



LUCILA DE BORTOLI DA SILVA

TETRAHIDROBIOPTERINA E 2-METIL-3-FENIL-6-AMINOQUINOXALINA: EFEITO NO METABOLISMO CEREBRAL E ENVOLVIMENTO EM PROCESSOS COGNITIVOS

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

Orientador: Prof^ª. Dra. Alexandra Susana Latini
Coorientador: Dra. Rita Raisman-Vozari

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 2015

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

De Bortoli Da Silva, Lucila
Tetrahydrobiopterina e 2-metil-3-fenil-6-
aminoquinoxalina: efeito no metabolismo cerebral e
envolvimento em processos cognitivos / Lucila De Bortoli
Da Silva ; orientadora, Alexandra Susana Latini ;
coorientadora, Rita Raisman-Vozari. - Florianópolis, SC,
2015.

153 p.

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

Inclui referências

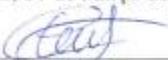
1. Neurociências. 2. Neurociências. 3. Memória. 4.
Doenças Neurodegenerativas. 5. Metabolismo Energético. I.
Latini, Alexandra Susana . II. Raisman-Vozari, Rita. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. IV. Título.

LUCILA DE BORTOLI DA SILVA

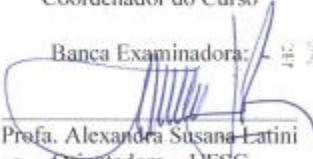
“TETRAHIDROBIOPTERINA E 2-METIL-3-FENIL-6-AMINOQUINOXALINA: EFEITO NO METABOLISMO CEREBRAL E ENVOLVIMENTO EM PROCESSOS COGNITIVOS”.

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 31 de março de 2015.

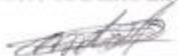

Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

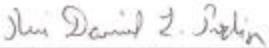

Prof. Alexandra Susana Latini
Orientadora – UFSC


Prof. Gustavo da C. Ferreira
Membro da Banca Externo


Prof. Nelson H. Gabilan
Membro - UFSC


Prof. Pablo Pandolfo
Membro da Banca Externo


Prof. Patricia F. Schuck
Membro da Banca Externo


Prof. Rui Daniel S. Prediger
Membro - UFSC

“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Algumas vezes, os agradecimentos se tornam mais difíceis de escrever do que o próprio trabalho. Isso porque não somos uma ilha, e no fim de uma caminhada sempre existiram muitas pessoas que nos ajudaram, não somente na elaboração do trabalho em si, mas fazendo com que não desanimássemos quando algo, aparentemente, não estava indo bem. De alguma forma, esquecer-me-ei de citar nomes nesta seção, e por isso tentarei evitá-los, mas quero que todos que estiveram comigo nesta caminhada acadêmica, nem que por poucos momentos, se sintam agradecidos, pois de alguma forma contribuíram para que neste momento eu esteja concluindo esta etapa.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família por todo sempre acreditarem na minha capacidade. Aos meus pais, Edson e Elenice, pela oportunidade que sempre me ofereceram de seguir com os meus objetivos, pelo apoio moral e financeiro, e por serem meu alicerce e meu porto seguro. E em especial ao meu marido, Fabiano Schefer, pelo apoio incondicional!

Da mesma forma em primeiro lugar, mas de “maneira acadêmica” quero agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Alexandra Susana Latini, por todo o conhecimento de vida e de profissão transmitido. Por todas as oportunidades únicas que me foram proporcionadas graças à seu esforço e dedicação. Com certeza, será sempre um dos meus exemplos nesta carreira e na área de pesquisa.

Agradeço também à minha coorientadora, Prof. Dra. Rita Raisman-Vozari, e a todos os outros professores que abriram as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar o meu trabalho. Isso inclui a Prof. Dra. Ana Lucia de Paul e a Prof. Dra. Mariela Pérez, que acompanharam meu trabalho durante o período de doutorado sanduíche em Córdoba, Argentina, assim como a Prof. Dra. Laurence Lanfumey e o Prof. Dr. Raymond Mongeau, que acompanharam meu trabalho durante o período de doutorado sanduíche em Paris, França.

Aos meus amigos de laboratório (e fora dele também): Aderbal, Aline, Ana Júlia, Anelise, Débora, Fritz, Karina, Paulo Silveira, Paulo Alexandre, Priscila, Roberta e Viviane. Em especial Aderbal e Renata, pelo auxílio metodológico.

Aos professores da pós-graduação em Neurociências, e ao secretário Nivaldo.

Aos técnicos do LAMEB da UFSC, pelo auxílio metodológico.

Aos meus amigos, que de perto ou de longe, antigos e novos, da pós-graduação UFSC e fora dela, acompanharam este trabalho.

À CAPES pela bolsa doutoral concedida.

RESUMO

O número de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas crônicas vem crescendo nas últimas décadas devido ao aumento da expectativa de vida mundial. A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes na população. Além das manifestações motoras clássicas, mais de 90% dos pacientes com DP também desenvolvem complicações não motoras, entre as quais se destacam prejuízos cognitivos e depressão. Embora muitas estratégias farmacológicas tenham sido aplicadas e/ou propostas para o tratamento da DP, assim como para doenças neurodegenerativas em geral, a necessidade de abordagens terapêuticas neuroprotetoras/restauradoras permanece não atendida. Derivados de quinoxalina representam uma família de compostos de interesse terapêutico por possuir um largo espectro de atividades biológicas. O composto sintético 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ) é um derivado quinoxalínico recentemente estudado, o qual parece exercer atividade neuroprotetora. Ainda, a tetrahydrobiopterina (BH4) é uma pterina que atua 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 limitantes da biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina. A BH4 também atua como cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas de óxido nítrico sintases (*NOS*), a qual sintetiza óxido nítrico (*NO*), uma molécula mensageira envolvida em inúmeros processos fisiológicos, além de ser um mensageiro retrógrado no sistema nervoso central (SNC). O objetivo deste trabalho foi caracterizar o possível efeito neuroprotetor do composto MPAQ, assim como melhor entender o papel da BH4 em processos cognitivos. Foram avaliados parâmetros do metabolismo mitocondrial, as concentrações de monoaminas e seus metabolitos principais, a atividade da monoamina oxidase (MAO), uma enzima importante para os processos catabólicos das principais monoaminas, bem como a ativação do sistema imune. Observou-se que MPAQ não apresentou efeito tóxico sobre o material biológico proveniente do cérebro de camundongos Swiss albino. O número de neurônios TH⁺ observados em culturas de células mesencefálicas tratadas *in vitro* com MPAQ aumentou significativamente após o tratamento com 100 µM de MPAQ. Da mesma forma, a captação de [H³]-dopamina por neurônios TH⁺ aumentou após o tratamento com 50 e 100 µM de MPAQ. O conteúdo de neopterina, um metabólito

secundário da via de síntese de BH4, aumentou significativamente no plasma e no estriado de camundongos C57bl/6 administrados com MPTP, demonstrando que no modelo animal agudo da DP a via de síntese de BH4 está aumentada provavelmente devido à ativação do processo inflamatório com consequente produção de *NO*. Considerando que na DP o processo inflamatório é crônico e não agudo, a biodisponibilidade de BH4 poderia ser deficiente e assim ser responsável pelas alterações cognitivas presentes nos indivíduos afetados pela doença. Para isso, foram investigadas medidas comportamentais que avaliam a formação da memória aversiva após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BH4 em modelos *in vivo* de neuroinflamação e depressão, assim como em diferentes linhagens de roedores de cepas selvagens. A BH4 favoreceu a formação da memória em todos os sistemas experimentais testados, o que correlacionou com um menor limiar para a geração do *LTP*. No entanto, este efeito foi suprimido pela administração de L-NAME (inibidor não seletivo de *NOS*) e MK-801 (antagonista não competitivo de receptores NMDA). A administração do análogo de GMPc, o 8-bromo-GMPc, não reverteu a inibição gerada por L-NAME ou MK-801, sugerindo que a BH4 participa da neuromodulação da memória através de vias clássicas dependentes da sinalização glutamatérgica e do *NO*. Concluindo, este trabalho sugere que o composto MPAQ possivelmente exerce atividade neuroprotetora *in vitro* e que BH4 modula a formação da memória através de vias de sinalização clássicas que envolvem *NO* e receptores NMDA.

Palavras-chave: Neurodegeneração, Doença de Parkinson, 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina, tetrahydrobiopterina, óxido nítrico, receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, neuroproteção e neuromodulação.

ABSTRACT

The number of patients affected by chronic neurodegenerative diseases has increased in recent decades due to increase in the life span worldwide. Parkinson's disease (PD) is one of the most prevalent neurodegenerative disease in the population. Besides the classic motor manifestations, more than 90% of patients with PD also develop non-motor complications, including cognitive losses and depression. Although many pharmacologic strategies have been applied and / or proposed for the treatment of PD, as well as neurodegenerative diseases in general, the need for neuroprotective / restorative therapeutic approaches remains unmet. Quinoxaline derivatives represent a family of compounds of therapeutic interest to possess a broad spectrum of biological activities. The synthetic compound 2-methyl-3-phenyl-6-aminoquinoxaline (MPAQ) is a quinoxaline derivative recently studied, which appears to exert neuroprotective activity. Still, tetrahydrobiopterin (BH4) is a pterin that acts as cofactor for phenylalanine hydroxylase,

which catalyze the initial steps of phenylalanine degradation in the liver, as well as the limiting steps of the biosynthesis of neurotransmitters dopamine and serotonin. BH4 also acts as cofactor for the activity of all nitric oxide synthase (NOS) isoforms, essential for nitric oxide (NO) synthesis, a messenger molecule involved in many physiological processes, besides being a retrograde messenger in the central nervous system (CNS). The objective of this study was to characterize the possible neuroprotective effect of MPAQ compound, as well as better understand the role of BH4 in cognitive processes. We evaluated parameters of mitochondrial metabolism, the concentrations of monoamines and their major metabolites, the monoamine oxidase (MAO) activity, an important enzyme for the monoamines catabolic processes, as well as activation of the immune system. It was observed that MPAQ showed no toxic effect on the biological material from Swiss Albino mice brain. The number of TH⁺ neurons observed in the mesencephalic cell cultures treated in vitro with MPAQ increased significantly after treatment with 100 μM of MPAQ. Likewise, the uptake of [H³]-dopamina by TH⁺ neurons increased after treatment with 50 and 100 μM of MPAQ. The contents of neopterin, a secondary metabolite of BH4 pathway increased significantly in plasma and striatal C57BL/6 mice administered MPTP, demonstrating that in acute animal model of PD the BH4 synthesis pathway is increased probably due to activation of the inflammatory process with consequent

production of NO. Whereas in PD the inflammation is chronic and not acute, the bioavailability of BH4 could be deficient and thus be responsible for the cognitive changes present in individuals affected by the disease. For this, behavioral measures were investigated to assess the aversive memory formation after intracerebroventricular (i.c.v.) administration of BH4 in *in vivo* models of neuroinflammation and depression, as well as in different strains of rodents from wild strains. It was observed that BH4 favored memory formation in all the experimental systems tested, which correlated with a lower threshold for the LTP generation. However, this effect was suppressed by L-NAME (non-selective NOS inhibitor) and MK-801 (non-competitive NMDA receptor antagonist) administration. The administration of the cGMP analogue, 8-bromo-cGMP, did not reverse the inhibition generated by L-NAME or MK-801, suggesting that BH4 participates in memory's neuromodulation through the glutamatergic and NO classical signaling. In conclusion, this study suggests that MPAQ compound possibly has neuroprotective activity *in vitro* and BH4 modulates memory formation through classic pathways involving NO and NMDA receptors.

Keywords: Neurodegeneration, Parkinson's disease, 2-methyl-3-phenyl-6-aminoquinoxaline, tetrahydrobiopterin, nitric oxide, NMDA glutamate receptor, neuromodulation and neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HQ: 4-hidroxiquinolina

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

8-bromo-cGMP: 8-bromo-monofosfato de guanosina cíclico

Ach: acetilcolina

aCSF: *artificial cerebrospinal fluid* (líquido cefalorraquidiano artificial)

AGMO: *alkylglycerol monooxygenase* (alquilglicerol monooxygenase)

AKR1B1: *aldo-keto-reductase family 1 member B1* (membro B1 da família aldo-ceto reductase 1)

AKR1C3: *aldo-keto-reductase family 1 member C3* (membro C3 da família aldo-ceto reductase 1)

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

AR: aldose redutase

ATP: adenosina trifosfato

BBB: *blood-brain barrier* (barreira hematoencefálica)

BH2: 7,8-diidrobiopterina

BH2q: diidrobiopterina quinoide

BH4: tetraidrobiopterina

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

BSA: *bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CNRS: Centre Nationale de la Recherche Scientifique

COMT: catecol-*O*-metil-transferase

COX-2: ciclooxygenase 2

CR: carbonil redutase

CREB: *cAMP response element-binding protein* (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico)

CS: *conditioned stimulus* (estímulo condicionado)

Cybrids: linhagens celular híbridas

DA: dopamina

dbcAMP: N(6),20-*O*-*dibutyryl*adenosine 3':50 *cyclic monophosphate*

DH: Doença de Huntington

DHFR: diidrofolato redutase

DHPR: diidropterina redutase

DIV: dias *in vitro*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP: Doença de Parkinson
DRD: *Dopa-Responsive Dystonia* (Distonia Dopa-Responsiva)
DTE: ditioeritritol
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica
EPM: erro padrão da média
ERK: *extracellular-signal-regulated kinases* (cinase regulada por sinal extracelular)
EROS: espécies reativas extra mitocondriais
FAD: *flavin adenine dinucleotide* (dinucleotídeo de flavina-adenina)
FCCP: Carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona
fEPSPs: *field excitatory postsynaptic potentials* (potenciais pós-sinápticos excitatórios)
FMN: *Flavin mononucleotide* (mononucleotídeo de flavina)
GDNF: *glial cell-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado de células gliais)
GFRP: *GTPCH feedback regulatory protein* (proteína reguladora da ativação da GTPCH)
Glu: glutamato
GMPc: *guanosine monophosphate cyclique* (monofosfato cíclico de guanosina)
GTP: Guanosina trifosfato
GTPCH: GTP ciclohidrolase
HFS: *high frequency stimulation* (estimulação de alta frequência)
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
i.c.v.: intracerebroventricular
IL6: interleucina-6
i.n.: intranasal
i.p.: Intraperitoneal
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
ITI: *inter trial interval* (intervalo inter-trial)
L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster
LPS: lipopolissacarídeo
LTM: *long term memory* (memória de longa duração)
LTP: *long term potential* (potencial de longa duração)
MAO-B: monoamino oxidase B
MAPK: *mitogen-activated protein kinases* (proteínas cinases ativadas por mitógenos)

MPAQ: 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina
MPTP: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina
mtDNA: *mitochondrial DNA* (DNA mitocondrial)
MTT: brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5 difeniltetrazólio
NA: noradrenalina
NADH: Nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH: Fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NINDS: *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*
NMDA: N-metil-D-Aspartato
NO: nitric oxide (óxido nítrico)
NOS: nitric oxide sintase (óxido nítrico sintase)
NOS II: nitric oxide sintase II (óxido nítrico sintase II)
NRF1: fator nuclear respiratório
PCD: pterina-4 α -carbinolamina desidratase
PNAD: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PKA: *protein kinase A* (proteína cinase dependentes de AMPc)
PP: *perforant pathway* (via perfurante)
PTPS: 6-piruvil-tetrahydropterina sintase
SN: *substantia nigra*
SNC: sistema nervoso central
SNCA: α -sinucleína
SNpc: *substantia nigra pars compacta*
SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences* (Pacote estatístico para ciências sociais)
SR: sepiaterina redutase
STM: *short term memory* (memória de curta duração)
TCA: ácido tricloroacético
Tfam: Fator A de transcrição mitocondrial
TNF- α : *tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral- α)
TH: tirosina hidroxilase
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
UMR: Unité Mixte de Recherche
UPDRS: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*
US: *unconditioned stimulus* (estímulo não-condicionado)
WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. História, quadro clínico e patológico da doença de Parkinson | 29 |
| Figura 2. Síntese de MPAQ e compostos derivados de quinoxalina | 39 |
| Figura 3. Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4) | 40 |
| Figura 4. Síntese <i>de novo</i> de BH4 e vias alternativas | 42 |
| Figura 5. Via de reciclagem de BH4..... | 44 |
| Figura 6. Síntese de BH4 pela via de salvação..... | 45 |
| Figura 7. Processo de formação da LTP..... | 49 |
| Figura 8. Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio em um experimento de respirometria clássica..... | 56 |
| Figura 9. Efeito <i>in vitro</i> de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 0,1-100µM) sobre parâmetros de respiração celular em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos..... | 61 |
| Figura 10. Efeito <i>in vitro</i> de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina) sobre a atividade dos complexos I (A) e IV (B) da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos..... | 62 |
| Figura 11. Efeito <i>in vitro</i> de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina) sobre a liberação de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após a exposição à MPAQ (0 – 100 µM) ou rotenona (10 e 25 µM) durante 1h..... | 63 |
| Figura 12. Efeito <i>in vitro</i> de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 0,1-100uM) sobre o perfil metabólico de monoaminas em homogenato do cérebro total de camundongos Swiss albino machos adultos..... | 64 |
| Figura 13. Efeito <i>in vitro</i> de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 0,1-100µM) sobre a atividade da enzima monoamina | |

oxidase (MAO) em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos..... 65

Figura 14. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 0,1 – 100µM) sobre a liberação de neopterina em fatias de estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após a exposição à MPAQ (0 – 100µM), rotenona (10 e 25µM) e azida sódica (1 e 10mM) durante 1h..... 66

Figura 15. Efeito neuroprotetor de concentrações crescentes de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 10 – 100µM) em neurônios dopaminérgicos de cultura de células mesencefálicas..... 67

Figura 16. Efeito neuroprotetor de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 50 – 100µM) em cultura de células mesencefálicas desprovidas de *GDNF*..... 68

Figura 17. Estratégia experimental para análise de *LTM* no teste da esquiwa inibitória..... 79

Figura 18. Estratégia experimental para análise da consolidação da memória no teste do medo condicionado..... 81

Figura 19. Estratégia experimental para análise da extinção da memória no teste do medo condicionado..... 81

Figura 20. Administração intranasal (i.n.) de MPTP..... 82

Figura 21. Estratégia experimental para análise da geração de LTP... 84

Figura 22. Efeito da administração de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) sobre a concentração de neopterina no plasma (A) e no estriado (B) de camundongos C57bl/6 machos adultos..... 87

Figura 23. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4, 400 e 4000pmol; 1uL) sobre a tarefa comportamental da esquiwa inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos..... 88

Figura 24. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1uL) sobre a tarefa comportamental da esquiwa inibitória em camundongos Swiss albino (A), C57bl/6 (B) e ratos Wistar (C) machos adultos..... 89

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 25. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre o teste do medo condicionado em camundongos C57bl6 machos adultos..... | 91 |
| Figura 26. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre o teste do medo condicionado em camundongos VGV machos adultos..... | 93 |
| Figura 27. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre a geração do potencial de longa duração (LTP) em ratos Wistar..... | 94 |
| Figura 28. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino adultos..... | 95 |
| Figura 29. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre o conteúdo de nitrito em camundongos Swiss albino machos adultos..... | 96 |
| Figura 30. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1µL) sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos..... | 97 |
| Figura 31. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 e 400pmol; 1µL) sobre a captação de glutamato e a viabilidade celular em camundongos Swiss albino machos adultos..... | 99 |
| Figura 32. Síntese de neopterin..... | 101 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. A história clínico-patológica da DP..... | 32 |
|-----------------------------------------------------------|----|

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I | 26 |
| 1. INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1. Aumento da expectativa de vida vs. doenças neurodegenerativas crônicas | 27 |
| 1.2. Doença de Parkinson | 28 |
| 1.2.1. Fisiopatologia da doença de Parkinson | 29 |
| 1.2.2. Aspectos Clínicos da doença de Parkinson | 31 |
| 1.2.3. Déficits cognitivos na doença de Parkinson | 33 |
| 1.2.4. Depressão na doença de Parkinson | 34 |
| 1.2.5. Modelos experimentais da doença de Parkinson | 35 |
| 1.3. Derivados de quinoxalina | 37 |
| 1.4. Tetrahydrobiopterina | 39 |
| 1.4.1. Biossíntese de tetrahydrobiopterina | 40 |
| 1.4.1.1. Síntese de novo | 40 |
| 1.4.1.2. Via de reciclagem da BH4 | 43 |
| 1.4.1.3. Via de salvação da BH4 | 44 |
| 1.4.2. Homeostase de BH4 | 46 |
| 1.5. Processos cognitivos | 46 |
| 1.6. Hipótese | 51 |
| CAPÍTULO II | 52 |
| 2. OBJETIVOS | 53 |
| 2.1 Objetivo Geral | 53 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 53 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 53 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Fármacos | 53 |
| 3.2. Preparação de frações enriquecidas de mitocôndrias..... | 53 |
| 3.3. Preparação de fatias de estriado..... | 54 |
| 3.4. Cultura primária de células mesencefálicas..... | 54 |
| 3.5. Respirometria de alta resolução..... | 54 |
| 3.6. Determinação da atividade das enzimas da cadeia respiratória..... | 56 |
| 3.7. Determinação da concentração de lactato..... | 57 |
| 3.8. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)..... | 57 |
| 3.8.1. Determinação do conteúdo de monoaminas e seus metabólitos por HPLC | 57 |
| 3.8.2. Determinação do conteúdo de neopterin por HPLC | 58 |
| 3.9. Determinação da atividade de monoamina oxidase (MAO)..... | 58 |
| 3.10. Imunofluorescência de tirosina hidroxilase (TH)..... | 58 |
| 3.11. Captação de [2,5,6-3h]-Dopamina..... | 59 |
| 3.12. Determinação de proteínas..... | 60 |
| 3.13. Análise estatística..... | 60 |
| 4. RESULTADOS | 61 |
| 4.1. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre o consumo de oxigênio mitocondrial em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino..... | 61 |
| 4.2. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino..... | 62 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a liberação de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino..... | 63 |
| 4.4. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre o perfil metabólico de monoaminas em homogenato do cérebro total de camundongos Swiss albino..... | 63 |
| 4.5. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a atividade de MAO em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino..... | 64 |
| 4.6. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a liberação de neopterinina em fatias de estriado de camundongos Swiss albino..... | 65 |
| 4.7. Efeito de MPAQ em cultura de células mesencefálicas..... | 66 |
| 4.8. Efeito de MPAQ em cultura de células mesencefálicas desprovidas da atividade de GDNF..... | 67 |
| 5. DISCUSSÃO | 69 |
| CAPÍTULO III | 75 |
| 6. OBJETIVOS | 76 |
| 6.1 Objetivo Geral..... | 76 |
| 6.2 Objetivos Específicos..... | 76 |
| 7. MATERIAL E MÉTODOS..... | 77 |
| 7.1. Experimentos <i>in vivo</i> com Tetrahydrobiopterina..... | 77 |
| 7.1.1. Animais | 77 |
| 7.1.2. Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no ventrículo lateral direito | 77 |
| 7.1.3. Fármacos..... | 78 |
| 7.1.4. Parâmetros comportamentais..... | 78 |
| 7.1.4.1. Teste da esQUIVA inibitória..... | 79 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.1.4.2. Teste do medo condicionado | 80 |
| 7.2. Experimentos <i>ex vivo</i> com tetrahydrobiopterina | 82 |
| 7.2.1. Administração de MPTP e indução de parkinsonismo experimental | 82 |
| 7.2.1.1. Administração intranasal de MPTP | 82 |
| 7.2.1.2. Administração intraperitoneal de MPTP ... | 83 |
| 7.2.2. Eletrofisiologia | 83 |
| 7.2.3. Determinação do conteúdo de nitrito | 84 |
| 7.2.4. Captação de glutamato | 85 |
| 7.2.5. Ensaio de viabilidade celular | 85 |
| 7.2.6. Determinação do conteúdo de neopterin por HPLC | 86 |
| 7.3. Determinação de proteínas..... | 86 |
| 7.4. Análise estatística | 86 |
| 8. RESULTADOS | 87 |
| 8.1. Efeito da administração de MPTP sobre a concentração de neopterin no plasma e estriado de camundongos C57bl/6..... | 87 |
| 8.2. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino..... | 88 |
| 8.3. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em diferentes linhagens de roedores..... | 88 |
| 8.4. Efeito da administração de BH4 sobre o teste do medo condicionado durante o estado de neuroinflamação aguda induzida por LPS em camundongos C57bl/6 | 90 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.5. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre o teste do medo condicionado em camundongos VGV (receptor 2C da serotonina completamente editado) | 92 |
| 8.6. Efeito da administração de BH4 sobre a geração de LTP hipocampal em ratos Wistar | 94 |
| 8.7. Efeito da administração i.c.v. BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino tratados com L-NAME (inibidor da NOS) 95 | 95 |
| 8.8. Efeito da administração i.c.v. BH4 sobre o conteúdo de nitrito em camundongos Swiss albino tratados com L-NAME (inibidor da NOS) | 96 |
| 8.9. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino tratados com MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e 8-bromo-cGMP (análogo cGMP) | 97 |
| 8.10. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a captação de glutamato e a viabilidade celular em camundongos Swiss albino..... | 98 |
| 9. DISCUSSÃO | 100 |
| CAPÍTULO IV | 105 |
| CAPÍTULO V | 107 |
| 11. PERSPECTIVAS | 108 |
| CAPÍTULO VI | 109 |
| 12. REFERÊNCIAS | 110 |
| ANEXO I..... | 143 |
| Artigo científico publicado na revista <i>European Journal of Medicinal Chemistry</i> em janeiro de 2015. | 143 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aumento da expectativa de vida vs. doenças neurodegenerativas crônicas

O número de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas vem crescendo nas últimas décadas devido ao aumento da expectativa de vida mundial. O envelhecimento populacional, proeminente fenômeno mundial que nas últimas décadas está modificando as sociedades, tem como principal consequência o aumento na frequência das enfermidades neurodegenerativas no adulto. De acordo como a Organização Mundial da Saúde (*WHO* - do inglês, *World Health Organization*), a partir da metade deste século as doenças neurodegenerativas representarão a segunda maior causa de óbito, principalmente pela falta de tratamentos eficazes que permitam prevenir, atenuar ou reverter estes processos (Lipton et al., 2007, Imtiaz et al., 2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1950 existiam cerca de 204 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade no mundo, sendo que em 1998 este contingente alcançava 579 milhões, um crescimento de quase oito milhões de idosos por ano. Dados recentes do IBGE, estimam que em 2060 o Brasil terá 5 milhões de idosos com 90 anos, o que corresponde a uma população dez vezes maior que a atual. Em 2060, a expectativa de vida média chegará a 81,2 anos, sendo em média de 78 anos para homens e 84,5 anos para mulheres (IBGE, 2013). Embora estes dados reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, também alertam para a possibilidade de que em um futuro próximo haja um crescimento significativo do número de pessoas idosas acometidas por doenças neurodegenerativas crônicas.

As enfermidades neurodegenerativas crônicas podem ser definidas como um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por um início insidioso, de progressão lenta e com características neuropatológicas fortemente associadas à degeneração em áreas específicas do cérebro. Como exemplos, podem ser citadas a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (*SNpc*), na doença de Parkinson (DP) (Jellinger, 1988, Blandini et al., 2000), dos neurônios corticais na doença de Alzheimer, dos neurônios pequenos do estriado na doença de Huntington, ou dos neurônios motores na Esclerose Lateral Amiotrófica (Ross e Poirier, 2004). No entanto, apesar das diferenças clínicas apresentadas em cada patologia neurodegenerativa crônica (como vulnerabilidade seletiva dos neurônios, envolvimento de distintos genes, fatores ou eventos

desencadeantes, etc.), uma grande similaridade nos mecanismos moleculares de degeneração tem sido demonstrada (para revisão ver Everse e Coates, 2009).

1.2. Doença de Parkinson

A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa crônica relacionada à idade com maior incidência mundial, ficando atrás somente da Doença de Alzheimer (Vila e Przedborski, 2004). Segundo a *WHO* a DP é um distúrbio universal, com uma taxa de incidência de 4,5-19 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano. No Brasil, não existem estimativas oficiais, mas segundo o IBGE a média de população acima de 65 anos aumentou 21%, e estima-se uma população de cerca de 200 mil indivíduos com DP. A prevalência em pessoas com idade entre 60 e 69 anos é de 700/100.000, e entre 70 e 79 anos é de 1500/100.000. No entanto, 10% dos doentes têm menos de 50 anos e 5% têm menos de 40 anos (IBGE, 2013).

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva crônica descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817 no livro “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Parkinson, 2002). Histopatologicamente a DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da *SNpc* do mesencéfalo, e por inclusões intracitoplasmáticas conhecidas como corpúsculos de Lewy, os quais são constituídos principalmente pelas proteínas α -sinucleína e ubiquitina (Figura 1) (Bernheimer et al., 1973; Spillantini et al., 1997). As manifestações clínicas da DP incluem tremor, rigidez de repouso, bradicinesia (lentidão de movimentos) e também instabilidade postural. Porém, além destas manifestações motoras clássicas, mais de 90% dos pacientes também desenvolvem complicações não motoras, incluindo perda cognitiva, distúrbios do sono, disfunção olfativa, fadiga e depressão (Ziemssen e Reichmann, 2007; Drechsel e Patel, 2008; Chaudhuri et al., 2011), os quais estão ganhando maior consciência nos últimos anos devido à grande importância dos mesmos sobre a qualidade de vida das pessoas afetadas pela doença (Lyon e Pahwa, 2011; Breen e Drutyte, 2012; Hinnell et al., 2012). Deficits cognitivos, tais como deficiências de aprendizagem e memória, tem sido observado com frequência nestes pacientes e gerado uma preocupação clínica relevante (Rana et al., 2013). Da mesma forma que a depressão tem apresentado uma grande comorbidade com a DP (Menza et al., 2009).

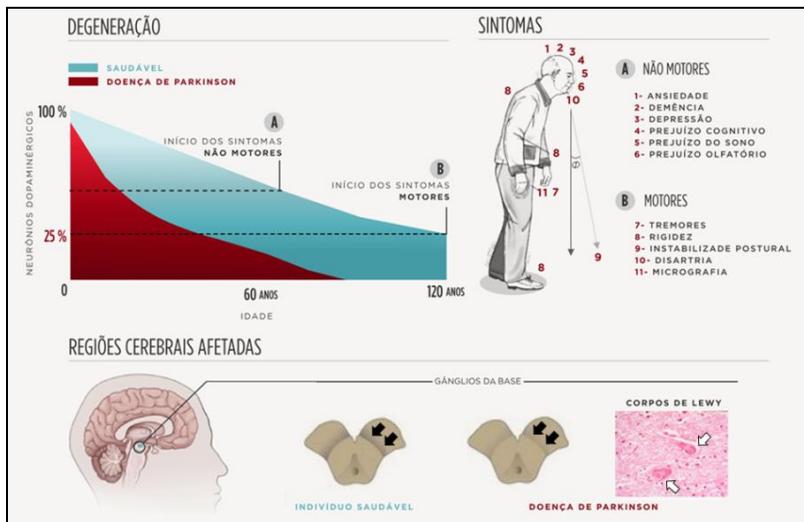


Figura 1. História, quadro clínico e patológico da doença de Parkinson. Esquerda (acima): ilustração da neurodegeneração dopaminérgica verificada na DP e o aparecimento dos sintomas motores e não motores. Direita (acima): ilustração clássica da DP realizada pelo neurologista William Gowers em 1886, baseada no *Essay* de Parkinson. Alguns sintomas motores e não motores ilustram a complexidade da DP. Abaixo: ilustração das evidências *post-mortem* da diminuição de neuromelanina na *substantia nigra pars compacta* (*SNpc*) (setas pretas) e da presença de corpos de Lewy (direita, setas brancas).

1.2.1. Fisiopatologia da doença de Parkinson

Conforme já mencionado, a fisiopatologia da DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da *SNpc* e pela presença de inclusões intracitoplasmáticas (corpos de Lewy). A morte de neurônios dopaminérgicos provoca redução nos níveis de dopamina (DA) no estriado e prejuízos funcionais dos núcleos da base presentes nesta estrutura (putâmen e caudado) (Burch e Sheerin, 2005), os quais fazem parte do sistema extrapiramidal envolvido em processos motores, cognitivos e sensoriais (Packard e Knowlton, 2002). Tradicionalmente, a presença de corpos de Lewy foi necessária para a confirmação diagnóstica da DP. No entanto, com a descoberta de outros fatores etiológicos, como por exemplo, mutações no gene da proteína PARK2, tem sido reconhecido que a patologia pode ocorrer ainda com a ausência de corpos de Lewy (Kitada et al., 1998). A maioria dos casos de DP

causada por mutações genéticas são esporádicos na natureza, porém, mutações em vários genes foram identificadas como causadoras de DP de herança autossômica dominante ou recessiva (Abeliovich e Flint Beal, 2006).

Vários mecanismos patogênicos já foram propostos para a DP, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e nitrosativo, agregação e falhas no dobramento proteico, apoptose, respostas inflamatórias e excitotoxicidade glutamatérgica exacerbadas (Tansey et al., 2007, Tsang e Chung, 2009). No entanto, nenhuma destas vias tem demonstrado ser de forma independente o mecanismo citotóxico que conduz à perda de neurônios dopaminérgicos (Ross e Poirier, 2004, Abeliovich e Flint Beal, 2006). Com a descoberta de que a inibição seletiva do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) leva ao desenvolvimento de parkinsonismo, surgiu uma forte evidência de que a disfunção mitocondrial estaria diretamente envolvida na patogênese da DP (Langston e Ballard, 1983). A deficiência do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na DP pode também ser considerada uma alteração sistêmica da fosforilação oxidativa, uma vez que a deficiência também foi constantemente observada em plaquetas de pacientes afetados pela doença (Parker et al., 1989, Krige et al., 1992, Haas et al., 1995). Além disso, resultados obtidos a partir da fusão de linhagens celular híbridas (*cybrids*), obtidas a partir da fusão de células que não possuem DNA mitocondrial (*mtDNA* - do inglês, *mitochondrial DNA*) com plaquetas de pacientes com DP, apresentaram inibição do complexo I com a linhagem celular Rho0, sugerindo que a diminuição da atividade do complexo I seja devido a alterações no genoma mitocondrial (Swerdlow et al., 1996, Gu et al., 1998). Ainda, células *cybrid* estão associadas com o estresse oxidativo e a formação de agregações citosólicas, ligando a disfunção mitocondrial do complexo I com a formação dos corpos de Lewy. O comprometimento da atividade do complexo I leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio que contribuem para o acúmulo de mutações e dano oxidativo ao *mtDNA*, devido ao fato de ser uma molécula circular e não empacotada como o DNA nuclear (Suen et al., 2010, Arduino et al., 2015).

A ativação do sistema imune também tem sido envolvida na fisiopatologia da DP (Dzamko et al., 2014). A estimulação deste sistema ativa o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), um fator de transcrição que promove processos inflamatórios e de estresse oxidativo. Dessa maneira, há uma estimulação para a produção de interferon- γ (IFN- γ), o qual será

responsável pela ativação e recrutamento de macrófagos. Essa ativação do sistema imune pode ser monitorada através da formação da neopterina, um metabólito secundário da via de síntese da pterina denominada tetrahidrobiopterina (BH4), amplamente conhecida como marcador sensível da ativação do sistema imune (Fuchs et al., 1989). Pacientes afetados pela DP apresentam altas concentrações de neopterina nos fluídos corporais (Freitas et al., 2012; Dissertação de Mestrado). Além disso, vários estudos já demonstraram que agonistas inflamatórios tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou agentes patogênicos virais induzem a perda de neurônios dopaminérgicos em roedores (Qin et al., 2007). Portanto, podemos sugerir que o metabolismo da BH4 possa estar envolvido na fisiopatologia da DP.

1.2.2. Aspectos Clínicos da doença de Parkinson

Ainda não existem exames laboratoriais ou de neuroimagem para o diagnóstico clínico definitivo da DP, sendo o seu uso limitado para o diagnóstico diferencial (Jankovic, 2008). Os critérios de diagnóstico atualmente utilizados são: (i) a tríade parkinsoniana, tremor de repouso (4-7 Hz, principalmente nas mãos), rigidez muscular (fenótipo plástico), e bradicinesia (Figura 1); (ii) a instabilidade postural (Figura 1); e, (iii) a boa resposta clínica à L-DOPA, a qual é o tratamento de primeira escolha para a DP. Os sintomas motores da DP são utilizados em seu diagnóstico clínico. Entretanto, estes são verificados somente em estágios mais avançados da doença, quando aproximadamente 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da *SNpc* encontram-se degenerados e os níveis de DA no estriado já foram depletados em 70-80% (Figura 1; Tabela 1) (Riederer e Wuketich, 1976).

Além do comprometimento da via nigroestriatal, também deve ser ressaltado o comprometimento de outras vias dopaminérgicas, como as vias mesolímbicas e mesocorticais, envolvidas no controle de processos sensoriais (como o bulbo olfatório) e cognitivos (como o córtex pré-frontal) (Spanagel e Weiss, 1999; Horvitz, 2000). O processo neurodegenerativo também afeta outros neurotransmissores como os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico, todos estes contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas não motores da DP (Tabela 1).

Tabela 1. A história clínico-patológica da doença de Parkinson.

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

Hoehn e Yahr (1967)

Os recursos farmacológicos para o tratamento da DP são normalmente focados no restabelecimento da neurotransmissão dopaminérgica, incluindo drogas como: precursores da DA (L-DOPA) e inibidor da DOPA-descarboxilase periférica (Carbidopa e Benserazida); anticolinérgicos (Biperideno, Triexifenidil, Bentropina), para diminuir o desequilíbrio da neurotransmissão de Ach/DA; inibidor das enzimas monoamino oxidase B (MAO-B) (Selegilina, Rasagilina) e catecol-*O*-metil-transferase (COMT) (Tolcapone e Entacapone), com o objetivo de diminuir o catabolismo da DA por estas duas enzimas; agonistas dopaminérgicos, ergolínicos (Bromocriptina, Pergolida, Lisurida, e Cabergolina) e não-ergolínicos (Pramipexole), com alvo nos receptores dopaminérgicos, principalmente do tipo D₂; e Amantadina, um antagonista glutamatérgico para diminuir a excitabilidade córtico-

estriatal e o desequilíbrio da neurotransmissão de Glu/DA. Embora muitas estratégias terapêuticas tenham sido aplicadas e/ou propostas para o tratamento da DP, drogas que promovem a repleção de DA ou ativam seus receptores podem aliviar os sintomas motores com eficácia, mas são incapazes de parar ou mesmo retardar a progressão da doença, além de induzirem efeitos colaterais severos (Quinn, 1998). Por esta razão, abordagens terapêuticas neuroprotetoras e/ou neurorestauradoras permanecem como uma necessidade não atendida.

1.2.3. Déficits cognitivos na doença de Parkinson

A presença de alterações cognitivas na DP foi ignorada por muito tempo. Isso ocorreu possivelmente por causa da descrição original da doença feita por Parkinson (1817), na qual havia a afirmação de que o intelecto persistia inalterado e também pela menor sobrevivência dos doentes, antes da introdução da levodopa (precursora da dopamina) no tratamento da doença (Emre e Aarsland, 2004). Entretanto, a DP não compromete apenas o sistema motor do paciente, mas, entre outras manifestações não motoras, provoca alterações cognitivas que podem estar presentes logo no início da doença (Foltynie et al., 2004), ou progredir com o avançar do tempo para um quadro de demência (McKeith et al., 2005). Como mencionado, déficits cognitivos podem ocorrer já nas fases iniciais da DP, e nessas circunstâncias podem não ser clinicamente aparentes, mas detectáveis apenas por testes específicos. Déficits cognitivos proeminentes nos domínios da memória e das funções executivas são encontrados em pessoas com DP sem demência e em fases iniciais da enfermidade (Muslimovic et al., 2005). Mais de 50% dos pacientes com DP sem demência têm alguma forma de alteração cognitiva e 20% exibem predominantemente déficits de memória, 30% sofrem de disfunções executivas e 50% têm desempenho cognitivo globalmente prejudicado (Janvin et al., 2003).

Entre as alterações cognitivas, a demência associada à DP é a manifestação mais grave aumentando o risco de morte (De Lau et al., 2005). Esta é altamente prevalente e causa significativa redução da qualidade de vida do indivíduo (Schrag et al., 2000; Aarsland et al., 1999). O quadro demencial na DP instala-se em fases mais tardias da doença e tem como principais características a lentificação do processo cognitivo, a apatia, o comprometimento da memória e das funções executivas frontais (Bayles et al., 1996). Dessa forma, as alterações cognitivas da demência associada à DP são déficits visuoespaciais, alterações de memória e disfunção cognitiva associadas ao mau

funcionamento do lobo frontal, traduzido como comprometimento da memória operacional e das funções executivas (Emre, 2003a e b).

Estudos de seguimento clínico de longo prazo mostram que o declínio cognitivo está apenas parcialmente relacionado ao comprometimento motor, indicando que outros mecanismos estão envolvidos (Marder et al., 1995; Portin e Rinne, 1986). Os mecanismos neurobiológicos implicados nos déficits cognitivos da DP ainda não foram elucidados. Por isso, o melhor conhecimento sobre fatores de risco e maior compreensão sobre os mecanismos biológicos envolvidos com o prejuízo cognitivo associado à DP constituem áreas de grande interesse atual, uma vez que poderão ser úteis para a introdução de novas estratégias terapêuticas, inclusive de prevenção do declínio cognitivo.

1.2.4. Depressão na doença de Parkinson

Assim como os déficits cognitivos, a depressão é um distúrbio neuropsiquiátrico muito comum na DP (Rojo et al, 2003). A prevalência de depressão em pacientes com DP ocorre entre 25% a 40%, (Poewe et al, 2007; Tandberg et al, 1997), podendo ocorrer tanto em estágios iniciais quanto finais da doença (Silberman et al, 2004). De acordo com Silberman (2004) e Althaus et al (2008) em cerca de 25% dos pacientes com DP a depressão antecede os sintomas motores (Braak et al 2003). Em estudo realizado por Behari et al (2005) demonstrou-se que a presença de depressão em pacientes com DP, reduz o grau de independência refletindo na qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, Camargo et al (2004) e Silberman et al, (2004) descreveram que pacientes portadores da DP com diagnóstico de depressão apresentam declínio cognitivo e diminuição das atividades de vida diária significativamente maior em relação aos pacientes com DP sem depressão. Resultados similares foram observados em outras partes do mundo, confirmando que esse distúrbio não motor está diretamente relacionado com a redução na qualidade de vida (Corod-Artal et al, 2008). A causa da depressão em pacientes com DP ainda não está elucidada. A hipótese psicogênica como consequência das limitações motoras (Silberman et al, 2004; Kanda et al, 2008, Frisina et al, 2009) e a hipótese da neurodegeneração crônica da DP, são cogitadas como responsáveis pelo desenvolvimento da depressão nesses pacientes (Camargo et al 2004; Norman, 2002; Okun, 2002; Wollers et al, 2008, Frisina et al, 2009). A hipótese da neurodegeneração crônica da DP é referente à deficiência de neurotransmissores como DA, serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) (Camargo et al 2004; Norman, 2002; Okun,

2002; Wollers et al, 2008, Frisina et al, 2009). A 5-HT tem função inibitória na liberação de DA no estriado, assim, a redução da neurotransmissão serotoninérgica pode ser um mecanismo compensatório relacionado à redução da neurotransmissão dopaminérgica na DP (Silberman et al, 2004; Kanda et al, 2008). De acordo com Schrag (2004) existem evidências de disfunção dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica em pacientes com DP e depressão. Mais ainda, pacientes com DP e depressão apresentaram uma redução no número do receptor 5-HT_{1A} cortical em comparação com pacientes não deprimidos com DP, indicando uma disfunção pós-sináptica do receptor 5HT_{1A}, sugerindo que a depressão possa ser parte integrante da disfunção cerebral na DP. Porém, até o momento pode-se afirmar apenas que a interação entre depressão e DP é complexa e bidirecional, ou seja: depressão pode ser um fator de risco para DP, assim como a DP pode ser um fator de risco para depressão (Silberman et al, 2004).

Animais geneticamente modificados vem sendo frequentemente usados na investigação da fisiopatologia da depressão. Um exemplo recente está representado por camundongos VGV (Valina – Glicina - Valina), animais geneticamente modificados que expressam a isoforma totalmente editada do receptor 2C de serotonina (5-HT_{2c}R). O 5-HT_{2c}R é encontrado apenas no sistema nervoso central e atua sobre vários processos fisiológicos e comportamentais. Dessa forma, o aumento da ansiedade (Heisler et al., 2002), hiperlocomoção (Nonogaki et al., 2003), hiperfagia e obesidade (Tecott et al., 1995) são demonstrados em camundongos que possuem o 5-HT_{2c}R editado, confirmando a importância deste tipo de receptor serotoninérgico na regulação da emoção, locomoção, apetite e controle da taxa metabólica (Kawahara et al., 2008). Sendo assim, alterações em comportamentos relacionados à ansiedade e depressão são característicos nesses animais (Mombereau et al., 2010; Olaghere et al., 2010). Fenótipo comportamental que ocorre em conjunção com a redução do conteúdo de serotonina no cérebro de camundongos VGV durante o stress (Martin et al., 2008).

1.2.5. Modelos experimentais da doença de Parkinson

Modelos animais refletem as características da doença no homem, simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas e seus distúrbios funcionais. A DP é uma doença humana, e não se manifesta espontaneamente em animais. Dessa forma, a indução da DP em modelos experimentais através da administração de agentes neurotóxicos se faz necessária para a investigação dos mecanismos

patológicos envolvidos. A Reserpina, o haloperidol, a rotenona e o LPS são utilizados para produzir modelos experimentais da DP, no entanto, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e MPTP representam os modelos da DP mais utilizados.

O modelo induzido pela toxina 6-OHDA foi o primeiro modelo animal associado com a morte de neurônios dopaminérgicos na DP (Luthman et al., 1989, Dauer et al., 2003). A perda maior de neurônios dopaminérgicos é observada na região ventral do encéfalo na *SNpc*, enquanto os neurônios da região mesocortical são os mais resistentes (Jonsson, 1980; Dauer et al., 2003). A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (*BBB* – do inglês, *blood-brain barrier*), portanto deve ser administrada diretamente no encéfalo. Uma vez dentro dos neurônios, 6-OHDA é facilmente oxidada e induz a produção de radicais livres como peroxinitrito (ONOO^-) e radical hidroxila (OH^-) (Ungerstedt, 1968; Glinka et al., 1997; Blum et al., 2001; Betarbet et al., 2002). No entanto, esta toxina não leva à formação de corpúsculos de Lewy (Dauer et al., 2003, Meredith et al, 2008).

O MPTP é uma neurotoxina capaz de produzir mudanças bioquímicas e neuropatológicas semelhantes a que ocorre na DP idiopática (Schulz, 2004), embora raramente ocasione a formação de corpúsculos de Lewy (Newhouse et al., 2004). Devido a estas similaridades bioquímicas e histológicas, o modelo do MPTP tem sido muito importante para a compreensão da fisiopatologia da DP (Meredith et al, 2008). O MPTP produz, a morte dos neurônios dopaminérgicos da *SNpc*, com conseqüente redução dos níveis de DA no estriado e perda dos neurotransmissores NA e 5-HT no locus coeruleus e no núcleo da Rafe, respectivamente (Watanabe et al., 2005; Meredith et al, 2008; Marien, et al., 2004). Uma vez administrado no animal, o MPTP atravessa facilmente a *BBB*, sendo convertido rapidamente nas células gliais à 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+), um radical livre altamente neurotóxico responsável pelo efeito lesivo do MPTP (Mattson et al, 2008; Kumar et al, 2009). De acordo com Przedborski (2005), a morte neuronal dopaminérgica pela administração de MPTP esta relacionada com o estresse oxidativo e déficit de energia, porém estes processos não são os principais responsáveis pela morte neuronal. Na verdade, esses processos atuam provocando a lesão inicial e ativando vias moleculares que levam à morte da célula, como por exemplo, a ativação das quinases e vários componentes apoptóticos. Desta forma, embora esses fatores não se encontrem capazes de iniciar a lesão, atuariam amplificando a neurodegeneração.

A rotenona é uma substância tóxica altamente lipofílica que se liga ao mesmo local que o MPP⁺ e inibe o complexo mitocondrial (Cicchetti et al, 2009). Uma vez dentro da célula, a rotenona acumula-se no complexo mitocondrial (Cannon et al, 2009) onde inibe a transferência de elétrons de ferro-enxofre (Fe-S). O consequente aumento na produção de espécies reativas de oxigênio leva à formação de ONOO⁻, resultando em danos aos neurônios dopaminérgicos (Dauer et.al, 2003).

Infelizmente ainda não existe um modelo que pode, por si só, representar fidedignamente todos os sinais da DP (Dauer et al.; 2003; Przedborski, 2005; Da Cunha et al, 2008).

1.3. Derivados de quinoxalina

Derivados de quinoxalina (benzopirazina) representam uma família de compostos de interesse terapêutico por possuir um largo espectro de atividades biológicas (Tanimori et al., 2009; Cushing et al., 2012). Vários estudos tem demonstrado que derivados de quinoxalinas que preservam seus anéis aromáticos exibem atividades farmacológicas com ação antifúngica (Ishikawa et al., 2013), antibacteriana (Ishikawa et al., 2013; Vieira et al., 2014), anti-malárico (Gil et al., 2014), anticancerígeno (Loch-Neckel et al., 2015), antiparasitária (Cogo et al., 2015), anti-tuberculose (Vicente et al., 2011), hipoglicêmico (Pawar e Bhise, 2006), antiviral (Shibinskaya et al., 2011), atividade anti-helmíntica (Cogo et al., 2015), analgésica e anti-inflamatória (Ismail et al., 2005), neuroprotetora (Lo et al., 1997), antidepressiva e antagonismo de receptores NMDA (Deshmukh et al., 2007; Cuenca et al., 2012). Por exemplo, a quinoxalina-2,3-diona oferece neuroproteção por reverter os efeitos deletérios do brometo de etídio sobre a fraqueza muscular, descoordenação muscular ou redução da atividade locomotora induzidas em ratos (Jubie et al., 2012); a 2,3-di-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoylbenzo-[f]-quinoxalina (NBQX), um derivado de quinoxalina com ação antagonista do receptor de glutamato, que exerce efeitos diferenciais sobre a sobrevivência celular e o conteúdo de dopamina em um modelo *in vivo* de DP induzido pela inibição do gene DJ-1A em *Drosophila*, o qual é caracterizado por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, e perda de neurônios dopaminérgicos (Faust et al., 2009); e ainda novos derivados de quinoxalina denominados pirido [2', 3':3,4] pirrolo [1,2-a] quinoxalinas e pirido [3', 2':3,4] pirrolo [1,2-a] quinoxalinas que demonstram efeito anti-proliferativo associado a apoptose e à intervenção no ciclo celular durante a fase mitótica G2 (Parrino et al., 2015). Muitas são as propriedades farmacológicas dos

derivados de quinoxalina, mas mesmo que alguns destes compostos sejam conhecidos por proporcionar proteção contra lesões neuronais excitotóxicas agudas (Long et al., 1990; Kong e Yu, 2006), o conhecimento das propriedades terapêuticas das quinoxalinas ainda não foram completamente avaliados num contexto crônico degenerativo.

O composto sintético 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ) é um derivado quinoxalínico sintetizado a partir do produto natural híbrido 6-aminoquinoxalina (Schmidt et al., 2009; Schmidt et al., 2010). A síntese de MPAQ é realizada através de um método original e altamente seletivo desenvolvido por Hui et al. (2007) e executado no *Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 8076 BioCIS, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, França*.

Recentemente, Le Douaron et al (2015) propôs a possível atividade neuroprotetora do composto MPAQ. O estudo demonstra que MPAQ atinge o parênquima cerebral com suficiente eficácia. Além disso, análises de quantificação do MPAQ através de cromatografia líquida/espectrometria de massa (HPLC-MS) em homogenatos cerebrais de camundongos ou bem de espectrometria de massa por imagem (MALDI-TOF) em secções de tecido do cérebro de camundongos tratados com MPAQ demonstram que MPAQ colocaliza com áreas do cérebro que contêm neurônios dopaminérgicos vulneráveis. Esses resultados são comparáveis com resultados apresentados por uma única injeção de nicotina (Ghosheh et al., 1999), um composto de referência por demonstrar neuroproteção em modelos de DP em roedores e macacos (Quik et al., 2012). No entanto, a administração de MPAQ por via oral demonstra que a meia vida desse composto no cérebro de ratos é relativamente curta (Le Douaron et al., 2015), o que poderia constituir um fator limitante. Dessa forma, novos avanços no conhecimento do possível mecanismo neuroprotetor de MPAQ se fazem necessários.

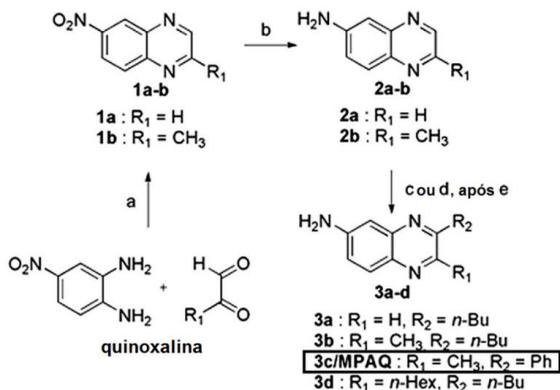


Figura 2. Síntese de MPAQ e compostos derivados de quinoxalina. Reagentes e condições foram: (a) H₂O, refluxo; (b) H₂, Pd/C, 60°C; (c) R₁Li, THF, -78°C; (d) R₂Li, THF, -78°C e após R₁Li, THF, -78°C e 0°C; (e) MnO₂, CHCl₃, refluxo.

1.4. Tetrahydrobiopterina

A BH₄ é a forma totalmente reduzida (6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina) e funcional da pterina denominada biopterina (6-(L-eritro-1',2'-diidroxipropil)-2-amino-4-hidroxipteridina). BH₄ atua 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 limitantes da biossíntese dos neurotransmissores DA e 5-HT (Kaufman, 1963). Além disso, BH₄ também atua como cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas de óxido nítrico sintase (*NOS* - do inglês, *nitric oxide sintase*) (Mayer et al., 1990; Werner et al., 1998), sendo essencial para a síntese de óxido nítrico (*NO* - do inglês, *nitric oxide*), molécula mensageira envolvida em inúmeros processos fisiológicos além de ser um mensageiro retrógrado no sistema nervoso central (SNC) (Tayeh e Marletta, 1989; Schuman e Madison, 1991; Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1996; Son et al., 1996; Kleppisch et al., 1999). Estudos demonstram ainda que BH₄ está envolvida na clivagem de éteres lipídicos pela enzima alquilglicerol monooxigenase (Thony et al., 2000). Consequentemente, BH₄ está presente em provavelmente todas as células e tecidos dos organismos superiores e inicia ações fundamentais em uma grande quantidade de processos biológicos e estados patológicos associados

com os neurotransmissores monoaminérgicos, disfunções cardiovasculares e endoteliais, resposta imune e sensibilidade à dor (Kaufman, 1992).

1.4.1. Biossíntese de tetrahydrobiopterina

A síntese de BH4 é realizada através de três vias biossintéticas denominadas (i) síntese *de novo*, (ii) via de reciclagem e (iii) via de salvação (Figura 3).

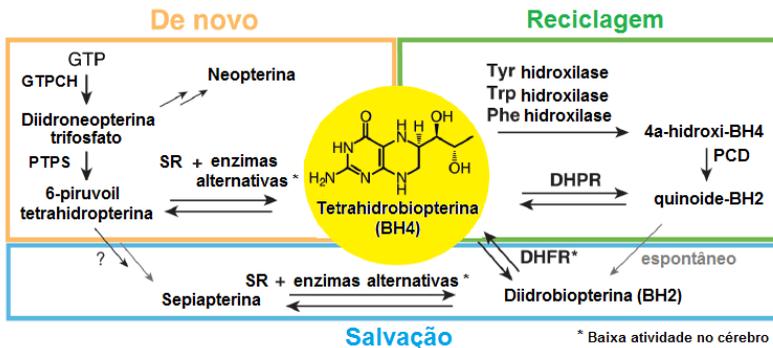


Figura 3. Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4). A BH4 pode ser sintetizada por três vias metabólicas distintas: a via de síntese *de novo*, a via de salvação e a via de reciclagem. GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, GTP ciclodrolase; PTPS, 6-piruvil tetrahydropterina sintase; SR, sepiapterina redutase; DHFR, diidrofolato redutase; PCD, pterina-4 α -carbinolamina desidratase; DHPR, diidropterina redutase; Tyr, tirosina; Trp, triptofano; Phe, fenilalanina. Adaptado de Haruki et al. (2013).

1.4.1.1. Síntese de novo

Normalmente, BH4 é sintetizada pela síntese *de novo* a partir da guanosina trifosfato (GTP) através de reações dependentes de Mg²⁺, Zn²⁺ e NADPH catalisadas pelas enzimas GTP ciclodrolase (GTPCH), 6-piruvil-tetrahydropterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase (SR). Inicialmente, GTP é convertida a 7,8-diidroneopterina trifosfato pela catálise enzimática da GTPCH. A seguir, PTPS converte 7,8-diidroneopterina trifosfato em 6-piruvil-tetrahydropterina. Finalmente, SR realiza a redução do intermediário 6-piruvil-tetrahydropterina para formar 1'-hidroxi-2'-oxopropil-tetrahydropterina,

o qual é reduzido para 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina e posteriormente à BH4 em duas reações adicionais catalisadas também por SR (Figura 4) (Bracher et al., 1998, Thony et al., 2000). No entanto, apesar da SR ser suficiente para completar a biossíntese de BH4, a família das aldo-ceto redutases dependentes de NADPH, incluindo carbonil redutase (CR) e aldose redutase (AR), representa uma opção alternativa para a realização do último passo da via e síntese desta pterina (Park et al., 1991). Dessa forma, o intermediário 6-piruvoil-tetrahydropterina é reduzido pelo membro C3 da família aldo-ceto reductase 1 (*AKR1C3* - do inglês, *aldo-keto-reductase family 1 member C3*) para produzir o intermediário 1'-hidroxi-2'-oxopropil-tetrahydropterina, ou pelo membro B1 da família aldo-ceto reductase 1 (*AKR1B1* - do inglês, *aldo-keto-reductase family 1 member B1*), assim como por CR para produzir o intermediário 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina. O intermediário 1'-hidroxi-2'-oxopropil-tetrahydropterina é então reduzido diretamente a BH4 por *AKR1B1*, enquanto o intermediário 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina pode ser reduzido a BH4 por SR (Iino et al., 2003). Portanto, a existência de diferentes enzimas capazes de realizar o terceiro passo da biossíntese de BH4 torna possível descrever seis vias alternativas a partir do intermediário 6-piruvoil-tetrahydropterina: SR>SR>SR, *AKR1C3*>SR>SR, SR>*AKR1B1*, *AKR1C3*>*AKR1B1*, *AKR1B1*>SR, e CR>SR. É importante notar que a única via alternativa que não requer SR utiliza ambos os membros da família aldo-ceto reductase 1, *AKR1C3* e *AKR1B1* (Figura 4). Em casos de deficiência de SR, esta via parece estar ativa no fígado, mas não no cérebro, e como consequência ocorrem déficits severos na biossíntese de BH4 no SNC com prejuízo na neurotransmissão de monoaminas e NO (Zorzi et al., 2002).

A síntese de BH4 é controlada por um circuito regulador através da ação da proteína reguladora da ativação da GTPCH (*GFRP* - do inglês, *GTPCH feedback regulatory protein*), a qual forma complexos específicos com GTPCH para modular a atividade desta última. *GFRP* regula a atividade de GTPCH através de um mecanismo de *feedback*, negativo por BH4 e/ou positivo por fenilalanina. Sendo assim, em condições basais a enzima do metabolismo de BH4 que controla o fluxo metabólico é a GTPCH (Viveros et al., 1981). No entanto, em condições inflamatórias, a expressão e conteúdo de GTPCH é induzida tornando-se a enzima limitante a PTPS (Brodacki et al., 2008). Os principais indutores desta desregulação metabólica são INF- γ e IL-2, dois mediadores pró-inflamatórios, já encontrados em soro de pacientes com DP, como citado anteriormente.

Neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos apresentam imunoreatividade positiva para enzimas responsáveis pela síntese *de novo* de BH4: GTPCH, PTPS e SR, coincidindo o local de síntese de BH4 com o de síntese de neurotransmissores monoaminas. Além disso, células de hipocampo, hipotálamo e amígdala também apresentam imunoreatividade positiva para estas enzimas, sendo sempre mais eminente a reatividade nuclear da PTPS em condições basais (Elzaouk et al., 2004). Neste sentido, tem sido demonstrado uma redução significativa da expressão da PTPS e um aumento de 400% de SR em tecido cerebelar *postmortem* de indivíduos diagnosticados neurológica e neuropatologicamente com DP (Tobin et al., 2007).

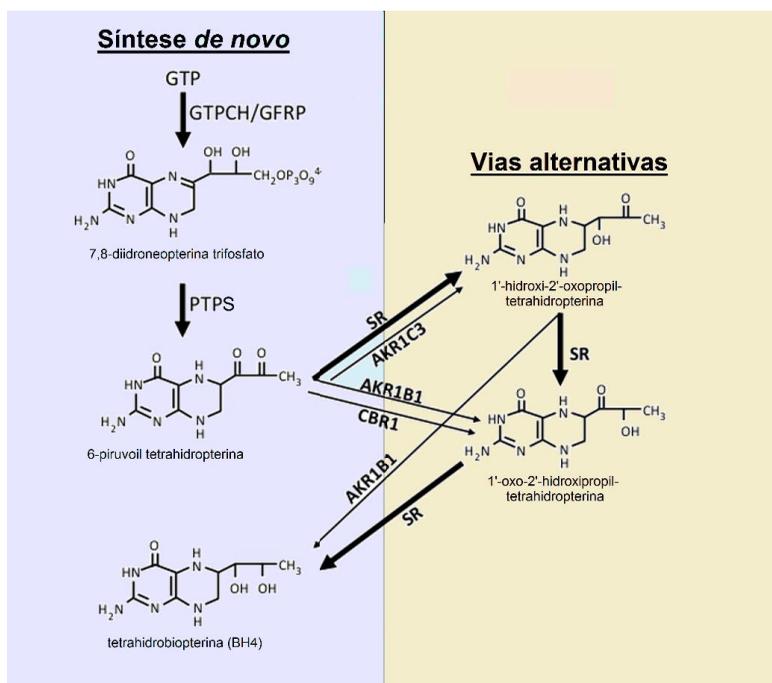


Figura 4. Síntese de novo de BH4 e vias alternativas. Via utilizada pela síntese *de novo*: SR>SR>SR. Vias alternativas: AKR1C3>SR>SR, SR>AKR1B1, AKR1C3>AKR1B1, AKR1B1>SR, e CBR1>SR. GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, GTP ciclohidrolase 1; PTPS, 6-piruvil tetrahydropterina sintase; SR, sepiapterina redutase; AKR1C3, membro C3 da família aldo-ceto reductase 1; AKR1B1, membro B1 da família

aldo-ceto reductase 1; CBR1, carbonil redutase. Adaptado de Kapatos (2013).

1.4.1.2. Via de reciclagem da BH4

Durante a hidroxilação enzimática dos aminoácidos aromáticos, o oxigênio molecular é transferido para o aminoácido correspondente e BH4 é oxidada a 4 α -hidroxi-tetrahidrobiopterina, a partir da qual BH4 é regenerada por duas enzimas adicionais: pterina-4 α -carbinolamina desidratase (PCD) e diidropterina redutase (DHPR) (Thony et al., 2000) (Figura 5). No entanto, no caso do evento catalítico da *NOS*, a regeneração da BH4 não requer a atividade de PCD e DHPR, uma vez que BH4 sofre um ciclo redox de apenas um elétron sem a necessidade de regeneração por enzimas adicionais (Werner et al., 2011). A via de reciclagem da BH4 acontece principalmente no fígado, devido à 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, visto que BH4 permeia a *BBB*.

Na via de reciclagem de BH4, PCD realiza a desidratação de 4 α -hidroxi-tetrahidrobiopterina para formar diidrobiopterina quinoide (BH2q). Logo, a enzima DHPR realiza a conversão final de BH2q em BH4. Seguindo os mecanismos clássicos de desidratação, uma molécula de água é libertada e o produto BH2q é reduzido novamente a BH4 em uma reação dependente de NADH. Na ausência de PCD a desidratação de 4 α -hidroxi-tetrahidrobiopterina também pode ocorrer não enzimaticamente, porém em uma taxa insuficiente para manter BH4 no estado reduzido, pelo menos no fígado (Bailey et al., 1993) (Figura 5). A reciclagem enzimática de BH4 é parte essencial do sistema de hidroxilação da fenilalanina para assegurar um fornecimento contínuo do cofator reduzido (Duch e Smith, 1991), e para evitar a acumulação de metabólitos nocivos produzidos por rearranjo de 4 α -hidroxi-tetrahidrobiopterina (Bracher et al., 1998).

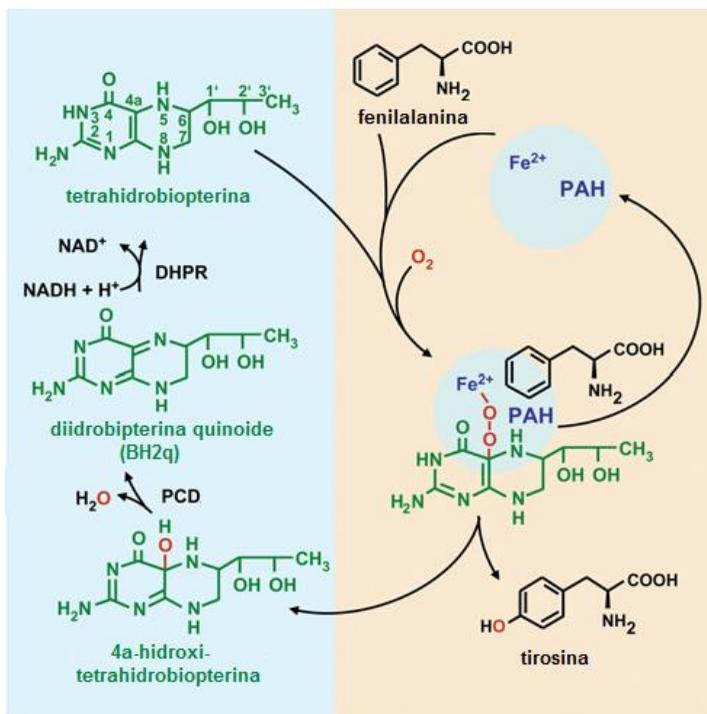


Figura 5. Via de reciclagem de BH4. Reciclagem de BH4 realizada pela atividade das enzimas PCD e DHPR a partir da hidroxilação enzimática da fenilalanina. PAH, fenilalanina hidroxilase; PCD, pterina-4 α -carbinolamina desidratase; DHPR, diidropterina redutase. Adaptado de Werner et al. (2013).

1.4.1.3. Via de salvação da BH4

A BH4 pode ser sintetizada a partir de uma via de salvação, onde o intermediário 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina é convertido a 6-lactoil-7,8-diidropterina (sepiapterina) através de uma reação não enzimática (Milstien e Kaufman, 1983). A síntese de BH4 através da via de salvação suporta duas possíveis rotas, uma vez que as enzimas SR e CR podem reduzir sepiapterina para gerar 7,8-diidrobiopterina (BH2), que é subsequentemente reduzida a BH4 por DHFR (Milstien e Kaufman, 1983) (Figura 6).

A síntese de BH4 a partir de sepiapterin fornece um meio útil para a repleção de BH4. Porém, é preciso salientar que quando BH2 é derivada da oxidação de BH4 durante a catálise enzimática das

aminoácido aromático hidroxilases (BH2q), não há síntese de BH4 através da via de salvação (Shi et al., 2004).

O fluxo metabólico através da via de salvação não está bem estabelecido, mas pode ser substancial com base na acumulação de sepiapterina derivada de 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina e de BH2 derivada de sepiapterina no líquido cefalorraquidiano de pacientes com deficiência de SR (Zorzi et al., 2002). Além disso, alguns estudos relatam que sepiapterina estimula a biossíntese de monoaminas no cérebro de ratos quando injetada diretamente no ventrículo (Kapatos et al., 1982).

A via de salvação é um mecanismo alternativo para a síntese de BH4 do qual a comunidade científica só tomou conhecimento após a descoberta de pacientes com deficiência autossômica recessiva de SR, que apresentavam deficiência de neurotransmissores monoaminérgicos sem o diagnóstico de hiperfenilalaninemia (Blau e Thony, 2001).

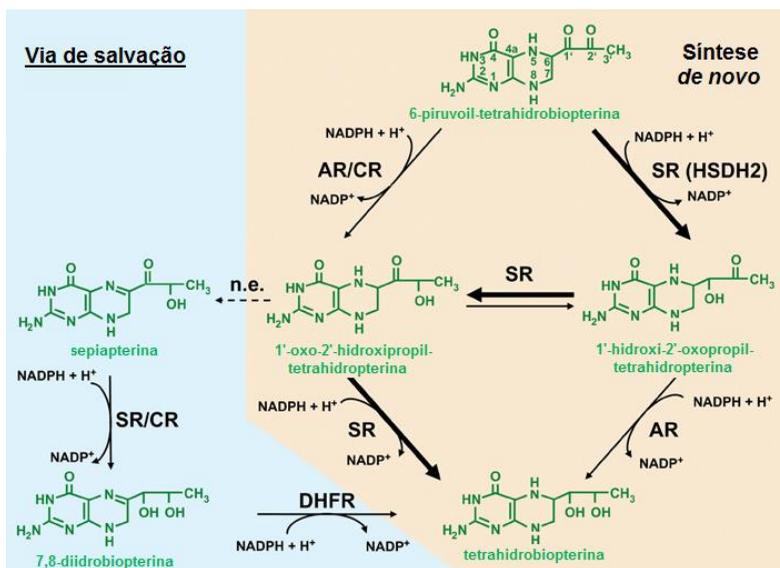


Figura 6. Síntese de BH4 pela via de salvação. O intermediário 1'-oxo-2'-hidroxipropil-tetrahydropterina é convertido não enzimaticamente a sepiapterina que é convertida em 7,8-diidrobiopterina por CR ou SR. Por fim, 7,8-diidrobiopterina (BH2) é reduzida a BH4 por DHFR. SR, sepiapterina redutase; AR, aldose

redutase; CR, carbonil redutase; DHFR, diidrofolato redutase. Adaptado de Werner et al. (2013).

1.4.2. Homeostase de BH4

Conforme citado anteriormente, em condições basais a enzima do metabolismo da BH4 que controla o fluxo metabólico é a GTPCH (Viveros et al., 1981). A regulação do cofator pelo complexo formado entre GTPCH e *GFRP* tem sido melhor estudada em tecido endotelial. Pouco se sabe sobre a modulação da atividade de GTPCH em outros órgãos, como fígado e cérebro. Além disso, não está claro como a homeostase e a biodisponibilidade da BH4 são reguladas: o que envolve a biossíntese, a distribuição, o transporte (captação e liberação) e a transição entre o estado de oxidação e de regeneração do cofator. No entanto, a biodisponibilidade e o estado de oxidação da BH4 parecem influenciar, direta ou indiretamente, em vários processos fisiológicos, incluindo a função/disfunção vascular (Schmidt e Alp., 2007), hipertensão (Schmidt e Alp., 2007), diabetes (Pieper, 1997), assim como de vias metabólicas biossintéticas, como da fenilalanina (Thony et al., 2004) e dos neurotransmissores monoaminas (Foxton et al, 2007; Ponz et al., 2009). Em geral, a BH4 é lábil e pode reagir facilmente com o oxigênio para produzir radicais livres, gerando espécies reativas de oxigênio como superóxido, H_2O_2 e $ONOO^-$ (Kirsch et al., 2003). Paradoxalmente, BH4 apresenta atividade antioxidante em concentrações fisiológicas, já que espécies reativas como o OH^- e $ONOO^-$ são reduzidas pelo cofator (Lam et al., 2007). Sendo assim, a concentração de BH4 é um fator decisivo na determinação do seu papel protetor ou deletério.

1.5. Processos cognitivos

Processos cognitivos são os processos subjacentes à elaboração do conhecimento. Entre eles estão a percepção, a aprendizagem, a memória e a consciência. A aprendizagem é o processo pelo qual são adquiridas novas informações e inerente a este processo está a memória, que possibilita reter o aprendido para responder adequadamente às situações do presente ou projetar o futuro. Por esta razão, a memória é um processo cognitivo que compreende a capacidade de adquirir, reter e evocar, quando necessárias, informações que de alguma forma são relevantes (Izquierdo, 2004). Há diferentes tipos de memórias, baseados em três formas de armazenamento de informação: a memória de trabalho, a memória de curta duração (*STM* - do inglês, *short term memory*) e a memória de longa duração (*LTM* - do inglês, *long term*

memory). A memória de trabalho tem sido descrita como um sistema cerebral que provê armazenamento e manipulação temporários (de segundos a poucos minutos) da informação necessária para tarefas complexas como a compreensão da linguagem, aprendizagem e razão (Baddeley, 1992). Em paralelo à memória de trabalho, forma-se a *STM*, que dura minutos ou horas e serve para proporcionar a continuidade do sentido do presente, adquirido pela memória de trabalho. A principal importância da *STM* é manter as informações “vivas” no cérebro, permitindo que elas sejam requisitadas (evocadas), durante o período (poucas horas) em que estas informações ainda não foram armazenadas na sua forma definitiva, a *LTM* (Izquierdo et al., 1998). As memórias de curta e de longa duração utilizam circuitos neurais que envolvem, entre outras estruturas cerebrais, o hipocampo e o córtex entorrinal.

O mecanismo utilizado para o armazenamento da *LTM* ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, estudos indicam a potenciação de longa duração (*LTP* - do inglês, *long term potential*) como o principal candidato para tal mecanismo. O *LTP* é um aumento persistente na força sináptica após a intensa estimulação de uma sinapse química (Cooke e Bliss, 2006). Este é um dos vários fenômenos subjacentes à plasticidade sináptica (capacidade das sinapses químicas em alterar sua força), a qual é relacionada ao processo de formação de *LTM* por inúmeros estudos já publicados (Bliss e Collingridge, 1993). Por esta razão, o *LTP* é considerado um dos principais mecanismos celulares que antecedem a aprendizagem e a memória (Bliss e Collingridge, 1993; Cooke e Bliss, 2006). Em particular, o *LTP* gerado na região CA1 do hipocampo tem sido amplamente estudado e relacionado ao aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular mediado por receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) (Malenka e Nicoll, 1999). Estudos realizados nos últimos 30 anos demonstram que o processo de formação do *LTP* hipocampal compreende uma fase inicial, onde a estimulação de receptores do tipo NMDA promove o influxo de Ca^{2+} na célula pós-sináptica. O influxo de Ca^{2+} provoca a ativação de proteínas cinases dependentes do complexo Ca^{2+} /calmodulina que por sua vez aumentarão o tráfego de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) desde o citosol até a membrana pós-sináptica (Malinow, 2003). Subjacente a este fenômeno está a fase tardia da formação do *LTP*, que requer a transcrição de genes e a síntese de proteínas responsáveis pela formação do *LTP* na célula pós-sináptica (Frey et al., 1996). No entanto, pouco se sabe sobre a identidade das proteínas sintetizadas durante a fase tardia da formação do *LTP*. A hipótese mais estudada pela comunidade científica é de que a

persistente ativação de proteínas cinases ativadas por mitógeno (*MAPK* - do inglês, *mitogen-activated protein kinases*) (Sweatt, 1999; Kelleher et al., 2004; Lynch, 2004), em particular a cinase regulada por sinal extracelular (*ERK* do inglês, *extracellular-signal-regulated kinases*), seja o elo entre as fases inicial e tardia da formação do *LTP*. Logo, *ERK* estimula fatores de transcrição, tais como a proteína de ligação a elementos de resposta ao AMPc (*CREB* - do inglês, *cAMP response element-binding protein*), que promoverão o passo final de transcrição gênica e síntese de proteínas (Kelleher et al., 2004). Além disso, está bem estabelecido na literatura que a persistente atividade pós-sináptica do complexo Ca^{2+} /calmodulina durante a fase inicial de formação do *LTP* leva à síntese de um “mensageiro retrógrado” (Overeen et al., 2010). Este processo de sinalização retrógrada facilita a resposta pré-sináptica a estímulos subsequentes por promover o aumento no número de vesículas sinápticas e sua posterior liberação na fenda sináptica (Ninan et al., 2006). Ainda, proteínas cinases responsáveis pela comunicação entre as fases inicial e tardia da formação do *LTP* (*ERK*), também sofrem regulação extracelular a partir deste “sinal retrógrado” (Lynch, 2004) (Figura 7).

Inúmeras evidências sugerem o *NO* como um importante “mensageiro retrógrado” no processo de formação do *LTP* (Schuman e Madison, 1991; Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1996; Son et al., 1996; Kleppisch et al., 1999). *NO* é um neurotransmissor gasoso gerado pós-sinápticamente a partir do influxo de Ca^{2+} subsequente à ativação de receptores NMDA. A síntese de *NO* acontece através da reação da enzima *NOS*, a qual é dependente de Ca^{2+} /calmodulina e utiliza o aminoácido L-arginina como substrato. No entanto, a atividade da *NOS* depende de cinco cofatores enzimáticos: i) o mononucleotídeo de flavina (*FMN* - do inglês, *flavin mononucleotide*); ii) o dinucleotídeo de flavina (*FAD* - do inglês, *flavin dinucleotide*); iii) a proteína regulatória calmodulina; iv) a protoporfirina IX heme; v) e a pterina BH₄, a qual também atua como cofator para as enzimas aminoácido aromático hidroxilases e alquilglicerol monooxigenase (Masters et al., 1996).

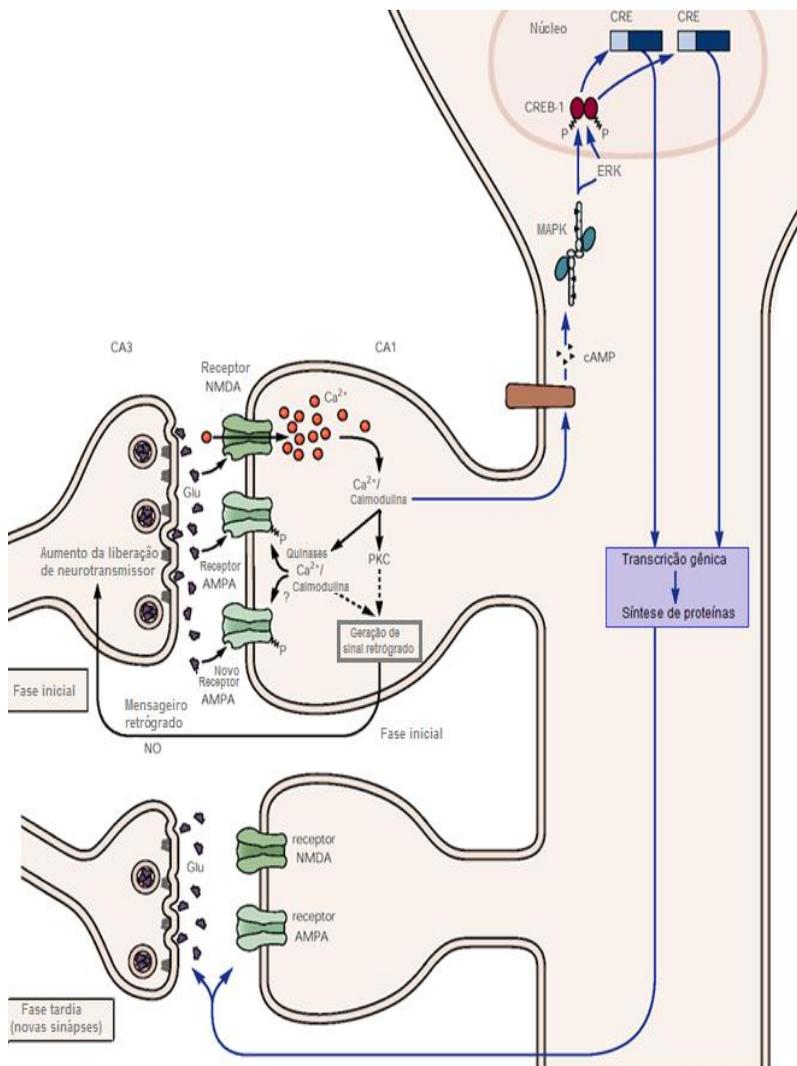


Figura 7. Processo de formação do LTP. Fase inicial: a estimulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) promove o influxo de Ca^{2+} na célula pós-sináptica, que provoca a ativação de proteínas cinases dependentes do complexo Ca^{2+} /calmodulina aumentando o tráfego de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) desde o citosol até a membrana pós-sináptica. Ainda, a persistente atividade pós-sináptica do complexo Ca^{2+} /calmodulina leva à síntese de

óxido nítrico (*NO*), que atua como mensageiro retrógrado, facilitando a resposta pré-sináptica à estímulos subsequentes por promover o aumento no número de vesículas sinápticas e sua posterior liberação na fenda sináptica. Fase tardia: a persistente ativação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (*ERK*) estimula fatores de transcrição, como a proteína de ligação a elementos de resposta ao AMPc (*CREB1*), que promove a transcrição gênica e síntese de proteínas. *LTP* – potenciação de longa duração; *NO* – óxido nítrico; *AMPA* - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; *Glu* - glutamato; *NMDA* - N-metil-D-aspartato; *cAMP* – monofosfato de adenosina cíclico; *MAP* – proteína ativada por mitógeno; *CREB1* – proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP; *CRE* - elemento de resposta ao cAMP Adaptado de Kandel et al. (2000).

Muitos protocolos para estudar o processo de aprendizagem e a formação da memória foram desenvolvidos em muitas décadas de pesquisa científica. Tradicionalmente, a geração de *LTP* é determinada através de parâmetros eletrofisiológicos que avaliam a formação de potenciais elétricos excitatórios a nível hipocampal (Claiborne et al., 1993). No entanto, inúmeros ensaios comportamentais estão disponíveis para desenvolver modelos de memória humana em macacos e roedores, incluindo protocolos específicos para a avaliação da aprendizagem e memória dependente do *LTP* hipocampal (Clark e Squire, 2013). Entre os protocolos comportamentais bem estabelecidos na literatura, destacam-se: a tarefa da esQUIVA inibitória (passiva), a qual avalia aprendizagem e memória através do condicionamento pavloviano clássico (Perry et al., 1983); o teste do medo condicionado, o qual avalia aprendizagem e memória através do condicionamento pavloviano em um panorama onde o aprendizado está associado a um contexto e a um estímulo incondicionado (Maren, 2008); e o labirinto aquático de Morris, o qual avalia aprendizagem espacial e memória (Morris, 1984). Estas são metodologias tradicionais para o estudo da memória onde o condicionamento clássico é avaliado. Independentemente do paradigma experimental, é crucial que a tarefa comportamental esteja de acordo com as características comportamentais específicas de cada espécie, como idade, sexo, e as características peculiares de modelos animais geneticamente modificados.

1.6. Hipótese

Considerando a projeção do aumento no número de indivíduos acometidos por doenças neurodegenerativas, em particular a doença de Parkinson, e a necessidade de encontrar alternativas terapêuticas mais efetivas para as mesmas, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses:

Hipótese 1: uma vez que quinoxalinas representam uma família de compostos de interesse que possuem um largo espectro de atividades biológicas, sugerimos que a síntese de compostos derivados de quinoxalina, como o composto 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ), possa representar uma alternativa terapêutica promissora com potencial ação neuroprotetora;

Hipótese 2: uma vez que o cofator tetrahydrobiopterina (BH4) possui estreita relação com a homeostase dos sistemas monoaminérgicos, assim como do óxido nítrico, um importante sinalizador retrógrado na geração do LTP, propomos que a deficiência na biodisponibilidade de BH4 possa estar relacionada com as alterações na memória e cognição observadas nos indivíduos afetados pela DP.

CAPÍTULO II

EFEITO DO COMPOSTO 2-METIL-3-FENIL-6-AMINOQUINOXALINA SOBRE O METABOLISMO CEREBRAL

2. Objetivos
 3. Material e Métodos
 4. Resultados
 5. Discussão
-

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito do composto sintético 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ) sob condições fisiológicas e/ou de morte neuronal com o intuito de encontrar alternativas terapêuticas mais eficazes para o dano neuronal, em particular, o dano neuronal característico da doença de Parkinson.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Investigar o efeito *in vitro* de concentrações crescentes de MPAQ sobre a mensuração do consumo de oxigênio e a atividade de monoamina oxidase em frações mitocondriais; a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória, a liberação de lactato e o conteúdo de neopterinina em fatias hipocâmpais; bem como o perfil metabólico de monoaminas no cérebro de camundongos Swiss albino;

2.2.2. Investigar o efeito *in vitro* de MPAQ sobre a imunomarcagem de tirosina hidroxilase e a captação de $[H^3]$ -dopamina em um modelo de cultura de células mesencefálicas em que a morte de neurônios dopaminérgicos ocorre de forma espontânea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fármacos

Os reagentes utilizados para as análises *in vitro* foram de grau de pureza P.A. ou grau HPLC, adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Frações mitocondriais, fatias do estriado ou homogeneizado de cérebro total de camundongos Swiss albino machos adultos foram tratados *in vitro* com dimetil sulfóxido (DMSO) 1%, MPAQ (0,1, 1,0, 10 e 100 μ M), rotenona (10 e 25 μ M), cianeto (0,5 μ M) e azida sódica (1 e 10 mM). MPAQ foi diluído em DMSO 1%, rotenona foi diluída em etanol, enquanto que cianeto e azida sódica foram diluídos em água milli-Q.

3.2. Preparação de frações enriquecidas de mitocôndrias

Frações mitocondriais foram preparadas utilizando centrifugação em gradientes diferenciais. Camundongos Swiss albino machos adultos foram sacrificados por decapitação e o cérebro total

separado e homogeneizado em 5 volumes de tampão de respiração mitocondrial [fosfato de potássio (4,4 mM; pH 7,4), contendo sacarose (0,3M), MOPS (5 mM), EGTA (1 mM) e albumina de soro bovino (0,1 %)]. Logo após, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g por 10min a 4°C e o sobrenadante foi separado e centrifugado novamente a 15.000 x g por 10min a 4°C. O pellet final foi suspenso em tampão de respiração mitocondrial (250 µL) de acordo com Latini et al. (2005).

3.3. Preparação de fatias de estriado

Camundongos Swiss albino machos adultos foram sacrificados por decapitação, o estriado separado e mantido em tampão Krebs (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 10 mM e CaCl₂ 1,3 mM) saturado com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ gelado. Após, o estriado foi fatiado em *Chopper* obtendo-se fatias com 400 µm de espessura, as quais foram revitalizadas em tampão Krebs por 30 minutos a 37° (Latini et al., 2005).

3.4. Cultura primária de células mesencefálicas

Embriões foram coletados a partir dos cornos uterinos de ratos Sprague-Dawley (Janvier Labs, Le Genest St Isle, França) no 15° dia gestacional. Em seguida, o mesencéfalo ventral foi dissecado e suspensões celulares foram preparados por trituração mecânica de pedaços de tecido cerebral sem o uso de enzimas proteolíticas. As células foram colocadas em placas de cultura com 24 ou 48 poços (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EUA) contendo 1 mg/mL de polietilenimina (Sigma, Saint Quentin Fallavier, França) diluída em tampão Borato (pH 8,3) *overnight*. As culturas foram mantidas em meio N5 suplementado com glicose (5 mM), soro de cavalo (5 %) e soro fetal de vitelo (0,5 %), exceto durante os 3 primeiros dias *in vitro* (DIV), quando a concentração de soro fetal de vitela foi fixada em 2,5 % para favorecer a maturação inicial das culturas (Guerreiro et al., 2008). Nestas condições, a perda de neurônios DA é espontânea e seletiva. Por isso, quando necessário, algumas culturas foram mantidas por até 10 DIV na presença de 20 ng/mL do peptídeo trófico *GDNF* para adiar a neurodegeneração. Em seguida, estas culturas foram privadas de *GDNF* até o 15 DIV para possibilitar a avaliação da neuroproteção.

3.5. Respirometria de alta resolução

O consumo de oxigênio foi avaliado em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos. A análise da

respiração mitocondrial foi realizada a 37°C em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com volumes fixados em 2 mL (De Paula Martins et al., 2013). Primeiramente, aguardou-se a estabilização do consumo de oxigênio, sem a adição de substratos ou inibidores da respiração, determinando a respiração basal. Após, veículo (DMSO) ou MPAQ numa concentração final de 0,1, 1,0, 10 ou 100 μM foi adicionado e observou-se a respiração basal durante 15 minutos após a estabilização. Após este período, foram observados os seguintes parâmetros da respiração mitocondrial:

- 1- Estado IV de respiração mitocondrial: Este estado respiratório está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Neste estado não há síntese de adenosina trifosfato (ATP) e experimentalmente é estudado analisando o consumo de oxigênio (aproximadamente durante 4 minutos) após adicionar oligomicina (Leak; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no meio. A oligomicina é um inibidor da subunidade F_0 da ATP sintase ou complexo V da cadeia respiratória. O efeito induzido por esta inibição é caracterizado por uma marcada redução no consumo de oxigênio (Nelson e Cox, 2004).
- 2- Respiração máxima: Este parâmetro representa o consumo de oxigênio observado após titular o sistema experimental com o desacoplador mitocondrial carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenilhidraxona (FCCP). Ionóforos como o FCCP permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Eles desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (Nelson e Cox, 2004). Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons (Gnaiger, 2001).
- 3- Consumo de oxigênio residual: Indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A produção de espécies reativas de oxigênio é observada após adicionar rotenona (0,5 μM), que inibe o complexo I da cadeia respiratória, e antimicina A (2,5 μM), inibidor do complexo III. Desta forma, com a cadeia transportadora de elétrons inibida, o oxigênio que está sendo consumido não é devido à passagem de elétrons pela cadeia respiratória (Gnaiger, 2001).

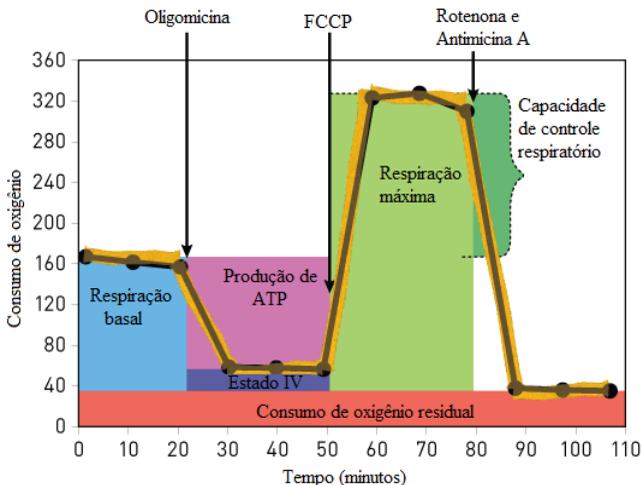


Figura 8. Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio em um experimento de respirometria clássica. Adaptado de <http://www.seahorsebio.com>. Os dados foram coletados por meio do software DatLab 4.3 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), avaliando a concentração e o fluxo de oxigênio após a adição de inibidores e desacopladores da cadeia respiratória mitocondrial. Os dados foram expressados como pmol de O₂/s/mg proteína.

3.6. Determinação da atividade das enzimas da cadeia respiratória

A atividade das enzimas dos complexos I e IV da cadeia respiratória foram determinadas em homogeneizado de fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos, tratadas com MPAQ (0,1 – 100 μM) por 60 minutos. A atividade do complexo I da cadeia respiratória foi determinada através da taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH a 420 nm como descrito por Cassina e Radi (1996). A atividade da enzima citocromo *c* oxidase (complexo IV) foi determinada de acordo com Rustin et al. (1994). Os métodos descritos para medir essas atividades foram ligeiramente modificados, conforme detalhado em Latini et al. (2005). Espectrofotômetro com controle de temperatura (Varian, USA) foi utilizado para as análises. As atividades dos complexos I e IV da cadeia respiratória foram calculadas como nmol/min/mg de proteína.

3.7. Determinação da concentração de lactato

A concentração de lactato foi determinada no sobrenadante de fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos, tratadas com MPAQ (0,1 – 100 μ M) por 60 minutos. A determinação de lactato foi realizada através de um analisador específico (YSI 2700 STAT, Yellow Springs, Ohio, USA) e os resultados foram expressos em mmol/L.

3.8. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

As análises realizadas através de HPLC foram realizadas utilizando-se cromatógrafo Waters composto por um módulo de separação Waters e2695, um detector eletroquímico Waters 2465, e/ou um detector fluorescente Multi λ Waters 2475.

3.8.1. Determinação do conteúdo de monoaminas e seus metabólitos por HPLC

O conteúdo de monoaminas e seus metabólitos foram determinados em homonegato do cérebro total de camundongos Swiss albino machos adultos de acordo com Castro et al (2012). Após o sacrifício dos animais por decapitação o cérebro total foi separado e homogeneizado em 7 volumes de tampão fosfato de potássio (4,4 mM; pH 7,4), contendo sacarose (0,3 M), MOPS (5 mM), EGTA (1 mM) e albumina de soro bovino (0,1 %). Após, o homogenato foi centrifugado a 3.500 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante tratado com MPAQ (0,1 – 100 μ M) por 60 minutos. Após, as amostras foram desproteinizadas com 1 volume de ácido perclórico (0,1 M) e centrifugadas a 16,000 x g por 10 minutos a 4°C. As concentrações de monoaminas e de seus metabólitos foram determinadas através da análise de 20 μ L do sobrenadante em um sistema composto por uma fase móvel contendo fosfato de sódio (90 mM), ácido cítrico (50 mM), heptanosulfonato de sódio (1,7 mM), EDTA (48 μ M), 10 % de acetonitrila e pH 3,0 com um fluxo de 0,3 mL/minuto em uma coluna C18 de 120 x 2,0 mm (Synergi Hydro). Nessas condições o tempo de retenção das monoaminas e de seus metabólitos foram de aproximadamente 2,7 minutos para DA, 4,2 minutos para o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 4,8 minutos para serotonina e 6,5 minutos para ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), com tempo total de corrida de 8 minutos. As concentrações de DA, DOPAC, serotonina e 5-HIAA foram determinadas por um detector eletroquímico (Waters 2465) e calculadas como ng/mg de proteína (Castro et al., 2012).

3.8.2. Determinação do conteúdo de neopterinina por HPLC

A determinação do conteúdo de neopterinina foi realizada no sobrenadante de fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos, tratadas com MPAQ (0,1 – 100 μ M) por 60 minutos. As amostras foram desproteinizadas com 1 volume de ácido tricloroacético (TCA) 5 % e centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C. A concentração de neopterinina foi determinada através da análise de 20 μ L do sobrenadante das fatias em um sistema composto por uma fase móvel composta por acetato de sódio (50 nM), ácido cítrico (5 mM), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (48 μ M) e ditioeritritol (DTE) (160 μ M) com um fluxo de 0,7 mL/minuto. A identificação e quantificação de neopterinina foram realizadas por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 350 nm e emissão de 430 nm. Nessas condições o tempo de retenção da neopterinina foi de aproximadamente 2,9 minutos, com tempo total de corrida de 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/L (Dantas et al., 2013).

3.9. Determinação da atividade de monoamina oxidase (MAO)

A atividade da MAO foi determinada fluorimetricamente em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos a partir da quantidade do produto fluorogênico 4-hidroxiquinolina (4-HQ) formada pela oxidação de kinuramina por MAO. As atividades específicas das isoformas A e B da MAO foram determinadas através do uso de inibidores específicos: deprenil (inibidor da MAO-B), para a determinação da atividade da MAO-A; e clorgilina (inibidor da MAO-A), para a determinação da atividade da MAO-B. A atividade da MAO foi analisada em um meio contendo Na_2HPO_4 (16,8 mM), KH_2PO_4 (10,6 mM), KCl (3,6 mM) e 0,5mg de proteína mitocondrial a 37°C. Após 30 minutos de pré-incubação, os inibidores deprenil (250 nM) e clorgilina (250 nM) foram adicionados ao meio. A reação foi iniciada pela adição de kinuramina (90 μ M para MAO-A e 60 μ M para MAO-B). As atividades de MAO-A e -B foram determinadas após 1 hora de incubação a 37°C com MPAQ (0,1 - 100 μ M). Os dados foram expressos como nmol de 4-HQ/min/mg de proteína.

3.10. Imunofluorescência de tirosina hidroxilase (TH)

As avaliações de imunofluorescência de TH foram realizadas de acordo com Le Douaron et al. (2015) pelo Laboratoire de

Pharmacognosie, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 8076 BioCIS, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, França, em colaboração com a coorientadora desse trabalho Dra. Rita Raisman-Vozari.

A imunofluorescência de TH foi utilizada para a detecção de neurônios dopaminérgicos em culturas de células mesencefálicas. Após fixação com formaldeído 4% em tampão fosfato-salino (PBS) de Dulbecco por 12 minutos, culturas primárias de células mesencefálicas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas *overnight* a 4°C com um anticorpo primário monoclonal anti-TH (1:5000). Após, foi realizada incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-camundongo (diluição 1:500) por 1 hora a 37°C, seguido de lavagens com PBS e montagem da lâmina utilizando-se Gel Mount (Sigma). As análises de imunofluorescência para TH foram realizadas em microscópio de fluorescência invertido (TE-300, Nikon, Tokyo, Japão), acoplado a uma câmera digital ORCA-ER (Hamamatsu; Bridgewater, NJ). As imagens foram adquiridas com o software Simple-PCI (C-Imaging Systems). A contagem das células TH⁺ foi realizada com ampliação de 200x usando uma lente objetiva de 20x combinada com uma ocular de 10x. O número de neurônios TH⁺ em cada poço foi estimado após a contagem de todos os campos visuais, distribuídos ao longo dos eixos x e y.

3.11. Captação de [2,5,6-3h]-Dopamina

As avaliações de captação de DA foram realizadas de acordo com Le Douaron et al. (2015) pelo *Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité mixte de recherche (UMR) 8076 BioCIS, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, França*, em colaboração com a coorientadora desse trabalho Dra. Rita Raisman-Vozari.

A integridade e a função sináptica dos neurônios dopaminérgicos foram avaliadas através da sua capacidade de acumular DA tritiada ([2,5,6-3H]-DA) (Michel et al., 1999; Rougé Pont et al., 1999). A captação de dopamina foi iniciada pela adição de 50 nM de [2,5,6-3H]-DA (40 Ci/mmol) (PerkinElmer, Boston, EUA) em culturas primárias de células mesencefálicas mantidas a 37°C em 500 µL de PBS contendo 5 mM de glicose. Os dados usados como controle foram obtidos através do tratamento de algumas culturas celulares com 1 µM de GBR-12909 (Sigma-Aldrich), um inibidor seletivo do transportador de DA. A captação de DA foi interrompida após 20 minutos por

remoção da mistura de incubação, seguido de duas lavagens rápidas com PBS gelado. Em seguida, as células foram suspensas dos poços da placa de cultura utilizando 500 μ L de água destilada. A radioatividade acumulada pelos neurônios dopaminérgicos foi avaliada por espectrometria de cintilação líquida.

3.12. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (*BSA* - do inglês, *bovine serum albumin*) como padrão.

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). A interação entre os fatores em estudo foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via. Os testes post-hoc foram: Tukey e Dunnett's. Apenas valores significativos são citados no texto. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism 5[®].

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre o consumo de oxigênio mitocondrial em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino

A Figura 9 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos **adultos**. Na figura pode ser observado que os parâmetros de respirometria em geral não foram alterados de forma significativa por nenhuma das concentrações de MPAQ avaliadas. No entanto, 100 μM de MPAQ diminuiu significativamente o consumo de oxigênio durante a respiração máxima [$F_{(4,10)} = 3,573$, $P = 0,046$].

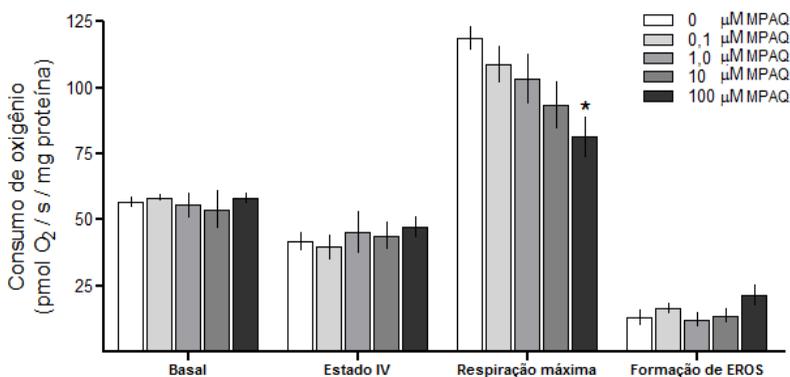


Figura 9. Efeito *in vitro* de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 0,1-100 μM) sobre parâmetros de respiração celular em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos. As medidas de consumo de oxigênio (respiração basal, estado IV de respiração mitocondrial, respiração máxima e formação de espécies reativas mitocondriais) foram medidas em respirômetro de alta resolução Oroboros. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao basal (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey). MPAQ, 2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; EROS, espécies reativas mitocondriais.

4.2. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino

A Figura 10 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos. Na figura pode ser observado que MPAQ não prejudicou a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino. Por outro lado, 25 μM de rotenona (inibidor clássico do complexo I; Figura 10A) e 0,5 mM de cianeto (inibidor clássico do complexo IV; Figura 10B) reduziram significativamente a atividade dos respectivos complexos [Complexo I: $F_{(7,39)} = 4,304$, $P = 0,0012$; Complexo IV: $F_{(6,31)} = 4,430$, $P = 0,0041$].

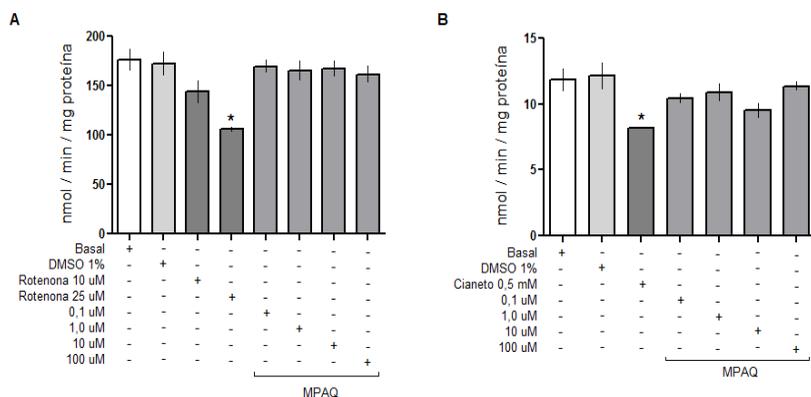


Figura 10. Efeito *in vitro* de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina) sobre a atividade dos complexos I (A) e IV (B) da cadeia respiratória em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos. As fatias foram expostas a concentrações crescentes de MPAQ (0 – 100 μM), rotenona (10 e 25 μM) ou cianeto (0,5 μM) durante 1 hora. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao basal (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey). DMSO, dimetil sulfóxido.

4.3. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a liberação de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino

A Figura 11 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre a concentração de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após tratamento *in vitro* (1 hora). Na figura pode ser observado que 10 e 25 μM de rotenona aumentaram significativamente a produção e liberação de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino [$F_{(7, 46)} = 5,327$; $P = 0,0002$], enquanto que MPAQ não alterou este parâmetro.

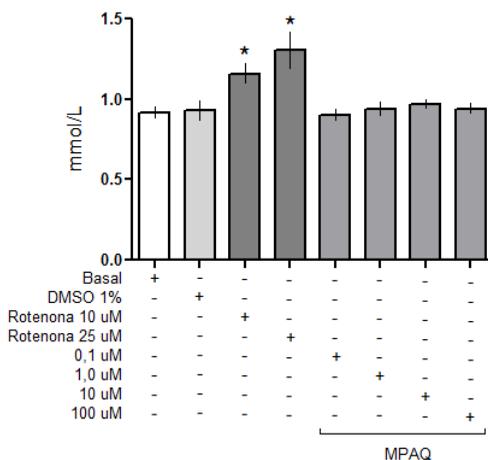


Figura 11. Efeito *in vitro* de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina) sobre a concentração de lactato em fatias do estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após a exposição à MPAQ (0 – 100 μM) ou rotenona (10 e 25 μM) durante 1 hora. Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao basal (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey). DMSO, dimetil sulfoxido.

4.4. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre o perfil metabólico de monoaminas em homogenato do cérebro total de camundongos Swiss albino

A Figura 12 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre o perfil metabólico de monoaminas em homogenato do cérebro total de camundongos Swiss albino machos adultos. Na figura pode ser observado que as concentrações de

monoaminas e de seus metabolitos em geral não foram alteradas de forma significativa por nenhuma das concentrações de MPAQ avaliadas. No entanto, 100 μM de MPAQ aumentou a concentração de serotonina no cérebro de camundongos Swiss albino [Serotonina: $F_{(4,19)} = 3,352$, $P = 0,0309$].

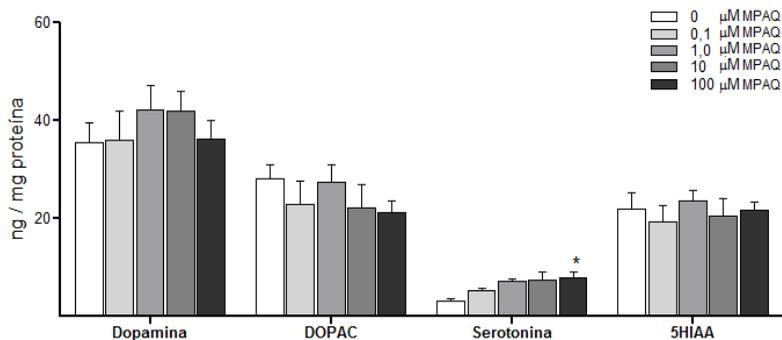


Figura 12. Efeito *in vitro* de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 0,1-100 μM) sobre o perfil metabólico de monoaminas em homogenato do cérebro total de camundongos Swiss albino machos adultos. O conteúdo de monoaminas foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey). DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 5HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético.

4.5. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a atividade de MAO em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino

A Figura 13 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre a atividade de MAO em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos. Nas figuras 13A-C pode ser observado que a atividade de MAO total, assim como de suas duas isoformas, MAO-A e MAO-B, foram reduzidas significativamente somente quando expostas a 100 μM de MPAQ [MAO total: $F_{(4,15)} = 17,41$, $P < 0,001$; MAO-B: $F_{(4,15)} = 9,89$, $P < 0,001$; MAO-A: $F_{(4,15)} = 4,88$, $P < 0,01$].

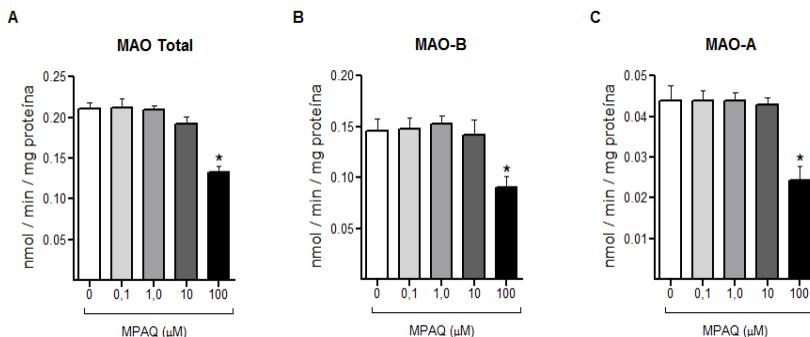


Figura 13. Efeito *in vitro* de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 0,1-100 μM) sobre a atividade da enzima monoamina oxidase (MAO) em frações mitocondriais do cérebro de camundongos Swiss albino machos adultos. (A) Atividade de MAO total; (B) Atividade de MAO-B; (C) Atividade de MAO-A. Os dados apresentam a média ± erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

4.6. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ sobre a liberação de neopterina em fatias de estriado de camundongos Swiss albino

A Figura 14 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (0,1 – 100 μM) sobre a liberação de neopterina em fatias de estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após a exposição à MPAQ (0 – 100 μM), rotenona (10 e 25 μM) e azida sódica (1 e 10 mM) durante 1 hora. Na figura pode ser observado que 1 e 10 mM de azida sódica aumentaram significativamente a liberação de neopterina para o meio de tratamento [$F_{(9, 34)} = 490,2$; $P < 0,0001$], enquanto que MPAQ (0,1 – 100 μM) e rotenona (10 e 25 μM) não provocaram a liberação de neopterina.

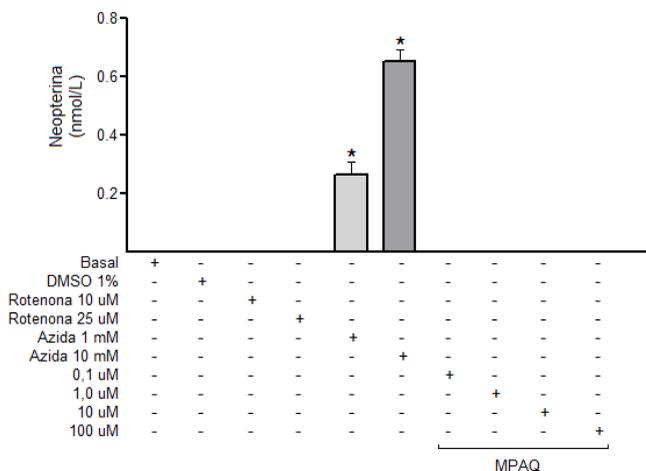


Figura 14. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 0,1 – 100 μM) sobre a liberação de neopterin em fatias de estriado de camundongos Swiss albino machos adultos após a exposição à MPAQ (0 – 100 μM), rotenona (10 e 25 μM) e azida sódica (1 e 10 mM) durante 1 hora. O conteúdo de neopterin foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao basal (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey). DMSO, dimetil sulfóxido.

4.7. Efeito de MPAQ em cultura de células mesencefálicas

A Figura 15 mostra o efeito de concentrações crescentes de MPAQ (10 – 100 μM) em cultura de células mesencefálicas. Na figura pode ser observado que 100 μM de MPAQ aumentou significativamente o número de neurônios TH⁺ em cultura de células mesencefálicas, porém não mais que o análogo lipofílico de AMPc (controle positivo) (Figura 15A). MPAQ (50 e 100 μM) também aumentou significativamente a captação de [³H]-dopamina em cultura de células mesencefálicas (Figura 15B). Além disso, a análise microscópica de cultura de células mesencefálicas tratadas com 100 μM de MPAQ revelou um aumento significativo da rede neurítica quando comparado ao controle (Figura 15C).

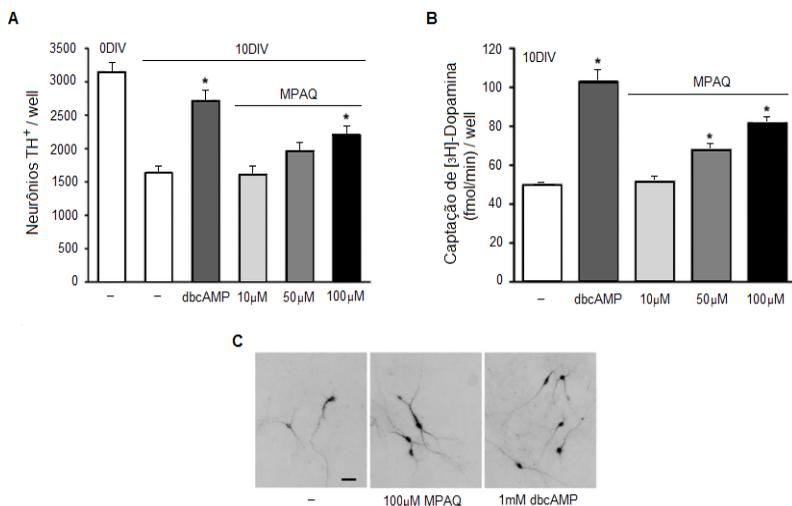


Figura 15. Efeito de concentrações crescentes de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-amino-quinoxalina; 10 – 100 μM) em neurônios dopaminérgicos de cultura de células mesencefálicas. (A) Número de neurônios TH⁺ em cultura de células tratadas com MPAQ por 10 dias *in vitro* (DIV). (B) Quantificação da captação de [H³]-dopamina em 10 DIV de cultura de células tratadas com MPAQ. Os dados apresentam a média ± erro padrão da média gerado de pelo menos três triplicatas de três experimentos independentes. * $P < 0,05$; comparado ao controle (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Dunnett's). TH, tirosina hidroxilase; dbcAMP, N(6),20-O-dibutyryladenosine 3':50 cyclic monophosphate.

4.8. Efeito de MPAQ em cultura de células mesencefálicas desprovidas da atividade de *GDNF*

A Figura 16 mostra o efeito de MPAQ (50 – 100 μM) em cultura de células mesencefálicas desprovidas da atividade biológica de *GDNF*. Na figura 16A pode ser observado que AB-212-NA (anti-*GDNF*; 10 μg/mL) preveniu o aumento do número de neurônios TH⁺ em cultura de células mesencefálicas tratadas com *GDNF* (20 ng/mL). No entanto, o número de neurônios TH⁺ aumentou significativamente quando as células foram tratadas concomitantemente com 100 μM de MPAQ e AB-212-NA. Na figura 16B pode ser observado que a remoção de *GDNF* previamente adicionado ao meio de cultura de células mesencefálicas (10 DIV) reduziu significativamente o número

de neurônios TH⁺. Por outro lado, o número de neurônios TH⁺ aumentou significativamente quando *GDNF* foi removido do meio de cultura e substituído por 50 e 100 μM de MPAQ.

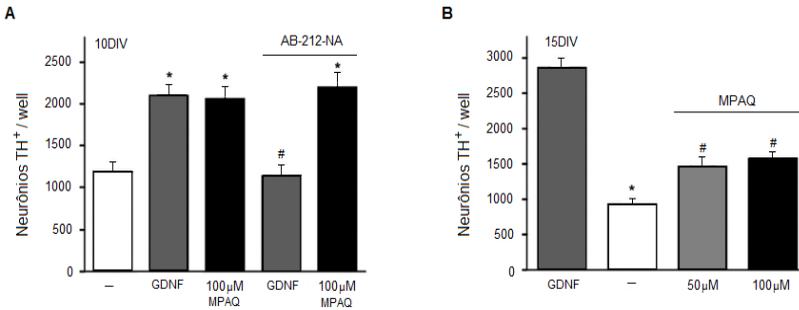


Figura 16. Efeito de MPAQ (2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina; 50 – 100 μM) em cultura de células mesencefálicas desprovidas de *GDNF*. (A) Número de neurônios TH⁺ em cultura de células tratadas com MPAQ (100 μM) por 10 dias *in vitro* (DIV), na presença do anticorpo anti-*GDNF* (AB-212-NA; 10 μg/mL). *GDNF* (20 ng/mL) foi usado como controle positivo. * $P < 0,05$; comparado ao controle; # $P < 0,05$; comparado às culturas tratadas com *GDNF*. (B) Efeito neuroprotetor de MPAQ sobre culturas de células mesencefálicas expostas a *GDNF* (20 ng/mL) por 10 DIV e deprivadas do peptídeo neurotrófico entre o 11 DIV até o 15 DIV. Comparação com culturas mantidas com *GDNF* de forma contínua até o 15 DIV. * $P < 0,05$; comparado às culturas tratadas com *GDNF*. Os dados apresentam a média ± erro padrão da média gerado de pelo menos três triplicatas de três experimentos independentes (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Dunnett's). TH, tirosina hidroxilase; *GDNF*, fator neurotrófico derivado de células gliais; AB-212-NA, anticorpo anti-*GDNF*; DIV, dias *in vitro*.

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento populacional tem como principal consequência o aumento na frequência de enfermidades neurodegenerativas no adulto, porém, a falta de tratamentos eficazes que permitam prevenir, atenuar ou reverter o processo neurodegenerativo permanece um grande desafio para a comunidade científica (Lipton et al., 2007; Imtiaz et al., 2014). Existem inúmeros tratamentos sintomáticos que são eficazes por alguns anos, mas faltam eficiência à medida que a doença progride (Kincses e Vecsei, 2011). Por isso, estratégias terapêuticas alternativas, que consistam no desenvolvimento de moléculas com potencial neuroprotetor, para preservar a população de neurônios vulneráveis em cada enfermidade neurodegenerativa, se fazem necessárias. No entanto, apesar dos intensos esforços de investigação e da descoberta de vários candidatos interessantes, são raros os fármacos que demonstram eficácia durante os ensaios clínicos (Kincses e Vecsei, 2011).

Derivados de quinoxalina representam uma família de compostos de interesse terapêutico por possuir um largo espectro de atividades biológicas (Tanimori et al., 2009; Cushing et al., 2012). Vários estudos tem mostrado que derivados de quinoxalinas que preservam seus anéis aromáticos exibem atividades farmacológicas com ação antifúngica (Ishikawa et al., 2013), antibacteriana (Ishikawa et al., 2013; Vieira et al., 2014), anti-malária (Gil et al., 2014), anticancerígena (Loch-Neckel et al., 2015), antiparasitária (Cogo et al., 2015), anti-tuberculose (Vicente et al., 2011), hipoglicêmica (Pawar e Bhise, 2006), antiviral (Shibinskaya et al., 2011), atividade anti-helmíntica (Cogo et al., 2015), analgésica e anti-inflamatória (Ismail et al., 2005), neuroprotetora (Lo et al., 1997), antidepressiva e antagonismo de receptores NMDA (Deshmukh et al., 2007; Cuenca et al., 2012). No contexto neuronal, por exemplo, a quinoxalina-2,3-diona oferece neuroproteção por reverter os efeitos deletérios do brometo de etídio sobre a fraqueza muscular, descoordenação muscular ou redução da atividade locomotora induzidas em ratos (Jubie et al., 2012). Já a 2,3-di-hidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo-[f]-quinoxalina (NBQX), um derivado de quinoxalina com ação antagonista do receptor de glutamato, exerce efeitos diferenciais sobre a sobrevivência celular e o conteúdo de dopamina em um modelo *in vivo* de DP induzido pela inibição do gene DJ-1A em *Drosophila*, o qual é caracterizado por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, e perda de neurônios dopaminérgicos (Faust et al., 2009).

Neste trabalho, avalia-se a capacidade toxicológica/neuroprotetora do composto derivado de quinoxalina 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ), o qual foi sintetizado a partir do composto 6-aminoquinoxalina através de um método original e altamente seletivo desenvolvido por Hui et al. (2007). Em uma abordagem que leva em consideração parâmetros que avaliam o metabolismo mitocondrial, as concentrações de monoaminas e seus principais metabolitos, a atividade da monoamina oxidase (MAO), uma enzima importante para os processos catabólicos das principais monoaminas, bem como a ativação do sistema imune, observa-se que MPAQ não apresenta efeito tóxico sobre células do SNC de camundongos.

Sabe-se que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são apontados como componentes-chave no processo neurodegenerativo (Kincses e Vecsei, 2011). Células que necessitam de uma alta demanda metabólica e um grande requerimento de energia, como as células neurais, são as mais vulneráveis às alterações que envolvem disfunção mitocondrial. Esta grande demanda energética deve-se ao fato de que os neurônios são células altamente diferenciadas que necessitam de grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembrana, e para os processos de neurotransmissão (Silver e Erecinska, 1998). Assim, considerando a relação existente entre produção de espécies reativas de oxigênio e alterações na respiração mitocondrial (Koopman et al., 2005), o presente trabalho demonstra que o composto sintético MPAQ em geral não altera o consumo de oxigênio de células neurais. Porém, observa-se que 100 μM de MPAQ reduz o consumo de oxigênio durante a respiração mitocondrial máxima, parâmetro que indica a capacidade mitocondrial máxima em transferir elétrons durante a fosforilação oxidativa (Gnaiger, 2001). A redução do consumo de oxigênio durante a respiração mitocondrial máxima poderia sinalizar a inibição, mesmo que mínima, dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, os resultados do presente trabalho demonstram também que MPAQ não prejudica a atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro de camundongos. Além disso, a produção e liberação de lactato em células do sistema nervoso central de camundongos também não é alterada por MPAQ. Juntos os resultados demonstram que o composto MPAQ não altera o metabolismo energético das células neurais. Haja vista que o déficit de ATP celular, característico em um quadro de disfunção mitocondrial, é normalmente restabelecido pela conversão do

metabolismo aeróbio em anaeróbio com consequente aumento das concentrações de lactato (Amorini et al., 2014).

Alterações nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos são também característicos em enfermidades neurodegenerativas à medida que a doença progride (Storga et al., 1996; Zarow et al., 2003; Devos et al., 2010). As interações funcionais entre os sistemas monoaminérgicos são vitais para a regulação de funções cerebrais tais como funções executivas e cognição, função motora e coordenação de movimentos voluntários, assim como emoção e humor. Por isso, uma maior atenção às interconexões anatômicas e interações funcionais entre os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, podem proporcionar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para doenças complexas do SNC. Nesse sentido, o presente trabalho demonstra que o composto MPAQ em geral não altera as concentrações de monoaminas e de seus metabólitos no cérebro de camundongos. Porém, observa-se um potencial efeito de MPAQ sobre o aumento do conteúdo de serotonina. Efeito demonstrado significativamente por 100 μ M de MPAQ.

A enzima MAO tem também um papel fundamental no metabolismo dos neurotransmissores no SNC (Shih et al., 1999). Esta é responsável pela desaminação oxidativa das aminas biogênicas com consequente regulação do conteúdo dos neurotransmissores monoaminérgicos, assim como dos estoques intracelulares de monoaminas (Shih et al., 1999). Por essa razão, os inibidores das isoenzimas da MAO (MAO-A e MAO-B) foram inicialmente usados no tratamento da depressão e são, atualmente, estratégias terapêuticas no tratamento de doenças neurodegenerativas, em particular da DP (Youdim et al., 2006). Dados de estudos pré-clínicos sugerem que a selegilina, um inibidor seletivo da MAO-B, é capaz de bloquear o desenvolvimento da neurotoxicidade induzida por MPTP (Cohen et al., 1984; Heikkila et al., 1984) e proteger neurônios mesencefálicos dopaminérgicos da toxicidade mediada por receptores de glutamato (Mytilineou et al., 1997 a e b), assim como da toxicidade induzida pela depleção de glutathione (Mytilineou et al., 1998). Resultados similares são obtidos com rasagilina, a qual também atua como inibidor seletivo da MAO-B e demonstra aumentar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (Finberg et al., 1998) e proteger contra a morte celular por apoptose induzida por neurotoxinas em células SH-SY5Y (Maruyama et al., 2000; Naoi et al., 2003). Estudos em modelos animais da DP demonstram ainda que o pré-tratamento com selegilina ou rasagilina é capaz de atenuar significativamente os déficits

comportamentais resultantes da exposição à MPTP e 6-OHDA (Kupsch et al., 2001; Blandini et al., 2004). Nesse contexto, o desenvolvimento de potenciais inibidores enzimáticos da MAO torna-se um alvo terapêutico significativo para doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Löhle e Reichmann, 2011). O presente trabalho, portanto, demonstra que o composto sintético MPAQ reduz significativamente a atividade da enzima MAO, inclusive quando as isoformas MAO-A e MAO-B foram avaliadas separadamente. Efeito novamente visualizado na dose de 100 μ M.

A ativação do sistema imune tem sido demonstrada em um amplo espectro de doenças e lesões do SNC (Noremborg, 1994) e o envolvimento da neuroinflamação na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas vem sendo cada vez mais salientado pela comunidade científica (Dzamko et al., 2014). O processo inflamatório predominante em enfermidades neurodegenerativas é sustentado principalmente pela microglia ativada exibindo um fenótipo pró-inflamatório caracterizado pela ativação do NF- κ B, fator de transcrição responsável pela promoção de processos inflamatórios e estresse oxidativo, com conseqüente produção de IFN- γ e recrutamento de macrófagos (Ward et al., 2015). Fenótipo que contribui para a progressão da doença (Ward et al., 2015). A ativação do sistema imune pode, no entanto, ser monitorada através da formação de neopterin, um metabólito secundário da via de síntese da pterina BH₄, amplamente conhecida como marcador sensível da ativação do sistema imune (Fuchs et al., 1989). Neste cenário, os resultados do presente trabalho demonstram que MPAQ não contribui para a ativação do sistema imune. Haja vista que a concentração de neopterin não aumentou no cérebro de camundongos tratados com o composto.

Com base nos resultados apresentados, é possível sugerir que MPAQ não possui efeitos deletérios *per se* no cérebro de camundongos. De forma similar, estudos com outros compostos derivados de quinoxalina também demonstram a inexistência de toxicidade, além de apresentarem propriedades antioxidante frente a uma situação de dano neuronal (Hampela et al., 2002). Nesse sentido, MPAQ foi recentemente demonstrado com potencial para proteção de neurônios dopaminérgicos submetidos a insultos mediados por estresse oxidativo (Le Douaron et al., 2015). Isto, em um contexto experimental em que a morte de neurônios dopaminérgicos resultante do estresse oxidativo ocorre devido à presença de ferro cataliticamente ativo no meio de cultura celular (Guerreiro et al., 2009; Rousseau et al., 2013). Levando em consideração a preservação de um anel aromático na posição 3 do

núcleo quinoxalínico na estrutura química de MPAQ, o que confere potencial para quelação de metais (Hampela et al., 2002), pode-se sugerir que tal mecanismo esteja na origem do efeito protetor de MPAQ no contexto oxidativo. Além disso, sabe-se que moléculas com propriedades antioxidantes podem apresentar potencial valor terapêutico em doenças caracterizadas por estresse oxidativo, como é o caso das doenças neurodegenerativas (Mayo et al., 2005).

Os resultados do presente trabalho demonstram ainda que MPAQ confere proteção para um modelo de cultura de células mesencefálicas onde a neurodegeneração ocorre espontaneamente e de forma seletiva para neurônios dopaminérgicos, como consequência de um mecanismo que envolve astrócitos imaturos e déficit na homeostase do cálcio (Toulorge et al., 2010). MPAQ também aumentou a captação de $[H^3]$ -dopamina por neurônios TH^+ , demonstrando que a restauração de neurônios dopaminérgicos não é apenas funcional (a captação de dopamina é um processo ativo), mas também diferenciada, uma vez que os sítios de captação de DA estão localizados preferencialmente em extensões neuríticas (Ciliax et al., 1995). Hipótese confirmada pelo fato de que neurônios TH^+ exibem redes neuríticas mais desenvolvidas em culturas de células tratadas com o composto MPAQ (Le Douaron et al., 2015).

Os resultados do presente trabalho também demonstram que o efeito protetor de MPAQ sobre a morte espontânea de neurônios dopaminérgicos não é prevenido por anti-*GDNF*, sugerindo que MPAQ não exerce seu efeito neuroprotetore por estimular a produção endógena do peptídeo trófico *GDNF*. Estudos recentes sugerem ainda que o efeito protetor de MPAQ sobre a morte espontânea de neurônios dopaminérgicos poderia estar associado a um efeito repressor sobre as células gliais imaturas presentes no modelo de cultura de células mesencefálicas estudado, visto que este composto derivado de quinoxalina provoca uma redução significativa na incorporação de timidina tritiada em sistemas experimentais muito similares (Mourlevat et al., 2003). Além disso, os resultados aqui apresentados demonstram que MPAQ oferece potencial proteção para neurônios dopaminérgicos mesmo quando esses neurônios amadurecem na presença do péptido trófico *GDNF* e posteriormente são privados dela. Efeito relevante à medida que a ação de MPAQ parece não estar limitada a um curto período de tempo após o plaqueamento e desenvolvimento da cultura celular.

Dessa forma, os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o composto sintético derivado de quinoxalina, MPAQ,

pode ser considerado como uma nova perspectiva neuroprotetora com particular ênfase na degeneração dopaminérgica. Evidência fortalecida pelo fato do composto MPAQ atingir o parênquima cerebral com suficiente eficácia (Le Douaron et al., 2015), uma vez que o insucesso de muitos compostos de interesse terapêutico está relacionado à incapacidade de atravessar a *BBB* (Yasuhara et al., 2007). Ainda, estudos de quantificação através de cromatografia líquida/espectrometria de massa (HPLC-MS) em homogeneizados cerebrais de camundongos ou bem de espectrometria de massa por imagem (MALDI-TOF) em secções de tecido do cérebro de camundongos tratados com MPAQ demonstram que este composto derivado de quinoxalina colocaliza com áreas do cérebro que contêm neurônios dopaminérgicos vulneráveis. No entanto, a administração de MPAQ por via oral demonstra que a meia vida do composto no cérebro de ratos é relativamente curta (Le Douaron et al., 2015), o que pode constituir um fator limitante. Por outro lado, esses resultados são comparáveis com aqueles apresentados por uma única injeção de nicotina (Ghosheh et al., 1999), um composto de referência por demonstrar neuroproteção em modelos da DP em roedores e macacos (Quik et al., 2012). Assim, estudos adicionais em modelos animais são necessários para novos avanços no conhecimento do papel terapêutico de MPAQ, em particular sobre seu potencial papel neuroprotetor.

CAPÍTULO III

PAPEL DA TETRAHIDROBIOPTERINA EM PROCESSOS COGNITIVOS

6. Objetivos
 7. Material e Métodos
 8. Resultados
 9. Discussão
-

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Estudar o metabolismo da tetrahidrobiopterina (BH4), cofator obrigatório para a síntese enzimática de monoaminas e de óxido nítrico, sob condições fisiológicas e/ou neurotóxicas que possibilitem a compreensão do papel deste cofator nos processos cognitivos.

6.2 Objetivos Específicos

6.2.1. Investigar o efeito *ex vivo* da administração de MPTP sobre a ativação do metabolismo da BH4 através da mensuração de neopterina no plasma e no estriado de camundongos C57bl/6;

6.2.2. Investigar o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BH4 sobre a formação da memória na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória e na formação de *LTP* (potenciação de longa duração) em camundongos Swiss albino e C57bl/6, e/ou ratos Wistar, respectivamente;

6.2.3. Investigar o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BH4 sobre o teste comportamental do medo condicionado em um modelo *in vivo* de neuroinflamação aguda induzida por LPS em camundongos C57bl/6, assim como em animais geneticamente modificados (camundongos VGV) que possuem o receptor 2C de serotonina completamente editado;

6.2.4. Investigar o efeito *ex vivo* da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BH4 sobre o conteúdo de nitrito, captação de glutamato e viabilidade celular em fatias do hipocampo de camundongos Swiss albino tratados com L-NAME (inibidor não seletivo de *NOS*).

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1. Experimentos *in vivo* com Tetrahydrobiopterina

7.1.1. Animais

Foram utilizados:

- Camundongos C57bl/6, machos adultos de 60 dias de vida (20-25g), obtidos do Biotério Central do Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), hospital Pitié Salpêtrière, Paris, França, assim como de uma colônia de expansão (3ª geração, irmão/irmã) mantida pelo Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.
- Camundongos VGV (expressam a isoforma totalmente editada do receptor 2C de serotonina; background C57bl/6), machos adultos de 60 dias de vida (15-20g), obtidos do Biotério Central do INSERM, hospital Pitié Salpêtrière, Paris, França.
- Ratos Wistar, machos adultos de 60 dias de vida (190-260g), obtidos do Biotério Central da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Camundongos Swiss albino, machos adultos de 60 dias de vida (45-50g), obtidos a partir do Biotério Central da UFSC, Florianópolis, Brasil.

Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e em um ciclo claro-escuro de 12 horas. Estes foram mantidos em caixas de plástico e separados em grupos de cinco animais, com livre acesso à água e à ração comercial para roedores. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelos Comitês de Ética no Uso de Animais local, assim como pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (PP00425/CEUA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e o seu sacrifício.

7.1.2. Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no ventrículo lateral direito

Cânulas de aço inoxidável (Plastics One, Roanoke, VA, EUA) com comprimento personalizado foram implantadas estereotaxicamente no ventrículo lateral de camundongos e ratos machos adultos. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de

cetamina (55 mg/kg; Virbac, França) e xilasina (11 mg/kg; Bayer) e colocados em um aparato de estereotaxia (Insight Equipamentos®) para o posicionamento da cânula no ventrículo lateral através do uso de coordenadas relativas ao bregma (C57bl/6 e VGV: anteroposterior = -0,34 mm, latero-lateral = +/-1 mm, dorsoventral = -2,3 mm; Wistar: anteroposterior = -0,8 mm, latero-lateral = +/-1,5 mm, dorsoventral = -4,0 mm; Swiss albino: anteroposterior = -0,5 mm, latero-lateral = +/-1 mm, dorsoventral = -2,5 mm) (Franklin e Paxinos, 1997; Paxinos e Watson, 2006). A cânula foi fixada ao crânio com cimento acrílico dental.

7.1.3. Fármacos

Os animais foram injetados intracerebroventricularmente (i.c.v.) com líquido cefalorraquidiano artificial (*aCSF* - do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*; NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ (2.H₂O) 2,5 mM, MgCl₂ (6.H₂O) 1 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM e de NaH₂PO₄ 0,27 mM), BH4 (4-400 pmol; Sigma) ou 8-bromo-monofosfato de guanosina cíclico (8-bromo-cGMP; 20 nmol; RBI) usando uma seringa Hamilton (10 µL) conectada a um tubo de polietileno PE-10 contendo uma agulha de calibre 30-gauge. O volume de infusão foi de 1 µL (*aCSF* e BH4) ou 2 µL (8-bromo-cGMP), injetado durante 1 minuto. N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 10 mg/kg; Sigma), LPS (0,33 mg/kg; Sigma) e dizocilpina (também chamada de MK-801; 0,1 mg/kg; RBI) foram administrados intraperitonealmente (i.p.) em um volume máximo de 100 µL. As soluções foram preparadas no momento do uso e armazenadas de forma adequada à sua conservação. BH4 foi diluída em *aCSF*, enquanto que 8-bromo-cGMP, L-NAME, LPS e MK-801 foram diluídos em água milli-Q. As injeções foram realizadas entre 10 e 12 horas da manhã para prevenir variações induzidas pelo ritmo circadiano dos animais.

7.1.4. Parâmetros comportamentais

As avaliações comportamentais referentes ao teste da esquila inibitória foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC, sob coordenação do Prof. Rui Daniel S. Prediger, assim como com o Departamento de Farmacologia da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, sob coordenação da professora Dra. Mariela Pérez. As avaliações comportamentais referentes ao teste do medo condicionado foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Physiopathologie des Troubles de l'Humeur et de l'Addiction,

localizado no Centro de Pesquisa em Psiquiatria e Neurociências na Université Paris Descartes, Hospital Pitié-Salpêtrière, em Paris, França, sob coordenação da professora Dra. Laurence Lanfumey.

7.1.4.1. Teste da esQUIVA inibitória

O teste comportamental da esQUIVA inibitória foi realizado em uma caixa de acrílico (camundongos: 30 x 20 x 20 cm; ratos: 50 x 25 x 25 cm) contendo uma base condutora de energia (grade com barras de bronze com 1mm de diâmetro e espaçamento de 1cm entre elas) e uma plataforma em acrílico (camundongos: 10 cm² de superfície e 2 cm de altura localizada no centro do assoalho; ratos: 7 x 25 cm de superfície e 2,5 cm de altura localizada no lado esquerdo do assoalho). Durante a sessão de condicionamento, a latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrada e um leve choque nas patas (0,4 mA) durante 2 segundos foi aplicado como estímulo aversivo. Imediatamente após, os animais foram retirados da caixa acrílica. L-NAME (i.p.), MK-801 (i.p.) e 8-bromo-cGMP (i.c.v.) foram administrados 30 minutos antes da sessão de condicionamento, enquanto que BH4 (4 pmol; i.c.v.) foi administrada imediatamente após a sessão de condicionamento. Vinte e quatro horas após, o animal foi submetido ao mesmo procedimento, porém omitindo-se o choque. Um teto de 180 segundos foi estabelecido como medida do teste e o tempo de latência foi tomado como um índice de retenção da memória. Dessa forma, foi possível avaliar a formação da *LTM*, como esquematizado na figura 17.

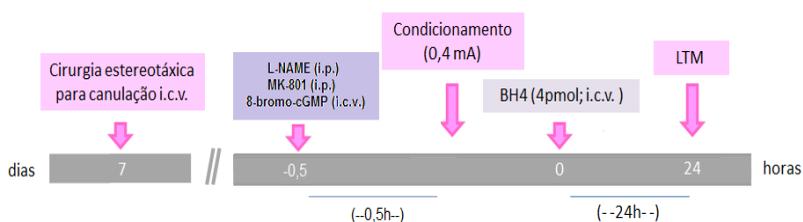


Figura 17. Estratégia experimental para análise da memória de longo prazo (*LTM*) no teste da esQUIVA inibitória. Primeiramente, os animais foram caulados i.c.v. através de cirurgia estereotáxica, permanecendo 7 dias em recuperação. Logo após, um protocolo experimental para a análise de *LTM* foi iniciado onde os animais foram primeiramente administrados com L-NAME (10 mg/kg; i.p.), MK-801 (0,1 mg/kg; i.p.) ou 8-bromo-cGMP (20 nmol; i.c.v.) e após 30 minutos condicionados. Imediatamente após o condicionamento, a administração

i.c.v. de BH4 (4 pmol) foi realizada (primeiro dia). Vinte e quatro horas após (segundo dia) a formação de *LTM* foi avaliada.

7.1.4.2. Teste do medo condicionado

O medo condicionado foi avaliado através de três dias consecutivos de testes comportamentais realizados em uma câmara operante (26 x 18 x 22 cm) com paredes laterais de alumínio, paredes anterior e posterior de acrílico, e um piso com grade de aço inoxidável (MED Associates, St Albans, VT). No primeiro dia, todos os animais (camundongos C57bl/6 ou VGV) foram colocados individualmente na câmara de condicionamento contendo odor de baunilha e permaneceram ambientando durante 3 minutos. Em seguida, um som (estímulo condicionado; *CS* - do inglês, *conditioned stimulus*) de 2500 Hz de frequência e intensidade de 85 dB apresentado por 30 segundos e seguido de um choque de 0,75 mA por 2 segundos (estímulo não-condicionado; *US* - do inglês, *unconditioned stimulus*). Logo após, um intervalo inter-trial (*ITI* - do inglês, *inter trial interval*) se estendeu por 2 minutos. O ciclo de *CS-US-ITI* repetiu-se por seis vezes. Vinte e quatro horas após (segundo dia), o condicionamento do medo contextual foi avaliado. Os animais retornaram para a mesma câmara onde ocorreu o condicionamento permitindo-se a exploração do ambiente durante 20 minutos, sem apresentação de *CS* ou *US*. No terceiro dia, a memória do medo condicionado foi avaliada. Os animais retornaram para a câmara após alteração do contexto (nenhum odor à baunilha, adição de papel quadriculado nas paredes posterior e anterior, bem como alteração do padrão de luz dentro da câmara). Nesta última etapa, apenas o *CS* foi apresentado 6 vezes separados por um *ITI* de 2 minutos (avaliação da evocação da memória; Figura 18) ou 40 vezes separados por um *ITI* de 2 segundos (avaliação da extinção da memória; Figura 19). Todas as sessões foram gravadas usando câmeras infravermelhas e controladas por interface de um sistema informatizado (MED Associates, St Albans, VT). O comportamento de congelamento (do inglês, *freezing*), definido como ausência completa de movimentos voluntários, exceto para a respiração, foi medido manualmente a cada 2 segundos e expresso através da percentagem de tempo em que o animal permaneceu em congelamento. LPS foi administrado (i.p.) imediatamente após o teste do condicionamento do medo contextual e BH4 (4 pmol) foi administrada (i.c.v.) 24 horas antes do teste de evocação da memória do medo condicionado ou do teste de extinção da memória do medo condicionado, conforme as figuras 18 e 19.

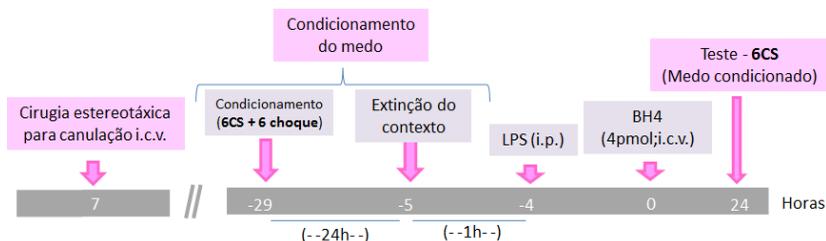


Figura 18. Estratégia experimental para análise da consolidação da memória no teste do medo condicionado. Primeiramente, os animais foram canulados i.c.v. através de cirurgia estereotáxica, permanecendo 7 dias em recuperação. Logo após, um protocolo experimental para condicionamento do medo foi iniciado e os animais condicionados (primeiro dia). Vinte e quatro horas após (segundo dia) o condicionamento do medo contextual foi avaliado, o qual foi seguido pela administração i.p. de LPS (0,33 mg/kg) e a administração i.c.v. de BH4 (4 pmol). Por fim, a evocação da memória foi avaliada 24 horas após a administração de BH4 (terceiro dia). CS, estímulo condicionado.

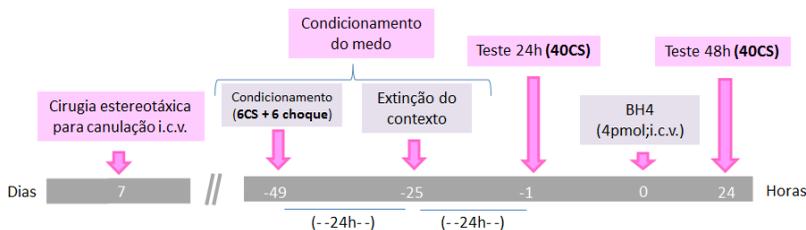


Figura 19. Estratégia experimental para análise da extinção da memória no teste do medo condicionado. Primeiramente, os animais foram canulados i.c.v. através de cirurgia estereotáxica, permanecendo 7 dias em recuperação. Logo após, um protocolo experimental para condicionamento do medo foi iniciado e os animais condicionados (primeiro dia). Vinte e quatro horas após (segundo dia) o condicionamento do medo contextual foi avaliado e novamente 24 horas mais tarde (terceiro dia) o primeiro teste de extinção da memória foi realizado, seguido pela administração i.c.v. de BH4. Por fim, o segundo teste de extinção da memória foi realizado 24 horas após a administração de BH4 (quarto dia). CS, estímulo condicionado.

7.2. Experimentos *ex vivo* com tetrahidrobiopterina

7.2.1. Administração de MPTP e indução de parkinsonismo experimental

7.2.1.1. Administração intranasal de MPTP

Após o relato de intoxicações acidentais (Wright et al., 1984; Langston e Palfreman, 1995), tem sido demonstrado que a via intranasal (i.n.) representa uma eficiente via para a administração de MPTP e indução de parkinsonismo experimental em roedores (Dluzen e Kefalas, 1996; Prediger et al., 2006; Rojo et al., 2006; Moreira et al., 2010). O protocolo de administração utilizado foi adaptado do método original desenvolvido por Prediger et al. (2010 e 2011). Camundongos C57bl/6, livres de anestesia, receberam três administrações de MPTP em ambas as narinas (10,5-19,6 μL /narina de solução 20 mg/mL), separados por intervalos 1 minuto para cada narina, e 3 horas entre cada administração, totalizando a dose de 65 mg/kg. O tratamento foi realizado através de um tubo de polietileno (PE-10) inserido 3-4 mm nas narinas dos animais, com taxa de infusão de 10 μL /minuto (Figura 20). Sete dias após a indução do parkinsonismo os animais foram sacrificados e o plasma separado para posterior determinação da concentração de neopteina.

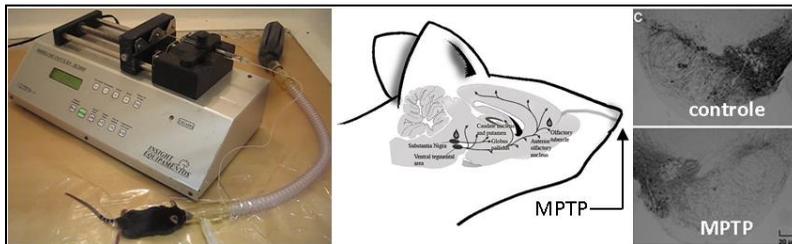


Figura 20. Administração intranasal (i.n.) de MPTP. À esquerda, a administração intranasal é realizada através de um tubo de polietileno PE10 conectado a uma microseringa e uma bomba de infusão. Esta via permite o acesso de substâncias ao sistema nervoso central via nervo olfatório e facial (meio), sendo que o tratamento com MPTP pela via intranasal diminui o número de neurônios TH⁺ na SN de camundongos C57bl/6 (direita) (Prediger et al., 2010).

7.2.1.2. Administração intraperitoneal de MPTP

Para a indução de parkinsonismo através da administração intraperitoneal (i.p.) de MPTP, camundongos C57bl/6 machos adultos, livres de anestesia, receberam quatro injeções i.p. de MPTP (20 mg/kg) diluído em solução salina (NaCl 0,9 %). As injeções foram separadas por intervalos de 2 horas, totalizando a dose de 80 mg/kg (Salazar et al., 2008). Um dia, 2, 4 ou 7 dias após a indução do parkinsonismo os animais foram sacrificados e o estriado coletado para posterior determinação da concentração de neopteína (Dantas et al., 2013).

7.2.2. Eletrofisiologia

As avaliações eletrofisiológicas foram realizadas em colaboração com o Departamento de Farmacologia da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, sob coordenação da professora Dra. Mariela Pérez.

Para as análises eletrofisiológicas, ratos Wistar machos adultos foram sacrificados 24 horas após a administração *in vivo* de BH4 (4 pmol; i.c.v.) e fatias hipocâmpais (400 μ m) foram colocadas em uma câmara de registro (BSC - BU Harvard Apparatus), perfundidas com tampão Krebs (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 10 mM e CaCl₂ 1,3 mM) saturado com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A taxa de perfusão foi de 1,6 mL/minuto enquanto que a temperatura da solução do banho foi mantida a 28°C por um regulador de temperatura (TC - 202A Harvard Apparatus). Potenciais pós-sinápticos excitatórios (*fEPSPs* - do inglês, *field excitatory postsynaptic potentials*) foram evocados com um eletrodo estimulante introduzido na via perfurante (*PP* - do inglês, *perforant pathway*) e um eletrodo de registro inserido na camada de células granulares do corpo denteado (Figura 21B). Somente fatias que mostraram uma resposta estável foram incluídas. Os *fEPSPs* que responderam a pulsos de 0,2 Hz (0,5 ms, 10 mA cada) foram amostrados a cada 5 minutos durante um período de 20-30 minutos (*baseline*). Uma vez que não foram observadas alterações na amplitude dos *fEPSPs*, o protocolo de estimulação foi aplicado para determinar a frequência geradora de *LTP*. O protocolo de estimulação consistiu em um trem de pulsos (0,5 ms, 10 mA cada) de 2 segundos de duração (tétano), com aumento de frequência variável (5-200 Hz), que foi entregue a *PP* por um gerador de pulso A310 Accupulser (World Precision Instruments Inc. , EUA). Após o tétano, um novo *fEPSP* médio foi registrado a 0,2 Hz e quando a formação de *LTP* não foi observada, uma nova estimulação com frequência mais elevada foi

aplicada. O *LTP* foi considerado existente quando a amplitude do *fEPSP* aumentou em pelo menos 30 %, quando comparada ao *fEPSP* basal, e persistiu durante 60 minutos (Figura 21C). Uma vez formado o *LTP*, nenhum outro tétano foi aplicado. Para cada animal, uma segunda fatia hipocampal foi avaliada para confirmar o limiar de geração de *LTP* através da aplicação do tétano na mesma frequência em que o *LTP* foi induzido anteriormente. Não foram observadas diferenças na geração de *LTP* entre fatias.

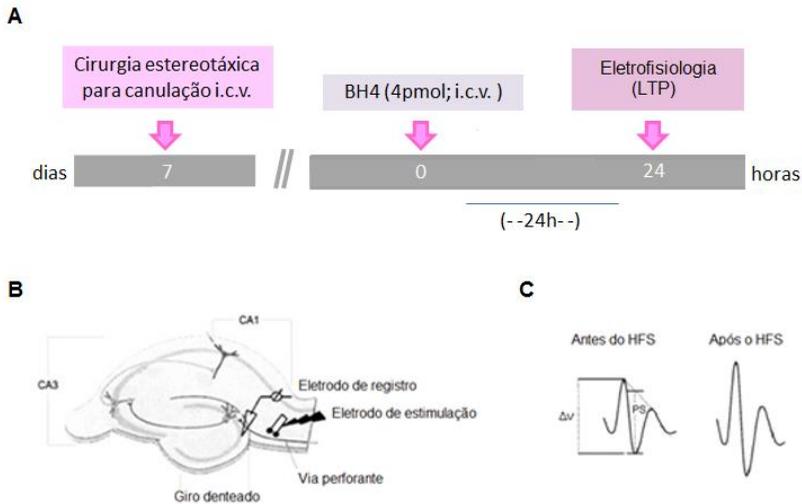


Figura 21. Estratégia experimental para análise da geração de LTP. Primeiramente, ratos Wistar machos adultos foram canulados i.c.v. através de cirurgia estereotáxica, permanecendo 7 dias em recuperação. Vinte e quatro horas após, os animais foram sacrificados por decapitação, a estrutura hipocampal foi separada e fatiada (400 μm) para análise eletrofisiológica. (A) Estratégia experimental. (B) Posicionamento dos eletrodos de estimulação e registro. (C) Diferença de amplitude entre o *fEPSP* basal e o *fEPSP* após estímulo tétano.

7.2.3. Determinação do conteúdo de nitrito

O conteúdo de nitrito, um metabolito estável do *NO*, foi determinado através do método baseado na reação de Griess (Gold, 1986). Camundongos Swiss albino machos adultos foram sacrificados 24 horas após a administração de BH4 (4 pmol; i.c.v.) e L-NAME (i.p.) e o hipocampo foi homogeneizado para a análise do conteúdo de nitrito.

Volumes iguais do reagente de Griess [N-(1-naftil) dicloridrato de etilenodiamina 0,1 %, sufamilamida 1 %, e ácido fosfórico 2,5 % (todos de Sigma)] e de amostra foram misturados, incubados durante 10 minutos a 22°C e a absorbância lida a 550 nm. As concentrações de nitrito presentes na amostra foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito (Sigma).

7.2.4. Captação de glutamato

A captação de L-[³H] glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al., 2005. Camundongos Swiss albino machos adultos foram sacrificados 24 horas após a administração *in vivo* de BH4 (4 e 400 pmol; i.c.v.) e fatias do hipocampo foram mantidas em um meio contendo tampão Krebs (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 10 mM e CaCl₂ 1,3 mM) saturado com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ por 30 minutos. Em seguida, o tampão Krebs foi retirado e as fatias incubadas com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) ou HBSS colina (para retirar o Na⁺, NaCl e Na₂HPO₄ foram substituídos por cloreto de colina 137 mM) por 15 minutos. A captação foi iniciada após a adição de 0,33 µCi/ml de L-[³H] glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100 µM, por 7 minutos. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas 2 vezes com HBSS ou HBSS-colina gelados. Em seguida, as fatias foram solubilizadas em uma solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01 % e incubadas *overnight*. A determinação do conteúdo intracelular de L-[³H] glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida. A absorção independente de sódio foi determinada usando cloreto de colina no lugar de cloreto de sódio no tampão HBSS. A absorção não específica (independente de sódio) foi subtraída da absorção total para obter a absorção específica de glutamato (dependente de sódio).

7.2.5. Ensaio de viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada em fatias do hipocampo de camundongos suíços machos adultos 24 horas após a administração de BH4 (4 e 400 pmol; i.c.v.). O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzólil-2,5 difeniltetrazólio) baseia-se na clivagem deste composto por desidrogenases mitocondriais formando um composto púrpura chamado formazan. A formação do formazan foi analisada espectrofotometricamente a 570 nm. Os resultados foram

expressos em percentagem do controle, no qual foi atribuído 100 % de atividade enzimática (Mosmann, 1983).

7.2.6. Determinação do conteúdo de neopterin por HPLC

A determinação do conteúdo de foi realizada no plasma e/ou homogenato do estriado de camundongos C57bl/6 machos adultos tratados in vivo com MPTP. O preparo das amostras e a identificação e quantificação de neopterin foram realizadas conforme descrito no item 4.1.8.2.

7.3. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (*BSA* - do inglês, *bovine serum albumin*) como padrão.

7.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou como mediana \pm intervalo interquartil quando o tempo de latência dos animais em descer da plataforma no teste da esQUIVA inibitória e o tempo de congelamento dos animais no teste do medo condicionado foram avaliados. A comparação entre as médias foi realizada com teste-t de Student e a interação entre os fatores em estudo foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via, com medidas repetidas quando necessário. Os testes post-hoc foram: Newman-Keuls, Tukey e Dunn's. A comparação das medianas foi realizada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney. Apenas valores significativos são citados no texto. Diferenças entre os grupos foram considerados significativas quando $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism 5[®].

8. RESULTADOS

8.1. Efeito da administração de MPTP sobre a concentração de neopterina no plasma e estriado de camundongos C57bl/6

A Figura 22A mostra o efeito da administração i.n. de MPTP sobre a concentração de neopterina no plasma de camundongos C57bl/6 machos adultos. Na figura pode ser observado que a concentração de neopterina aumentou significativamente no plasma de animais tratados com MPTP [$t_{(4,10)} = 2,744$, $P = 0,0288$]. A Figura 22B mostra o efeito da administração i.p. de MPTP sobre a concentração de neopterina no estriado de camundongos C57bl/6 machos adultos. Na figura pode ser observado que a concentração de neopterina aumentou significativamente no estriado de animais tratados com MPTP a partir do primeiro dia de tratamento até atingir concentrações máximas de aproximadamente 4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido [$F_{(4,10)} = 22,09$, $P = 0,0002$].

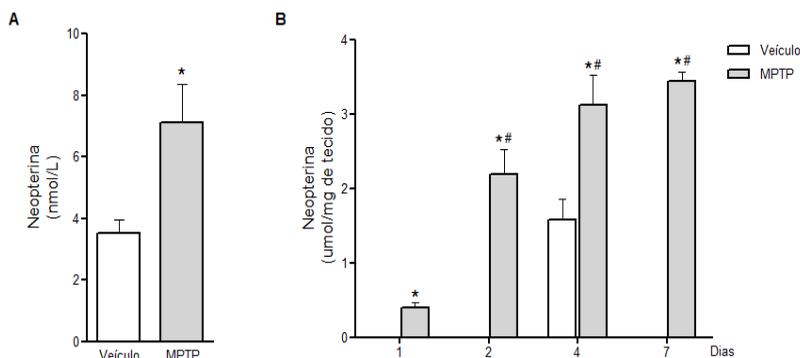


Figura 22. Efeito da administração de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) sobre a concentração de neopterina no plasma (A) e no estriado (B) de camundongos C57bl/6 machos adultos. Administração de MPTP: i.n. (65 mg/kg) em (A) e i.p. (80 mg/kg) em (B). O conteúdo de neopterina foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC acoplado a detector de fluorescência). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao veículo. # $P < 0,05$; comparado ao veículo [Teste-*t* de Student (A); ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey (B)].

8.2. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino

A Figura 23 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4, 400 e 4000 pmol de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos. Pode ser observado na figura que doses elevadas de BH4 como 400 e 4000 pmol reduziram significativamente o tempo de latência dos animais em descer da plataforma durante o teste da esQUIVA inibitória [$U_{(6, 24)} = 0,000$; $P = 0,0043$], enquanto 4 pmol de BH4 aumentou o tempo de latência dos animais em descer da plataforma quando comparado ao grupo controle [$U_{(6, 24)} = 0,000$; $P = 0,0079$].

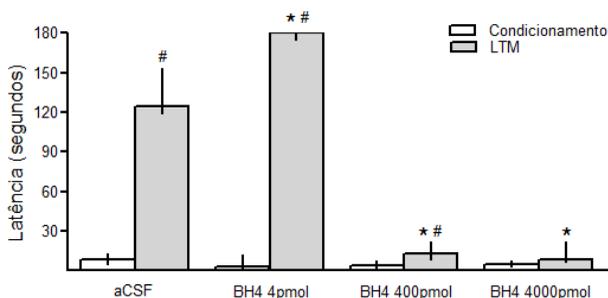


Figura 23. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4, 400 e 4000 pmol; 1 uL) sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica. As barras representam o tempo de latência dos animais para descer da plataforma: barras brancas representam o período de condicionamento (sessão de aquisição da memória), e barras cinzas representam a evocação da *LTM* 24 horas após o condicionamento dos animais e administração de BH4 (ver Figura 10). Os dados apresentam a mediana \pm desvio interquartil. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (Mann-whitney). # $P < 0,05$; comparado ao período de condicionamento dos animais (Mann-whitney). *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; *LTM*, memória de longo prazo.

8.3. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em diferentes linhagens de roedores

A Figura 24 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4 pmol de BH4 sobre a tarefa comportamental da esquila inibitória em camundongos Swiss albino, camundongos C57bl/6, assim como em ratos Wistar machos adultos. Pode ser observado na Figura 24A que a administração de BH4 (4 pmol) provocou um aumento no tempo de latência em descer da plataforma nos camundongos Swiss albino [$U_{(6, 12)} = 0,000$; $P = 0,0079$]. Efeitos similares foram observados após a administração da BH4 em camundongos C57bl/6 [$U_{(5, 10)} = 0,000$; $P = 0,0080$] (Figura 24B) e ratos Wistar [$U_{(9, 18)} = 0,000$; $P = 0,0004$] (Figura 24C).

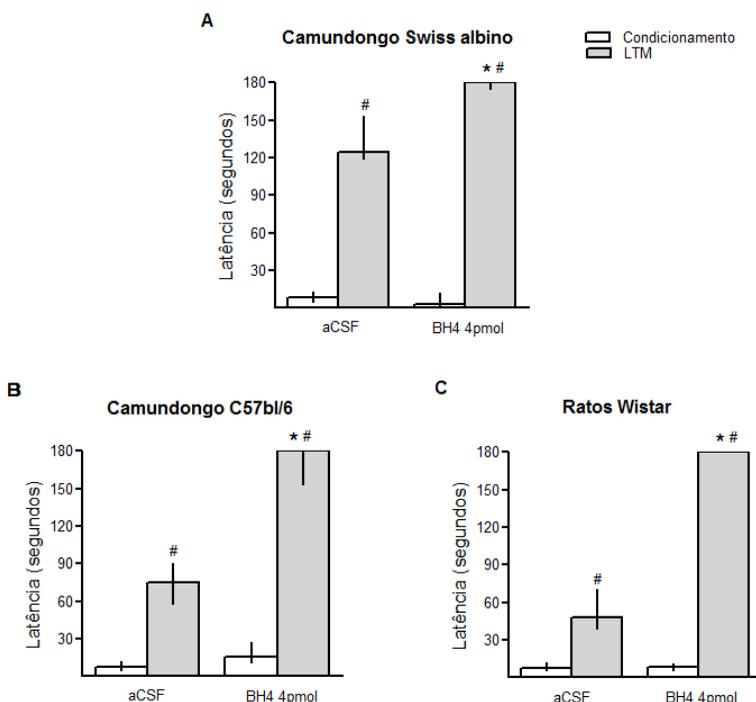


Figura 24. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 uL) sobre a tarefa comportamental da esquila inibitória em camundongos Swiss albino (A), C57bl/6 (B) e ratos Wistar (C) machos adultos. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica. As barras representam o tempo de latência dos animais para descer da plataforma: barras brancas

representam o período de condicionamento (sessão de aquisição da memória), e barras cinzas representam a evocação da *LTM* 24 horas após o condicionamento dos animais e administração de BH4 (ver Figura 10). Os dados apresentam a mediana \pm desvio interquartil. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (Mann-whitney). # $P < 0,05$; comparado ao período de condicionamento dos animais (Mann-whitney). *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; *LTM*, memória de longo prazo.

8.4. Efeito da administração de BH4 sobre o teste do medo condicionado durante o estado de neuroinflamação aguda induzida por LPS em camundongos C57bl/6

A Figura 25 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4pmol de BH4 sobre o teste do medo condicionado em camundongos C57bl/6 machos adultos previamente tratados com LPS (0,33 mg/kg) de acordo com a Figura 18. As Figuras 25A-B mostram o condicionamento dos animais durante o estímulo condicionado (*CS*; Figura 25A) e o intervalo inter-trial (*ITI*; Figura 25B), enquanto a Figura 25C mostra o condicionamento do medo contextual. As Figuras 25D-E mostram a evocação da memória durante o estímulo condicionado (*CS*; Figura 25D) e o intervalo inter-trial (*ITI*; Figura 25E), onde observa-se a redução significativa do congelamento nos animais tratados com LPS [$U_{(5, 20)} = 0,5000$; $P < 0,0160$] e a restauração do mesmo quando os animais foram administrados com LPS e BH4 [$U_{(5, 20)} = 1.500$; $P = 0,0236$].

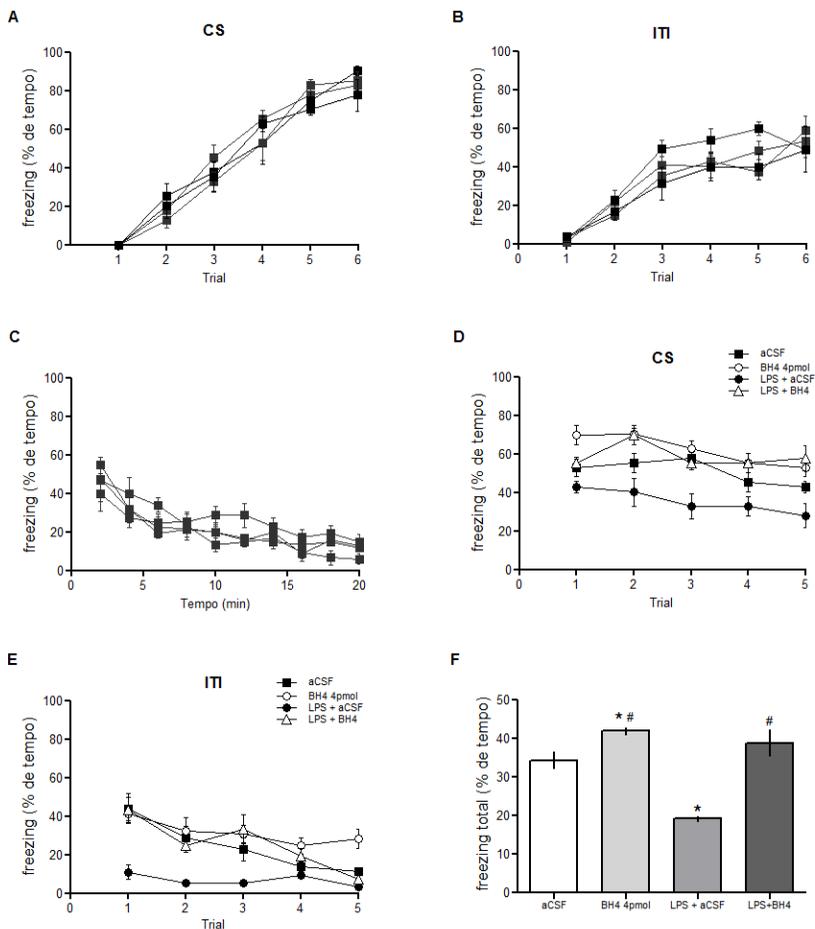


Figura 25. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre o teste do medo condicionado em camundongos C57Bl/6 machos adultos. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica e tratados com LPS (0,33 mg/kg; ver Figura 11). A porcentagem de congelamento dos animais foi avaliada seguindo os seguintes parâmetros: (A) durante o CS no momento do condicionamento, (B) durante o *ITI* no momento do condicionamento, (C) durante o teste de condicionamento do medo contextual, (D) durante o CS no teste de evocação da memória do medo condicionado, (E) durante o *ITI* no teste de evocação da memória do medo condicionado. Os gráficos (A, B, C, D e E) estão representados pelos seguintes símbolos: ■ grupo controle (salina i.p. + aCSF i.c.v.), ○

grupo BH4 (salina i.p. + BH4 i.c.v.), ● grupo LPS (LPS i.p. + *aCSF* i.c.v.), Δ grupo LPS + BH4 (LPS i.p. + BH4 i.c.v.). (F) Histograma representando a porcentagem de congelamento total (*CS* + *ITI*) durante o teste de evocação da memória do medo condicionado. Os dados apresentam a média erro padrão da média (A, B, C, D e E) e a mediana ± desvio interquartil (F). * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$; comparado ao grupo LPS [ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunns (A, B, C, D e E); Mann-whitney (F)]. *CS*, estímulo condicionado; *ITI*, intervalo inter-trial; *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; LPS, lipopolissacarídeo.

8.5. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre o teste do medo condicionado em camundongos VGV (receptor 2C da serotonina completamente editado)

A Figura 26 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4 pmol de BH4 sobre o teste do medo condicionado em camundongos VGV machos adultos. As Figuras 26A-B mostram o condicionamento dos animais durante o estímulo condicionado (*CS*; Figura 26A) e o intervalo inter-trial (*ITI*; Figura 26B), enquanto a figura 26C mostra o condicionamento do medo contextual e as figuras 26D-E mostram o período do *CS* do primeiro teste de extinção da memória do medo condicionado. Durante estes três primeiros momentos não houveram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, uma vez que a administração de BH4 foi realizada somente após o primeiro teste de extinção da memória. As Figuras 26F-G mostram o segundo teste de extinção da memória do medo condicionado, onde o congelamento máximo, característico em camundongos VGV (Kawahara et al., 2008) durante a extinção da memória, reduziu significativamente no grupo de animais administrados com BH4 [$U_{(6, 12)} = 0,000$; $P = 0,0001$].

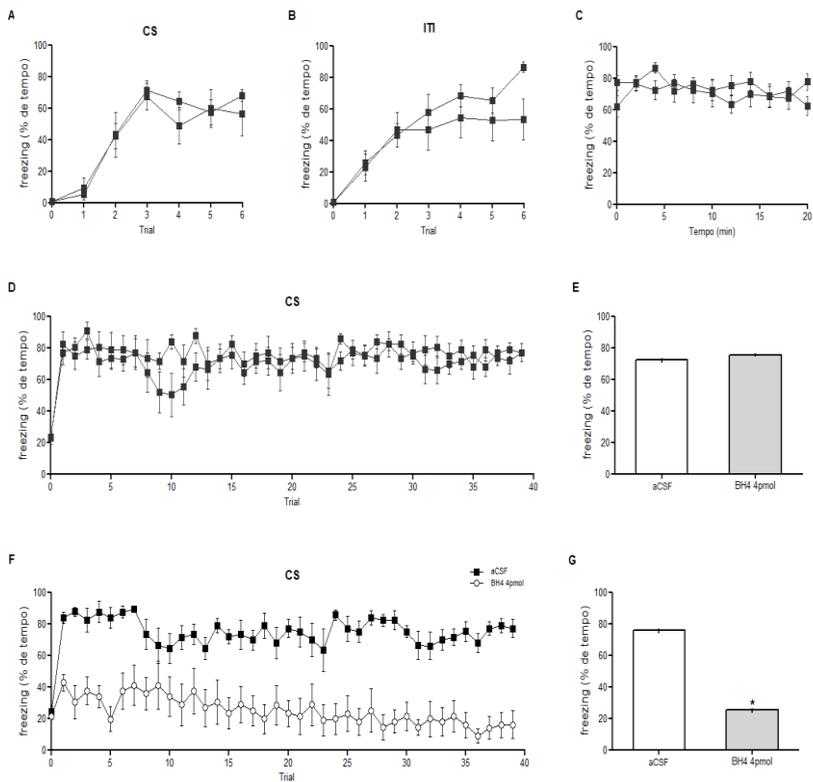


Figura 26. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre o teste do medo condicionado em camundongos VGV machos adultos. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica. A porcentagem de congelamento dos animais foi avaliada seguindo os seguintes parâmetros: (A) durante o CS no momento do condicionamento, (B) durante o ITI no momento do condicionamento, (C) durante o teste de condicionamento do medo contextual, (D) durante o CS no primeiro teste de extinção da memória do medo condicionado. (E) Histograma representando a porcentagem de congelamento dos animais durante o CS no primeiro teste de extinção da memória do medo condicionado. (F) Porcentagem de congelamento durante o CS no segundo teste de extinção da memória do medo condicionado. (G) Histograma representando a porcentagem de congelamento dos animais durante o CS no segundo teste de extinção da memória do medo condicionado. Os gráficos (A, B, C, D e F) estão representados pelos seguintes símbolos:

■ grupo controle (*aCSF*, i.c.v.), ○ grupo BH4 (BH4, i.c.v.). Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média (A, B, C, D e F) e a mediana \pm desvio interquartil (E e G). * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle [ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunns (A, B, C, D e F); Mann-whitney (E e G)]. CS, estímulo condicionado; ITI, intervalo inter-trial; *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial.

8.6. Efeito da administração de BH4 sobre a geração de LTP hipocampal em ratos Wistar

A Figura 27 mostra o efeito da administração i.c.v. de BH4 (4 pmol; 1 μ L) sobre o processo de geração de LTP hipocampal em ratos Wistar. Na Figura 26A pode ser observado que 4 pmol de BH4 não possui efeito sobre a geração de potenciais pós-sinápticos do tipo excitatórios (*fEPSP*), quando comparado ao grupo controle. No entanto, a Figura 26B mostra que a administração de 4 pmol de BH4 diminuiu significativamente o limiar para a geração de LTP sob estímulo de frequência variável, quando comparado ao grupo controle [$t_{(6, 12)} = 10,73$; $P = 0,001$].

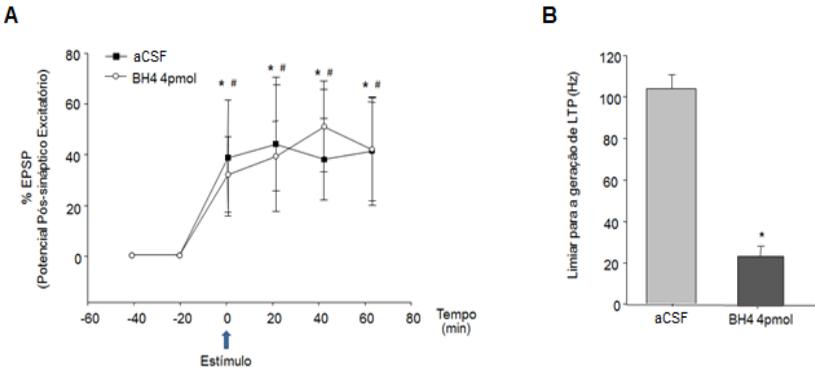


Figura 27. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre a geração do potencial de longa duração (LTP) em ratos Wistar. (A) Geração de *fEPSP* mediante estimulação supra-máxima (3 pulsos de 10 Hz e 1 segundo de duração cada um, separados por um intervalo de tempo de 20 segundos). Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média da porcentagem de *fEPSP* gerado de quatro experimentos independentes. * $P < 0,001$; comparado ao basal do grupo controle; # $P < 0,001$; comparado ao basal do grupo tratado com BH4. (B) Limiar para geração de LTP. Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,001$; comparado ao grupo

controle [ANOVA de uma via com medidas repetidas seguido do teste *post hoc* de Newman Keuls (C); Teste-*t* de Student (D)]. *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; *EPSP*, potencial pós-sináptico excitatório.

8.7. Efeito da administração i.c.v. BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino tratados com L-NAME (inibidor da NOS)

A Figura 28 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4 pmol de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos tratados com L-NAME (10 mg/kg; ver Figura 17). Na figura pode ser observado que o tratamento com L-NAME reduziu significativamente o tempo de latência dos animais em descer da plataforma durante o teste da esQUIVA inibitória [$U_{(7, 14)} = 0,0000$; $P = 0,0006$], enquanto 4 pmol de BH4 aumentou o tempo de latência dos animais em descer da plataforma quando comparado ao grupo controle [$U_{(7, 14)} = 0,0000$; $P = 0,0012$]. No entanto, a redução do tempo de latência dos animais em descer da plataforma não foi revertida quando L-NAME e BH4 foram administrados concomitantemente.

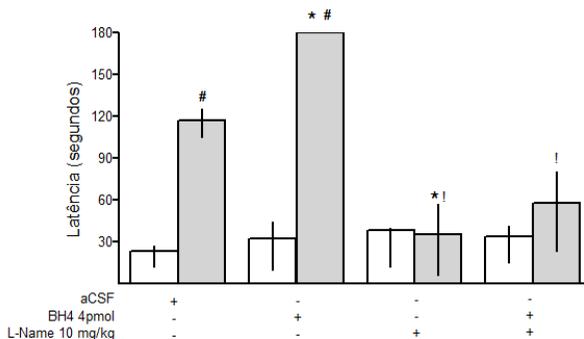


Figura 28. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino adultos tratados com L-NAME. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotóxica e tratados com L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster; 10 mg/kg; i.p.; ver Figura 17). As barras representam o tempo de latência dos animais para descer da plataforma: barras brancas representam o período de condicionamento (sessão de aquisição da memória), e barras cinzas representam a evocação da *LTM* 24 horas

após o condicionamento dos animais e a administração de BH4. L-NAME foi administrado 30 minutos antes do condicionamento dos animais, enquanto BH4 foi administrada imediatamente após o condicionamento dos animais. Os dados apresentam a mediana \pm desvio interquartil. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$; comparado ao período de condicionamento dos animais. ! $P < 0,05$; comparado ao grupo BH4 (Mann-whitney). *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; *LTM*, memória de longo prazo.

8.8. Efeito da administração i.c.v. BH4 sobre o conteúdo de nitrito em camundongos Swiss albino tratados com L-NAME (inibidor da NOS)

A Figura 29 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4 pmol de BH4 sobre o conteúdo de nitrito em camundongos Swiss albino machos adultos tratados com L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster; 10 mg/kg). Na figura pode ser observado que 4 pmol de BH4 aumentou significativamente o conteúdo de nitrito quando comparado ao grupo controle [$t_{(6, 12)} = 4,066$; $P = 0,0153$]. Por outro lado, L-NAME reduziu significativamente o conteúdo de nitrito quando comparado ao grupo controle [$t_{(6, 12)} = 8,858$; $P = 0,0030$], efeito que não foi revertido pela administração concomitante de BH4.

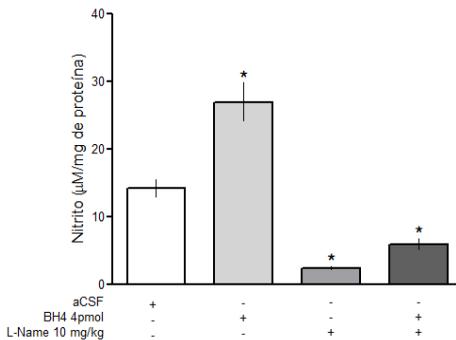


Figura 29. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre o conteúdo de nitrito em camundongos Swiss albino machos adultos tratados com L-NAME. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica e tratados com L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster; 10 mg/kg; i.p.). O gráfico representa o conteúdo de nitrito quantificado através do método de Griess e analisado em fatias hipocâmpais. BH4 foi

administrada 30 minutos após a administração de L-NAME nos animais. Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (Teste - t de Student). aCSF, líquido cefalorraquidiano artificial.

8.9. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino tratados com MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e 8-bromo-cGMP (análogo cGMP)

A Figura 30 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4pmol de BH4 sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Swiss albino machos adultos tratados com MK-801 (0,1 mg/kg; i.p.) e 8-bromo-cGMP (20 nmol; i.c.v.) (ver Figura 17). Na figura pode ser observado que MK-801 reduziu significativamente o tempo de latência dos animais em descer da plataforma durante o teste da esQUIVA inibitória [$U_{(7, 14)} = 0,0000$; $P = 0,0007$], mesmo quando BH4 foi administrada concomitantemente [$U_{(7, 14)} = 3,000$; $P = 0,0022$]. Por outro lado, 8-bromo-cGMP aumentou significativamente o tempo de latência dos animais em descer da plataforma quando comparado ao grupo [$U_{(7, 14)} = 0,0000$; $P = 0,0016$], assim como BH4 [$U_{(7, 14)} = 0,0000$; $P = 0,0016$]. No entanto, o tempo de latência dos animais em descer da plataforma durante o teste da esQUIVA inibitória reduziu significativamente em animais tratados concomitantemente com MK-801 e 8-bromo-cGMP [$U_{(7, 14)} = 1,000$; $P = 0,0081$], efeito que se manteve mesmo com a adição de BH4 [$U_{(7, 14)} = 0,000$; $P = 0,0016$].

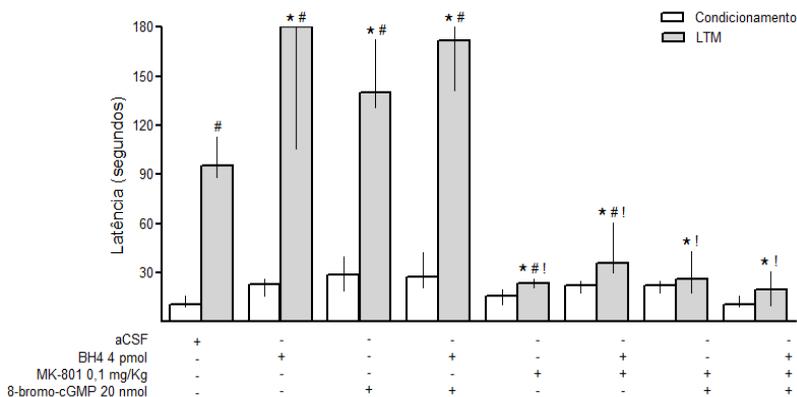


Figura 30. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 pmol; 1 μ L) sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em

camundongos Swiss albino machos adultos tratados com MK-801 e 8-bromo-cGMP. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica e tratados com MK-801 (dizocilpina; 0,1 mg/kg; i.p.) e 8-bromo-cGMP (20 nmol; i.c.v.) (ver Figura 17). As barras representam o tempo de latência dos animais para descer da plataforma: barras brancas representam o período de condicionamento (sessão de aquisição da memória), e barras cinzas representam a evocação da *LTM* 24 horas após o condicionamento dos animais e administração de BH4. MK-801 e 8-bromo-cGMP foram administrados 30 minutos antes do condicionamento dos animais e BH4 foi administrada imediatamente após o condicionamento dos animais. Os dados apresentam a mediana \pm desvio interquartil. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$; comparado ao período de condicionamento dos animais. † $P < 0,05$; comparado ao grupo BH4 (Mann-whitney). *aCSF*, líquido cefalorraquidiano artificial; *LTM*, memória de longo prazo.

8.10. Efeito da administração i.c.v. de BH4 sobre a captação de glutamato e a viabilidade celular em camundongos Swiss albino

A Figura 31 mostra o efeito da administração i.c.v. de 4 e 400 pmol de BH4 sobre a captação de glutamato e a viabilidade celular em camundongos Swiss albino machos adultos. Na figura pode ser observado que 4 pmol de BH4 aumentou significativamente a captação de glutamato [$t_{(5, 10)} = 3,323$; $P = 0,0450$] (Figura 31A) e não teve efeito sobre a viabilidade celular (Figura 31B). Por outro lado, 400 pmol de BH4 não alterou a captação de glutamato (Figura 31A), mas diminuiu significativamente a viabilidade celular [$t_{(5, 10)} = 2,845$; $P = 0,0294$] (Figura 31B).

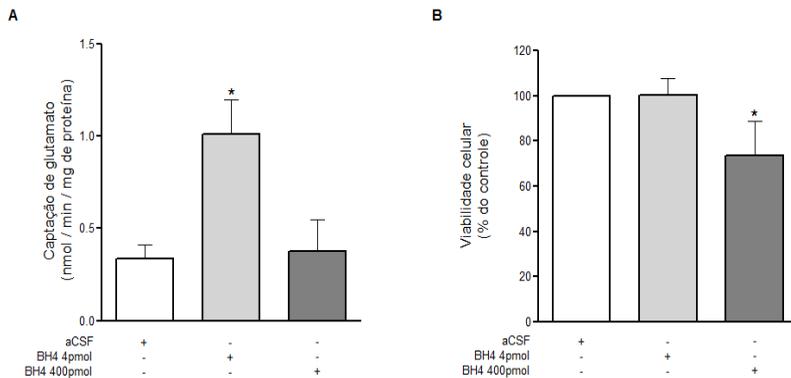


Figura 31. Efeito da administração i.c.v. de tetrahydrobiopterina (BH4; 4 e 400 pmol; 1 μ L) sobre a captação de glutamato e a viabilidade celular em camundongos Swiss albino machos adultos. Os animais foram canulados no ventrículo lateral direito por meio de cirurgia estereotáxica. (A) Representa a captação de glutamato em fatias hipocâmpais de animais administrados *in vivo*. (B) Representa a viabilidade celular quantificada através do método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzólil-2,5 difeniltetrazólio) nas fatias hipocâmpais de animais administrados *in vivo*. Os dados apresentam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$; comparado ao grupo controle (Teste-*t* de Student). aCSF, líquido cefalorraquidiano artificial.

9. DISCUSSÃO

Embora muitos tenham sido os avanços sobre o entendimento do metabolismo cerebral, assim como da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas crônicas, a total compreensão dos mecanismos envolvidos ainda se faz necessária. A tetrahidrobiopterina (BH4), a qual é um cofator essencial para a atividade das aminoácido aromático hidroxilases, assim como para todas as isoformas da *NOS*, tem despertado um grande interesse científico pelo fato de iniciar ações fundamentais em uma grande quantidade de processos biológicos e estados patológicos devido à sua estreita relação com o *NO* e os sistemas monoaminérgicos (Kaufman, 1992). A biodisponibilidade de BH4 parece ser determinante para a homeostase cerebral, visto que estudos *pós-mortem* têm demonstrado que este cofator se encontra em concentrações reduzidas no líquido cefalorraquidiano de pacientes com doenças neurológicas/neurodegenerativas crônicas, entre as quais destaca-se a DP (Hashimoto et al., 1994; Tani et al., 1994; Sakai, 2001). Além disso, estudos prévios demonstram que o metabólito secundário da via de síntese da BH4, a neopterina, conhecida como marcador sensível da ativação do sistema imune (Fuchs et al., 1989), se encontra aumentada no plasma de indivíduos com DP (Freitas et al., 2012).

Resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a via de síntese da BH4 está aumentada no modelo animal da DP induzido por MPTP, visto que se observa o aumento nas concentrações da neopterina no plasma e no estriado de animais tratados com MPTP. O aumento das concentrações de neopterina nos fluídos biológicos demonstra a regulação aumentada da enzima GTPCH, a qual é o passo inicial e normalmente limitante da síntese de BH4 (Thöny et al., 2000). A ativação aumentada de GTPCH faz com que a enzima PTPS (segundo passo na via de síntese de BH4) se torne limitante e acumule o precursor 7,8-diidroneopterina trifosfato, com conseqüente acúmulo de neopterina (Figura 32) (Brodacki et al., 2008). Estima-se que o aumento da expressão de GTPCH e conseqüente aumento da síntese de BH4 durante a ativação aguda de um processo neuroinflamatório, possa induzir neurotoxicidade devido ao aumento exacerbado das concentrações de *NO* (Pfeilschifter et al., 1996). Assim, pode ser sugerido que em processos neurodegenerativos em que existe um estado neuroinflamatório crônico, BH4 seria recrutada para a síntese persistente de *NO*, comprometendo dessa forma a síntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina.

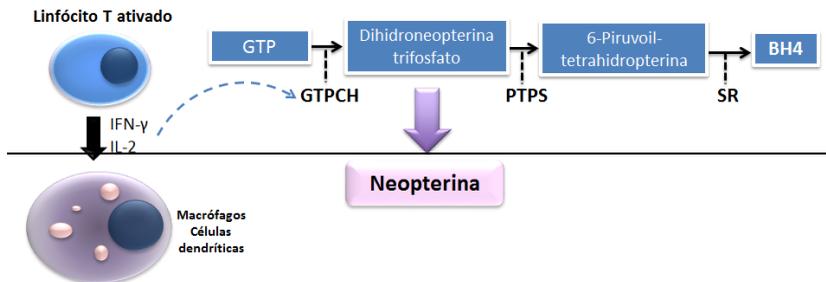


Figura 32. Síntese de neopterina. A ativação do sistema imune promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias com um consequente aumento na regulação da enzima GTP ciclodrolase (GTPCH) - passo inicial e normalmente limitante da síntese de tetrahidrobiopterina (BH4). Logo, a enzima 6-piruvil-tetraidropterina sintase (PTPS) - segundo passo na via de síntese de BH4 – torna-se o passo limitante da via e acumula o precursor 7,8-diidroneopterina trifosfato, com consequente acúmulo de neopterina.

Por outro lado, as baixas concentrações de BH4 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP poderiam estar modulando alterações cognitivas e afetivas também presentes na fisiopatologia da doença. Haja vista que a redução das concentrações de BH4 refletem diretamente na síntese de *NO* e serotonina. Nesse contexto, o presente trabalho avalia o efeito da administração aguda de BH4 sobre o processo de formação da memória de longo prazo (*LTM*) através do teste comportamental da esQUIVA inibitória. Esta, uma metodologia tradicional para o estudo da memória onde o condicionamento clássico aversivo é avaliado através do tempo de permanência do animal sobre uma plataforma segura livre de choque, após o animal ter passado por um período de condicionamento (aquisição da memória) (Perry et al., 1983). No presente trabalho, observa-se que 4 pmol de BH4 aumentou o tempo de latência dos animais sobre a plataforma livre de choque 24 horas após o período de condicionamento, o que demonstra o aumento da *LTM* quando BH4 foi administrada em uma concentração próxima do padrão fisiológico. Ainda, observa-se que a aparente modulação da *LTM* por BH4 se mantém em diferentes linhagens de roedores (camundongos Swiss albino, camundongos C57bl/6 e ratos Wistar). Fato que fortalece a hipótese de modulação da memória pelo cofator BH4.

Os resultados do presente trabalho demonstram ainda que a administração aguda de BH4 melhora a *LTM* no teste comportamental do medo condicionado. Outra metodologia comportamental clássica que avalia a formação da memória aversiva através do condicionamento *Pavloviano*, em que o aprendizado está associado a um contexto (estímulo condicionado) e a um estímulo incondicionado (Maren, 2008). No presente trabalho observa-se que 4 pmol de BH4 reverteu o prejuízo cognitivo provocado pela administração de LPS em camundongos C57bl/6 durante o teste do medo condicionado. Dessa forma, pode ser postulado que BH4 modula a formação da *LTM* mesmo sob condições neuroinflamatórias. Haja vista que a ativação da micróglia é o primeiro mecanismo de defesa do cérebro contra os eventos patológicos em doenças neurodegenerativas e que a neuroinflamação é conhecida por desempenhar um papel importante na progressão de doenças neurodegenerativas, em particular da DP (Trudler et al., 2015),

Considerando ainda que a depressão é um distúrbio neuropsiquiátrico muito comum na DP (Rojo et al., 2003) e que indivíduos portadores da doença com diagnóstico de depressão apresentam declínio cognitivo e diminuição das atividades de vida diária significativamente maior em relação aos pacientes com DP sem depressão (Camargo et al., 2004; Silberman et al., 2004), o efeito da administração aguda de BH4 sobre a memória do medo condicionado foi avaliado também em um contexto depressivo. Para isso, foram utilizados animais geneticamente modificados que expressam a isoforma totalmente editada do receptor 2C de serotonina (animais nulos para o receptor 5-HT_{2c}). Estes animais são comumente conhecidos como VGV pelo fato da alteração genética resultar em um códon que codifica Valina-Glicina-Valina (Kawahara et al., 2008), o que resulta em um fenótipo comportamental relacionado à ansiedade e a depressão (Mombereau et al., 2010; Olaghere et al., 2010) caracterizado no teste do medo condicionado por um comportamento de congelamento máximo (Martin et al., 2008). Por essa razão, o efeito da administração aguda de BH4 sobre a formação da memória em camundongos VGV foi avaliado através do mecanismo de extinção da memória do medo condicionado. Esta, representa a desvinculação de um estímulo condicionado do estímulo incondicionado que previamente havia sido associado com a geração de uma resposta aprendida (Izquierdo et al., 2006; Cammarota et al., 2004a). No processo de extinção, o estímulo passa a se associar com a ausência do estímulo incondicionado, mostrando que o estímulo incondicionado não mais ocorre (Cammarota

et al., 2004a). Dessa forma, a extinção da memória indica a ocorrência de um novo aprendizado (Vianna et al., 2001; Myers e Davis, 2002; Cammarota et al., 2004b). Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram, portanto, que 4 pmol de BH4 favoreceu a extinção da memória do medo condicionado em camundongos VGV, sugerindo que o cofator melhora o quadro de ansiedade e depressão no modelo genético de distúrbios do humor, assim como facilita o aprendizado e a formação da memória.

A potenciação de longo prazo (*LTP*) é o mecanismo bioquímico molecular responsável pelo aumento da plasticidade sináptica e consequente formação da *LTM* (Cooke e Bliss, 2006), uma vez que a memória adquirida passa da forma lábil para a forma estável por remodelações sinápticas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006). A geração da *LTP* hipocampal, por exemplo, é um mecanismo modulado pelo neurotransmissor glutamato e seus receptores (Cauli et al., 2010). Dessa forma, o influxo de cálcio decorrente da ativação de receptores AMPA e NMDA ativa a enzima *NOS* que entre outros substratos e cofatores é dependente do complexo Ca^{2+} /calmodulina e de BH4 para promover a síntese de *NO* (Yun, 1999; Frade et al., 2009), o qual atua como sinalizador retrógrado no mecanismo de geração da *LTP* hipocampal (Kleppisch et al., 1999; Tagatgeh et al., 2009). Por esta razão, sugerimos que o efeito de BH4 sobre o aprendizado e a *LTM*, observados no paradigma comportamental, esteja vinculado à geração da *LTP* através da via clássica glutamatérgica. Mecanismo que poderia estar sendo facilmente modulado pela biodisponibilidade de BH4. Uma evidência fortalecida no presente trabalho pela facilitação direta da geração da *LTP* em fatias hipocampais de ratos administrados *in vivo* com 4 pmol de BH4.

Sabe-se que a esQUIVA inibitória é o paradigma que melhor propicia a avaliação dos mecanismos moleculares que são responsáveis pela consolidação da memória e, o glutamato, é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso que participa da consolidação da *LTM* (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo e cols., 2006). Com a intenção de elucidar os mecanismos moleculares pelos quais BH4 parece modular a formação da memória, os resultados do presente trabalho demonstram que o bloqueio da síntese de *NO* pela inibição não seletiva de *NOS* por L-NAME, assim como a inibição do sistema glutamatérgico pelo antagonista não competitivo de receptores NMDA, o MK-801, prejudicam o efeito de BH4 sobre a formação da *LTM* durante a evocação da memória aversiva na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória. Resultados que corroboram com estudos onde a

administração aguda de inibidores da *NOS* no hipocampo de ratos, perturba significativamente a aprendizagem aversiva, a aprendizagem espacial, e a tarefa de reconhecimento de objetos (Prickaerts et al., 1997; Majlessi et al., 2008; Harooni et al., 2009; Wang et al., 2014). Da mesma forma, que a administração de MK-801 demonstra prejudicar a formação da memória de trabalho e a aquisição da memória aversiva (Parada-Turska e Turski, 1990). Os resultados aqui apresentados demonstram ainda que mesmo quando 8-bromo-GMPc, uma molécula análoga do GMPc e BH4 foram coadministrados com L-NAME e MK-801, o prejuízo no processo de formação da memória não foi revertido. Dessa forma, é possível sugerir que o efeito de BH4 sobre a formação da *LTM* é dependente da sinalização retrógrada do *NO* no processo de geração da *LTP*, bem como da ativação de receptores NMDA. Hipótese ainda mais fortalecida por resultados do presente trabalho em que o conteúdo de *NO* presente no hipocampo de camundongos tratados com BH4 e L-NAME corresponde ao comportamento desses animais durante a formação da *LTM* na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória.

Considerando ainda que altas concentrações de *NO* são neurotóxicas (Kuiper et al., 1994) e que a ativação excessiva de receptores NMDA pode induzir excitotoxicidade glutamatérgica (Waring et al., 2005), os resultados do presente trabalho também demonstram que a administração aguda de 4 pmol de BH4 não contribui para o dano celular; uma vez que melhora a captação de glutamato e não altera a viabilidade celular. Nesse sentido, Yu et al. (2014) demonstram que BH4 aumenta a sobrevivência neuronal em um modelo *in vitro* de hipóxia/isquemia, sugerindo que a biodisponibilidade deste cofator é importante para restabelecer as funções cerebrais após estresse celular.

Por fim, é importante salientar a provável participação da via de salvação de BH4 nos efeitos observados nesse trabalho. A BH4 é uma molécula altamente oxidável e durante seu percurso até as células é provavelmente oxidada a BH2. Porém, os efeitos modulatórios demonstrados não poderiam estar vinculados à BH2, uma vez que essa é uma molécula conhecida por promover o desacoplamento da *NOS* com consequente produção de $O^{\cdot -2}$ no lugar de *NO* (Schmidt et al., 2014). Dessa forma, a facilitação da geração da *LTP* não seria possível devido à supressão de *NO*, o qual atua retrogradamente neste mecanismo. Assim, postulamos que os efeitos observados nos resultados desse trabalho são realmente promovidos por BH4, visto que essa é provavelmente recuperada à sua forma reduzida pela via de salvação.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

10. CONCLUSÕES

- Os resultados apresentados no presente trabalho permitem observar que o composto derivado de quinoxalina, 2-metil-3-fenil-6-aminoquinoxalina (MPAQ), demonstra não ser um agente causador de neurotoxicidade, assim como parece apresentar atividade neuroprotetora/neurotrófica *in vitro*;
- Com base nos resultados obtidos, sugerimos o composto derivado de quinoxalina MPAQ como um novo alvo de investigações científicas, uma vez que este parece ser um potencial candidato tentativa de prevenir ou até mesmo reverter os mecanismos de neurodegeneração presentes, em particular, na DP;
- Os resultados observados nesse estudo demonstram também que o cofator tetrahidrobiopterina (BH4) apresenta efeito modulador sobre o processo de formação da memória de longo prazo (*LTM*);
- Os resultados apresentados no presente trabalho permitem observar que o efeito de BH4 sobre a formação de LTM acontece através da sinalização retrógrada do *NO* no mecanismo de geração da potenciação de longo prazo (*LTP*);
- Os relatos de queda nas concentrações de BH4 no líquido cefalorraquidiano de pacientes afetados pela DP sugerem que o déficit cognitivo, um sintoma não motor frequentemente observado na fisiopatologia da doença e que exerce forte influência sobre a qualidade de vida dos pacientes, possa estar vinculado à biodisponibilidade do cofator BH4.

CAPÍTULO V

PERSPECTIVAS

11. PERSPECTIVAS

Serão realizados experimentos adicionais para complementar e aprimorar a qualidade dos resultados apresentados neste trabalho doutoral. Para isto, serão analisados os seguintes parâmetros:

1) Avaliar o perfil metabólico da via de síntese da BH4 no modelo animal da doença de Parkinson mediante a administração intranasal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos C57Bl/6 e camundongos nocaute para *NOS II* (iNOS^{-/-}), através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) mediante detecção eletroquímica e fluorescente (Ormazabal et al., 2005).

2) Avaliar o influxo de Ca²⁺ no hipocampo de camundongos C57Bl/6 tratados intracerebroventricularmente (i.c.v.) com BH4; a fim de complementar os resultados apresentados nesse trabalho, mostrando que os efeitos da BH4 sobre a formação de *LTM* na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória são realmente dependentes de receptores do tipo NMDA (Zanatta et al., 2011).

3) Avaliar se a deficiência em BH4, induzida pelo uso de um inibidor da enzima SR, altera a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) (EVSEEV *et al.*, 2003) em terminais dopaminérgicos; assim como a expressão da enzima GTPCH (TEGEDER *et al.*, 2006), a qual controla o fluxo metabólico da BH4, em fatias hipocâmpais de camundongos C57Bl/6 e camundongos nocaute para *NOS II* (iNOS^{-/-}), a fim de evidenciar a dependência desta enzima.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

12. REFERÊNCIAS

AARSLAND, D. et al. Mental symptoms in Parkinson's disease are important contributors to caregiver distress. **Int J Geriatr Psychiatry**. 14:866-874, 1999.

ABELIOVICH A; FLINT BEAL M. Parkinsonism genes: culprits and clues. **Journal of Neurochemistry**, 99:1062-1072, 2006.

ALTHAUS, A.; BECKER, O., A.; SPOTTKE, A.; DENGLER, R.; SCHNEIDER, F.; KLOSS, M.; EGGERT, K.; OERTEL, W. H.; DILMANN, U.; HERTING, B.; CLASSEN, J.; DODEL, R. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. **Parkinsonism and Related Disorders**. xx: 1- 7, 2008.

AMORINI, A.M.; NOCITI, V.; PETZOLD, A.; et al. Serum lactate as a novel potential biomarker in multiple sclerosis. **Biochim Biophys Acta**.1842:1137–1143, 2014.

ARANCIO, O.; KIEBLER, M.; LEE, C. J.; LEV-RAM, V.; TSIEN, R. Y.; KANDEL, E. R.; HAWKINS, R. D. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. **Cell**, 87:1025–1035, 1996.

ARDI, A.E. Questões atuais sobre depressão. 3. ed. **Rev. e Ampl.** São Paulo, Lemos, 2006.

ARDUINO D.M.; ESTEVES A.R.; SWERDLOW R.H.; CARDOSO S.M. A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. **Methods Mol Biol**, 1265:415-424, 2015.

ASANUMA, M.; NISHIBAYASHI-ASANUMA, S.; MIYAZAKI, I.; KOHNO, M.; OGAWA, N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. **J Neurochem**, 76:1895-1904, 2001.

BADDELEY A. Working Memory: The Interface between Memory and Cognition. **J Cogn Neurosci**, 4(3):281-8, 1992.

BAILEY, J.M.; MAKHEJA, A.N.; SIMON, T. 15-Lipoxygenase

induction as an index of oxidative stress and atherogenesis. **Biochem Soc Trans**, 21(4):406S, 1993.

BARKER, R.A. Continuing trials of GDNF in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, 5(4):285e286, 2006.

BAYLES, K.A. et al. Change in cognitive function in idiopathic Parkinson's disease. **Arch Neurol**. 53:1140-1146, 1996.

BEHARI M.; SRIVASTAVA, A.K.; PANDEY, R.M. Quality of life in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 11:221-226, 2005.

BERNHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O.; JELLINGER, K.; SEITELBERGER, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J Neurol Sci.**, 20(4):415-455, 1973.

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

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

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; FANCELLU, R.; BLAUGRUND, E.; NAPPI, G. Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. 187:455-459, 2004.

BLAU, N.; THÖNY, B.; COTTON, R.G.H.; HYLAND, K. Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines. **Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, cap. 78, 2011.

BLENDY, J. A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, 59(12), 1144-50, 2006.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31-39, 1993.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M. F.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the

apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. 65: 135- 172, 2001.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RÜB, U.; BRATZKE, H.; TREDICI, K. D. Stages in the development of Parkinson's disease related pathology. **Cell Tissue Res**. 318: 121–134, 2004.

BRACHER, A.; EISENREICH, W.; SCHRAMEK, N.; RITZ, H.; GOTZE, E.; HERRMANN, A.; GUTLICH, M.; BACHER, A. Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. **J Biol Chem**, 273:28132-28141, 1998.

BREEN, K. C.; DRUTYTE, G. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: the patient's perspective. **J Neural Transm**, 2012.

BRODACKI, B.; STASZEWSKI, J.; TOCZYŁOWSKA, B.; KOZŁOWSKA, E.; DRELA, N.; CHALIMONIUK, M.; STEPIEN, A. 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. **Neuroscience letters**, 441:158-162, 2008.

BROWN, A. S.; GERSHON, S. Dopamine and depression. **J Neural Transm Gen Sect**, 91(2-3):75-109, 1993.

BURCH, D.; SHEERIN, F. Parkinson's disease. **Lancet**, 365:622-627, 2005.

CANNON, J. R.; TAPIAS, V.; NA, H. M.; HONICK, A. S.; DROLET, R. E.; GREENAMYRE, J. T. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**. 34: 279–290, 2009.

CAMARGO, A. C. R.; COPIO, F. C. Q.; SOUZA, T. R. R.; GOULART, F. O impacto da Doença de Parkinson na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. 8: 267-272, 2004.

CASTREN, E.; VOIKAR, V.; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr Opin Pharmacol**, 7(1):18-21, 2007.

CASTRO, A.A.; GHISONI, K.; LATINI, A.; QUEVEDO, J.; TASCA, C.I.; PREDIGER, R.D. 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**, 229:208-215, 2012.

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

CAULI, O.; HERRAIZ, S.; PELLICER, B.; PELLICER, A.; FELIPO, V. Treatment with sildenafil prevents impairment of learning in rats born to pre-eclamptic mothers. **Neuroscience**. v.171, p.506-512, 2010.

CELADA, P.; PUIG, M.; AMARGÓS-BOSCH, M.; ADELL, A.; ARTIGAS F. The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. **J Psychiatry Neurosci**, 29(4):252-65, 2004.

CHAUDHURI, K.R.; ODIN, P.; ANTONINI, A.; MARTINEZ-MARTIN, P. Parkinson's disease: the non-motor issues. **Parkinsonism Relat Disord.**, 17(10):717-723, 2011.

CHITTIPROL, S.; VENKATASUBRAMANIAN, G.; NEELAKANTACHAR, N.; BABU, S.V.; REDDY, N.A.; SHETTY, K.T.; GANGADHAR, B.N. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. **J Psychiatr Res**. 44(5):310-3, 2010.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**. 30: 475-482, 2009.

CILIAUX, B.J.; HEILMAN, C.; DEMCHYSHYN, L.L.; PRISTUPA, Z.B.; INCE, E.; HERSCH, S.M.; NIZNIK, H.B.; LEVEY, A.I. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. **J. Neurosci**, 75(3):1714e1723, 1995.

CLAIBORNE, B.J.; XIANG, Z.; BROWN, T.H. Hippocampal circuitry complicates analysis of long-term potentiation in mossy fiber synapses. **Hippocampus**, 3(2):115-21, 1993.

CLARK, R.E.; SQUIRE, L.R. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 110(Suppl 2):10365–70, 2013.

COGO, J.; KAPLUM, V.; SANGI, D.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A.G.; NAKAMURA, C.V. Synthesis and biological evaluation of novel 2,3-disubstituted quinoxaline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. **Eur J Med Chem**, 90:107-23, 2015.

COHEN, G.; PASIK, P.; COHEN, B.; LEIST, A.; MYTILINEOU, C.; YAHR, M.D. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. **Eur J Pharmacol**. 106:209-210, 1984.

COOKE, S.F.; BLISS, T.V. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, 129:1659–1673, 2006.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry**, 113(504):1237-64, 1967.

COPPEN, A. J.; DOOGAN, D. P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **J Clin Psychiatry**, 49 Suppl:4-11, 1988.

COROD-ARTAL, F.J.; ZIOMKWSKI, S.; MESQUITA, H. M.; MARTINEZMARTIN, P. Anxiety and depression: Main determinants of health-related quality of life in Brazilian patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. 14: 102-108, 2008.

CUENCA, A.; PÉREZ, S.; YEPEZ, A.; PAREDES, L.; MONTECINOS, L.; LLOVERA, L.; RODRÍGUEZ, C. An efficient and expeditious microwave-assisted synthesis of quinoxaline derivatives via nucleophilic heteroaromatic substitution. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 45(4):1199–1201, 2008.

CUSHING, T.D.; METZ, D.P.; WHITTINGTON, D.A.; MCGEE, L.R. PI3K δ and PI3K γ as targets for autoimmune and inflammatory diseases. **J. Med. Chem**, 55:8559e8581, 2012.

D'AQUILA, P. S.; COLLU, M.; GESSA, G.L.; SERRA, G. The role of

dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur J Pharmacol**, 405(1-3):365-73, 2000.

D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord**, 4(3):183-94, 2002.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E.; FERRO, M.; MERTINEZ, G.; VITAL, M. HIPOLIDE, D.; TUFIK, S.; CANTERAS, N. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behav Brain Res**. 189: 364-397, 2008.

DAEUR, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and models. **Revista Neuron**. 39: 889-909, 2003.

DE LAU, L.M.; SCHIPPER, C.M.; HOFMAN, A.; KOUDSTAAL, P.J.; BRETELER, M.M. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. **Arch Neurol**. 62:1265-1269, 2005.

DE PAULA MARTINS, R.; GLASER, V.; DA LUZ SCHEFFER, D.; DE PAULA FERREIRA, P.M.; WANNMACHER, C.M.; FARINA, M.; DE OLIVEIRA, P.A.; PREDIGER, R.D.; LATINI, A. Platelet oxygen consumption as a peripheral blood marker of brain energetics in a mouse model of severe neurotoxicity. **J Bioenerg Biomembr**, 45(5):449-57, 2013.

DESHMUKH, M.B.; MALI, A.R.; JADHAV, S.D.; SURYAWANSHI, A.W. Synthesis of some 4-substituted hydrazinotetrazolo [1, 5 - a] quinoxalines. **Indian Journal of Chemistry B**, 46(7):1211-1213, 2007.

DEVOS, D.; DEFEBVRE, L.; BORDET, R. Dopaminergic and non-dopaminergic pharmacological hypotheses for gait disorders in Parkinson's disease. **Fundam Clin Pharmacol**. 24:407-421, 2010.

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

DOZE, V. A; PAPAY, R.S.; GOLDENSTEIN, B.L.; GUPTA, M.K.; COLLETTE, K.M.; NELSON, B.W.; LYONS, M.J.; DAVIS, B.A.;

LUGER, E.J.; WOOD, S.G.; HASELTON, J.R.; SIMPSON, P.C.; PEREZ, D.M. Long-term alpha1A-adrenergic receptor stimulation improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. **Mol Pharmacol**, 80(4):747-58, 2011.

DOWLATI, Y. HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E.K.; LANCTÔT, K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, 67(5):446-57, 2010.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, 44(11):1873-1886, 2008.

DU, Y.; MA, Z.; LIN, S.; DODEL, R.C.; GAO, F.; BALES, K.R.; TRIARHOU, L.C.; CHERNET, E.; PERRY, K.W.; NELSON, D.L.; LUECKE, S.; PHEBUS, L.A.; BYMASTER, F.P.; PAUL, S.M. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98:14669-14674, 2001.

DUCH, D.S.; SMITH, G.K.; Biosynthesis and function of tetrahydrobiopterin. **J Nutr Biochem**, 2:411, 1991.

DUMAN, R. S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, 46(9):1181-91, 1999.

DZAMKO, N.; GECZY, C.L.; HALLIDAY, G.M. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2014.

ELZAOUK L.; LAUFS, S.; HEERKLOTZ, D.; LEIMBACHER, W.; BLAU, N.; RESIBOIS, A.; THONY, B. Nuclear localization of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, 1670:56-68, 2004.

EMRE, M. Dementia associated with Parkinson's disease. **Lancet Neurol**. 2: 229-237, 2003a.

EMRE, M. What cause mental dysfunction in Parkinson's disease? **Mov Disord**. 18 (suppl 6): S63-S71, 2003b.

EMRE, M.; AARSLAND, A. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. **N Engl J Med**. 351: 2509-2518, 2004.

EVERSE, J.; COATES, P.W. Neurodegeneration and peroxidases. **Neurobiol Aging**, 30:1011-1025, 2009.

FABBRINI, G.; ABBRUZZESE, G.; MARCONI, S.; ZAPPIA, M. Selegiline: a reappraisal of its role in Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol**, 35(3):134-40, 2012.

FAUST, K.; GEHRKE, S.; YANG, Y.; YANG, L.; BEAL, M.F.; LU, B. Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. **BMC Neurosci**, 10:109, 2009.

FINBERG, J.P.; TAKESHIMA, T.; JOHNSTON, J.M.; COMMISSIONG, J.W. Increased survival of dopaminergic neurons by rasagiline, a monoamine oxidase B inhibitor. **Neuroreport**. 9:703-707, 1998.

FOLTYNIE, T.; BRAYNE, C.E.; ROBBINS, T.W.; BARKER, R.A. The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK: the CamPaIGN study. **Brain**. 127:550-560, 2004.

FRADE, J.G.; BARBOSA, R.M.; LARANJINHA, J. Stimulation of NMDA and AMPA glutamate receptors elicits distinct concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal slices. **Hippocampus**. 1;19(7):603-11, 2009.

FRANKLIN, K.B.J.; PAXINOS, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Computer Graphics Files. **Academic Press**, 1997.

FREITAS et al., 2012; Dissertação de Mestrado

FREY, U.; FREY, S.; SCHOLLMEIER, F.; KRUG, M. Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. **J Physiol.**, 490:703-712, 1996.

FRISINA, P. G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. xx: 1-5, 2009

FOXTON, R.H.; LAND, J.M.; HEALES, S. J. Tetrahydrobiopterin

availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. **Neurochem Res**, 32:751-756, 2007.

FUCHS, D.; SPIRA, T.J.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WERNER, E.R.; FELMAYER, G.W.; WACHTER, H. Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin Chem.**, 35:1746-1749, 1989.

GHOSHEH, O.; DWOSKIN, L.P.; LI, W.K.; Crooks, P.A. Residence times and half-lives of nicotine metabolites in rat brain after acute peripheral administration of [2'-(14)C]nicotine. **Drug Metab. Dispos.**, 27:1448e1455, 1999.

GIL, A.; PABÓN, A.; GALIANO, S.; BURGUETE, A.; PÉREZ-SILANES, S.; DEHARO, E.; MONGE, A.; ALDANA, I. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of new quinoxaline derivatives as anti-Plasmodium falciparum agents. **Molecules**, 19(2):2166-80, 2014.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M.B. Mechanism of 6 hydroxydopamine neurotoxicity. **J Neural Transm.** 50[Suppl]:55-66, 1997.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry**, 7(3):254-75, 2002.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respir Physiol**, 128:277-297, 2001.

GU, M.; COOPER, J.M.; TAANMAN, J.W.; SCHAPIRA, A.H. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, 44:177-186, 1998.

GUERREIRO, S.; TOULORGE, D.; HIRSCH, E.; MARIEN, M.; SOKOLOFF, P.; MICHEL, P.P. Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. **Mol. Pharmacol**, 74:980-989, 2008.

GUERREIRO, S.; PONCEAU, A.; TOULORGE, D.; MARTIN, E.; ALVAREZ-FISCHER, D.; HIRSCH, E.C.; MICHEL, P.P. Protection of midbrain dopaminergic neurons by the end-product of purine metabolism uric acid: potentiation by low-level depolarization. **J. Neurochem.** 109:1118-1128, 2009.

HAAS R.H.; NASIRIAN, F.; NAKANO, K.; WARD, D.; PAY, M.; HILL, R.; SHULTS, C.W. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. **Annals of neurology**, 37:714-722, 1995.

HAGBERG, L.; CINQUE, P.; GISSLEN, M.; BREW, B.J.; SPUDICH, S.; BESTETTI, A.; PRICE, R.W.; FUCHS, D. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS Res Ther**, 7:15, 2010.

HAMPELA, O.; RODEB, C.; WALTHERB, D.; BECKERTA, R.; GÖRLSB, H. New derivatives of quinoxaline syntheses, complex formation and their application as controlling ligands for zinc catalyzed epoxide-CO₂ copolymerization, **Z. Naturforsch.** 57:946-956, 2002.

HAROONI, H.E.; NAGHDI, N.; SEPEHRI, H.; ROHANI, A.H. The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats. **Behav Brain Res.** 19;201(1):166-72, 2009.

HARUKI, H.; PEDERSEN, M.G.; GORSKA, K.I.; POJER, F.; JOHNSSON, K. Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. **Science**, 340(6135):987-91, 2013.

HASEGAWA, H.; SAWABE, K.; NAKANISHI, N.; WAKASUGI, O. K. Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH₄) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH₄. **Mol. Genet. Metab.**, 86(Suppl.1):S2-S10, 2005.

HASHIMOTO, R.; MIZUTANI, M.; OHTA, T.; NAKAZAWA, K.; NAGATSU, T. Changes in plasma tetrahydrobiopterin levels of depressives in depressive and remission phases: reconfirmed by measurement with an internal standard. **Neuropsychobiology**, v.29, p.57-60, 1994.

HEIKKILA, R.E.; MANZINO, L.; CABBAT, F.S.; DUVOISIN, R.C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. **Nature**. 311:467-469, 1984.

HINNELL, C.; HURT, C.S.; LANDAU, S.; BROWN, R.G.; SAMUEL, M.; PROMS-PD STUDY GROUP. Nonmotor versus motor symptoms: how much do they matter to health status in Parkinson's disease? **Mov. Disord.**, 27:236-241, 2012.

HORVITZ, J.C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience**, 96:651-6, 2000.

IBGE. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Um panorama da saúde no Brasil: acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde, 2008, Rio de Janeiro, 2010.

IINO, T.; TABATA, M.; TAKIKAWA, S.; SAWADA, H.; SHINTAKU, H.; ISHIKURA, S.; HARA, A. Tetrahydrobiopterin is synthesized from 6-pyruvoyl-tetrahydropterin by the human aldo-keto reductase AKR1 family members. **Arch. Biochem. Biophys**, 416:180-187, 2003.

IMTIAZ, B.; TOLPPANEN, A.M.; KIVIPELTO, M.; SOININEN, H. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. **Biochemical pharmacology**, 88:661-670, 2014.

INVESTIGATORS TNN-P. A randomized clinical trial of coenzyme Q10 and GPI-1485 in early Parkinson disease. **Neurology**, 68:20-28, 2007.

ISHIKAWA, H.; SUGIYAMA, T.; YOKOYAMA, A. Synthesis of 2,3-bis(halomethyl)quinoxaline derivatives and evaluation of their antibacterial and antifungal activities. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 61(4):438-44, 2013.

ISMAIL, M.M.; AMMAR, Y.A.; IBRAHIM, M.K.; EL-ZAHABY, H.S.; MAHMOUD, S.S. Synthesis and pharmacological evaluation of novel quinoxalines as potential nonulcerogenic anti-inflammatory and analgesic agents. **Arzneimittelforschung**, 55(12):738-43, 2005.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol.** 9:421-427, 1998.

IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer.** Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 1ª ed., 2004.

JANVIN, C.; AARSLAND, D.; LARSEN, J.P.; HUGDAHL, K. Neuropsychological profile of patients with Parkinson's disease without dementia. **Dement Geriatr Cogn Disord.** 15: 126-131, 2003

JELLINGER, K. The pedunculo-pontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry,** 51:540-543, 1988.

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

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MUTEL, V.; MARTIN, J.R. Brain 5-HT_{1C} receptors and antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,** 18(3):563-74, 1994.

JUBIE, S.; GAYATHRI, R.; KALIRAJAN, R. Synthesis and neuropharmacological evaluation of some novel quinoxaline 2, 3-dione derivatives. **Scientific World Journal,** 718023, 2012.

KANDA, F.; OISHI, K.; KUGA, A.; KOBESSHO, H.; SHIRAFUJI, T.; HIGUCHI, H.; ISHIHARA, H. Characteristics of depression in Parkinson's disease: Evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. **Parkinsonism and Related Disorders.** 14: 19-23, 2008.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of Neural Science. New York: McGraw-Hill. Commun. 175:738-744, 2000.

KAPATOS, G.; KATOH, S.; KAUFMAN, S. Biosynthesis of biopterin by rat brain. **J Neurochem,** 39(4):1152-62, 1982.

KAPATOS, G. The neurobiology of tetrahydrobiopterin biosynthesis: a model for regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription within nigrostriatal dopamine neurons. **UBMB Life**, 65(4):323-33, 2013.

KASTER, M.P.; GADOTTI, V.M.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES, A.L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. **Neuropharmacology**, 62(1):419-26, 2012.

KAUFMAN, S. The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 50:1085-1093, 1963.

KAUFMAN, S. Novel aspects of metabolism and function of tetrahydrobiopterin. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, 492-6, 1992.

KAWAHARA, Y.; GRIMBERG, A.; TEEGARDEN, S.; MOMBÉREAU, C.; LIU, S.; BALE, T. L.; BLENDY, J. A.; NISHIKURA, A. K. Dysregulated Editing of Serotonin 2C Receptor mRNAs Results in Energy Dissipation and Loss of Fat Mass. **The Journal of Neuroscience**, 28(48):12834–12844, 2008.

KELLEHER, R.; GOVINDARAJAN, A.; TONEGAWA, S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. **Neuron**, 44:59-73, 2004.

KLEPPISCH, T.; PFEIFER, A.; KLATT, P.; RUTH, P. MONTKOWSKI, A.; SSLER, R.F.A.; HOFMANN, F. Long-Term Potentiation in the Hippocampal CA1 Region of Mice Lacking cGMP-Dependent Kinases Is Normal and Susceptible to Inhibition of Nitric Oxide Synthase. **The Journal of Neuroscience**, 19(1):48-55, 1999.

KINCSES, Z.T.; VECSEI, L. Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **CNS Neurosci. Ther.** 17:345-367, 2011.

KIRSCH, M.; KORTH, H. G.; STENERT, V.; SUSTMANN, R.; DE GROOT, H. The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited. Proof of superoxide formation from reaction of tetrahydrobiopterin with molecular oxygen. **J. Biol. Chem.**, 278:24481-24490, 2003.

KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.;

YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, 392:605-608, 1998.

KRIGE, D.; CARROLL, M.T.; COOPER, J.M.; MARSDEN, C.D.; SCHAPIRA, A.H. Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. **Annals of neurology**, 32:782-788, 1992.

KONG, L.L.; YU, L.C. It is AMPA receptor, not kainate receptor, that contributes to the NBQX-induced antinociception in the spinal cord of rats. **Brain Res**, 1100:73e77, 2006.

KUIPER, M.A.; VISSER, J.J.; BERGMANS, P.L.; SCHELTENS, P.; WOLTERS, E.C.
Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients. **J Neurol Sci**. 121(1):46-9, 1994.

KUMAR, P.; KUNDAL, R. K.; MORE, S.; SHAEMA, S. S. Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. **Behavioral brain research**. 197: 398-403, 2009.

KUPSCH, A.; SAUTTER, J.; GOTZ, M.E.; BREITHAUPT, W.; SCHWARZ, J.; YODIM, M.B.; RIEDERER, P.; GERLACH, M.; OERTEL, W.H. Monoamine oxidase-inhibition and MPTP-induced neurotoxicity in the non-human primate: comparison of rasagiline (TVP 1012) with selegiline. **J Neural Transm**. 108:985-1009, 2001.

LAM, A.A.; HYLAND, K.; HEALES, S.J. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse; implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. **J Inherit Metab Dis**, 30:256-262, 2007.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.A. JR. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **N Engl J Med**. 309(5):310, 1983.

LANGSTON, J. W.; PALFREMAN, J. **The case of the frozen addicts:** How the solution of a medical mystery revolutionized the understanding of Parkinson's disease. IOS Press, 1995.

LATINI, A.; RODRIGUEZ, M.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; REIS DE ASSIS, D.; DA COSTA FERREIRA, G.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M. C.; BUZIN, L.; GIUGLIANI, R.; CASSINA, A.; RADI, R.; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**, 135:111-20, 2005.

LE DOUARON, G.; SCHMIDT, F.; AMAR, M.; KADAR, H.; DEBORTOLI, L.; LATINI, A.; SÉON-MÉNIÉL, B.; FERRIÉ, L.; MICHEL, P.P.; TOUBOUL, D.; BRUNELLE, A.; RAISMAN-VOZARI, R.; FIGADÈRE, B. Neuroprotective effects of a brain permeant 6-aminoquinoxaline derivative in cell culture conditions that model the loss of dopaminergic neurons in Parkinson disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 89:467e479, 2015.

LIPTON, S.A.; GU, Z.; NAKAMURA, T. Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. **International review of neurobiology**, 82:1-27, 2007.

LO, E.H.; PIERCE, A.R.; MANDEVILLE, J.B.; ROSEN, B.R. Neuroprotection with NBQX in rat focal cerebral ischemia. Effects on ADC probability distribution functions and diffusion-perfusion relationships. **Stroke**, 28(2):439-46; 1997.

LOCH-NECKEL, G.; BICCA, M.A.; LEAL, P.C.; MASCARELLO, A.; SIQUEIRA, J.M.; CALIXTO, J.B. In vitro and in vivo anti-glioma activity of a chalcone-quinoxaline hybrid. **Eur J Med Chem**, 90:93-100, 2015.

LÖHLE, M.; REICHMANN, H. Controversies in Neurology: why monoamine oxidase B inhibitors could be a good choice for the initial treatment of Parkinson's disease. **BMC Neurology**. 11:112, 2011.

LONG, S.K.; SMITH, A.S.; SIAREY, R.J.; EVANS, R.H. Effect of 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline (CNQX) on dorsal root,

NMDA, kainate and quisqualate-mediated depolarization of rat motoneurons in vitro. **Br. J. Pharmacol**, 100:850e854, 1990.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193:265-275, 1951.

LUCKI, I. Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. **J Clin Psychiatry**, 52 Suppl: 24-31, 1991.

LUTHMAN, J.; FREDRIKSSON, A.; LEWANDER, T.; JONSSON, G.; ARCHER, T. Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. **Psychopharmacology**. 99,1989.

LYNCH, M. Long-term potentiation and memory. **Physiol Rev.**, 84:87-136, 2004.

MAJLESSI, N., CHOOPANI, BOZORGMEHR, T.; AZIZI, Z. Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. **Neurobiol Learn Mem**. 90(2):413-9, 2008.

MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci**, 26(12):631-8, 2005.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation--a decade of progress? **Science**, 285:1870-1874, 1999.

MALINOW, R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 358:707-714, 2003.

MANJI, H. K.; MCNAMARA, R.; CHEN, G.; LENOX, R.H. Signalling pathways in the brain: cellular transduction of mood stabilisation in the treatment of manic-depressive illness. **Aust N Z J Psychiatry**, 33 Suppl:S65-83, 1999.

MANJI, H. K.; MOORE, G.J.; RAJKOWSKA, G.; CHEN, G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol Psychiatry**, 5(6):578-93, 2000.

MARDER, K. et al. The frequency and associated risk factors for dementia in patients with Parkinson's disease. **Arch Neurol.** 52:695-701, 1995.

MAREN, S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. **European Journal of Neuroscience**, 28:1661-1666, 2008.

MARTIN, C.B.; RAMOND, F.; FARRINGTON, D.T.; AGUIAR JR., A.S.; CHEVARIN, C.; BERTHIAU, A.S.; CAUSSANEL, S.; LANFUMEY, L.; HERRICK-DAVIS, K.; HAMON, M.; MADJAR, J.J.; MONGEAU, R. RNA splicing and editing modulation of 5-HT_{2C} receptor function: relevance to anxiety and aggression in VGVmice. **Mol Psychiatry**, 18(6):656-65, 2013.

MARUYAMA, W.; AKAO, Y.; YODIM, M.B.; NAOI, M. Neurotoxins induce apoptosis in dopamine neurons: protection by N-propargylamine-1(R)- and (S)- aminoindan, rasagiline and TV1022. **J Neural Transm Suppl.** 60:171-186, 2000.

MASTERS, B. S.; MCMILLAN, K.; SHETA, E.A.; NISHIMURA, J. S.; ROMAN, L. J.; MARTASEK, P. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal. *FASEB J.*, 10:552-558, 1996.

MATTSON, M. P.; MARC CLEICHAMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in Neuroplasticity and neurological Disorders. **Neuron.** 60:748-766, 2008.

MAYBERG, H. S.; LEWIS, P.J.; REGENOLD, W.; WAGNER JR., H.N. Paralimbic hypoperfusion in unipolar depression. **J Nucl Med**, 35(6):929-34, 1994.

MAYER, B.; JOHN, M.; BOHME, E. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. **FEBS Lett**, 277:215-219, 1990.

MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; TAN, D.X.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C.; REITER, R. Melatonin and Parkinson's disease. **Endocrine**. 27:169-178, 2005.

MCKEITH, I.G. et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. **Neurology**. 65:1863-1872, 2005.

MENZA, M.; DOBKIN, R.D.; MARIN, H.; MARK, M.H.; GARA, M.; BUYSKE, S.; BIENFAIT, K.; DICKE, A. The impact of treatment of depression on quality of life, disability and relapse in patients with Parkinson's disease. **Mov Disord**, 24(9):1325-32, 2009.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P.; CHESSELET, M. F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathol**. 115: 385–398, 2008.

MICHEL, P.P.; MARIEN, M.; RUBERG, M.; COLPAERT, F.; AGID, Y. Adenosine prevents the death of mesencephalic dopaminergic neurons by a mechanism that involves astrocytes, **J. Neurochem**, 72:2074e2082, 1999.

MIKOVA, O.; YAKIMOVA, R.; BOSMANS, E.; KENIS, G.; MAES, M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. **Eur Neuropsychopharmacol**, 11(3):203-8, 2001.

MILSTIEN, S.; KAUFMAN, S. Dihydrofolate reductase catalyzes the reduction of 7,8-dihydrobiopterin in liver and brain. In *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines* (Curtius, H. C., Pfeleiderer, W. and Wachter, H., eds), pp. 133–138, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1983.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem Res**, 30(1):83-9, 2005.

MOMBEREAU, C.; KAWAHARA, Y.; GUNDERSEN, B.B.; NISHIKURA, K.; BLENDY, J.A. Functional relevance of serotonin 2C

receptor mRNA editing in antidepressant- and anxiety-like behaviors. **Neuropharmacology**. 59(6):468-73, 2010 .

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

MORETTI, A.; GORINI, A.; VILLA, R. F. Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. **Mol Psychiatry**, 8(9):773-85, 2003.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci Methods**, 11(1):47-60, 1984.

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

MOURLEVAT, S.; TROADEC, J.D.; RUBERG, M.; MICHEL, P.P. Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/Glial mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. **Mol. Pharmacol**, 64:578e586, 2003.

MUSLIMOVIC, D. et al. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. **Neurology**. 65:1239-1245, 2005.

MYTILINEOU, C.; RADCLIFFE, P.; LEONARDI, E.K.; WERNER, P.; OLANOW, C.W. L-deprenyl protects mesencephalic dopamine neurons from glutamate receptor-mediated toxicity in vitro. **J Neurochem**. 68:33-39, 1997 a.

MYTILINEOU, C.; RADCLIFFE, P.M.; OLANOW, C.W. L(-)-desmethylselegiline, a metabolite of selegiline [L(-)-deprenyl], protects mesencephalic dopamine neurons from excitotoxicity in vitro. **J Neurochem**. 68:434-436, 1997 b.

MYTILINEOU, C.; LEONARDI, E.K.; RADCLIFFE, P.; HEINONEN, E.H.; HAN, S.K.; WERNER, P.; COHEN, G.; OLANOW, C.W. Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion. **J Pharmacol Exp Ther.** 284:700-706, 1998.

NAGATSU, T.; MOGI, M.; ICHINOSE, H.; TOGARI, A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl.** (60):277-90, 2000.

NAIR, A.; VAIDYA, V. A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J Biosci,** 31(3):423- 34, 2006.

NAOI, M.; MARUYAMA, W.; YODIM, M.B.; YU, P.; BOULTON, A.A. Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B monoamine oxidase. **Inflammopharmacology.** 11:175-181, 2003.

NAOI, M.; MARUYAMA, W.; INABA-HASEGAWA, K. Revelation in the neuroprotective functions of rasagiline and selegiline: the induction of distinct genes by different mechanisms. **Expert Rev Neurother,** 13(6):671-84, 2013.

NELSON, D.L; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth Edition, Hardcover, 2004.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

NEWHOUSE, K.; HSUAN, S-L.; CHANG, S. H.; CAI, B.; WANG, Y.; XIA, Z. Rotenone-Induced Apoptosis Is Mediated By p38 And JNK MAP Kinases In Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells. **Toxicological Sciences.** 79, 137-146, 2004.

NINAN, I.; LIU, S.; RABINOWITZ, D.; ARANCIO, O. Early presynaptic changes during plasticity in cultured hippocampal neurons. **EMBO J.**, 25:4361-4371, 2006.

NONOGAKI, K.; ABDALLAH, L.; GOULDING, E.H.; BONASERA, S.J.; TECOTT, L.H. Hyperactivity and reduced energy cost of physical

activity in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. **Diabetes**. 52(2):315-20, 2003.

NORENBERG, M.D. Astrocyte responses to CNS injury. **J Neuropathol Exp Neurol**. 53:213-220, 1994.

NORMAN, S. et al. Effects of depression an Parkinson's Disease on cognitive functioning. **Journal Neuropsychiatry Clin Neurosci**. 14: 31-36, 2002.

NOZARI, M.; MANSOURI, F.A.; SHABANI, M.; NOZARI, H.; ATAPOUR, N. Postnatal MK-801 treatment of female rats impairs acquisition of working memory, but not reference memory in an eight-arm radial maze; no beneficial effects of enriched environment. **Psychopharmacology (Berl)**, 2015.

OKUN, M.S.; MCDONALD, W.M.; DELONG, M.R. Refractory nonmotor symptoms in male patients with Parkinson disease due to testosterone deficiency: a common unrecognized comorbidity. **Arch Neurol**. 59:807-811, 2002.

OLAGHERE DA SILVA, U.B.; MORABITO, M.V.; CANAL, C.E.; AIREY, D.C.; EMESON, R.B.; SANDERS-BUSH, E. Impact of RNA editing on functions of the serotonin 2C receptor in vivo. **Front Neurosci**, 2010.

ORJALES, A.; ALONSO-CIRES, L.; LABEAGA, L.; CORCÓSTEGUI, R. New (2-methoxyphenyl)piperazine derivatives as 5-HT1A receptor ligands with reduced alpha 1- adrenergic activity. Synthesis and structure-affinity relationships. **J Med Chem**, 38(8):1273-7, 1995.

OTA, A.; KANEKO, Y.S.; MORI, K.; NAKASHIMA, A.; NAGATSU, I.; NAGATSU, T; Effect of peripherally administered lipopolysaccharide (LPS) on GTP cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin and norepinephrine in the locus coeruleus in mice. **Stress**, 10:131-136, 2007.

OVEREEM, K. A.; OTA, K. T.; MONSEY, M. S.; PLOSKI, J. E.; SCHAFF, G.E. A role for nitric oxide-driven retrograde signaling in the

consolidation of a fear memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, 2010.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. **Annu Rev Neurosci**, 25:563-93, 2002.

PAEZ-PEREDA, M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 29(6):1010-6, 2005.

PÅLHAGEN, S.; QI, H.; MÅRTENSSON, B.; WÅLINDER, J.; GRANÉRUS, A.K.; SVENNINGSSON, P. Monoamines, BDNF, IL-6 and corticosterone in CSF in patients with Parkinson's disease and major depression. **J Neurol**. 257(4):524-32, 2010.

PAPAKOSTAS, G. I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, 16(6):391- 402, 2006.

PARADA-TURSKA, J.; TURSKI, W.A. Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. **Neuropharmacology**, 29(12):1111-6, 1990.

PARK, Y. S.; HEIZMANN, C. W.; WERMUTH, B.; LEVINE, R. A.; STEINERSTAUCH, P.; GUZMAN, J.; BLAU, N. Human carbonyl and aldose reductases: new catalytic functions in tetrahydrobiopterin biosynthesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 175(3):738-44, 1991.

PARKER JR., W.D; BOYSON, S.J.; PARKS, J.K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Annals of neurology**, 26:719-723, 1989.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, 14:223-236; discussion 222, 2002.

PARRINO, B.; CARBONE, A.; SPANÒ, V.; MONTALBANO, A.; GIALLOMBARDO, D.; BARRAJA, P.; ATTANZIO, A.; TESORIERE, L.; SISSI, C.; PALUMBO, M.; CIRRINCIONE, G.; DIANA, P. Aza-isoindolo and isoindolo-azaquinoxaline derivatives with antiproliferative activity. **Eur J Med Chem**, 94:367-377, 2015.

PAWAR, P.Y.; BHISE, S.B. Antihyperglycemic effects of newly synthesized 6,7-bis[2-(substitutedphenyl)-4-oxothiazolidin-3-yl]quinoxaline 2,3-(1 FH, 4 H)-diones. **Indian J Physiol Pharmacol**, 50(4):431-4, 2006.

PERRY M.L.; DIAS, R.D.; CARRASCO, M.A.; IZQUIERDO, I. Step-down inhibitory avoidance training and betaendorphin-like immunoreactivity of rat hypothalamus and plasma. **Braz J Med Biol Res**, 16:339-343, 1983.

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUMMEL, R.; KUNZ, D.; MÜHL, H.; NITSCH, D.; PLÜSS, C.; WALKER, G. Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase - potential for a novel class of anti-inflammatory agents. **Cell Biol Int**. 20(1):51-8, 1996.

PIEPER, G. M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. **J. Cardiovasc. Pharm**, 29:8-15, 1997.

PING, F.; SHANG, J.; ZHOU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, L. 5-HT(1A) receptor and apoptosis contribute to interferon-alpha-induced "depressive-like" behavior in mice. **Neurosci Lett**, 514(2):173-8, 2012.

POEWE, W.H.; RASCOL, O.; QUINN, N.; TOLOSA, E.; OERTEL, W.H.; MARTIGNONI, E.; et al. Efficacy of pramipexole and transdermal rotigotine in advanced Parkinson's disease: a double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. **Lancet Neurol**. 6:513-520, 2007.

PONS, R. The phenotypic spectrum of paediatric neurotransmitter diseases and infantile parkinsonism. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 32:321-332, 2009.

POPOLI, M.; BRUNELLO, N.; PEREZ, J.; RACAGNI, G. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. **J Neurochem**, 74(1)21-33, 2000.

PORTIN, R.; RINNE, U.K. Predictive factors for cognitive deterioration and dementia in Parkinson's disease. **Adv Neurol.** 45:413-416, 1986.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S., JR.; MOREIRA, E. L.; MATHEUS, F. C.; CASTRO, A. A.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; RAISMAN-VOZARI, R. The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's Disease. **Curr Pharm Des**, 17:489-507, 2011.

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

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

PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H.W.; SMITS, J.F.; DE VENTE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **Eur J Pharmacol.** 22;337(2-3):125-36, 1997.

PRZEDBORSKI S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders.** 11: S3-S7; 2005.

QIN, L.; WU, X.; BLOCK, M.L.; LIU, Y.; BREESE, G.R.; HONG, J.S.; KNAPP, D.J.; CREWS, F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, 55:453-462, 2007.

QUIK, M.; PEREZ, X.A.; BORDIA, T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 27:947e957, 2012.

QUINN, N.P. Classification of fluctuations in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, 51: S25eS29, 1998.

RANA, A.Q.; MASROOR, M.S.; KHAN, A.S. A review of methods used to study cognitive deficits in Parkinson's disease. **Neurol Res.**, 35(1)1-6, 2013.

RICCI, L.C.; WELLMAN, M.M. Monoamines: biochemical markers of suicide? **J Clin Psychol.** 46(1):106-16, 1990.

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

ROJO, A.; AGUILAR, M.; GAROLERA, M. T.; CUBO, E.; NAVAS, I.; QUINTANA, S. Depression in Parkinson's disease: clinical correlates and outcome. **Parkinsonism e Related Disorders**. 10: 23-28, 2003.

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

ROSS, C.A.; POIRIER, M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nature medicine**, S10-17, 2004.

ROUGÉ-PONT, F.; ABROUS, D.N.; LE MOAL, M.; PIAZZA, P.V. Release of endogenous dopamine in cultured mesencephalic neurons: influence of dopaminergic agonists and glucocorticoid antagonists. **Eur. J. Neurosci**, 11:2343e2350, 1999.

ROUSSEAU, E.; MICHEL, P.P.; HIRSCH, E.C. The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis. **Mol. Pharmacol**, 84:888e898, 2013.

ROWLAND, L.P. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci**, 160:S6–S24, 1998.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GERARD, B.; ROTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin Chim Acta**, 228:35-51, 1994.

SAKAI, T. Effects of tetrahydrobiopterin on ataxia in Machado-Joseph disease may be based upon the theory of 'cerebellar long-term depression'. **Med Hypotheses**, 57:180-182, 2001.

SALAZAR, J.; MENA, N.; HUNOT, S.; PRIGENT, A.; ALVAREZ-FISCHER, D.; ARREDONDO, M.; DUYCKAERTS, C.; SAZDOVITCH, V.; ZHAO, L.; GARRICK, L.M.; NUÑEZ, M.T.; GARRICK, M.D.; RAISMAN-VOZARI, R.; HIRSCH, E.C. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105(47):18578-83, 2008.

SAMII, A.; ETMINAN, M.; WIENS, M.O.; JAFARI, S. NSAID use and the risk of Parkinson's disease: Systematic review and meta-analysis of observational studies. **Drugs Aging**, 26:769-779, 2009.

SANT'ANNA, G.S.; MACHADO, P.; SAUZEM, P.D.; ROSA, F.A. RUBIN, M.A.; FERREIRA, J. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, 19:546-549, 2009.

SARAGOVI, H.U.; FITZPATRICK, D.; RAKTABUTR, A.; NAKANISHI, H.; KAHN, M.; GREENE, M.I. Design and synthesis of a mimetic from an antibody complementarity-determining region. **Science**, 253(5021):792e795, 1991.

SAWABE, K.; SAEKI, Y.; OHASHI, A.; MAMADA, K.; WAKASUGI, K. O.; MATSUOKA, H.; HASEGAWA, H. Tetrahydrobiopterin in intestinal lumen: its absorption and secretion in the small intestine and the elimination in the large intestine. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 32:79-85, 2009.

SCHRAG, A.; JAHANSHAHI, M.; QUINN, N. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 69:308-312, 2000.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease--an update. **J Neurol**. 251:795-804, 2004.

SCHULZ, J.B.; FALKENBURGER, B.H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell Tissue Res**. 318: 135-147, 2004.

SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V.A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science**, 254:1503-1506, 1991.

SCHAPIRA, A.H.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet**, 1:1269, 1989.

SCHMIDT, F.; CHAMPY, P.; LEONMENIEL, X.; FRANCK, R.; RAISMAN-VOZARI, FIGADERE, B. Chemicals possessing a neurotrophin-like activity on dopaminergic neurons in primary culture, **PLoS One** 4:e6215, 2009.

SCHMIDT, T.S.; MCNEILL, E.; DOUGLAS, G.; CRABTREE, M.J.; HALE, A.B.; KHOO, J.; O'NEILL, C.A.; CHENG, A.; CHANNON, K.M.; ALP, N.J. Tetrahydrobiopterin supplementation reduces atherosclerosis and vascular inflammation in apolipoprotein E-knockout mice. **Clin Sci**, 119:131-142, 2010.

SCHMIDT, K.; KOLESNIK, B.; GORREN, A.C.; WERNER, E.R.; MAYER, B. Cell type-specific recycling of tetrahydrobiopterin by dihydrofolate reductase explains differential effects of 7,8-dihydrobiopterin on endothelial nitric oxide synthase uncoupling. **Biochem Pharmacol**. 1;90(3):246-53, 2014.

SHI, W.; MEININGER, C.J.; HAYNES, T.E.; HATAKEYAMA, K.; WU, G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. **Cell Biochem Biophys**, 41(3):415-34. Review, 2004

SHIBINSKAYA, M.O.; KARPENKO, A.S.; LYAKHOV, S.A.; ANDRONATI, S.A.; ZHOLOBAK, N.M.; SPIVAK, N.Y.; SAMOCHINA, N.A.; SHAFRAN, L.M.; ZUBRITSKY, M.J.; GALAT, V.F. Synthesis and biological activity of 7H-benzo[4,5]indolo[2,3-b]-quinoxaline derivatives. **Eur J Med Chem**, 46(2):794-8, 2011.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122(5):509-22, 1965.

SCHMIDT, T.S.; ALP, N.J. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. **Clin. Sci. (Lond)**, 113:47-63, 2007.

SILBERMAN, C. D.; LAKS, J.; RODRIGUES, C. S.; ENGELHARDT, E. Uma revisão sobre depressão como fator de risco na Doença de Parkinson e seu impacto na cognição. **Revista de Psiquiatria RS**. 25: 52-60, 2004.

SŁAWEK, J.; DEREJKO, M. Depression and dementia: the most frequent non-motor symptoms of Parkinson disease. **Neurol Neurochir Pol**, 37 Suppl 5:103-15, 2003.

SON, H.; HAWKINS, R.D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P.L.; FISHMAN, M.C.; KANDEL, E.R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**. 13;87(6):1015-23, 1996.

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

SPILLANTINI, M.G.; SCHMIDT, M.L.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, 388(6645):839-840, 1997.

STAHL, S. 5HT1A receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? **Psychopharmacol Bull**, 30(1):39-43, 1994.

STAHL, S. Blue genes and the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry**, 61(2): 77-8, 2000.

STORGA, D.; VRECKO, K.; BIRKMAYER, J.G.; REIBNEGGER, G. Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. **Neurosci Lett.** 203:29-32, 1996.

SUEN, D.F.; NARENDRA, D.P.; TANAKA, A.; MANFREDI, G.; YOULE, R.J. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107:11835-11840, 2010.

SVENSSON, T. H. Central alpha-adrenoceptors and the mechanisms of action of antidepressant drugs. **Adv Biochem Psychopharmacol**, 39:241-8, 1984.

SWEATT, J. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. **Learn Mem**, 6:399-416, 1999.

SWERDLOW, R.H.; PARKS, J.K.; MILLER, S.W.; TUTTLE, J.B.; TRIMMER, P.A.; SHEEHAN, J.P.; BENNETT Jr., J.P.; DAVIS, R.E.; PARKER Jr., W.D. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, 40:663-671, 1996.

TANDBERG, E.; LARSEN, J.P.; ARSLAND, D.; LAAKE, K.; CUMMINGS, J.L. Risk factors for depression in Parkinson disease. **Arch Neurol.** 54, 625-630, 1997.

TANI, Y.; FERNELL, E.; WATANABE, Y.; KANAI, T.; LANGSTROM, B. Decrease in 6R-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin content in cerebrospinal fluid of autistic patients. **Neurosci Lett**, v.181, p.169-172, 1994.

TANIMORI, S.; NISHIMURA, T.; KIRIHATA, M. Synthesis of novel quinoxaline derivatives and its cytotoxic activities. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 19:4119e4121, 2009.

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. **Experimental neurology**, 208:1-25, 2007.

TAQATQEH, F.; MERGIA, E.; NEITZ, A.; EYSEL, U.T.; KOESLING, D.; MITTMANN, T. More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. **J Neurosci**, 22;29(29):9344-50, 2009.

TAYEH, M. A.; MARLETTA, M. A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. **J. Biol. Chem**, 264:19654-19658, 1989.

TECOTT, L.H.; SUN, L.M.; AKANA, S.F.; STRACK, A.M.; LOWENSTEIN, D.H.; DALLMAN, M.F.; JULIUS, D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. **Nature**. 6;374(6522):542-6, 1995.

THÖNY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochem J**, 347:1-16, 2000.

THÖNY, B.; DING, Z.; MARTINEZ, A. Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. **FEBS Lett**, 577:507-511, 2004.

TORRES, G. E.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 1, p. 13-25, 2003.

TRUDLER, D.; NASH, Y.; FRENKEL, D. New insights on Parkinson's disease genes: the link between mitochondria impairment and neuroinflammation. **J Neural Transm**. 2015.

TSANG, A.H.; CHUNG, K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta**, 1792:643-650, 2009.

TOBIN, J.E.; CUI, J.; WILK, J.B.; LATOURELLE, J.C.; LARAMIE, J.M.; MCKEE, A.C.; GUTTMAN, M.; KARAMOHAMED, S.; DESTEFANO, A.L.; MYERS, R.H. Sepiapterin reductase expression is increased in Parkinson's disease brain tissue. **Brain Res.**, 30:1139-11342, 2007.

TOULORGE, D.; GUERREIRO, S.; HIRSCH, E.C.; MICHEL, P.P. KATP channel blockade protects midbrain dopamine neurons by repressing a glia-to-neuron signaling cascade that ultimately disrupts mitochondrial calcium homeostasis. **J. Neurochem**, 114(2):553e564, 2010.

TUGLU, C.; KARA, S.H.; CALIYURT, O.; VARDAR, E.; ABAY, E. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. **Psychopharmacology (Berl)**, 170(4):429-33, 2003.

VICENTE, E.; VILLAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; GOLDMAN, R.C.; MONG, A. Quinoxaline 1,4-di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis. **Infect Disord Drug Targets**, 11(2):196-204, 2011.

VIEIRA, M.; PINHEIRO, C.; FERNANDES, R.; NORONHA, J.P.; PRUDÊNCIO, C. Antimicrobial activity of quinoxaline 1,4-dioxide with 2- and 3-substituted derivatives. **Microbiol Res**, 169(4):287-93, 2014.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Nature medicine**, 10:58-62, 2004.

VIVEROS, O.H.; LEE, C.L.; ABOU-DONIA, M.M.; NIXON, J.C.; NICHOL, C.A. Biopterin cofactor biosynthesis: independent regulation of GTP cyclohydrolase in adrenal medulla and cortex. **Science**, 213:349-350, 1981.

WAEHRENS, J.; GERLACH, J. Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. **J Affect Disord**, 3(2):193-202, 1981.

WAHNER, A.D.; BRONSTEIN, J.M.; BORDELON, Y.M.; RITZ, B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. **Neurology**, 69:1836-1842, 2007.

WATANABE, Y.U.; HIMEDA, T.; ARAKI, T. Mechanism of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. **Medical Science Monitor**. 11:17-23, 2005.

WOLTERS, E. C. Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. 266: 197-20, 2008.

WYSS, M.; BRAISSANT, O.; PISCHEL, I.; SALOMONS, G.S.; SCHULZE, A.; STOCKLER, S.; WALLIMANN, T. Creatine and creatine kinase in health and disease--a bright future ahead? **Subcell Biochem**, 46:309-34, 2007.

WARD, R.J.; DEXTER, D.T.; CRICHTON, R.R. Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. **Front Biosci**. 7:189-204, 2015.

WERNER, E. R.; BLAU, N.; THÖNY, B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology **Biochem J**, 438(3):397-414, 2011.

WERNER, E. R.; WERNER-FELMAYER, G.; MAYER, B. Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, 219:171-182, 1998.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.

WRIGHT, J. M.; WALL, R. A.; PERRY, T. L.; PATY, D. W. Chronic parkinsonism secondary to intranasal administration of a product of meperidine-analogue synthesis. **N Engl J Med**, 310(5):325, 1984.

YASUHARA, T.; SHINGO, T.; DATE, I. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. **Acta Med. Okayama**, 61(2):51e56, 2007.

YU, L.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; JIANG, R.; LUO, K.; DERRICK, M.; TAN, S. Developmental susceptibility of neurons to transient tetrahydrobiopterin insufficiency and antenatal hypoxia-ischemia in fetal rabbits. **Free Radic Biol Med**, 67:426-36, 2014.

YUN, H.Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Glutamate-stimulated calcium activation of Ras/Erk pathway mediated by nitric oxide. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.45, p.113-115, 1999.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONCALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D(3) signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, 50(47):10284–10292, 2011.

ZAROW, C.; LYNESS, S.A.; MORTIMER, J.A.; CHUI, H.C. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. **Arch Neurol**. 60:337–341, 2003.

ZHUO, M.; HU, Y.; SCHULTZ, C.; KANDEL, E. R.; HAWKINS, R. D. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. **Nature**, 368:635-639, 1994.

ZIEMSEN, T.; REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 13(6):323-32, 2007.

ZORZI, G.; REDWEIK, U.; TRIPPE, H.; PENZIEN, J. M.; THONY, B.; BLAU, N. Detection of sepiapterin in CSF of patients with sepiapterin reductase deficiency. **Mol. Genet. Metab**, 75:174-177, 2002.

ANEXO I

Artigo científico publicado na revista *European Journal of Medicinal Chemistry* em janeiro de 2015.
