



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS ARARANGUÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Ana Cristina de Bem Alves

**O papel dos receptores heterodímeros A_{2A} - D_2 no mecanismo de fadiga central
mediada pelo estriado**

Araranguá
2023

Ana Cristina de Bem Alves

**O papel dos receptores heterodímeros A_{2A} - D_2 no mecanismo de fadiga central
mediada pelo estriado**

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

Orientador(a): Prof. Aderbal Silva Aguiar jr, Dr.

Araranguá

2023

de Bem Alves, Ana Cristina

O papel dos receptores heterodímeros A2A-D2 no mecanismo de fadiga central mediada pelo estriado / Ana Cristina de Bem Alves
Orientador, Aderbal Silva Aguiar Jr, 2023.

66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Adenosina. 3. Fadiga . 4. Cafeína . 5. Estriado . I. Silva Aguiar Jr, Aderbal . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Ana Cristina de Bem Alves

**O papel dos receptores heterodímeros A_{2A}-D₂ no mecanismo de fadiga central
mediada pelo estriado**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 28 de abril de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Andréia Machado Cardoso, Dra.
Instituição Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Prof.(a) Manuella Pinto Kaster, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Aderbal Silva Aguiar Jr, Dr.
Orientador(a)

Araranguá, 2023.

Dedico este trabalho aos meus familiares, colegas de laboratório, amigos e professores que possibilitaram a realização desta pesquisa com excelência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela minha vida e secundamente à minha família, que sempre apoiou minha educação e não mediu esforços para que eu chegasse onde estou hoje. Além dos meus pais, Valdelir e Nizete, meus irmãos Gabriel, Maria Luiza e Mateus foram essenciais durante minha jornada acadêmica e crescimento pessoal. Também agradeço ao meu noivo, Hiago, que esteve ao meu lado apoiando minhas atividades científicas. Dedico este trabalho também a minha avó Robertina que faleceu no período do doutorado. Acredito que “aqueles que passam por nós, não vão sós. Deixam um pouco de si, e levam um pouco de nós”. Termino esta etapa da minha vida, confiante que dei o meu melhor e busquei ajudar os outros sempre que possível.

Ao meu orientador, prof. Aderbal, minha sincera gratidão. Este grande pesquisador me acolheu na iniciação científica e me guiou com paciência e sabedoria durante o mestrado e doutorado. Passamos por mudança de prédio, montagem do laboratório, ameaça de corte do investimento em pesquisa, pandemia covid-19, crises orçamentárias na bolsa CAPES, e ainda assim continuamos persistentes na educação e pesquisa de qualidade. A vida acadêmica (para aqueles que não sabem) é cheia de desafios, insônia e ansiedade. Ainda bem que encontramos colegas de laboratório que viram amigos e nos ajudam a vencer cada dia com boas risadas e esperança. Agradeço com carinho, minhas amigas Naiara, Ana Paula e Gabriela por esse apoio. Agradeço também a Tatyana, Maria Cristine e Liziane pelos projetos de colaboração.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências (PPGNeuro) da Universidade Federal de Santa Catarina que possibilitou a execução desta tese de doutorado e também proveu disciplinas, estrutura física e professores de excelência que contribuíram para meu aprendizado. Em especial, lembro com carinho do professor Adair, que nos deixou cedo, e do senhor Nivaldo, servidor agora aposentado, que foram exemplos de acolhimento e empatia. A toda a equipe administrativa e da coordenação do PPGNeuro pelo esforço incansável em garantir recurso e estrutura para os docentes e discentes. Por fim, agradeço a FAPESC, CAPES e CNPq pelo financiamento e pela minha bolsa de modalidade CAPES/DS, que possibilitou a dedicação exclusiva para a realização desta pesquisa.

“O ontem é história, o amanhã é um mistério, mas o hoje é uma dádiva. É por isso que se chama presente” (Filme Kung Fu Panda, 2008).

RESUMO

A adenosina é uma purina com alta seletividade para os receptores adenosinérgicos A₁R e A_{2A}R. A adenosina apresenta diferentes ações sobre o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores A₁R e A_{2A}R que retarda o processo de fadiga, se tornando o recurso ergogênico e psicoestimulantes mais utilizado no mundo. Os efeitos ergogênicos e psicoestimulantes da cafeína estão associados principalmente com o antagonismo central dos receptores A_{2A}R, entretanto os mecanismos exatos estão começando a ser elucidados. Além disso, os A_{2A}R são encontrados no estriado em estado de heterodimerização com receptores dopaminérgicos D₂R, tornando a investigação dos receptores heterodímeros A_{2A}R-D₂R relevante para o estudo da fadiga. Na estrutura desta tese serão apresentadas: uma introdução geral sobre o tema, três artigos que elucidam o papel dos receptores heterodímeros A_{2A}R-D₂R sobre a fadiga central, e por fim, uma discussão que abrange todos os estudos. O compilado de resultados da presente tese aponta quatro pontos principais: i) os efeitos ergogênicos e psicoestimulantes da cafeína ocorrem devido ao antagonismo A_{2A}R no estriado; ii) estes efeitos são acompanhados de modificações na neuroplasticidade estriatal e no metabolismo mitocondrial; iii) os efeitos do antagonismo A_{2A}R estão atrelados a potenciação da sinalização dopaminérgica via D₂R; iv) em modelo animal da doença de Parkinson, o bloqueio dos heterodímeros A_{2A}R-D₂R diminuem a fadiga provavelmente através do aumento da expressão de receptores D₃R. Em resumo, nossos resultados sugerem que os heterodímeros A_{2A}R-D₂R, particularmente localizados no estriado, estão envolvidos no mecanismo de fadiga central. Entretanto, possuem participação distinta frente ao déficit dopaminérgico e ao mecanismo de força.

Palavras-chave: adenosina; estriado; fadiga; cafeína.

ABSTRACT

Adenosine is a purine with high selectivity for A₁R and A_{2A}R adenosinergic receptors. Adenosine has different actions on the central (CNS) and peripheral (PNS) nervous system. Caffeine is a non-selective antagonist of A₁R and A_{2A}R receptors that delays fatigue, becoming the most used ergogenic and psychostimulant resource in the world. The ergogenic and psychostimulant effects of caffeine are mainly associated with central antagonism of A_{2A}R receptors. However, the exact mechanisms are beginning to be elucidated. Furthermore, the A_{2A}Rs are found in the striatum in a state of heterodimerization with dopaminergic D₂R receptors, which raises the importance of investigating these A_{2A}R-D₂R heterodimer receptors in the central fatigue. In the structure of this thesis will be presented: a general introduction about the theme, three manuscripts that elucidate the role of A_{2A}R-D₂R heterodimer receptors on the central fatigue, and a discussion section that includes all studies. The compilation of results highlights four main points: i) the ergogenic and psychostimulant effects of caffeine occur due to the A_{2A}R blockade in the striatum; ii) these effects are accompanied by changes in striatal neuroplasticity and mitochondrial metabolism; iii) the effects of A_{2A}R antagonism are linked to potentiation of dopaminergic signaling via D₂R; iv) in an animal model of Parkinson's disease, the blockade of A_{2A}R-D₂R heterodimer decreases fatigue probably by increasing the expression of D₃R receptors. In summary, our results suggest that A_{2A}R- D₂R heterodimers, particularly located in the striatum, are involved in the central fatigue mechanism. However, they have a distinct role in the presence of dopaminergic deficit and strength generation.

Keywords: adenosine; striatum; fatigue; caffeine.

SUMÁRIO

1	O PAPEL DOS RECEPTORES A_{2A} NA FADIGA CENTRAL	16
1.1	INTRODUÇÃO	16
1.1.1	O papel dos receptores A_{2A}-D₂ na fadiga	17
2	ARTIGO 1: O ESTRIADO CONTROLA OS EFEITOS ERGOGÊNICOS DA CAFEÍNA	19
2.1	INTRODUÇÃO	19
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.2.1	Experimentos #1 e #2	20
2.2.1.1	<i>Animais, cafeína e estereotaxia</i>	20
2.2.1.2	<i>Análises comportamentais</i>	20
2.2.1.3	<i>Teste do campo aberto</i>	21
2.2.1.4	<i>Teste do rotarod</i>	21
2.2.1.5	<i>Teste de força de preensão</i>	21
2.2.2	Experimento #3	21
2.2.2.1	<i>Eletrofisiologia</i>	21
2.2.3	Experimento #4	22
2.2.3.1	<i>Cultura celular e avaliação do metabolismo mitocondrial</i>	22
2.2.3.2	<i>Ensaio MTT</i>	23
2.2.3.3	<i>Protocolo de citometria de fluxo Mitotracker</i>	23
2.2.4	Análise estatística	23
2.3	RESULTADOS	24
2.3.1	Tratamento sistêmico e estriatal com cafeína é ergogênico	24
2.3.2	<i>Potenciação de longo prazo induzida por cafeína (LTP) no corpo estriado</i>	26
2.3.3	<i>A cafeína aumentou o metabolismo mitocondrial em células SH-SY5Y</i>	27
2.4	DISCUSSÃO	29
2.5	CONCLUSÃO	30
3	ARTIGO 2: O TRATAMENTO COMBINADO DE CAFEÍNA COM HALOPERIDOL REDUZ A FADIGA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON – UMA PROSPECTIVA AO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES HETERODÍMEROS A_{2A}R-D₂R	31

3.1	INTRODUÇÃO	31
3.2	MÉTODOS	32
3.2.1	Teste do campo aberto.....	33
3.2.2	Teste de força de preensão.....	33
3.2.3	Análise estatística.....	33
3.3	RESULTADOS.....	33
3.4	DISCUSSÃO	36
3.5	CONCLUSÃO	38
4	ARTIGO 3: OS HETERODÍMEROS A_{2A}R-D₂R ESTRIATAIS ESTÃO ASSOCIADOS AOS EFEITOS ERGOGÊNICOS DA CAFEÍNA	39
4.1	INTRODUÇÃO	39
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.2.1	Drogas.....	40
4.2.2	Teste do campo aberto.....	41
4.2.3	Teste de força de preensão.....	41
4.2.4	Teste incremental em esteira.....	42
4.2.5	Análise estatística.....	42
4.3	RESULTADOS.....	42
4.3.1	Os efeitos da inibição sistêmica e central de A_{2A}R-D₂R no controle motor	42
4.3.2	O efeito da inibição sistêmica e central de A_{2A}R-D₂R na força de preensão	44
4.3.3	Efeitos da inibição sistêmica dos A_{2A}R-D₂R no exercício de corrida...47	47
4.4	DISCUSSÃO	49
4.5	CONCLUSÃO	51
5	DISCUSSÃO GERAL	51
6	CONCLUSÃO FINAL	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE A – PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSC (CEUA/UFSC).....	64

1 O PAPEL DOS RECEPTORES A_{2A} NA FADIGA CENTRAL

1.1 INTRODUÇÃO

Fadiga é um termo usado desde a antiguidade. A Bíblia associava a dor do trabalho extenuante com a fadiga física e o sentimento de culpa e abatimento com a fadiga mental (MOTA; CRUZ; PIMENTA, 2005). O termo fadiga vem do latim *fatigãre* (CUNHA, 1999), e para começar a compreender este sintoma primeiro é importante diferenciar os termos fadiga e fadigabilidade. Fadiga é um dos sintomas mais importantes nas doenças neurológicas e pode ser definida como uma sensação subjetiva de cansaço, aumento da sensação de esforço, incompatibilidade entre o esforço despendido e o desempenho real, ou exaustão (DELUCA, 2005; GANDEVIA et al., 1995). Já a fadigabilidade é definida como a magnitude ou taxa de mudança em um critério de desempenho em relação a um valor de referência durante um determinado tempo de desempenho da tarefa ou medida de potência mecânica (AGUIAR et al., 2021; VØLLESTAD, 1997). A fadiga pode ser mensurada e estudada através da fadigabilidade (BAILEY; CHANNON; BEAUMONT, 2007; KRUPP; ELKINS, 2000). Entretanto, a padronização da associação entre fadiga e fadigabilidade é um objetivo importante para a pesquisa clínica e tem se mostrado um grande desafio (KLUGER; KRUPP; ENOKA, 2013).

O fisiologista italiano Angelo Mosso (1846-1910) apresentou no primeiro Congresso Internacional de Fisiologistas em Basel, na Suíça, suas descobertas sobre a fadiga muscular enquanto demonstrava o funcionamento de um ergógrafo (analisador de potência muscular) (DI GIULIO; DANIELE; TIPTON, 2006). Usando contrações concêntricas dos músculos flexores do dedo médio que eram estimulados eletricamente ou voluntariamente, Angelo foi capaz de caracterizar a fadiga muscular e sua associação com influências centrais e periféricas. O compilado de seus estudos levou a formulação de leis relativas à exaustão e a publicação do *La Fatiga*, onde dentre tantos estudos ele descreveu que o exercício poderia aumentar a força muscular e resistência enquanto prolongava a ocorrência da fadiga (DI GIULIO; DANIELE; TIPTON, 2006).

A fadiga como sintoma subjetivo associado às doenças é diferente da fadiga muscular desencadeada pelo exercício, descrita por vários pesquisadores (ALBUQUERQUE; SANCHEZ; GARLAND, 2015). A fadiga desencadeada pelo

exercício resulta na incapacidade de manter a mesma potência (fadiga tipo I) até sua interrupção (fadiga tipo II), e este “desgaste” do músculo ativo está bem descrito na literatura (ALBUQUERQUE; SANCHEZ; GARLAND, 2015). Por outro lado, também existem evidências sobre o papel do sistema nervoso central (SNC) no desenvolvimento da fadiga, descrita por alguns autores como fadiga central (CHONG et al., 2018; LOU, 2005). Sendo assim, a biologia do exercício sugere uma divisão dos mecanismos da fadiga em (i) periférica, basicamente decorrente de uma falha na regeneração de ATP muscular para sustentar a repetição da contração muscular necessária ao esforço; e (ii) central, decorrente do aumento de citocinas pró-inflamatórias (SEILER; MURDOCK; FAGUNDES, 2018), de comprometimento na neurotransmissão dopaminérgica (FARAMOUSHI; KHANI; SADRI, 2013), ou devido ao aumento da sinalização adenosinérgica no SNC (AGUIAR et al., 2020, 2021).

1.1.1 O papel dos receptores A_{2A}-D₂ na fadiga

A adenosina é uma purina com papel neuromodulador em condições fisiológicas e patofisiológicas em resposta ao estresse metabólico em um órgão ou tecido (JACOBSON; GAO, 2006). Entre os efeitos da sinalização adenosinérgica está o aumento do aporte sanguíneo através da vasodilatação ou angiogênese (RYZHOV et al., 2008), e a supressão da inflamação através da diminuição da ativação e infiltração de células inflamatórias e produção de citocinas (CHEN et al., 2006; MARTIN et al., 2006; OHTA; SITKOVSKY, 2001). A adenosina se liga a receptores de membrana acoplados a cascatas de sinalização intracelular. Existem quatro subtipos de receptores adenosinérgicos acoplados a proteína G, são estes os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. O segundo mensageiro associado a ligação adenosina-receptor é a ativação ou inibição da enzima adenilato ciclase (B. FREDHOLM; A. JACOBSON, 2009). Os receptores A₁ e A₃ estão acoplados a proteína G_i e inibem a produção do AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Os subtipos A_{2A} e A_{2B} estão acoplados a proteína G_s ou G_{olf} e estimulam a produção do AMPc. O receptor com menor afinidade pela adenosina é o subtipo A_{2B} que também pode estar acoplado a proteína G_q (RYZHOV et al., 2006). Por outro lado, o receptor A₃ possui afinidade intermediária e os subtipos A₁R e A_{2A}R alta afinidade pela adenosina (JACOBSON et al., 1995).

A cafeína é um antagonista de receptores adenosinérgicos que retarda a fadiga durante o exercício, e o uso do agonista A₁R/A₂R Adenosina-5'-N-etilcarboxamida (NECA) inibe os efeitos ergogênicos da cafeína no SNC (DAVIS et

al., 2003). Embora a cafeína possa atuar em ambos receptores A_1/A_{2A} , estudos posteriores demonstraram que é o antagonismo do $A_{2A}R$ que contribui para sua ação no cérebro (FREDHOLM et al., 1999; KASTER et al., 2015). Prova disso é que os efeitos da cafeína desaparecem em camundongos que não expressam $A_{2A}R$ (AGUIAR et al., 2020). Desde a descoberta dos efeitos ergogênicos da cafeína, vários antagonistas $A_{2A}R$ foram desenvolvidos, como os (i) antagonistas derivados de xantinas (e.g. CSC, DMPX e KW-6002) ou (ii) antagonistas não derivados de xantinas (e.g. SCH 58261) (ARMENTERO et al., 2011) e todos atenuaram a morte celular neuronal em modelos animais da doença de Parkinson (DP) (CARTA et al., 2009; CHEN et al., 2001a, 2001b; PIERRI et al., 2005). Em contrapartida, antagonistas A_1R como o DPCPX não demonstraram efeito protetor (CHEN et al., 2001b).

Os receptores A_{2A} são altamente expressos no estriado de mamíferos (BURGUEÑO et al., 2003). Estes receptores também são encontrados co-localizados com receptores dopaminérgicos D_2 (D_2Rs) em neurônios espinhosos médios (MSNs) GABAérgicos no estriado (TOZZI et al., 2011). Além disso, ambos receptores podem ser encontrados no estriado na forma de heterodímeros $A_{2A}R-D_2R$ (SALAMONE et al., 2012). Como mencionado anteriormente, os $A_{2A}R$ estão acoplados a proteínas G_{olf} estimulatórias, que ativam a enzima adenilato ciclase (AC), aumentando a produção de AMPc, que por sua vez estimula a enzima proteína quinase A (PKA), e culmina na ativação da MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos), do fator de transcrição CREB (proteína de ligação em resposta ao AMPc) e na expressão de diferentes genes associados a plasticidade neuronal, proliferação celular e mitose, como o c-FOS (BARROS et al., 2015; CIRUELA et al., 2006; FERRÉ et al., 2007). Por outro lado, os D_2R estão acoplados a proteínas G_i inibitórias que inibem a enzima AC (FERRÉ, 2010; HIGLEY; SABATINI, 2010). Desta forma, os receptores A_{2A} e D_2 possuem funções antagônicas (FERRÉ, 2016). Entretanto, evidências de estudos com os heterodímeros $A_{2A}R-D_2R$ têm demonstrado que o antagonismo desses receptores aumenta a motivação (SALAMONE et al., 2012).

Sendo assim, o objetivo desta tese é elucidar os efeitos do antagonismo dos heterodímeros $A_{2A}R-D_2R$ sobre a fadiga central.

2 ARTIGO 1: O ESTRIADO CONTROLA OS EFEITOS ERGOGÊNICOS DA CAFEÍNA

ALVES, A. C. B., et al. The Striatum Drives the Ergogenic Effects of Caffeine. **Purinergic Signalling**, 2023 (doi: 10.1007/s11302-023-09922-5).

2.1 INTRODUÇÃO

A fadiga do exercício é uma das principais barreiras ao exercício e ao desempenho esportivo (AGUIAR et al., 2020). A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um antagonista não seletivo da adenosina para os receptores A_1 e A_{2A} (A_{1R} e A_{2AR}) que exibem efeitos psicoestimulantes e ergogênicos (isto é, aumentam o desempenho físico), um dos auxiliares ergogênicos mais populares em exercícios e esportes (GRGIC; MIKULIC, 2017; JACKMAN et al., 1996; SOEREN et al., 1993; SPRIET et al., 1992). Os mecanismos centrais da cafeína têm evidências robustas de efeitos ergogênicos.

Os efeitos do aumento da cafeína incluem funções neurológicas aprimoradas, como velocidade de digitação, tempo de reação simples, atenção sustentada, memória e raciocínio lógico durante o repouso (COSTENLA; CUNHA; DE MENDONÇA, 2010). Davis demonstrou pela primeira vez que o agonista adenosinérgico 5'-N-etilcarboxamida adenosina (NECA) injetado nos ventrículos de ratos diminui o desempenho da corrida (DAVIS et al., 2003). Nós demonstramos o papel da adenosina extracelular no desenvolvimento da fadiga em camundongos (AGUIAR et al., 2021) e o papel fundamental do A_{2AR} no prosencéfalo de camundongos para os efeitos ergogênicos da cafeína (AGUIAR et al., 2020; AGUIAR JR; SPECK; CANAS, 2019). Por outro lado, o aumento de A_{2AR} (CUNHA, 2016; GOMES et al., 2011) é um mecanismo hipotético para o sintoma de fadiga em doenças neurológicas (ALVES et al., 2019).

A fadiga recruta conexões da via corticoestriatal que reduzem o desempenho (SCHIFF, 2008) e prejudicam a potenciação de longo prazo (LTP) e a depressão de longo prazo (LTD) (MA et al., 2018). Essa sinalização de adenosina induzida pelo exercício (AGUIAR et al., 2020, 2021) e mudança na neuroplasticidade (MA et al., 2018; SCHIFF, 2008) são responsáveis pelo componente central da fadiga. Neste trabalho, investigamos a neuroplasticidade estriatal da ergogenicidade da cafeína.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Quatro diferentes experimentos fazem parte deste trabalho. Primeiro, a cafeína foi administrada in vivo por via sistêmica (i.p., experimento #1) ou tratamento local via estereotaxia (estriado, experimento #2) para avaliar a fadiga e controle motor dos animais. A eletrofisiologia extracelular analisou a neuroplasticidade em fatias estriatais tratadas com cafeína (experimento #3), e o experimento #4 in vitro avaliou os efeitos da cafeína no metabolismo mitocondrial de linhagens celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.2.1 Experimentos #1 e #2

2.2.1.1 *Animais, cafeína e estereotaxia*

Nós utilizamos quarenta e um camundongos Swiss machos adultos (8-10 semanas, $47 \pm 1.5\text{g}$). O alojamento dos animais tinha iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12h, luzes acesas às 7h e temperatura ambiente de $21 \pm 1^\circ\text{C}$) e acesso livre a comida e água da torneira. O alojamento e o manejo dos animais seguiram a legislação brasileira vigente (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA) com número de aprovação bioética (CEUA 1503210519). A alocação dos animais nos grupos experimentais foi aleatória. O tratamento sistêmico (no volume de 10 mL/kg) com cafeína (15 mg/kg, i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, i.p.) foi realizado 15 min antes dos testes comportamentais e de exercício.

Os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina e duas cânulas foram implantadas no estriado direito (AP 0,5 mm; ML 2 mm e DV -3 mm) e outra no estriado esquerdo (AP 0,5 mm; ML -2 mm e DV -3 mm) (PAXINOS; FRANKLIN, 2012a) através da estereotaxia. Após uma semana da cirurgia, 4 μL de cafeína (15 μg) ou solução salina (0,5 μg) foram injetados em animais conscientes usando uma bomba de infusão (2 μL /minuto, Bonther®, Ribeirão Preto, Brasil) imediatamente antes dos testes comportamentais. A taxa de mortalidade foi de 22% (9 animais).

2.2.1.2 *Análises comportamentais*

Os experimentos comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo circadiano, após 1 hora de habituação, entre 9:00 e 16:00, em temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$)

e luminosidade (10 lux) controladas. Todos os equipamentos foram limpos com EtOH 20% após cada teste animal.

2.2.1.3 *Teste do campo aberto*

O teste de campo aberto circular (30×30cm, Insight® EP154C, Ribeirão Preto, Brasil) foi utilizado para mensurar a locomoção dos animais durante 5 minutos (AGUIAR et al., 2020). Os números de cruzamentos e levantamentos foram analisados manualmente.

2.2.1.4 *Teste do rotarod*

O teste rotarod (Insight® EFF411) avaliou a coordenação motora dos animais. O critério de inclusão primário foi permanecer no cilindro estacionário (0 RPM) por 30 segundos e girando (5 RPM) por 90 segundos (AGUIAR et al., 2009). Após 30 minutos, avaliou-se a latência para queda no cilindro acelerado (0,1 RPM/segundo) com rotação inicial de 5 RPM. Três quedas excluíram o animal da etapa de avaliação.

2.2.1.5 *Teste de força de preensão*

O teste de força de preensão (Bonther® 5 kgf) foi utilizado para mensurar a força e o tempo de preensão das patas dianteiras dos animais. Cada camundongo foi colocado individualmente na barra do medidor de preensão e, depois que ambas as patas estavam firmes, o experimentador puxou suavemente a cauda na direção oposta da barra. Foram realizadas 4 tentativas com 10 segundos cada e 1 minuto de intervalo entre as tentativas. Foi considerada a média das 3 melhores tentativas (3 de 4) (LUCA, 2008; PERSONIUS et al., 2010; TAKESHITA et al., 2017).

2.2.2 **Experimento #3**

2.2.2.1 *Eletrofisiologia*

Vinte e quatro camundongos C57BL/6 foram eutanasiados por deslocamento cervical, e o cérebro foi rapidamente removido (dentro de 1 minuto) e colocado em líquido cefalorraquidiano artificial gelado e oxigenado (95% O₂ e 5% CO₂) (ACSF; em mM: 124 NaCl, 4,5 KCl, 1,2 Na₂HPO₄, 26 NaHCO₃, 1,2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glicose). Fatias estriatais (400 µm de espessura) foram obtidas usando um vibrátomo 1500 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e deixadas em recuperação por pelo menos 90 min antes

de serem transferidas para uma câmara de registro submersa e superfundidas a 3 mL/min com ACSF oxigenado mantido a 30,5 °C. A transmissão corticoestriatal foi avaliada com o eletrodo estimulador colocado no corpo caloso e o eletrodo de registro preenchido com ACSF (2–5 MX), colocado na porção dorsolateral do corpo estriado. O estímulo neuronal foi realizado em estimulador Grass S44 (Grass Technologies, RI), e os registros foram obtidos em amplificador ISO-80 (World Precision Instruments, Hertfordshire, Inglaterra) e digitalizados com sistema ADC-42 (Pico Technologies, Pelham, NY). Três respostas consecutivas de pico populacional foram calculadas e quantificadas usando o software Win LTP v. 2.20b (WinLTP Ltd., Bristol, Reino Unido). A relação entre a responsividade dendrítica e a entrada sináptica foi determinada com base nas curvas de entrada/saída nas quais a amplitude do pico populacional foi plotada versus a intensidade do estímulo antes e depois da administração de diferentes concentrações de cafeína na solução ACSF. A intensidade da estimulação foi então selecionada para produzir 40% a 50% da resposta máxima. As fatias corticoestriatais foram tratadas com 1µM, 3µM e 10µM de cafeína em solução oxigenada de ACSF por vinte minutos antes da estimulação de alta frequência (HFS). Este protocolo consiste em três trens (100 Hz por 1 s com intervalos de 10 s entre os trens). A amplitude da resposta de pico da população para cada concentração foi avaliada 30 minutos após o HFS (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017; LOPES; PLIÁSSOVA; CUNHA, 2019; PAILLÉ et al., 2010).

2.2.3 Experimento #4

2.2.3.1 *Cultura celular e avaliação do metabolismo mitocondrial*

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram mantidas em DMEM/F12 suplementado com 10% FBS, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C, com 5% de CO₂, sob condições padrão. As células foram incubadas com cafeína (1µM, 3µM e 10µM) ou PBS. Um ensaio de MTT avaliou a viabilidade das células 20 minutos após a exposição à cafeína (DE OLIVEIRA et al., 2013). A massa mitocondrial e o potencial de membrana foram analisados usando *mitotracker green* e *red* (DE OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.3.2 *Ensaio MTT*

Células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços em DMEM-F12 com 10% de FBS ($1\frac{1}{2} \times 10^4$ células/poço). Após o tratamento com cafeína, as células foram incubadas com 0,5 mg/ml de MTT por duas horas a 37 °C. A viabilidade celular foi medida pela quantificação da atividade das desidrogenases celulares que reduzem o MTT (3-4,5-dimetiltiazolil-2,5-difenil-2H10 brometo de tetrazólio, Sigma Inc.) a um sal púrpura de formazan [HANSEN et al., 1989]. O sal formazan formado foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) e a absorbância foi quantificada em um espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 540 nm [(DE OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.3.3 *Protocolo de citometria de fluxo mitotracker*

Mitotracker green FM (Invitrogen) (MTG) ou *mitotracker* red (MTR) são usados para coloração de mitocôndrias de células vivas, dependendo, respectivamente, do conteúdo lipídico da organela (massa mitocondrial) e da atividade oxidativa (potencial de membrana mitocondrial). Resumidamente, após o tratamento com cafeína, as células SH-SY5Y foram lavadas em solução salina PBS e colhidas usando tripsina. Em seguida, as células foram ressuspensas e incubadas por 20 min no escuro com 100 nM de MTG e MTR diluído em (37°C) DMEM F-12 pré-aquecido. Uma banda verde mediu a emissão de fluorescência (FL1; 530 nm/30) e vermelho (FL3; passagem longa de 670 nm) em um FACSCalibur usando o software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), e os dados de 10.000 eventos foram adquirido usando uma escala logarítmica para todos os parâmetros, incluindo FSC e SSC. A média da intensidade de fluorescência de FL1-H e FL3-H foi avaliada para estimar a massa e o potencial mitocondrial, respectivamente. Todas as análises de citometria de fluxo foram realizadas usando o software FCS Express 4 (De Novo, Pasadena, CA, EUA) (DE OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.4 **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism versão 6.0 para Windows. GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com. Um teste t de Student unicaudal foi utilizado para as análises do teste de campo aberto, rotarod e força de preensão; o tamanho do efeito de Cohen (d) foi calculado como pequeno

(0,2), médio (1 0,5), grande (0,8) e muito grande (1,3) (SULLIVAN; FEINN, 2012). A ANOVA de uma via analisou os ensaios eletrofisiológicos e mitocondriais; O tamanho do efeito de Cohen (η^2) foi calculado como pequeno (0,01), médio (0,09) e grande (0,25) (1,3) (SULLIVAN; FEINN, 2012). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Tratamento sistêmico e estriatal com cafeína é ergogênico

O tratamento sistêmico com cafeína aumentou o número de cruzamentos ($t_{22} = 2.16$, $p < 0.05$, $d = 1.0$, fig.1a) e levantamentos ($t_{22} = 2.84$, $p < 0.05$, $d = 1.2$, fig.1b) no teste de campo aberto, e coordenação motora no teste do rotarod ($t_{28} = 3.08$, $p < 0.05$, $d = 0.45$, fig.1c). A cafeína não alterou o pico de força de preensão ($t_{22} = 1.37$, $p = 0.09$, fig.1d), mas aumentou o tempo de preensão ($t_{22} = 3.31$, $p < 0.05$, $d = 1.13$, fig.1e). A figura 1f mostra a área sob a curva (AUC) dos resultados de força versus tempo (fig.1f) e demonstra que os efeitos ergogênicos da cafeína são devidos à magnitude do impulso ($t_{22} = 2.14$, $p < 0.05$, $d = 0.81$, fig.1f-f').

A Figura 2a (topo) mostra as coordenadas do estriado de camundongos de acordo com Paxinos e Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2012b), e a fig.2a (parte inferior) mostra uma visão coronal do cérebro de um camundongo, confirmando que as cânulas foram implantadas no respectivo local. A cafeína injetada diretamente no corpo estriado aumentou o número de cruzamentos ($t_8 = 9.81$, $p < 0.05$, $d = 1.82$, fig. 2b) e levantamentos ($t_8 = 3.66$, $p < 0.05$, $d = 1.50$, fig. 2c) no teste do campo aberto. Da mesma forma, como o tratamento sistêmico, a cafeína no corpo estriado não alterou o pico de força ($t_8 = 0.85$, $p = 0.20$, fig. 2d), mas melhorou o tempo de preensão ($t_8 = 4.08$, $p < 0.05$, $d = 1.56$, fig. 2e) no teste de força de preensão. O efeito ergogênico na magnitude do impulso (fig.2f) permanece no tratamento tópico com cafeína no corpo estriado ($t_8 = 3.50$, $p < 0.05$, $d = 1.48$, fig. 2f').

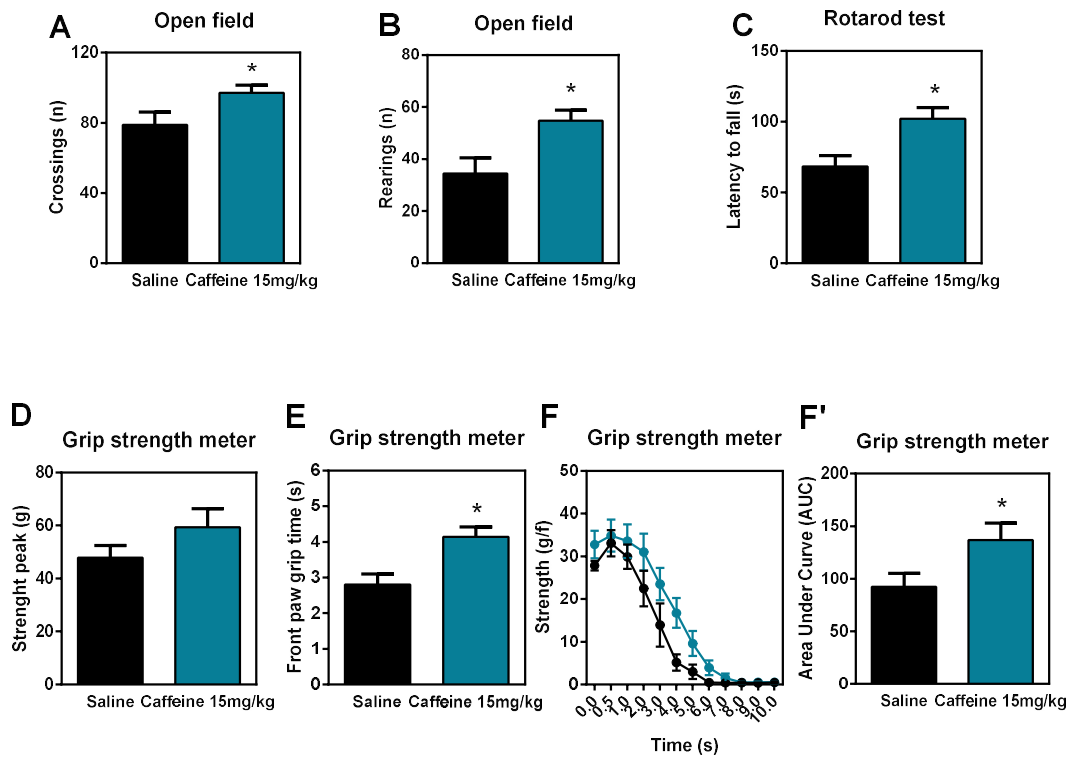


Figura 1. Efeitos comportamentais da cafeína sistêmica em camundongos, nomeadamente psicoestimulante (A e B), melhoria da coordenação motora (C), sem efeito na força de preensão (D), mas aumento do tempo de preensão (E). O painel F' é a integral de força \times tempo (F), representando o aumento do impulso induzido pela cafeína. Os dados são média \pm SEM. N=7–8 animais/grupo para três experimentos independentes. * $P < 0,05$ vs. solução salina (teste t de Student).

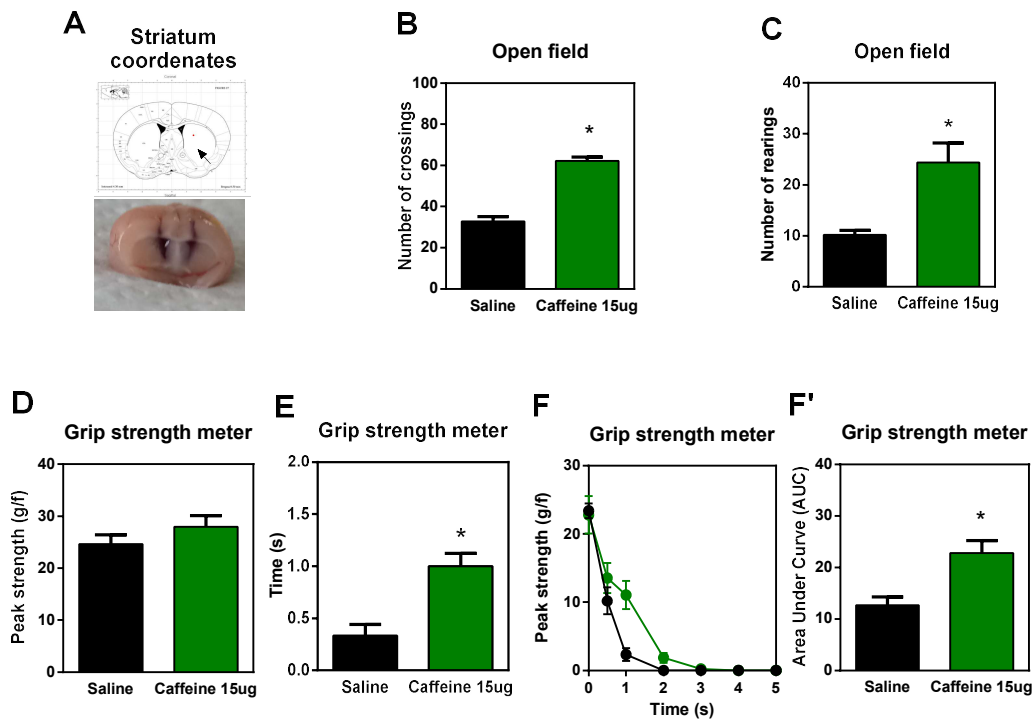


Figura 2. Os efeitos comportamentais da injeção intraestriatal (A) de cafeína em camundongos, nomeadamente psicoestimulante (B e C), nenhum efeito na força de preensão (D), mas um aumento no tempo de preensão (E). O painel F' é a integral da força \times tempo (F), representando o aumento do impulso induzido pela cafeína. Os dados são média \pm SEM. N=7–8 animais/grupo para três experimentos independentes. *P<0,05 vs. solução salina (teste t de Student).

2.3.2 Potenciação de longo prazo induzida por cafeína (LTP) no corpo estriado

A Fig.3a mostra a localização do eletrodo de estímulo (superior) no corpo caloso e o eletrodo de registro (inferior) na região dorsolateral de uma fatia do corpo estriado. A primeira curva de entrada/saída (fig.3.b) de estímulos elétricos crescentes mostra a viabilidade da fatia funcional no período de pré-tratamento sem cafeína. Após 20 min de tratamento com cafeína, nenhuma concentração alterou a plasticidade basal das fatias (fig.3c). A segunda curva de entrada/saída (fig.3.D) de estímulos elétricos crescentes mostra a viabilidade funcional das fatias após 20 min de tratamento com concentrações crescentes de cafeína (1,0-10,0 μ M). A aplicação do protocolo HFS (estimulação de alta frequência) (fig.3e, seta preta) após 10 min de plasticidade sináptica basal demonstra resposta LTD em fatias de controle, sem qualquer tratamento, e em concentrações de cafeína de 3,0 e 10,0 μ M. A Fig.3f representa os

10 minutos finais do protocolo LTP com mudança no comportamento das fatias de LTD para LTP com cafeína 1,0 μM ($F_{1,10} = 4,97$, $p < 0,05$, fig.3f).

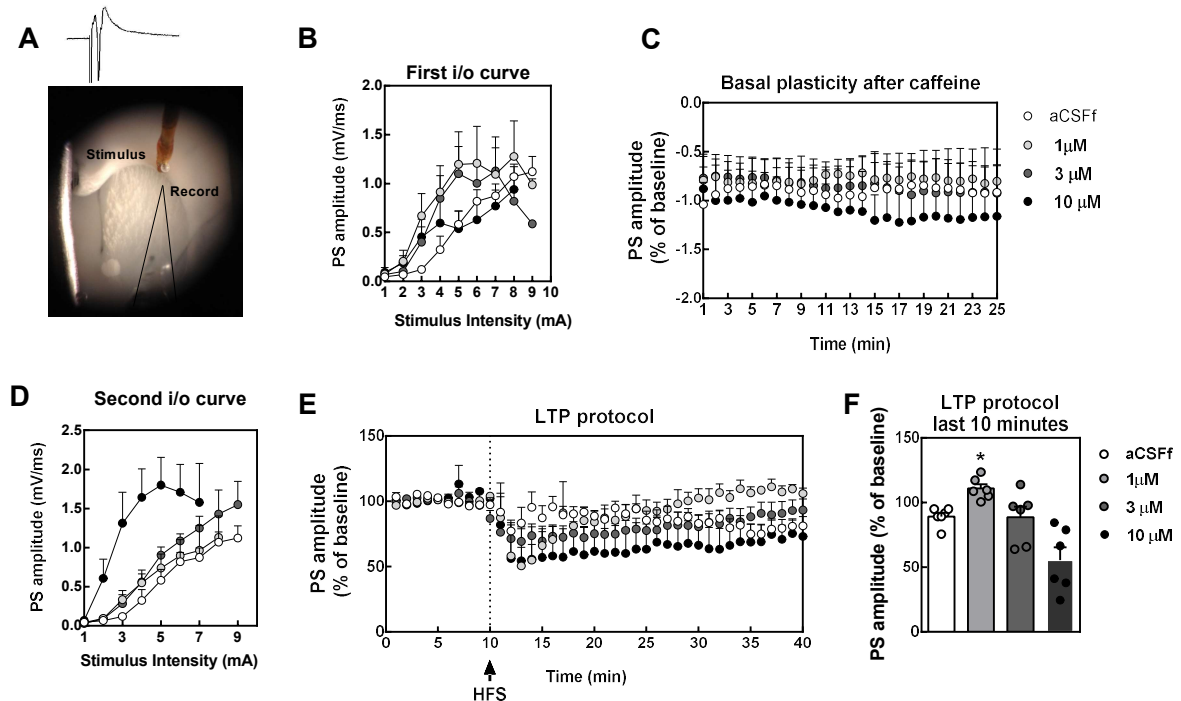


Figura 3. Registros eletrofisiológicos extracelulares das respostas de pico da população nas sinapses corticoestriadas no corpo estriado dorsolateral em cortes coronais do cérebro (A). Todos os grupos apresentaram curvas de entrada/saída superponíveis, indicando eficiência semelhante da transmissão corticoestriatal (B). Alteração da transmissão sináptica basal após exposição a diferentes concentrações de cafeína (C). Vinte minutos após a infusão de cafeína, apenas 10 μM de cafeína aumentaram a eficiência sináptica (D). A indução da plasticidade sináptica por estimulação de alta frequência (HFS) causou uma depressão de longo prazo (LTD) nas sinapses corticoestriatais (E), que foi alterada para uma potencialização de longo prazo (LTP) após a exposição a 1 μM de cafeína, conforme ilustrado no curso do tempo (E) e nas alterações médias da amplitude da plasticidade sináptica 30-40 min após EHF (F). Os dados são médias \pm SEM ($n=6$ fatias/grupo). ANOVA de uma via seguida de testes post hoc de Newman-Keuls). aLCR - líquido cefalorraquidiano artificial. i/o—entrada e saída. PS - População de pico pop.

2.3.3 A cafeína aumentou o metabolismo mitocondrial em células SH-SY5Y

A cafeína aumentou agudamente a massa e o potencial de membrana das mitocôndrias das células SH-SY5Y. A viabilidade celular não foi modificada em nenhuma concentração de cafeína (1 μm , 3 μm e 10 μm) analisada pelo ensaio MTT

($F_{3,68} = 0,58$, $p=0,6$, ($\eta^2 = 0,03$, fig.2a). A cafeína na concentração de $1\mu\text{M}$ aumentou o potencial de membrana mitocondrial ($1\mu\text{M}$, $F_{3,10} = 14,99$, $p < 0,05$, ($\eta^2 = 0,83$, fig.2b) e a massa mitocondrial ($F_{3,11} = 20,87$, $p < 0,05$, ($\eta^2 = 0,81$, fig.2c) de células SH-SY5Y. A Fig.1F mostra uma mudança de fluorescência para a direita em uma concentração de $1\mu\text{M}$.

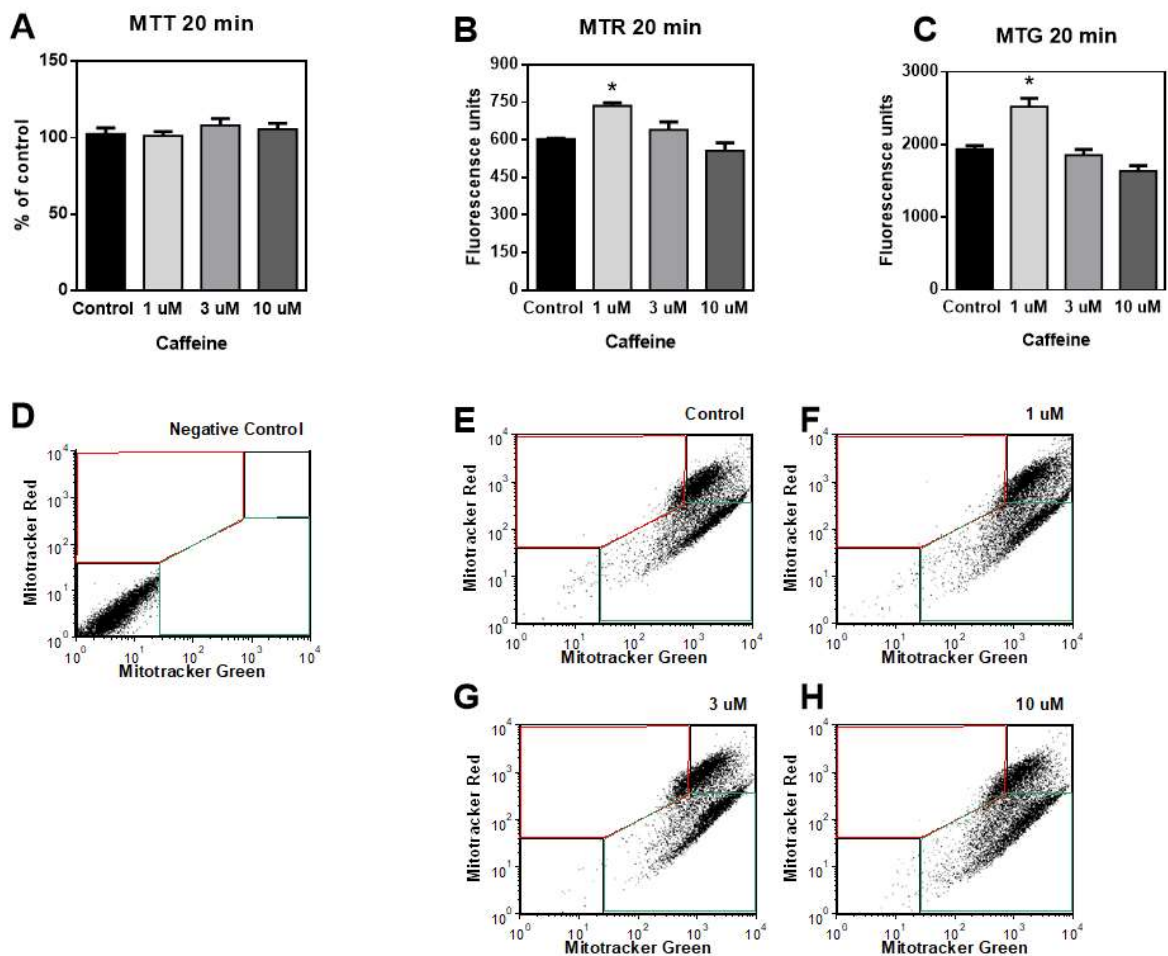


Figura 4. A cafeína melhorou o metabolismo mitocondrial em células SH-SY5Y. Enquanto não alterou a viabilidade celular (A), a cafeína ($1\mu\text{M}$) aumentou o potencial de membrana mitocondrial (B) e a massa mitocondrial (C). Os painéis D–H representam as análises de citometria de fluxo. Os dados são médias \pm SEM. ANOVA de uma via seguida de testes post hoc de Newman-Keuls). MTG - *mitotracker green*. MTR—*mitotracker red*. MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

2.4 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que o efeito ergogênico da cafeína na força de preensão está associado a uma LTP no estriado, provavelmente com aumento da massa mitocondrial e potencial de membrana dos neurônios. Nossos dados comportamentais reforçam a evidência de que a administração sistêmica de cafeína é ergogênica (AGUIAR et al., 2020; DAVIS et al., 2023; JACKMAN et al., 1996; SOEREN et al., 1993). No entanto, enfatizamos que esse conhecimento prévio analisou o desempenho da corrida em esteira, e demonstramos aqui pela primeira vez que a cafeína aumenta a força muscular (pegada) em camundongos, efeito bem observado em humanos (DELLELI et al., 2022; GRGIC, 2022). Além disso, nós demonstramos pela primeira vez que o tratamento local com cafeína no corpo estriado reproduz esses efeitos ergogênicos (tratamento sistêmico). Este tamanho de efeito ergogênico foi grande e muito grande para os tratamentos sistêmico e local, respectivamente. A modificação do desempenho da força foi através do impulso. O tamanho da força de preensão não mudou, mas foi aplicado por mais tempo. Mais uma vez, demonstramos que a cafeína modifica um índice de desempenho físico derivado do tempo (força \times tempo), como demonstramos anteriormente com a potência de corrida (força \div tempo) (AGUIAR et al., 2020). Assim, temos construído um corpo de evidências que reforça os mecanismos neurológicos dos efeitos ergogênicos da cafeína. Os efeitos ergogênicos da cafeína dependem do antagonismo do $A_{2A}R$ neuronal no SNC do roedor (AGUIAR et al., 2020; DAVIS et al., 2023), reforçado pelo efeito local (estriado) e alteração da neuroplasticidade demonstrada neste trabalho, uma região cerebral densa em $A_{2A}R$ (AGUIAR et al., 2020; GANGAROSSA et al., 2013). A cafeína melhora a coordenação motora do animal (no rotarod) e o tempo de preensão, alterando a neuroplasticidade estriatal para LTP. Em ratos, a cafeína injetada nos ventrículos cerebrais dos ratos melhora o desempenho da esteira, que desaparece com o agonista adenosinérgico NECA (DAVIS et al., 2023).

Nossos resultados fortalecem a hipótese sobre o mecanismo ergogênico da cafeína através do antagonismo adenosinérgico no SNC (AGUIAR et al., 2020; DAVIS et al., 2023). Camundongos tratados com cafeína e SCH 58261 demonstraram maior desempenho na corrida, enquanto nocautes $A_{2A}R$ no prosencéfalo tratados com cafeína não demonstraram esse efeito (AGUIAR et al., 2020). Os efeitos ergogênicos da cafeína estão associados ao antagonismo $A_{2A}R$ (FISONE; BORGKVIST; USIELLO,

2004). Como o estriado é denso em A_{2A}R (GANGAROSSA et al., 2013), injetamos cafeína no estriado dorsolateral de camundongos e observamos efeitos psicomotores e ergogênicos. Os efeitos psicomotores da cafeína no corpo estriado estão associados à modulação alostérica dos heterômeros A_{2A}R-D₂R e ao controle pré-sináptico da neurotransmissão glutamatérgica (CIRUELA et al., 2006). Os A_{2A}Rs estriatais facilitam a atividade neuronal no estriado aumentando a sinalização dopaminérgica, mais por aumentar a disponibilidade de receptores D₂ e D₃ do que por aumentar a neurotransmissão de dopamina (CHEN et al., 2001a). Assim, a interação alostérica A_{2A}R-D₂R modula os efeitos psicoestimulantes, e acreditamos que possa estar envolvida nos mecanismos ergogênicos.

O controle da cafeína da liberação pré-sináptica de glutamato e o aumento da função NMDA no corpo estriado podem contribuir para a atenuação da fadiga durante o exercício. Além disso, a LTP que observamos com concentrações fisiológicas de magnésio ocorre com a ativação dos receptores NMDA glutamatérgicos (DRAGICEVIC et al., 2012), sugerindo facilitação da neurotransmissão glutamatérgica em camundongos tratados com cafeína. Por outro lado, a fadiga induzida pelo exercício prejudica a LTP dependente do receptor NMDA na via corticoestriatal (MA et al., 2018). O aumento do metabolismo mitocondrial observado nas células suporta o aumento da atividade neuronal no local, como demonstrado anteriormente em camundongos transgênicos APP^{sw} (DRAGICEVIC et al., 2012)] e células de neuroblastoma (GIUNTA; ANDRIOLO; CASTORINA, 2014).

2.5 CONCLUSÃO

Nós resultados demonstram que os efeitos psicoestimulantes e ergogênicos da cafeína injetada diretamente no estriado acompanha modificações de neuroplasticidade, o que sugere a facilitação glutamatérgica como mecanismo ergogênico da cafeína.

3 ARTIGO 2: O TRATAMENTO COMBINADO DE CAFEÍNA COM HALOPERIDOL REDUZ A FADIGA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON – UMA PROSPECTIVA AO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES HETERODIMÉRICOS A_{2A}R-D₂R

ALVES, A. C. B., AGUIAR Jr, A. S. Caffeine *plus* Haloperidol Reduces Fatigue in an Experimental Model of Parkinson's Disease – A Prospective to A_{2A}-D_{2R} Heterodimer Antagonism. **Purinergic Signalling**, 2023 (doi: 10.1007/s11302-023-09933-2).

3.1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta aproximadamente quatro milhões de pessoas (HAYES, 2019). A exposição a pesticidas e a vida em áreas rurais são fatores de risco para o desenvolvimento da DP (SEMn CHUK; LOVE; LEE, 1992), enquanto o consumo de café mostrou efeitos protetores (HERNÁN et al., 2002). O achado clássico da DP é a degeneração dos receptores dopaminérgicos em neurônios na *substância nigra pars compacta* (ARON, 2009). Embora a etiologia da DP não seja totalmente clara (HAYES, 2019), o sistema adenosinérgico está envolvido na patogênese da doença (SCHAPIRA; JENNER, 2011). O aumento da adenosina está ligado à atividade neural prolongada e à fadiga mental (ALVES et al., 2019). L-DOPA (Levodopa), um precursor da dopamina, é o tratamento primário para o controle da DP (HAYES, 2019). No entanto, os tratamentos farmacológicos disponíveis não abrangem toda a sintomatologia e causam efeitos colaterais à longo prazo, como as discinesias (SHIOZAKI et al., 1999).

Os sintomas motores típicos da DP incluem bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (HOEHN; YAHR, 1967). No entanto, os sintomas não motores são igualmente importantes (FRIEDMAN; FRIEDMAN, 1993) e permanecem um desafio para as indústrias farmacêuticas (JENSEN et al., 2018). A fadiga é um sintoma não motor prevalente em 30-50% dos pacientes com DP (HERLOFSON; LARSEN, 2003) e uma queixa atual de muitos pacientes neurológicos (KLUGER; KRUPP; ENOKA, 2013). A neurotransmissão dopaminérgica comprometida (SCHEFFER et al., 2021) e o aumento da sinalização adenosinérgica no sistema nervoso central (SNC) estão associados ao desenvolvimento de fadiga na DP (AGUIAR et al., 2020). Modelos experimentais de DP auxiliam na investigação da fadiga (DANTZER et al., 2014). A reserpina é um inibidor do transportador vesicular

de monoaminas (VMAT) que diminui a ligação das monoaminas no SNC, principalmente a dopamina (SÜDHOF; STARKE, 2008), causando prejuízos motores e cognitivos que se assemelham à DP (SCHEFFER et al., 2021).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) retarda a fadiga através do antagonismo do receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) no SNC (DAVIS et al., 2003). O A_{2A}R é altamente expresso no estriado de mamíferos, e eles são encontrados colocalizados com receptores dopaminérgicos D₂ (D₂R) (TOZZI et al., 2011) ou na forma de heterodímero (A_{2A}R-D₂R) (ARMENTERO et al., 2011; AZDAD et al., 2009). O A_{2A}R está acoplado a proteína estimuladora G_s, que estimula a enzima adenilato ciclase (AC), aumentando o AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) e ativando a via de sinalização da proteína quinase A (PKA) (CIRUELA et al., 2006). Por outro lado, o D₂R está acoplado a proteína inibidora de G_i, inibindo a cascata AC e PKA (FERRÉ, 2010; HIGLEY; SABATINI, 2010). O antagonismo A_{2A}R já está associado à neuroproteção (TAURA et al., 2018a). No entanto, uma vez que a farmacologia dos receptores é modificada pela heteromerização, a forma heterodímera de A_{2A}R-D₂R levantou questões sobre os alvos potenciais para pacientes com DP (ORRU et al., 2011). Assim, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos da cafeína e do Haloperidol (um antagonista D₂R) na fadiga induzida por um modelo de DP usando reserpina.

3.2 MÉTODOS

Sessenta camundongos Swiss machos (8 semanas de idade, 49.22 ± 1,3 g) foram adquiridos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e alojados em gaiolas coletivas (38 x 32 x 17 cm) com livre acesso a água e comida. Os camundongos foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas a uma temperatura ambiente de 22 ± dois °C e umidade monitorada. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA-PP10519). Os animais foram aleatoriamente designados para os grupos experimentais (10 animais por grupo). A reserpina [1 mg/kg, via subcutânea (s.c.)] foi administrada 24 horas antes da avaliação da fadiga. A cafeína [6 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.)] foi administrada 15 minutos antes dos testes. L-DOPA (5 mg/kg, via i.p.) foi administrada 1 hora antes, e Haloperidol (0,25 mg/kg, via i.p.) 30 minutos antes dos testes. Salina 0,9% (NaCl) foi o veículo, e todos os tratamentos foram administrados em um volume de 10 ml/kg. As doses foram escolhidas com base em experimentos piloto e na literatura (AGUIAR et

al., 2009; FRANCISCO SOLANO et al., 2017; SANBERG; OSSENKOPP; KAVALIERS, 1996), incluindo a dosagem não cataléptica de Haloperidol.

3.2.1 Teste do campo aberto

O controle motor foi avaliado no teste do campo aberto (Insight® EP154). Os camundongos foram colocados individualmente no centro de um aparato circular (300x300mm) e deixados para explorar por 5 min (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). O número de cruzamentos e levantamentos foram analisados manualmente.

3.2.2 Teste de força de preensão

A fadiga foi avaliada utilizando o equipamento de força de preensão e seu respectivo software (Bonther® 5 kgf). Cada camundongo foi colocado individualmente na barra do equipamento e, quando ambas as patas dianteiras a seguravam firmemente, o experimentador puxou suavemente a cauda na outra direção. Foram realizadas 4 tentativas com 10 segundos cada. O valor final é a média das três melhores tentativas (DUNNETT; TORRES; ANNETT, 1998; LUCA, 2008; PERSONIUS et al., 2010; TAKESHITA et al., 2017).

3.2.3 Análise estatística

A análise estatística e os gráficos foram realizados no GraphPad Prism®, versão 9.0. O teste ANOVA de uma via (comparações múltiplas) e o teste de comparação post-hoc de Tukey foram usados para investigar as diferenças entre os grupos experimentais. Outliers foram testados usando o método ESD (*extreme studentized deviate*). O valor de um animal foi detectado como outlier e removido do grupo reserpina + Haloperidol no teste de campo aberto (número de cruzamentos e levantamentos). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.3 RESULTADOS

Os grupos de animais não diferiram quanto ao peso corporal ($[F_{5, 54}] = 0.44$, $p > 0.05$, fig. 1A). A reserpina prejudicou o controle motor no teste de campo aberto, conforme demonstrado pela diminuição do número de cruzamentos ($[F_{5, 53}] = 8.57$, $p < 0.05$, fig.

1B) e levantamentos ($[F_{5, 53}] = 7.96, p < 0.05$, fig. 1C). A L-DOPA melhorou significativamente o número de cruzamentos ($[F_{5, 53}] = 4.69, p < 0.05$, fig. 1B) e levantamentos ($[F_{5, 53}] = 4.49, p < 0.05$, fig. 1C). O tratamento isolado com Haloperidol diminuiu o número de cruzamentos ($[F_{5, 53}] = 8.78, p < 0.05$, fig. 1B) e levantamentos ($[F_{5, 53}] = 6.67, p < 0.05$, fig. 1C) no teste de campo aberto em comparação com o grupo controle. O tratamento isolado com cafeína aumentou o número de cruzamentos ($[F_{5, 53}] = 4.22, p < 0.05$, fig. 1B), mas não de levantamentos ($[F_{5, 53}] = 2.16, p > 0.05$, fig. 1C). Por outro lado, o tratamento combinado de cafeína mais Haloperidol foi eficaz em melhorar tanto o número de cruzamentos ($[F_{5, 53}] = 6.43, p < 0.05$, fig. 1B) quanto de levantamentos ($[F_{5, 53}] = 4.84, p < 0.05$, fig. 1C) no teste de campo aberto.

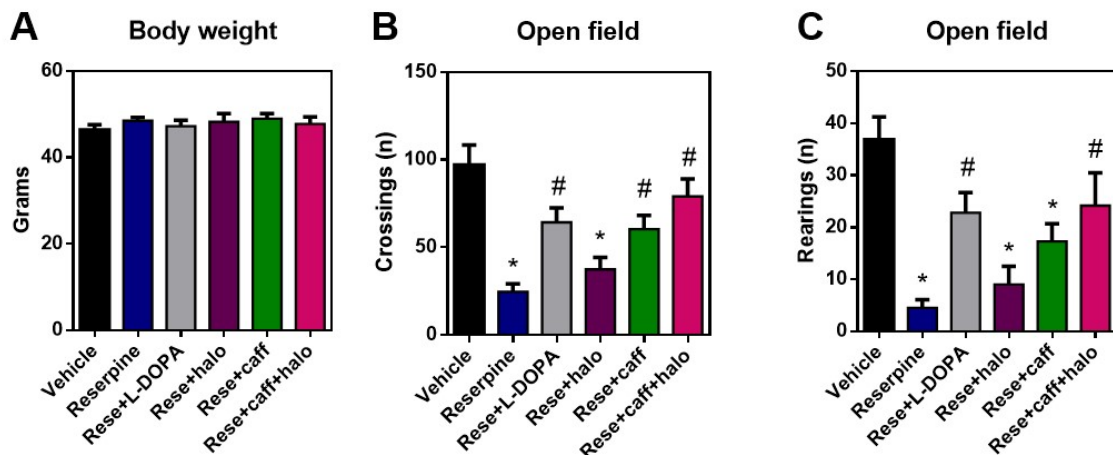


Figura 5. A reserpina induz déficits de controle motor no teste de campo aberto. Peso corporal (A), número de cruzamentos (B) e número de levantamentos (C). * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à reserpina. ANOVA de uma via, $n=10$ animais/grupo; Rese+halo $n=9$. Rese = reserpina, caff = cafeína, halo = Haloperidol.

A reserpina induziu fadiga, conforme demonstrado pela redução do pico de força relativa (números corrigidos pelo peso corporal do animal) ($[F_{5, 54}] = 8.80, p < 0.05$, fig. 2A), tempo de preensão ($[F_{5, 54}] = 4.14, p < 0.05$, fig. 2B) e área sob a curva (AUC) ($[F_{5, 54}] = 6.08, p < 0.05$, fig. 2C-D) no teste de força de preensão. Nenhum tratamento foi eficaz no aumento da força (fig.2A). No entanto, L-DOPA ($[F_{5, 54}] = 6.26, p < 0.05$, fig. 2B), Haloperidol ($[F_{5, 54}] = 5.44, p < 0.05$, fig. 2B), cafeína ($[F_{5, 54}] = 5.71, p < 0.05$, fig. 2B) e a combinação de cafeína mais Haloperidol ($[F_{5, 54}] = 6.15, p < 0.05$, fig. 2B) aumentaram significativamente o tempo de preensão. A análise da área sob a curva

(AUC), que considera a força ao longo do tempo no teste de força de preensão, evidencia que apenas o tratamento L-DOPA ($[F_{5,54}] = 4.59, p < 0.05$, fig. 2C-D) e cafeína mais Haloperidol ($[F_{5,54}] = 5.16, p < 0.05$, fig. 2C-D) foram eficazes na melhora da fadiga.

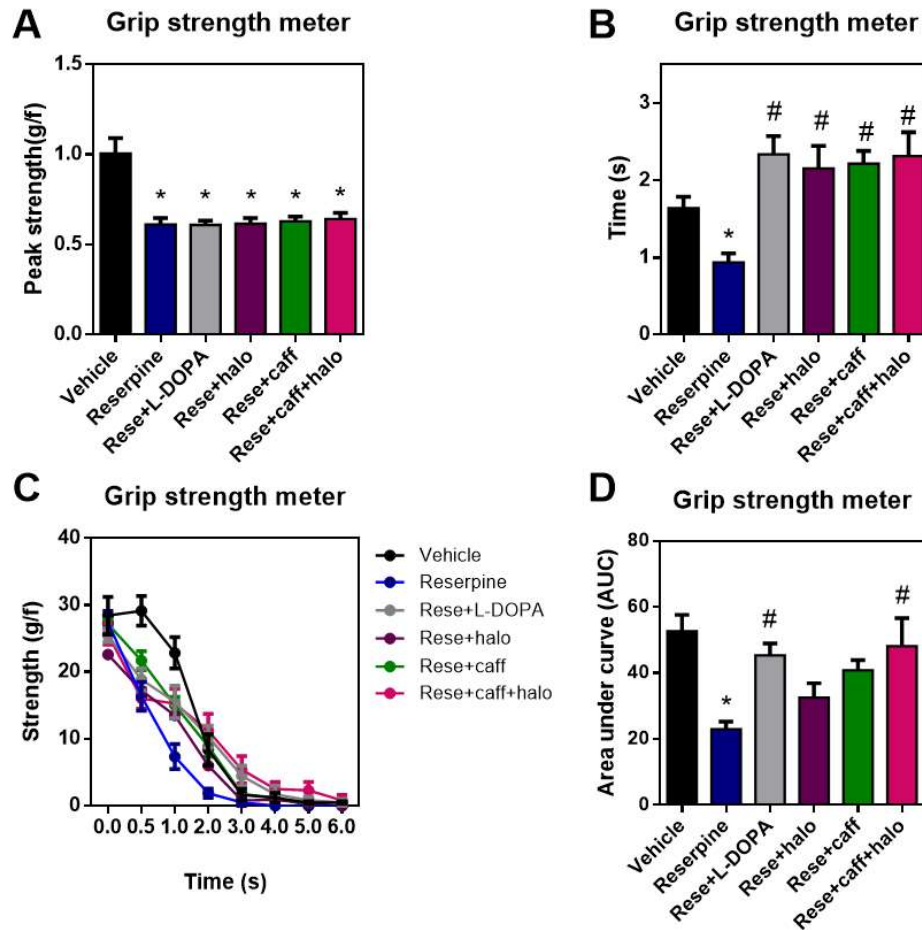


Figura 6. A reserpina induziu fadiga no teste de força de preensão. Pico de força (A), tempo de preensão (B), força x tempo (C) e área sob a curva (D) de força x tempo. * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à reserpina. ANOVA de uma via, $n=10$ animais/grupo. Rese = reserpina, caff = cafeína, halo = Haloperidol.

3.4 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que o comprometimento dopaminérgico provocado pela administração de reserpina induziu déficits no controle motor dos animais e fadiga. L-DOPA, cafeína e a combinação de cafeína mais Haloperidol atenuaram significativamente estes comprometimentos. Curiosamente, o tratamento com cafeína mais Haloperidol mostrou um resultado melhor do que a cafeína *per se* no número de levantamentos no teste de campo aberto. O prejuízo na neurotransmissão dopaminérgica foi associado ao comprometimento motor e à fadiga na DP (SCHEFFER et al., 2021). Estudos anteriores usando reserpina demonstraram fadiga no teste de natação forçada (SONG et al., 2021), rotarod (SONG et al., 2021) e teste incremental em esteira (SCHEFFER et al., 2021). A reserpina também acelerou o tempo de fadiga na estimulação elétrica dos músculos esqueléticos (HASSAN et al., 2021). No presente estudo, demonstramos que o comprometimento dopaminérgico associado ao modelo animal da DP também induz fadiga no teste de força de preensão.

A L-DOPA é um precursor da dopamina que atravessa a barreira hematoencefálica e aumenta a síntese de dopamina no SNC (HAYES, 2019). Foi o primeiro medicamento desenvolvido para a DP e é eficaz na redução da fadiga (LOU, 2009). No entanto, a L-DOPA está associada à tolerância a dose de uso prolongado e a efeitos colaterais, como discinesias (SHIOZAKI et al., 1999). A proposta do antagonismo $A_{2A}R$ no tratamento da DP visa atenuar os sintomas motores e não motores e prevenir a progressão da doença (KOLAHDOUZAN; HAMADEH, 2017). O antagonismo $A_{2A}R$ potencializa o efeito psicoestimulante mediado pela dopamina (CHEN et al., 2001a). A Istradefilina, um antagonista $A_{2A}R$, já foi aprovada para uso clínico nos EUA pelo FDA (a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos) (TORTI; VACCA; STOCCHI, 2018). Em modelos experimentais de DP de MPTP e Paraquat, a cafeína protegeu parcialmente os roedores contra a degeneração nigroestriatal (CHEN et al., 2001b; KALDA et al., 2006; SINGH et al., 2009; XU et al., 2002) e a perda de neurônios dopaminérgicos (KACHROO; IRIZARRY; SCHWARZCHILD, 2010). Em nosso estudo, a cafeína atenuou os déficits no controle motor e a fadiga no modelo animal da DP, reforçando o efeito neuroprotetor do antagonismo $A_{2A}R$ (KOLAHDOUZAN; HAMADEH, 2017). Embora a cafeína seja um antagonista não seletivo de $A_{1}R$ e $A_{2A}R$ (LOPES; PLIÁSSOVA;

CUNHA, 2019), apenas o A_{2A}R tem sido associado a efeitos ergogênicos e psicoestimulantes (AGUIAR et al., 2020).

Os A_{2A}R são ricamente expressos no estriado de mamíferos, e são encontrados co-localizados com receptores D₂R e/ou na forma de heterodímero A_{2A}R-D₂R (ARMENTERO et al., 2011). Salamone e colaboradores, 2016, demonstraram que a manipulação A_{2A}R-D₂R altera o comportamento de motivação relacionadas ao esforço (XU et al., 2002) e está associada à tomada de decisões (SALAMONE et al., 2016, 2018). Uma vez que a farmacologia dos receptores é modificada pela heteromerização (ARMENTERO et al., 2011), a investigação do heterodímero A_{2A}R-D₂R deve ser considerada na avaliação dos efeitos terapêuticos do antagonismo A_{2A}R (AZDAD et al., 2009). Haloperidol é um antagonista seletivo de alta afinidade de D₂R (SILVA et al., 2019). Para garantir que o Haloperidol não prejudicasse o controle motor dos camundongos, utilizamos uma dose não cataléptica de Haloperidol, descrita nos métodos. Nossos estudos anteriores demonstraram que, em condições fisiológicas, a administração de cafeína e o antagonismo A_{2A}R têm efeitos ergogênicos (AGUIAR et al., 2020; DE BEM ALVES et al., 2023). Outras evidências do comportamento motivacional demonstraram que o antagonismo D₂R modifica os efeitos do antagonismo A_{2A}R (SALAMONE et al., 2008, 2012).

O antagonismo A_{2A}R aumenta a sinalização dopaminérgica e a disponibilidade de D₂R e D₃R, aumentando a neurotransmissão dopaminérgica (FERRARO et al., 2012; LINDBERG et al., 2018b). Nossos resultados apontam para a hipótese de que o antagonismo A_{2A}R-D₂R aumenta a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica e esse neurotransmissor se liga ao D₃R, que foi aumentado via bloqueio A_{2A}R, resultando na atenuação da fadiga. Somos o primeiro grupo a demonstrar que o antagonismo A_{2A}R, independentemente do antagonismo D₂R, atenua a fadiga em um modelo de reserpina de DP, o que esclarece o potencial da modulação do heterodímero A_{2A}R-D₂R na DP. É oportuno observar que o uso de um antagonista A_{2A}R não seletivo, a administração periférica de drogas, o uso de camundongos machos, e a contraindicação do Haloperidol para pacientes com DP na clínica, são possíveis limitações deste estudo. Além disso, o papel dos heterodímeros A₁R-A₂R e A₁R-D₂R (LINDBERG et al., 2018a) também devem ser considerados em estudos futuros.

3.5 CONCLUSÃO

Nossos resultados destacam o potencial do antagonismo do heterodímero A₂A_R-D₂R no controle da fadiga na doença de Parkinson.

4 ARTIGO 3: OS HETERODÍMEROS A_{2A}R-D₂R ESTRIATAIS ESTÃO ASSOCIADOS AOS EFEITOS ERGOGÊNICOS DA CAFEÍNA

Artigo em processo de submissão

4.1 INTRODUÇÃO

A adenosina é uma purina neuromoduladora que atua no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP) (JACOBSON; GAO, 2006). Existem quatro subtipos de receptores adenosinérgicos, os A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R e A₃R), e todos estão acoplados a proteínas G. O segundo mensageiro associado à ligação adenosina-receptor é a ativação ou inibição da enzima adenilato ciclase (AC) (B. FREDHOLM; A. JACOBSON, 2009). O A₁R e o A_{2A}R têm a maior afinidade pela adenosina (JACOBSON et al., 1995). A sinalização adenosinérgica periférica participa do suprimento sanguíneo por meio de vasodilatação ou angiogênese (RYZHOV et al., 2008), e diminuição da resposta inflamatória por meio da supressão da produção de citocinas (CHEN et al., 2006; MARTIN et al., 2006). A sinalização adenosinérgica central participa do estado de alerta e fadiga (AGUIAR et al., 2021; ALVES et al., 2019). Os efeitos ergogênicos da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) são devidos ao antagonismo central dos A_{2A}Rs (AGUIAR et al., 2020; ALVES et al., 2019; ALVES et al., 2023). Recentemente, demonstramos que o estriado medeia os efeitos ergogênicos da cafeína (ALVES et al., 2022).

Os A_{2A}Rs são ricamente expressos no corpo estriado (BURGUEÑO et al., 2003), região que podem ser encontrados em co-localização com receptores dopaminérgicos D₂ (D₂R) em neurônios espinhosos médios GABAérgicos (MSNs) (TOZZI et al., 2011). Os A_{2A}Rs estão acoplados a proteínas estimuladoras G_{s/olf} que ativam a AC, aumentando a produção de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) (BARROS et al., 2015; CIRUELA et al., 2006; FERRÉ et al., 2007). Por outro lado, os D₂Rs estão acoplados a proteínas inibitórias G_i, que inibem a AC (FERRÉ, 2010; HIGLEY; SABATINI, 2010). Portanto, esses receptores apresentam efeitos antagônicos sobre a mesma cascata de sinalização (FERRÉ, 2016). Além da co-localização pós-sináptica de A_{2A}Rs e D₂R, existem formas heterodímeras desses receptores no corpo estriado (ARMENTERO et al., 2011; AZDAD et al., 2009). Como a heterodimerização modifica a farmacologia do receptor (SALAMONE et al., 2008), é

imprescindível investigar se o heterodímero A_{2A}R-D₂R está envolvido nos efeitos ergogênicos da cafeína e do antagonismo A_{2A}R, relatados anteriormente.

Desde a descoberta dos efeitos ergogênicos da cafeína (BOND V et al., 1986; COYLE E F, 1984; POWERS; DODD, 1985), foram desenvolvidos antagonistas seletivos de A_{2A}R e A₁R, como SCH58261 e DPCPX, respectivamente. Evidências com o uso do SCH58261 demonstram que o antagonismo A_{2A}R está associado aos efeitos ergogênicos e psicoestimulantes da cafeína (AGUIAR et al., 2020; LOPES; PLIÁSSOVA; CUNHA, 2019). Entretanto, estudos relacionando o uso do DPCPX na fadiga permanecem escassos. A fadiga é definida como uma sensação subjetiva de cansaço e aumento do esforço percebido em comparação com o desempenho real, ou exaustão (DELUCA, 2005; GANDEVIA et al., 1995)], e pode ser medida objetivamente através da fatigabilidade. A fatigabilidade é a magnitude ou taxa de mudança em um critério de desempenho em relação a um valor de referência durante um determinado tempo de desempenho da tarefa ou medida de potência mecânica (AGUIAR et al., 2021; VØLLESTAD, 1997). Portanto, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos periféricos e estriatais do antagonismo heterodímero A_{2A}R-D₂R na fadiga, utilizando cafeína, SCH58261, DPCPX e Haloperidol (um antagonista D₂R).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Cento e noventa camundongos Swiss machos (8 semanas de idade, 49,45 ± 1,5 g) foram adquiridos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e alojados em gaiolas coletivas (38 x 32 x 17 cm) com livre acesso a água e comida. Os camundongos foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12h, e temperatura ambiente de 22 ± 1°C, com umidade monitorada. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA-PP10519). Os animais foram aleatoriamente designados para os grupos experimentais. Para avaliar a fadiga, investigamos o comportamento dos camundongos no teste de campo aberto, teste de força de preensão e no exercício incremental em esteira.

4.2.1 Drogas

Para a administração sistêmica, todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg. A cafeína (Sigma-Aldrich) e o Haloperidol (Haldol®) foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). SCH58261

(Sigma-Aldrich) e DPCPX (Sigma-Aldrich) foram diluídos em DMSO. Cafeína (6 mg/kg) foi administrada 15 min antes dos testes, Haloperidol (0,25 mg/kg) 30 min antes, SCH58261 (1 mg/kg) 15 min, DPCPX (1 mg/kg) 30 min antes. Salina e DMSO foram administradas nos respectivos grupos de controle.

Para a administração no estriado dorsolateral, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina. Uma cânula foi implantada no estriado direito (AP 0,5 mm; ML 2 mm e DV -3 mm), e outra no estriado esquerdo (AP 0,5 mm; ML -2 mm e DV -3 mm) através da estereotaxia, de acordo com as coordenadas de Paxinos e Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2012a). A cafeína foi diluída em salina (NaCl 0,9%), o SCH58261 foi diluído em DMSO. Após uma semana da cirurgia, 4µL de cafeína (15µg) ou solução salina (0,5µg) ou SCH58261 (2µg) ou DMSO (0,5µg) foram injetados nos animais conscientes usando uma bomba de infusão (2 µL/minuto, Bonther®, Ribeirão Preto, Brasil). Imediatamente após as administrações os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Haloperidol (0,25 mg/kg) foi administrado 30 min i.p. antes dos testes. A taxa de mortalidade foi de 5% (10 animais). Todas as doses experimentais foram escolhidas com base em experimentos piloto e na literatura (AGUIAR et al., 2009; FRANCISCO SOLANO et al., 2017; SANBERG; OSSENKOPP; KAVALIERS, 1996). O exercício em esteira não pôde ser realizado em animais pós cirurgia estereotáxica porque a altura das cânulas impedia o desempenho na esteira.

4.2.2 Teste do campo aberto

O controle motor foi avaliado no teste de campo aberto (Insight® EP154). Os camundongos foram colocados individualmente no centro de um aparato circular (300 x 300 mm) e deixados livres para explorar por 5 min (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). O número de cruzamentos e levantamentos foram analisados manualmente.

4.2.3 Teste de força de preensão

A fadiga foi avaliada no equipamento de força de preensão e no software (Bonther® 5 kgf). Cada camundongo foi colocado individualmente na barra do equipamento e quando ambas as patas dianteiras estavam firmes, o experimentador puxava suavemente a cauda na outra direção. Foram realizadas 4 tentativas com 10 segundos cada, e 1 minuto de intervalo entre as tentativas. O valor final é a média das

três melhores tentativas (DUNNETT; TORRES; ANNETT, 1998; LUCA, 2008; PERSONIUS et al., 2010; TAKESHITA et al., 2017).

4.2.4 Teste incremental em esteira

Os camundongos foram ambientados em uma esteira de roedores por 3 dias e, após 48h de descanso, realizaram o teste incremental. A inclinação da esteira (1,7 graus) e o choque (0,2 mA) foram mantidos constantes ao longo dos dias. No primeiro dia de ambientação os animais realizaram 10 minutos de exercício em 5 m/min, no segundo dia 5 minutos em 5 m/min + 5 minutos em 10m/min, e no terceiro dia 10 minutos em 10 m/min de intensidade. Após 48h, os camundongos retornaram à esteira, e 5 m/min foram adicionados pelo experimentador a cada 3 min de corrida, iniciando com 5 m/min. Este protocolo incremental foi baseado em experimentos-piloto usando medição de lactato sanguíneo. O lactato foi coletado por punção da veia submandibular e analisado por meio de um lactímetro.

4.2.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism© (versão 9.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste ANOVA de uma via (comparações múltiplas) foi usado para investigar as diferenças entre os grupos experimentais. Outliers foram testados usando o método ESD (*extreme studentized deviate*). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efeitos da inibição sistêmica e central dos A_{2A}R-D₂R no controle motor

A cafeína (i.p.) aumentou o número de cruzamentos ($[F_{3, 36}] = 4,29, p < 0,05$, fig. 1A) e levantamentos ($[F_{3, 36}] = 3,92, p < 0,05$, fig. 1B) dos animais no teste de campo aberto. O Haloperidol (i.p.) também aumentou o número de cruzamentos ($[F_{3, 36}] = 4,34, p < 0,05$, fig. 1A) e levantamentos ($[F_{3, 36}] = 4,00, p < 0,05$, fig. 1B). No entanto, a administração de cafeína mais Haloperidol aboliu as diferenças estatísticas. Da mesma forma, a administração de cafeína no estriado (st.) de camundongos aumentou o número de cruzamentos ($[F_{2, 12}] = 9,67, p < 0,05$, fig. 1C) e levantamentos ($[F_{2, 12}] = 6,08, p < 0,05$, fig. 1D) no teste de campo aberto. Corroborando os achados

sistêmicos, a coadministração de cafeína (st.) e Haloperidol (i.p.) diminuiu o número de cruzamentos ($[F_{2, 12}] = 9,67, p < 0,05$, fig. 1C) e levantamentos ($[F_{2, 12}] = 7,79, p < 0,05$, fig. 1D).

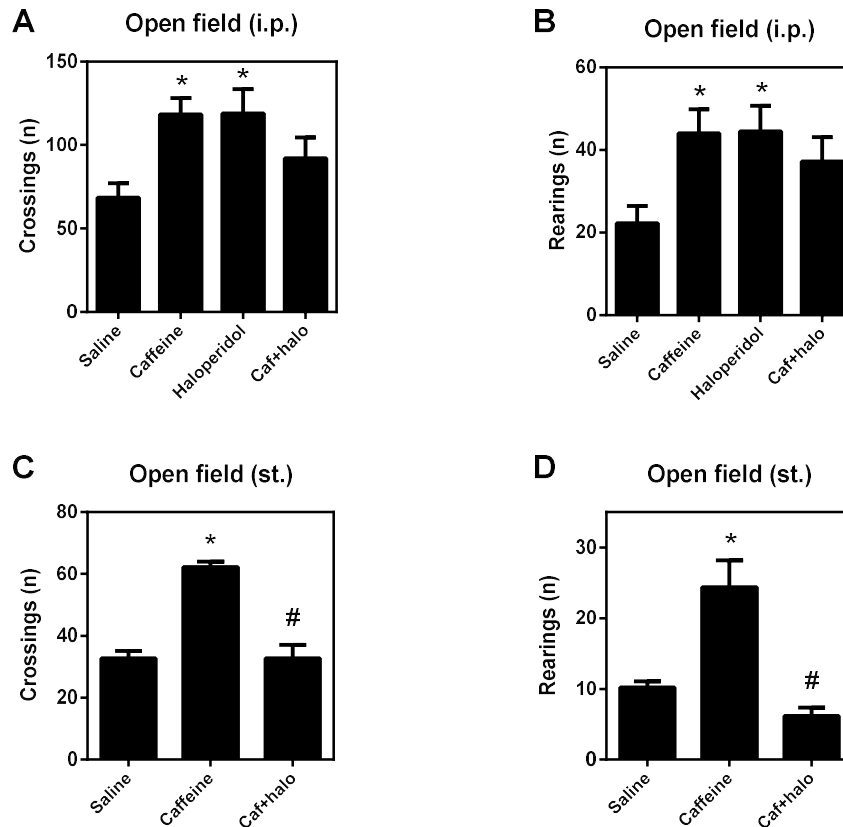


Figura 7. Os efeitos da administração sistêmica e central de cafeína e Haloperidol no campo aberto. Números de cruzamentos (A) e números de levantamentos (B) após administração sistêmica. Números de cruzamentos (C) e levantamentos (D) após administração central das drogas. * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à cafeína. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=10$ animais/grupo (sistêmico) e $n=5$ animais/grupo (central). i.p. = intraperitoneal; st.= estereotaxia; caf = cafeína; halo = Haloperidol.

Semelhante à cafeína, a administração sistêmica (i.p.) de SCH58261 aumentou o número de cruzamentos ($[F_{3, 36}] = 6,64, p < 0,05$, fig. 2A) e levantamentos ($[F_{3, 36}] = 4,72, p < 0,05$, fig. 2B) dos animais no teste de campo aberto. Por outro lado, a coadministração de Haloperidol (i.p.) inibiu os efeitos psicoestimulantes do SCH58261 observados no número de cruzamentos, conforme observado no número de cruzamentos ($[F_{3, 36}] = 7,59, p < 0,05$, fig. 2A) e levantamentos ($[F_{3, 36}] = 4,44, p < 0,05$, fig. 2B). A administração sistêmica de DPCPX (i.p.) não teve efeito psicoestimulante

para os camundongos, portanto não foi administrado no estriado. A administração estriatal (st.) de SCH58261 também aumentou o número de cruzamentos ($[F_{2, 12}] = 11,45, p < 0,05$, fig. 2C) e levantamentos ($[F_{2, 12}] = 4,07, p < 0,05$, fig. 2D) dos animais no teste de campo aberto. A coadministração de Haloperidol (i.p.) também inibiu os efeitos psicoestimulante centrais do SCH58261 no número de cruzamentos ($[F_{2, 12}] = 9,59, p < 0,05$, fig. 2C) e levantamentos ($[F_{2, 12}] = 10,19, p < 0,05$, fig. 2D).

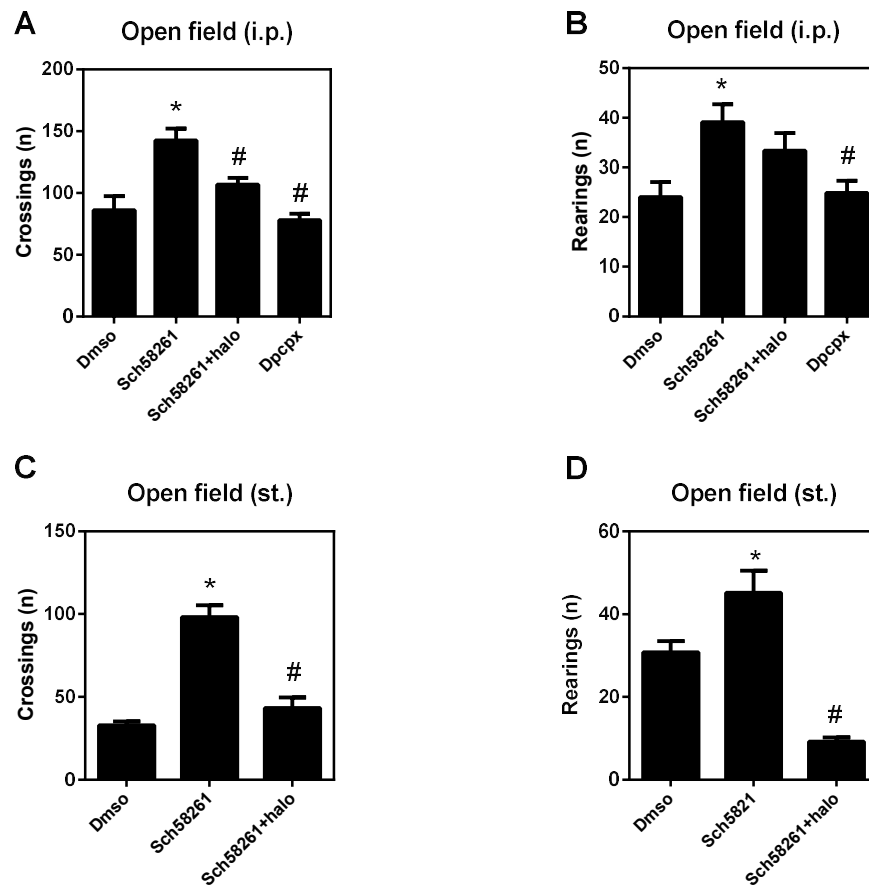


Figura 8. Os efeitos da administração sistêmica e central de SCH58261 e Haloperidol no campo aberto. Números de cruzamentos (A) e números de levantamentos (B) após administração sistêmica. Números de cruzamentos (C) e levantamentos (D) após administração central das drogas. * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à cafeína. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=10$ animais/grupo (sistêmico) e $n=5$ animais/grupo (central). i.p. = intraperitoneal; st.= estereotaxia; halo = Haloperidol.

4.3.2 Efeitos da inibição sistêmica e central dos $A_{2A}R$ - D_2R na força de prensão

A administração sistêmica (i.p.) de Haloperidol *per se* ($[F_{3, 36}] = 5,75, p < 0,05$, fig. 3A) e de cafeína mais Haloperidol ($[F_{3, 36}] = 5,11, p < 0,05$, fig. 3A) diminuiu o pico de força

no teste de força de preensão em comparação com o grupo controle. A coadministração de cafeína mais Haloperidol também diminuiu o pico de força em comparação com o grupo tratado com cafeína ($[F_{3, 36}] = 7,78, p < 0,05$, fig. 3A). A cafeína (i.p.) aumentou o tempo de preensão dos camundongos ($[F_{3, 36}] = 9,65, p < 0,05$, fig. 3B) e o Haloperidol diminuiu esse efeito ergogênico da cafeína ($[F_{3, 36}] = 6,39, p < 0,05$, fig. 3B), conforme observado no gráfico da área sobre a curva, que traduz o impulso ($[F_{3, 35}] = 11,49, p < 0,05$, fig. 3C-D). A administração estriatal (st.) de cafeína não alterou o pico de força (fig. 3E), mas aumentou o tempo de preensão ($[F_{2, 27}] = 7,58, p < 0,05$, fig. 3F) e o impulso ($[F_{2, 27}] = 6,63, p < 0,05$, fig. 3G-H) dos animais. No entanto, ao contrário do observado na administração sistêmica, o grupo que recebeu cafeína mais Haloperidol (i.p.) teve um aumento no tempo de preensão ($[F_{2, 27}] = 6,64, p < 0,05$, fig. 3F) e no impulso ($[F_{2, 27}] = 4,75, p < 0,05$, fig. 3G-H).

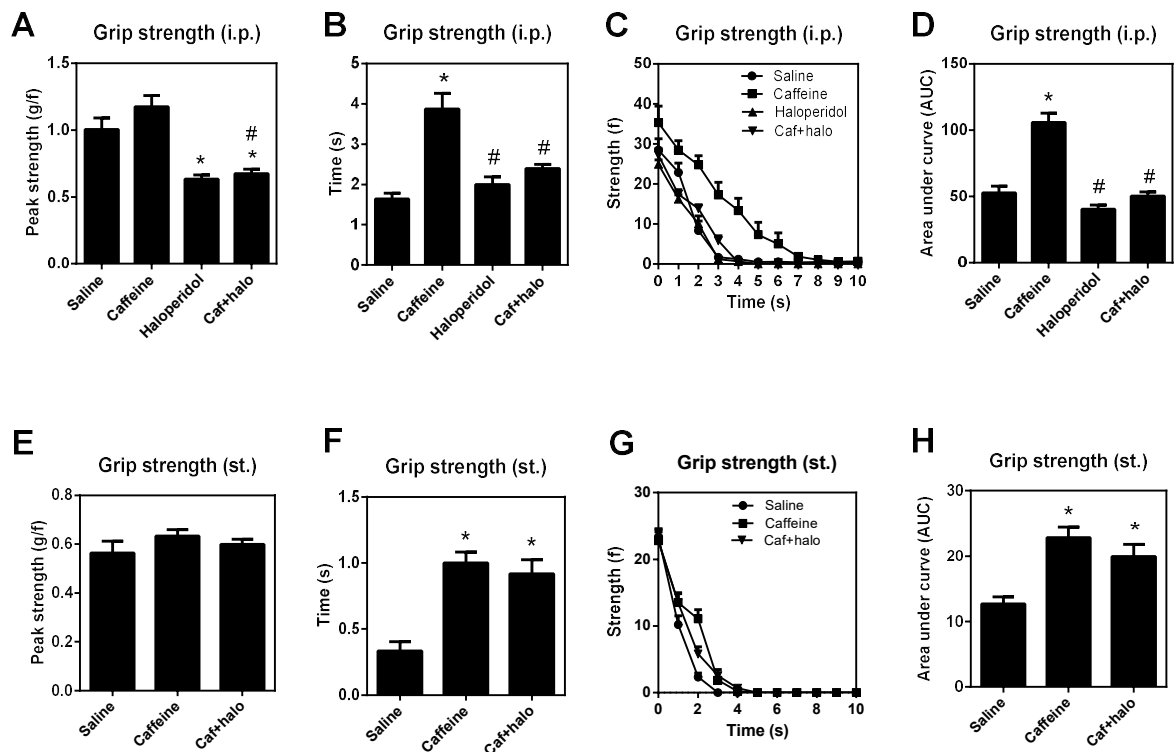


Figura 9. Os efeitos da administração sistêmica e central de cafeína e Haloperidol no teste de preensão. Pico relativo de força (A), tempo de preensão (B), curva do tempo versus força (C) e área sobre a curva (D) do tempo versus força (C), após administração sistêmica das drogas. Pico relativo de força (E), tempo de preensão (F), curva do tempo versus força (G) e área sobre a curva (H) do tempo versus força (G), após administração central das drogas. * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à cafeína. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=10$ animais/grupo (sistêmico) e $n=5$ animais/grupo (central). Caf = cafeína; halo = Haloperidol.

No teste de força de preensão, a administração de SCH58261 (i.p.) não alterou o pico de força (fig. 4A), mas aumentou significativamente o tempo de preensão ($[F_{3, 36}] = 4,80, p < 0,05$, fig. 4B), e o impulso dos animais ($[F_{3,36}] = 4,47, p < 0,05$, fig. 4C-D). Novamente, a coadministração de Haloperidol (i.p.) reduziu o tempo de preensão ($[F_{3, 36}] = 5,78, p < 0,05$, fig. 4B) e o impulso ($[F_{3,36}] = 5,64, p < 0,05$, fig. 4C-D) dos animais. Semelhantemente a administração de cafeína no estriado, a administração central (st.) de SCH58261 aumentou o tempo ($[F_{2,27}] = 4,46, p < 0,05$, fig. 4F) e o impulso $[F_{2,27}] = 4,44, p < 0,05$, fig. 4G-H) dos animais. Entretanto, o grupo tratado com cafeína mais Haloperidol (i.p.) também exibiu um aumento significativo nos mesmos parâmetros ($[F_{2,27}] = 3,51, p < 0,05$, fig. 4F) e $[F_{2,27}] = 3,53, p < 0,05$, FIG. 4G-H), respectivamente.

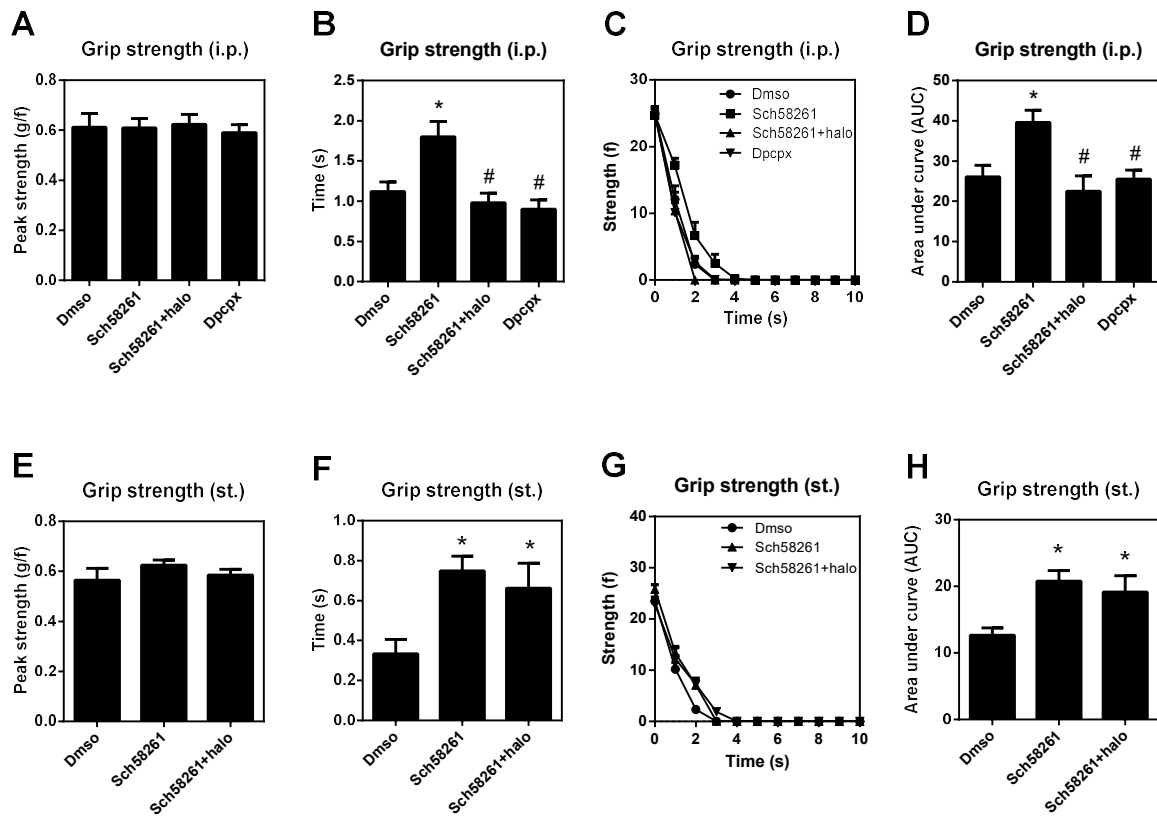
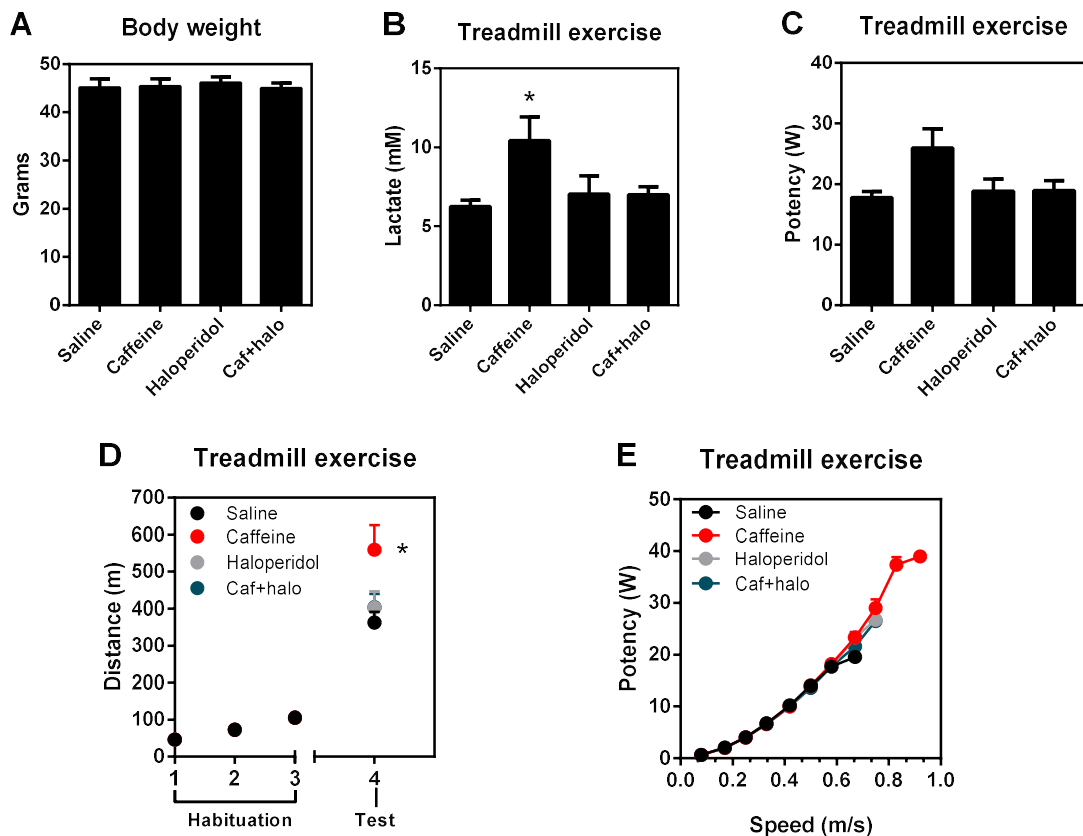


Figura 10. Os efeitos da administração sistêmica e central de SCH58261 e Haloperidol no teste de preensão. Pico relativo de força (A), tempo de preensão (B), curva do tempo versus força (C) e área sobre a curva (D) do tempo versus força (C), após administração sistêmica das drogas. Pico relativo de força (E), tempo de preensão (F), curva do tempo versus força (G) e área sobre a curva (H) do tempo versus força (G), após administração central das drogas. * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado à cafeína. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=10$ animais/grupo (sistêmico) e $n=5$ animais/grupo (central). Caf = cafeína; halo = Haloperidol.

4.3.3 Efeitos da inibição sistêmica dos $A_{2A}R$ - D_2R no exercício incremental

Os grupos submetidos ao teste incremental em esteira não diferiram quanto ao peso corporal (fig. 5A). A cafeína sistêmica (i.p.) aumentou o lactato sanguíneo ($[F_{3,26}] = 4,05$, $p < 0,05$, fig. 5B) e a distância percorrida ($[F_{3,27}] = 4,11$, $p < 0,05$, fig. 5D) no dia do teste. Por outro lado, nenhum tratamento alterou a potência (fig. 5C e E). A coadministração de Haloperidol (i.p.) aboliu o efeito ergogênico da cafeína (fig. 5D).



Os grupos tratados com os antagonistas seletivos não diferiram em peso corporal (fig.

Figura 11. Efeitos da administração sistêmica de cafeína e Haloperidol no teste incremental em esteira. Peso corporal (A), lactato sanguíneo (B), Potência (C), Distância percorrida (D) e Potência versus velocidade (E). * $p < 0.05$ comparado ao veículo. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=6-8$ animais/grupo. Caf = cafeína; halo = Haloperidol.

6A) e nível de lactato (fig. 6B). O SCH58261 (i.p.) aumentou a potência ($[F_{3,20}] = 5,33$, $p < 0,05$, fig. 6C) e distância percorrida ($[F_{3,20}] = 6,74$, $p < 0,05$, fig. 6D-E) dos animais. A coadministração de Haloperidol inibiu os efeitos ergogênicos do SCH58261 sobre a potência ($[F_{3,20}] = 5,61$, $p < 0,05$, fig. 6C) e distância ($[F_{3,20}] = 5,00$, $p < 0,05$, fig. 6D-E). Além disso, o DPCPX diminuiu a potência dos camundongos ($[F_{3,20}] = 7,23$, $p < 0,05$, fig. 6C) e a distância percorrida ($[F_{3,20}] = 6,51$, $p < 0,05$, fig. 6D-E) em comparação com o grupo SCH58261.

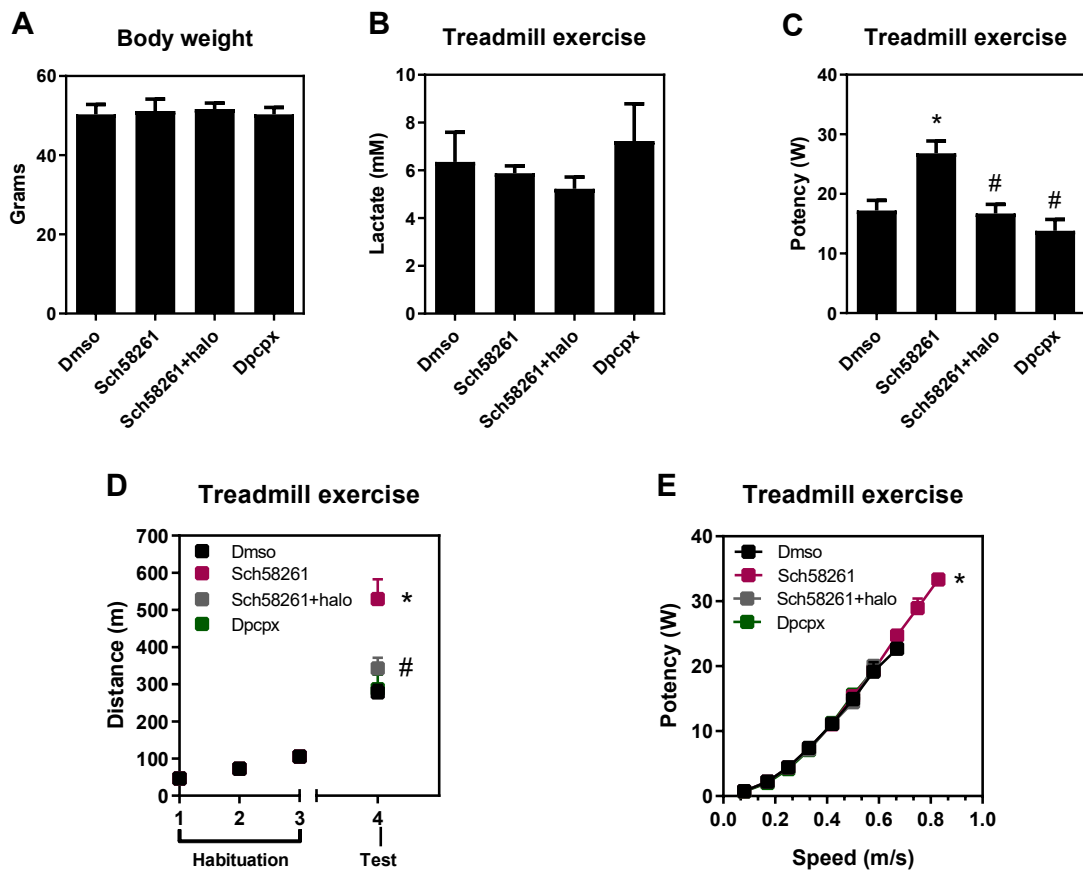


Figura 12. Efeitos da administração sistêmica de SCH58261 e Haloperidol no teste incremental em esteira. Peso corporal (A), lactato sanguíneo (B), Potência (C), Distância percorrida (D) e Potência versus velocidade (E). * $p < 0.05$ comparado ao veículo, # $p < 0.05$ comparado ao SCH58261. ANOVA de uma via com teste de múltiplas comparações de Tukey, $n=6-8$ animais/grupo. halo = Haloperidol

4.4 DISCUSSÃO

Nosso estudo reforça que os efeitos ergogênicos e psicoestimulantes da cafeína são devidos ao antagonismo $A_{2A}R$, especificamente no estriado, conforme demonstrado pela administração sistêmica e local de cafeína e SCH58261. Além disso, nos resultados mostram que o antagonismo A_{1R} , através do DPCPX, não exibiu qualquer efeito psicoestimulante ou ergogênico nos camundongos. Curiosamente, a investigação do heterodímero $A_{2A}R$ - D_2R revelou que a maioria dos efeitos de antagonismo $A_{2A}R$ são devidos à potencialização da cascata de sinalização D_2R no estriado. No entanto, observamos que o estriado dorsolateral $A_{2A}R$ - D_2R medeia o

controle motor, mas não a força de preensão, sugerindo o envolvimento de outra região do cérebro, ou receptores, nesse mecanismo.

A administração sistêmica de cafeína aumentou o número de cruzamentos e levantamentos no teste de campo aberto, e o impulso no teste de força de preensão. Estes efeitos psicoestimulantes e ergogênicos da cafeína dão continuidade aos achados de nosso trabalho anterior (DE BEM ALVES et al., 2023). No presente estudo, estendemos o efeito ergogênico da cafeína ao exercício em esteira e adicionamos a participação do corpo estriado. Outras evidências demonstraram que a cafeína aumenta o $\dot{V}O_2$ máx, a potência de corrida e a potência máxima em camundongos (AGUIAR et al., 2020; FRANCISCO SOLANO et al., 2017). Os mesmos efeitos psicoestimulantes e ergogênicos foram observados por meio da administração estriatal de cafeína. A ação da cafeína no SNC está associada a neuroplasticidade estriatal e ao aumento do metabolismo mitocondrial dopaminérgico (DE BEM ALVES et al., 2023). A cafeína também aumenta a liberação pré-sináptica de glutamato e a ativação do receptor NMDA no corpo estriado (FERRÉ et al., 2007; POPOLI et al., 2002), o que pode contribuir para a atenuação da fadiga durante o exercício.

A cafeína é um antagonista não seletivo de $A_{2A}R$ e A_{1R} . Portanto, investigamos os efeitos de SCH58261 e DPCPX sobre esses parâmetros. A administração sistêmica do SCH58261 aumentou o controle motor de camundongos no campo aberto, o impulso no teste de força de preensão e a potência no exercício em esteira. Aguiar e colaboradores, demonstraram que os efeitos ergogênicos da cafeína foram abolidos em camundongos nocaute para o $A_{2A}R$ no prosencéfalo, demonstrando que o antagonismo $A_{2A}R$ no SNC é responsável pela ação ergogênica da cafeína (AGUIAR et al., 2020). Por outro lado, o DPCPX sistêmico não teve efeito psicoestimulante nem ergogênico em camundongos, o que é um resultado inédito. O SCH58261 estriatal reforçou os resultados sistêmicos, mostrando que os efeitos psicoestimulantes e ergogênicos do antagonismo $A_{2A}R$ são mediados no estriado. Os $A_{2A}R$ s estão localizados pós-sinápticamente em neurônios GABAérgicos estriatopálidais, antagonizando funções D_2R , e também estão localizados pré-sinápticamente em terminais corticoestriatais, facilitando a liberação de glutamato. Corroborando nossos achados, Shen et al., 2013, relataram que $A_{2A}R$ s nos terminais glutamatérgicos regulam ações psicoestimulantes de drogas através da integração da sinalização estriatal GABAérgica, dopaminérgica e glutamatérgica (SHEN et al., 2013).

Os resultados da manipulação farmacológica dos heterodímeros A_{2A}R-D₂R mostrou que os efeitos psicoestimulantes e ergogênicos do antagonismo A_{2A}R são devidos à potencialização da cascata de sinalização via D₂R no estriado. Salamone et al., 2012, investigaram o papel do heterodímero A_{2A}R-D₂R em processos relacionados à motivação e observaram que além da dopamina, particularmente no núcleo accumbens, a adenosina por meio da ativação de A_{2A}R também participa da regulação desses processos (SALAMONE et al., 2010). Além do papel dos A_{2A}Rs na integração da sinalização de neurotransmissores afirmado anteriormente (SHEN et al., 2013), as ações opostas sobre a cascata de sinalização AC, os A_{2A}Rs também facilitam a atividade neuronal no corpo estriado, melhorando a sinalização dopaminérgica, através do aumento da disponibilidade de D₂R e D₃R e aumento da neurotransmissão de dopamina (LINDBERG et al., 2018). No entanto, enquanto o antagonismo sistêmico e central do A_{2A}R aumentou o impulso no teste de força de preensão, o antagonismo D₂R (pelo Haloperidol) apenas aboliu esse efeito via sistêmica, mas não quando administrado no estriado. Como nosso estudo explorou a região do estriado dorsolateral, este último achado pode sugerir que o D₂R de outras regiões, como por exemplo do núcleo accumbens, no estriado ventral, participa da geração de força. Desta forma, novos estudos devem ser conduzidos a fim de investigar esta hipótese.

4.5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que os heterodímeros estriatais A_{2A}R-D₂Rs estão ligados aos efeitos psicoestimulantes e ergogênicos do antagonismo da adenosina em camundongos.

5 DISCUSSÃO GERAL

Os estudos atuais sobre a fisiopatologia da fadiga central estão relacionados a mecanismos inflamatórios (HEESEN et al., 2006; MILLER et al., 2008), ao prejuízo da neurotransmissão dopaminérgica (SCHEFFER et al., 2021), ou ao aumento da sinalização adenosinérgica no SNC (AGUIAR et al., 2020, 2021). Dados científicos da associação entre inflamação e fadiga provém principalmente de estudos conduzidos em pacientes com câncer, já que 80% desses pacientes apresentam fadiga (TYRING

et al., 2006). Entretanto, as abordagens terapêuticas propostas não atuam da mesma forma sobre as dimensões física e mental da fadiga (CAPURON et al., 2002). Além disso, a mensuração das concentrações circulantes de citocinas em pacientes representa a principal limitação destes estudos (TER WOLBEEK et al., 2007). Já os estudos envolvendo o receptor adenosinérgico A_{2A} ($A_{2A}R$) são promissores (AGUIAR et al., 2020, 2021).

Os $A_{2A}R$ foram identificados como alvo terapêutico para o tratamento de doenças neurológicas (TAURA et al., 2018b). Evidências robustas demonstraram que a administração sistêmica de cafeína atrasa a fadiga durante o exercício (AGUIAR et al., 2020, 2021). Nossos resultados corroboram os efeitos ergogênicos e psicoestimulantes da cafeína e do antagonismo seletivo $A_{2A}R$ (através da administração de SCH58261), como observados no teste do campo aberto, no teste do rotarod, no teste de força de preensão e no teste incremental em esteira. Além disso, também demonstramos de forma pioneira que o antagonismo A_{1R} (através da administração do DPCPX) não está associado aos efeitos da cafeína sobre a atenuação da fadiga, tanto no contexto do controle motor, como no esforço físico ou geração de força de preensão. Devido à alta expressão de receptores $A_{2A}R$ no corpo estriado, administramos a cafeína e o SCH58261 diretamente no estriado dorsolateral dos camundongos, algo que até então não havia sido realizado. Estes resultados demonstraram que os $A_{2A}R$ do estriado estão associados ao mecanismo de fadiga central nos animais. Além disso, nós demonstramos que o mecanismo de fadiga está associado à neuroplasticidade estriatal e ao aumento do metabolismo mitocondrial.

A descoberta da forma heterodímera dos receptores A_{2A} - D_2 no estriado torna-se importante na investigação dos efeitos farmacológicos da manipulação desses receptores (ARMENTERO et al., 2011; AZDAD et al., 2009). De fato, a existência dos receptores heterodímeros tem levantado questões relevantes sobre os verdadeiros alvos terapêuticos que podem beneficiar os pacientes neurológicos, ou seja, se a terapêutica deve ser baseada em receptores monômeros, homodímeros ou heterodímeros (SALAMONE et al., 2008). O antagonismo adenosina-dopamina foi sugerido como alvo terapêutico em situações de déficit dopaminérgico, como ocorre na DP (ARMENTERO et al., 2011). Os estudos de Salamone e colaboradores investigaram os efeitos da manipulação dos heterodímeros $A_{2A}R$ - D_2R sobre a decisão relacionada ao esforço, e demonstraram que o antagonismo $A_{2A}R$ - D_2R aumentava a motivação dos animais (SALAMONE et al., 2012, 2016, 2018).

Seguindo os resultados de Salamone e colaboradores descritos acima (SALAMONE et al., 2012, 2016, 2018), nossos experimentos foram direcionados para estudar o papel do antagonismo $A_{2A}R$ - D_2R sobre a fadiga central no modelo animal da doença de Parkinson, utilizando a reserpina. Nossos resultados demonstraram que o antagonismo dos heterodímeros $A_{2A}R$ - D_2R aumentou o controle motor e a força de preensão dos animais, demonstrando que essa manipulação farmacológica apresenta um potencial terapêutico na fadiga apresentada pelos pacientes com doença de Parkinson. Porém, os mecanismos exatos ainda precisam ser elucidados. Além disso nós também investigamos o papel do antagonismo $A_{2A}R$ - D_2R sobre a fadiga central de animais naive. Curiosamente, estes resultados demonstraram que os efeitos ergogênicos e psicoestimulantes do antagonismo $A_{2A}R$ estão associados à potencialização da via dopaminérgica através dos receptores D_2R no estriado. Este mecanismo foi observado no controle motor e no teste de esforço em esteira. Entretanto, não foi observado no teste de força de preensão. Sugerindo que outros receptores, vias de sinalizações, ou mesmo outras áreas cerebrais possam estar envolvidas no mecanismo de geração de força. Estes dados reforçam a necessidade de novos estudos experimentais.

6 CONCLUSÃO FINAL

Em resumo, os resultados apresentados nesta tese de doutorado evidenciam o potencial farmacológico dos receptores heterodímeros $A_{2A}R$ - D_2R , localizados no estriado, no manejo da fadiga central.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452–457, 2009.

AGUIAR, A. S. et al. Neuronal adenosine A2A receptors signal ergogenic effects of caffeine. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

AGUIAR, A. S. et al. Deletion of CD73 increases exercise power in mice. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 3, p. 393–397, 2021.

AGUIAR JR, A. S.; SPECK, A. E.; CANAS, P. M. Purines 2018 Basic and Translational Science on Purinergic Signaling and its Components for a Healthy and Better World. **Purinergic Signalling**, v. 14, p. S1–S122, 2019.

ALBUQUERQUE, R. L.; SANCHEZ, G.; GARLAND, T. Relationship between Maximal Oxygen Consumption (VO₂max) and Home Range Area in Mammals. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, n. 6, p. 660–667, 2015a.

ALBUQUERQUE, R. L.; SANCHEZ, G.; GARLAND, T. Relationship between Maximal Oxygen Consumption (VO₂max) and Home Range Area in Mammals. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, n. 6, p. 660–667, 2015b.

ALVES, A. C. DE B. et al. Role of Adenosine A 2A Receptors in the Central Fatigue of Neurodegenerative Diseases . **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 9, n. 4, p. 145–156, 2019.

ALVES, A. C. DE B. et al. The striatum drives the ergogenic effects of caffeine. **bioRxiv preprint doi:**, p. 1–18, 2022.

ARMENTERO, M. T. et al. Past, present and future of A2A adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 132, n. 3, p. 280–299, dez. 2011.

ARON, L. Genetic analysis of dopaminergic neuron survival: GDNF/Ret signaling and the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. **Thesis**, 2009.

AZDAD, K. et al. Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors Regulate NMDA-Mediated Excitation in Accumbens Neurons Through A2A–D2 Receptor Heteromerization. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 4, p. 972–986, 17 mar. 2009.

B. FREDHOLM, B.; A. JACOBSON, K. Adenosine Receptors: The Contributions by John W. Daly. **HETEROCYCLES**, v. 79, n. 1, p. 73, 2009.

BAILEY, A.; CHANNON, S.; BEAUMONT, J. G. The relationship between subjective fatigue and cognitive fatigue in advanced multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 13, n. 1, p. 73–80, 2007.

BARROS, V. N. et al. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. March, p. 1–8, 2015.

BOND V et al. Caffeine ingestion and isokinetic strength. **Brit.J.SportsMed**, v. 20, n. 3, p. 135–137, 1986.

BURGUEÑO, J. et al. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein α -actinin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37545–37552, 2003.

CAPURON, L. et al. Neurobehavioral effects of interferon- α in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 643–652, 2002.

CARTA, A. R. et al. Inactivation of neuronal forebrain A2A receptors protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 6, p. 1478–1489, 2009.

CHEN, G.-J. et al. Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 8, p. 1848–1855, dez. 2006.

CHEN, J. F. et al. The role of the D2 dopamine receptor (D2R) in A2A adenosine receptor (A2AR)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. **PNAS**, v. 98, n. 4, p. 1970–1975, 2001a.

CHEN, J. F. et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 2–7, 2001b.

CHONG, R. et al. The dimensionality of fatigue in Parkinson's disease. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2018.

CIRUELA, F. et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2080–2087, 2006.

COSTENLA, A. R.; CUNHA, R. A.; DE MENDONÇA, A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. SUPPL.1, p. S25–S34, 2010.

COYLE E F. Ergogenic aids. **Clin Sports Med**, v. 3, n. 3, p. 731–42, 1984.

CUNHA, A. Dicionário etimológico da língua portuguesa. Em: **Nova Fronteira**. [s.l: s.n.]. p. 2a edição.

CUNHA, R. A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 1019–1055, 2016.

DANTZER, R. et al. The neuroimmune basis of fatigue. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 1, p. 39–46, jan. 2014.

DAVIS, J. M. et al. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2 53-2, p. 399–404, 2003.

DAVIS, J. M. et al. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:**, v. 284, p. 399–404, 2023.

DE BEM ALVES, A. C. et al. The striatum drives the ergogenic effects of caffeine. **Purinergic Signalling**, 26 jan. 2023.

DE OLIVEIRA, J. et al. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 10, p. 2028–2036, 2013.

DELLELI, S. et al. Acute Effects of Caffeine Supplementation on Physical Performance , Physiological Responses , Perceived Exertion , and Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 14, p. 1–37, 2022.

DELUCA, J. **Fatigue as a Window to the Brain**. [s.l.] The MIT Press, 2005. v. 29

DI GIULIO, C.; DANIELE, F.; TIPTON, C. M. Angelo Mosso and muscular fatigue: 116 Years after the first congress of physiologists: IUPS commemoration. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 30, n. 2, p. 51–57, 2006.

DRAGICEVIC, N. et al. Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1368–1379, 2012.

DUNNETT, S. B.; TORRES, E. M.; ANNETT, L. E. A lateralised grip strength test to evaluate unilateral nigrostriatal lesions in rats. **Neuroscience Letters**, v. 246, n. 1, p. 1–4, 1998.

FARAMOUSHI, M.; KHANI, M.; SADRI, K. Metabolic and hormonal basis of fatigue during exercise. **Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 3, p. 233–244, 2013.

FERRARO, L. et al. **A2A/D2 receptor heteromerization in a model of Parkinson's disease. focus on striatal aminoacidergic signaling.** **Brain Research** Elsevier B.V., , 2 out. 2012.

FERRÉ, S. et al. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. **TheScientificWorldJournal**, v. 7, n. SUPPL. 2, p. 74–85, 2007.

FERRÉ, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. SUPPL.1, 2010.

FERRÉ, S. Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 10, p. 1963–1979, 20 maio 2016.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 7–8, p. 857–872, 2004.

FRANCISCO SOLANO, A. et al. Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice. **Journal of Systems and Integrative Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 1–4, 2017.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1999.

FRIEDMAN, J.; FRIEDMAN, H. Fatigue in parkinson's disease. **Neurology**, v. 43, n. 10, p. 2016–2018, 1993.

GANDEVIA, S. C. et al. Neurobiology of muscle fatigue: Advances and issues. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 384, p. 515–525, 1995.

GANGAROSSA, G. et al. Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. **Frontiers in neural circuits**, v. 7, n. July, p. 1–16, 2013.

GIUNTA, S.; ANDRIOLO, V.; CASTORINA, A. Dual blockade of the A1 and A2A adenosine receptor prevents amyloid beta toxicity in neuroblastoma cells exposed to aluminum chloride. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 54, p. 122–136, 2014.

GOMES, C. V et al. Adenosine receptors and brain diseases : Neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 5, p. 1380–1399, 2011.

GRGIC, J. Effects of caffeine on isometric handgrip strength : A meta-analysis. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 47, p. 89–95, 2022.

GRGIC, J.; MIKULIC, P. Caffeine ingestion acutely enhances muscular strength and power but not muscular endurance in resistance-trained men. **European Journal of Sport Science**, v. 17, n. 8, p. 1029–1036, 2017.

HASSAN, F. E. et al. Pioglitazone improves skeletal muscle functions in reserpine-induced fibromyalgia rat model. **Annals of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 1032–1040, 2021.

HAYES, M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **American Journal of Medicine**, v. 132, n. 7, p. 802–807, 2019.

HEESEN, C. et al. Fatigue in multiple sclerosis: An example of cytokine mediated sickness behaviour? **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 34–39, 2006.

HERLOFSON, K.; LARSEN, J. P. The influence of fatigue on health-related quality of life in patients with Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 107, n. 1, p. 1–6, 2003.

HERNÁN, M. A. et al. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 3, p. 276–284, 2002.

HIGLEY, M. J.; SABATINI, B. L. Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 958–966, 4 ago. 2010.

HOEHN, M. M.; YAHR, M. D. Parkinsonism: onset , progression , and mortality. **Neurology**, v. 17, n. 5, p. 427–442, 1967.

JACKMAN, M. et al. Metabolic , catecholamine , and endurance responses to caffeine during intense exercise. **J Appl Physiol.**, p. 1658–1663, 1996.

JACOBSON, K. A. et al. Structure-Activity Relationships of 9-Alkyladenine and Ribose-Modified Adenosine Derivatives at Rat A3 Adenosine Receptors. **J Med Chem**, v. 38, n. 10, p. 1720–1735, 1995.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 247–264, 2006.

JENSEN, Ø. et al. Fatigue in type 1 diabetes, prevalence, predictors and comparison with the background population. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 143, p. 71–78, 2018.

KACHROO, A.; IRIZARRY, M. C.; SCHWARZCHILD, M. A. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 657–661, 2010.

KALDA, A. et al. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 248, n. 1–2, p. 9–15, 2006.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 25, p. 7833–7838, 2015.

KLUGER, B. M.; KRUPP, L. B.; ENOKA, R. M. Fatigue and fatigability in neurologic illnesses. p. 409–416, 2013.

KOLAHDOUZAN, M.; HAMADEH, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 272–290, 2017.

KRUPP, L. B.; ELKINS, L. E. Fatigue and declines in cognitive functioning in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 55, n. 7, p. 934–939, 2000.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. **BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 104

LINDBERG, D. et al. Purinergic signaling in neuron-astrocyte interactions, circadian rhythms, and alcohol use disorder. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–13, 2018a.

LINDBERG, D. et al. **Purinergic signaling in neuron-astrocyte interactions, circadian rhythms, and alcohol use disorder**. **Frontiers in Physiology** Frontiers Media S.A., , 6 fev. 2018b.

LOPES, J. P.; PLIÁSSOVA, A.; CUNHA, R. A. The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 166, n. June, p. 313–321, 2019.

LOU, J. S. Approaching fatigue in neuromuscular diseases. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 1063–1079, 2005.

LOU, J.-S. Physical and Mental Fatigue in Parkinson's Disease. **Drugs & Aging**, v. 26, n. 3, p. 195–208, 2009.

LUCA, A. DE. Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice. **TREAT-NMD Neuromuscular Network**, v. DMD_M.2.2., n. 2.0, p. 1–11, 2008.

MA, J. et al. Exercise-Induced Fatigue Impairs Bidirectional Corticostriatal Synaptic Plasticity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–11, 2018.

MARTIN, L. et al. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor- κ B and extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 71–78, 2006.

MILLER, A. H. et al. Neuroendocrine-Immune Mechanisms of Behavioral Comorbidities in Patients With Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 6, p. 971–982, 20 fev. 2008.

MOTA, D. D. C. DE F.; CRUZ, D. DE A. L. M. DA; PIMENTA, C. A. DE M. Fadiga : uma análise do conceito. **Acta Paul Enferm**, v. 18, n. 3, p. 285–293, 2005.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, n. December, p. 916–919, 2001.

ORRU, M. et al. Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine a2a receptor antagonists. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

PAILLÉ, V. et al. Distinct levels of dopamine denervation differentially alter striatal synaptic plasticity and NMDA receptor subunit composition. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14182–14193, 2010.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.] Springer US, 2012a. v. 4th editio

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.] Springer US, 2012b. v. 4th editio

PERSONIUS, K. E. et al. Grip force, EDL contractile properties, and voluntary wheel running after postdevelopmental myostatin depletion in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 3, p. 886–894, 2010.

PIERRI, M. et al. KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 4, p. 517–524, 2005.

POPOLI, P. et al. Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: Possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1967–1975, 2002.

POWERS, S. K.; DODD, S. Caffeine and Endurance Performance. **Sports Medicine**, v. 2, p. 165–174, 1985.

RYZHOV, S. et al. Cross-Talk between G_s- and G_q-Coupled Pathways in Regulation of Interleukin-4 by A_{2B} Adenosine Receptors in Human Mast Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 727–735, ago. 2006.

RYZHOV, S. et al. Effect of A_{2B} adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 2, p. 694–700, 2008.

SALAMONE, J. D. et al. Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: Possible relevance to parkinsonism. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, n. SUPPL.2, p. 1–7, 2008.

SALAMONE, J. D. et al. Role of dopamine–adenosine interactions in the brain circuitry regulating effort-related decision making: insights into pathological aspects of motivation. **Future neurology**, v. 5, n. 3, p. 377–392, 2010.

SALAMONE, J. D. et al. the Behavioral Pharmacology of Effort-Related Choice Behavior: Dopamine, Adenosine and Beyond. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 97, n. 1, p. 125–146, 2012.

SALAMONE, J. D. et al. The pharmacology of effort-related choice behavior: Dopamine, depression, and individual differences. **Behavioural Processes**, v. 127, p. 3–17, 2016.

SALAMONE, J. D. et al. The psychopharmacology of effort-related decision making: Dopamine, adenosine, and insights into the neurochemistry of motivation. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 4, p. 747–762, 2018.

SANBERG, P. R.; OSSENKOPP, K.-P.; KAVALIERS, M. **Motor Activity and Movement Disorders - research issues and applications**. [s.l.] Humana Press Inc., 1996.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1049–1055, 2011.

SCHEFFER, D. DA L. et al. Impaired dopamine metabolism is linked to fatigability in mice and fatigue in Parkinson's disease patients. **Brain Communications**, v. 3, n. 3, 2021.

SCHIFF, N. D. Central Thalamic Contributions to Arousal Regulation and Neurological Disorders of Consciousness. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1129, p. 105–118, 2008.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–6, 2015.

SEILER, A.; MURDOCK, K. W.; FAGUNDES, C. P. Impaired mental health and low-grade inflammation among fatigued bereaved individuals. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 112, n. June, p. 40–46, 2018.

SEMCHUK, K. M.; LOVE, E. J.; LEE, R. G. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. **Neurology**, v. 42, n. 7, p. 1328–1335, 1992.

SHEN, H. et al. Adenosine A_{2A} Receptors in Striatal Glutamatergic Terminals and GABAergic Neurons Oppositely Modulate Psychostimulant Action and DARPP-32 Phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–11, 2013.

SHIOZAKI, S. et al. Actions of adenosine A_{2A} receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 90–95, 1999.

SILVA, R. R. et al. Evaluation of functional selectivity of haloperidol, clozapine, and lassBio-579, an experimental compound with antipsychotic-like actions in rodents, at G protein and arrestin signaling downstream of the dopamine D₂ receptor. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. JUN, 2019.

SINGH, S. et al. Effect of caffeine on the expression of cytochrome P450 1A₂, adenosine A_{2A} receptor and dopamine transporter in control and 1-methyl 4-phenyl 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine treated mouse striatum. **Brain Research**, v. 1283, p. 115–126, 2009.

SOEREN, M. H. VAN et al. Caffeine metabolism and epinephrine responses during exercise in users and nonusers. **J Appl Physiol.**, 1993.

SONG, J. H. et al. Improvement effects of myelophil on symptoms of chronic fatigue syndrome in a reserpine-induced mouse model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 2021.

SPRIET, L. L. et al. Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. **Am J Physiology**, 1992.

SÜDHOF, T. C.; STARKE, K. **Pharmacology of Neurotransmitter Release**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 184

SULLIVAN, G. M.; FEINN, R. Using Effect Size—or Why the P Value Is Not Enough. **Journal of Graduate Medical Education**, n. September, p. 279–282, 2012.

TAKESHITA, H. et al. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2015, p. 1–9, 2017.

TAURA, J. et al. Remote control of movement disorders using a photoactive adenosine A2A receptor antagonist. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. May, p. 135–142, 2018a.

TAURA, J. et al. Remote control of movement disorders using a photoactive adenosine A2A receptor antagonist. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. May, p. 135–142, 2018b.

TER WOLBEEK, M. et al. Longitudinal analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine production in severely fatigued adolescents. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 8, p. 1063–1074, 2007.

TORTI, M.; VACCA, L.; STOCCHI, F. Istradefylline for the treatment of Parkinson's disease: is it a promising strategy? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 16, p. 1821–1828, 2018.

TOZZI, A. et al. The distinct role of medium spiny neurons and cholinergic interneurons in the D2/A2A receptor interaction in the striatum: Implications for Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1850–1862, 2011.

TYRING, S. et al. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: Double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. **Lancet**, v. 367, n. 9504, p. 29–35, 2006.

VØLLESTAD, N. K. Measurement of human muscle fatigue. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 74, n. 2, p. 219–227, 1997.

XU, K. et al. Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. **Neuroscience Letters**, v. 322, n. 1, p. 13–16, 2002.

APÊNDICE A – PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSC (CEUA/UFSC)



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel dos receptores adenosinérgicos A2A na fadiga central em modelos animais de doenças neurológicas", protocolada sob o CEUA nº 1503210519 (ID 001354), sob a responsabilidade de **Aderbal Silva Aguiar Junior e equipe; Ana Cristina de Bel Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 28/08/2019.

We certify that the proposal "The role of A2A adenosinergic receptors in central fatigue in animal models of neurological diseases", utilizing 216 Heterogenics mice (216 males), protocol number CEUA 1503210519 (ID 001354), under the responsibility of **Aderbal Silva Aguiar Junior and team; Ana Cristina de Bel Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 08/28/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)