

Karina Ghisoni de Oliveira

**A PRODUÇÃO DE NEOPTERINA NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL E SEUS EFEITOS CITOPROTETOR E  
POTENCIALIZADOR COGNITIVO**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alexandra Susana Latini

Florianópolis  
2015

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

Oliveira, Karina Ghisoni

A PRODUÇÃO DE NEOPTERINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SEUS EFEITOS CITOPROTETOR E POTENCIALIZADOR COGNITIVO / Karina Ghisoni Oliveira ; orientadora, Alexandra Susana Latini - Florianópolis, SC, 2015.

116 p.

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

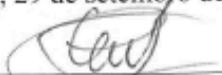
Inclui referências

1. Neurociências. 2. neopterina. 3. aprendizado. 4. memória. 5. neuroinflamação. I. Latini, Alexandra Susana. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Neurociências. III. Título.

**“A PRODUÇÃO DE NEOPTERINA NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL E SEUS EFEITOS  
CITOPROTETOR E PONTENCIALIZADOR  
COGNITIVO”.**

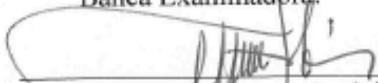
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e  
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 29 de setembro de 2015.

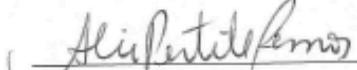


Prof. Rodrigo Bairy Leal  
Coordenador do Curso

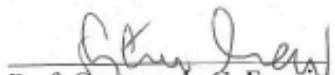
Banca Examinadora:



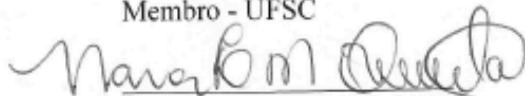
Profa. Alexandra Susana Latini  
Orientadora – UFSC



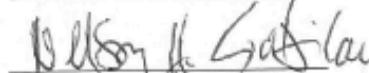
Dra. Aline Pertile Remor  
Membro - UFSC



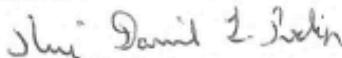
Prof. Gustavo da C. Ferreira  
Membro da Banca Externo



Profa. Nara Lins M. Quintão  
Membro da Banca Externo



Prof. Nelson H. Gabilan  
Membro - UFSC



Prof. Rui Daniel S. Prediger  
Membro - UFSC



Dedico este trabalho à minha irmã,  
bailarina, ginasta e princesa Vitória.  
Você é a luz dos olhos meus.



## AGRADECIMENTOS

À Mestre – Alexandra Latini, agradeço por me receber em seu laboratório e por me orientar. Obrigada por ser esta pesquisadora apaixonada pelo conhecimento e pela ciência, o exemplo vale mais que qualquer palavra. Muito obrigada também pelas oportunidades proporcionadas, cada uma delas contribui, e muito, para a formação da minha vida acadêmica e pessoal.

Aos mestres “internacionais” – Prof. Mariela Pérez de Córdoba na Argentina, Prof. Gilles Guillemin de Sidney na Austrália, e a Prof. Laurance Lanfumey de Paris na França pela oportunidade proporcionada.

Ao Prof. Rui D. Prediger e o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC pelo essencial auxílio nos testes comportamentais.

Aos Profs. Gustavo Ferreira e Ricardo Reis pelo auxílio nos experimentos relacionados a captação de cálcio.

Ao Prof. Anicleto Poli pela dedicação e pelos ensinamentos relacionados ao HPLC.

Ao LABOX – colegas, amigos e exemplos. Agradeço a todos os que tive o prazer de conviver durante toda esta jornada. Aos que já saíram e aos que ainda permanecem no grupo, a certeza de poder ter momentos de descontração com vocês fez toda diferença. Agradeço em especial a Aline, Débora e a Roberta por estarem ao meu lado desde o início do doutorado e serem, além de tudo, grandes amigas.

À UFSC – ao Centro de Ciências Biológicas e ao Programa De Pós-Graduação em Neurociências, em especial aos professores, pilares da nossa formação e ao secretário Nivaldo. E também ao LAMEB e os seus técnicos pelo auxílio metodológico.

À CAPES e ao CNPq – pelo incentivo a pesquisa e auxílio financeiro.

Aos amigos da vida e coração – muito obrigada, vocês são imprescindíveis para a minha felicidade.

À minha família – não tenho palavras para expressar a gratidão de ser filha e irmã de quem sou. Durante a vida e o período deste doutorado alguns obstáculos foram apresentados a nossa família, mas a certeza de poder contar com a minha mãe e saber que a minha força serviria também para fortalecer a ela faz tudo ter sentido.

Ao meu amor Pablo – mil vezes obrigada por suportar a minha pior versão . Você é o melhor do mundo em me fazer feliz.

“Nada há no intelecto que não tenha estado antes nos sentidos.”

*Aristóteles*



## RESUMO

O declínio de funções cognitivas básicas, como o aprendizado e a memória, é uma condição associada com o processo natural de envelhecimento e com diferentes patologias neurológicas e neurodegenerativas. Embora algumas estratégias farmacológicas têm sido aplicadas para prevenir e/ou atenuar os déficits observados nessa condição a descoberta de novas ferramentas nootrópicas é alvo da indústria farmacêutica. A neopterina, um metabólito secundário da via de síntese *de novo* da tetrahydrobiopterina, é encontrada em concentrações aumentadas em fluidos biológicos de indivíduos afetados por patologias que apresentam ativação do sistema imune, porém o seu efeito é pouco explorado. A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura a descrevem como um composto inerte, e uma pequena parcela associa tratamentos *in vitro* dessa pterina com efeitos relacionados a estresse eletrofilico, porém a sua função no sistema nervoso central não é conhecida. Considerando que estresse eletrofilico pode ativar vias de proteção celular, o presente trabalho investigou o possível efeito da neopterina como um potencializador cognitivo. Para isto, o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de neopterina foi estudado sobre parâmetros comportamentais e relacionados ao estresse oxidativo e inflamação, no cérebro de diversas cepas de roedores (camundongos Suíços de 60 dias de vida; nocautes para a citocina IL-10 (IL-10<sup>(-/-)</sup>) de 17 meses de vida; camundongos VGV de 60 dias de vida, camundongos C57BL/6 de 60 dias de vida; e ratos Wistar de 60 dias de vida. Ainda, a síntese e o efeito *in vitro* da neopterina foram também investigados em sistemas experimentais (culturas primárias de células nervosas humanas, células gliais C6 e cultura primária de astrócitos estriatais e hipocampais de ratos) onde foi gerado estresse eletrofilico pela adição do oxidante peróxido de hidrogênio ou do inibidor da cadeia respiratória, azida sódica; ou ainda indução de inflamação por agentes pro-inflamatórios. Os resultados demonstraram que a administração i.c.v. de neopterina (0,4 ou 4 pmol) facilitou a aquisição e consolidação da memória sem modificar a atividade locomotora espontânea em camundongos Suíços, IL-10<sup>(-/-)</sup> e ratos Wistar. Por outro lado, este mesmo tratamento conseguiu prevenir as deficiências na locomoção induzidas pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg; intraperitoneal) em animais IL-10<sup>(-/-)</sup>. Em concordância com os resultados comportamentais relacionados a memória, a administração i.c.v. de neopterina diminuiu o limiar para a potenciação de longo prazo em fatias hipocampais de ratos Wistar. Adicionalmente, a administração

i.c.v. de neopterinina aumentou a resistência ao estresse oxidativo tecidual, por aumentar as concentrações de glutatona, tióis livres e atividade de enzimas antioxidantes e por diminuir a peroxidação lipídica em camundongos Suíços. A neopterinina também demonstrou atividade anti-inflamatória por prevenir o aumento das concentrações de IL-6 induzida pela administração de LPS em animais IL-10<sup>(-/-)</sup>. *In vitro*, foi observado que o bloqueio da função mitocondrial em fatias hipocámpais de camundongos Suíços resulta em liberação extracelular de neopterinina. Em culturas primárias de células humanas neurais (astrócitos, neurônios e microglia) a produção e liberação de neopterinina para o meio extracelular foi induzida por fatores inflamatórios como interferon- $\gamma$  e LPS. Em concordância com os resultados encontrados *in vivo*, o pré-tratamento com neopterinina em sistemas *in vitro* preveniu o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e azida. Além disso, a incubação com neopterinina promoveu um aumento da marcação para o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e o conteúdo da enzima hemeoxigenase-1. Finalmente, a captação de glutamato e cálcio foram analisadas como forma de melhor entender o efeito da neopterinina sobre a LTP, onde foi observado que neopterinina aumentou a captação de glutamato tanto em fatias hipocámpais quanto em células C6, além de aumentar a mobilização de cálcio intracelular em astrócitos hipocámpais de ratos Wistar. Em conjunto estes resultados sugerem que a neopterinina apresenta um efeito potencializador da cognição, facilitando a aquisição da memória e tem ação citoprotetora via ativação de Nrf2.

**Palavras-chave:** neopterinina, cognição, aprendizado, memória, neuroinflamação

## ABSTRACT

The impairment of basic cognitive functions, such as learning and memory, is a condition associated with both the natural process of aging and several neurological and neurodegenerative disorders. Even though some therapeutic strategies have been applied to cognitive impairments prevention or attenuation in these conditions, the discovery of new nootropic tools is a target of the pharmaceutical industry. Neopterin, a secondary metabolite of the tetrahydrobiopterin *de novo* biosynthetic pathway, is found at increased levels in biological fluids from patients of pathologies with immune system activation; however, its role on the central nervous system is virtually unknown. Most of the studies available on the literature have described neopterin as an inert compound, and some of them associated the *in vitro* exposure to the pterin with electrophilic stress-related effects. Taking into consideration that electrophilic stress can activate cellular protective pathways, the present work investigated the potential effect of neopterin as a cognitive potentiator. Thus, the effect of neopterin intracerebroventricular (i.c.v.) administration was investigated on behavior and parameters related to oxidative stress and inflammation in the brain from several rodent strains (60 day old Swiss and C57BL/6 mice; 17 month old IL-10 cytokine knockout (IL-10<sup>(-/-)</sup>); and 60 day old Wistar rats). In addition, neopterin synthesis and *in vitro* effects were investigated in experimental systems (human primary nervous cell cultures, C6 glial cell line and rat primary hippocampal and striatal astrocytes culture) in which electrophilic stress was induced by the addition of the oxidant hydrogen peroxide or the mitochondrial respiratory chain inhibitor, sodium azide; or pro-inflammatory agents to induce inflammation. The results demonstrated that neopterin (0.4 or 4 pmol) i.c.v. administration improved memory acquisition and consolidation without affect spontaneous locomotor activity in Swiss and IL-10<sup>(-/-)</sup> mice and Wistar rats. Still, the same treatment prevented locomotor impairments induced by the bacterial lipopolysaccharide (LPS; 0.33 mg/kg; intraperitoneal) in IL-10<sup>(-/-)</sup> mice. In agreement with the behavioral results related to memory, neopterin i.c.v. administration reduced the long term potentiation in Wistar rats hippocampal slices. Moreover, neopterin i.c.v. administration increased the resistance to oxidative stress by increasing glutathione and free thiol levels and antioxidant enzymes activities and decreasing lipid oxidation in Swiss mice brain. Neopterin also showed anti-inflammatory activity by preventing IL-6 levels increase induced by LPS in IL-10<sup>(-/-)</sup> mice. *In vitro*, it was observed that

the mitochondrial function blockage in Swiss mice hippocampal slices results in neopterin extracellular release. In human primary neural cell cultures (astrocytes, neurons and microglia), neopterin production and release for the extracellular medium was induced by inflammatory factors as interferon- $\gamma$  and LPS. In agreement with the *in vivo* results, the pretreatment with neopterin in *in vitro* systems prevented the hydrogen peroxide and azide-induced oxidative stress. Furthermore, neopterin exposure promoted an increase in nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) staining and the heme oxygenase-1 enzyme content. Finally, glutamate and calcium uptake were analyzed in order to improve the understanding regarding neopterin effects on LTP, and it was observed that neopterin increased glutamate uptake both in hippocampal slices and C6 cell line and increased calcium influx in Wistar rats hippocampal astrocytes culture. These results suggest that neopterin exerts a cognitive potentiator role, facilitating memory acquisition and has a cytoprotective action through Nrf2 activation.

**Keywords:** neopterin, cognition, learning, memory, neuroinflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

7,8-NH<sub>2</sub>: 7,8-diidroneopterina  
AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico  
AR: aldose redutase  
ARE: elemento de resposta antioxidante  
ATP: trifosfato de adenosina  
BH<sub>2</sub>: dihidrobiopterina  
BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina  
BSA: albumina sérica bovina  
Ca<sup>2+</sup> : cálcio  
CaMK: proteína calmodulina dependente  
CR: Carbonil redutase  
CRE: elemento de resposta ao cAMP  
CREB-1 : proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP  
DAG: diacilglicerol  
DCF: diclorofluoresceína fluorescente  
DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato  
DHFR: dihidropterina redutase  
DTE: ditioeritritol  
ERKs: proteína quinase regulada por sinal extracelular  
ERNs: espécies reativas de nitrogênio  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
fEPSPs: potenciais pós-sinápticos excitatórios  
GFAP: proteína ácida fibrilar glial  
GPx: glutaciona peroxidase  
GR: glutaciona redutase  
GSH: glutaciona  
GTP: guanosina trifosfato  
GTPCH: GTP ciclohidrolase I  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peróxido de hidrogênio  
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência  
i.c.v.: intracerebroventricular  
i.p.: intraperitonal  
IFN- $\gamma$  : interferon- $\gamma$   
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$   
IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trifosfato  
Keap1: proteína associado ao citoesqueleto  
LPS: lipopolissacarídeo bacteriano  
LTM: memória de longa duração  
LTP: potenciação de longa duração

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno  
Mg<sup>2+</sup>: íon magnésio  
mGlu: receptor glutamatérgico metabotrópico  
MHC: complexo maior de histocompatibilidade  
Na<sup>2+</sup>: íon sódio  
NF-κB: Fator de transcrição nuclear Kappa B  
NGF: fator de crescimento do nervo  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
NO: óxido nítrico  
NOS-1: Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS-2: Óxido nítrico sintase induzível  
NOS-3: Óxido nítrico sintase endotelial  
NOS: enzima oxido nítrico sintase  
NPSH: conteúdo de tiois livres  
Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2  
PBS: tampão fosfato salina  
PCBD: Pterina-4α-carbinolamina desidratase  
PheOH: fenilalanina hidroxilase  
PKA: proteína dependente de AMPc  
PKC: proteína quinase C  
PKG: proteína quinase dependente do GMPc  
PP: via perforante  
PTPS: 6-piruvoil tetrahidrobiopterina sintase  
QDPR: enzima quinonoide dihidrobiopterina redutase  
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real  
SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio  
SNC: Sistema nervoso central  
SR: sepiapterina resutase  
STM: Memória de curta duração  
TBA-RS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TBA: ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricloroacético  
TNF-α: fator de necrose tumoral α  
TrpOH: triptofano hidroxilase  
TyrOH: tirosina hidroxilase

## LISTA DE FIGURAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 1</b> | Processos de formação da LTP.....  | 31 |
| <b>Figura 2</b> | Papel do sistema Keap1-Nrf2-ARE na regulação da resposta antioxidante.....   | 39 |
| <b>Figura 3</b> | Vias metabólicas ( <i>de novo</i> , salvação e reciclagem) envolvidas na produção de BH4.....  | 41 |
| <b>Figura 4</b> | Estrutura da neopterina.....   | 43 |
| <b>Figura 5</b> | Indução da síntese de neopterina.....  | 44 |
| <b>Figura 6</b> | Efeito da administração única e intracerebroventricular de neopterina (Neo; 0,4 e 4 pmol) sobre a memória aversiva (A) e locomoção espontânea (B) em camundongos Suíços machos de 60 dias de vida.....   | 69 |
| <b>Figura 7</b> | Efeito da administração de neopterina (Neo; 0,4 e 4 pmol; intracerebroventricular) sobre a resistência tecidual ao estresse oxidativo em córtex cerebral de camundongos Suíços de 60 dias de vida.....   | 70 |
| <b>Figura 8</b> | Efeito da administração de neopterina (Neo 4 pmol; intracerebroventricular) sobre as tarefas de memória aversiva (A), número de entradas do animal nos braços abertos do labirinto elevado em cruz (B), tempo de permanência nos braços abertos do labirinto elevado em cruz (C) e sobre a formação do potencial de longa duração (LTP; D) em ratos Wistar machos adultos..... | 70 |
| <b>Figura 9</b> | Efeito da administração periférica de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg; intraperitoneal) sobre a expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ e IL-6 e sobre as enzimas GCH1 e SPR envolvidas na síntese de novo de BH4 em córtex (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F) de camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida.....                      | 73 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 10</b> | Efeito da administração de neopterinina (Neo; 0,4 pmol; intracerebroventricular) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg; intraperitoneal) sobre a locomoção espontânea (A) e memória aversiva (B) e sobre a produção de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ (C) e IL-6 (D), em camundongos nocaute para IL-10 <sup>(-/-)</sup> de 17 meses de idade..... | 75 |
| <b>Figura 11</b> | Efeito da administração de neopterinina (Neo; 0,4 pmol; intracerebroventricular) sobre a locomoção espontânea e induzida por D-anfetamina (3,0 mg/kg; intraperitoneal) em camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida.....   | 76 |
| <b>Figura 12</b> | Efeito da administração de neopterinina (Neo; 0,4 pmol; intracerebroventricular) sobre o comportamento de congelamento em camundongos VGV machos adultos.....   | 77 |
| <b>Figura 13</b> | Efeito da administração de escopolamina (0,5 mg/kg; intraperitoneal) e/ou neopterinina (Neo 0,4 pmol; intracerebroventricular) sobre a memória aversiva em camundongos Suíços de 60 dias de vida.   | 78 |
| <b>Figura 14</b> | Efeito da azida sódica (0 – 500 mM) sobre a liberação de neopterinina a partir de fatias hipocámpais obtidas de cérebro de camundongos adultos Suíços.....  | 79 |
| <b>Figura 15</b> | Efeito do tratamento com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS 10 e/ou 100 ng/mL; A,C, E e F) e do interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ 5 e/ou 40 ng/mL; B, D, H e I) sobre a produção e liberação de neopterinina em células do sistema nervoso central obtidas a partir de fetos humanos.....   | 81 |
| <b>Figura 16</b> | Efeito de concentrações crescentes de neopterinina (Neo 0 – 500 nM; 3h) sobre a taxa de oxidação do diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) em culturas de células gliais C6.....   | 82 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
|                  | Efeito de concentrações crescentes de neopterinina (Neo 0 – 5000 nM; 2,5h) frente ao estresse oxidativo induzido pela exposição a peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,1 mM e 1 mM; 3h e 0,5h, respectivamente) sobre a oxidação do diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) em culturas de células gliais C6 e astrócitos corticais obtidos a partir de cérebro de rato Wistar neonato..... | 84 |
| <b>Figura 17</b> |  |    |
|                  | Efeito da neopterinina (50 e 500 nM) e/ou azida sódica 5 mM por 3h sobre o conteúdo de heme oxigenase-I (HO-1) em culturas de astrócitos primários de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos.....  | 85 |
| <b>Figura 18</b> |  |    |
|                  | Efeito da neopterinina (50 nM) por 3h sobre o conteúdo de Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) em culturas de células C6.....   | 86 |
| <b>Figura 19</b> |  |    |
|                  | Efeito da neopterinina (50 – 5000nM) e/ou azida sódica (5 mM) em células C6 e fatias hipocâmpais de camundongos Suíços sobre a captação de glutamato.....  | 87 |
| <b>Figura 20</b> |  |    |
|                  | Efeito da neopterinina (500nM) sobre o influxo de cálcio em astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar.....  | 88 |
| <b>Figura 21</b> |  |    |
|                  | Efeito da neopterinina (50 nM; 24h) sobre a quantidade e a localização de mitocôndrias em neurônios dos gânglios da raiz dorsal.....   | 89 |
| <b>Figura 22</b> |  |    |

## LISTA DE TABELAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b> | Compilação dos efeitos extracelulares da neopterina <i>in vitro</i> .....  | 47 |
| <b>Tabela 2</b> | Comparação dos efeitos extracelulares da neopterina e do seu precursor defosforilado 7,8 diidroneopterina (7,8-NH <sub>2</sub> ) <i>in vitro</i> ..... | 48 |
| <b>Tabela 3</b> | Sequência de primers utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....   | 59 |

## SUMÁRIO

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| <b>1.</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 25 |
| 1.1.          | PROCESSOS COGNITIVOS.....  | 25 |
| <b>1.1.1.</b> | <b>Memória</b> .....   | 25 |
| 1.1.1.1.      | Mecanismos de formação da memória.....   | 26 |
| 1.1.1.1.1.    | <i>Sistema glutamatérgico</i> .....  | 27 |
| 1.1.1.1.1.    | <b>Potenciação de longa duração</b> .....  | 28 |
| 1.1.1.1.2.    | <i>Sistema colinérgico</i> .....   | 32 |
| 1.1.1.2.      | Déficits na memória.....   | 33 |
| 1.1.1.3.      | Mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processos relacionados a disfunções cognitivas..... | 34 |
| 1.1.1.3.1.    | <i>Produção de radicais livres e Estresse Oxidativo</i> .....                                  | 34 |
| 1.1.1.3.2.    | <i>Neuroinflamação</i> .....   | 36 |
| <b>1.1.2.</b> | <b>Compostos nootrópicos</b> .....   | 37 |
| 1.2.          | TETRAHIDROPIOPTERINA.....  | 39 |
| <b>1.2.1.</b> | <b>Biossíntese de novo</b> .....   | 40 |
| <b>1.2.1.</b> | <b>Via de reciclagem</b> .....   | 40 |
| <b>1.2.3.</b> | <b>Via de salvação</b> .....   | 40 |
| 1.3.          | NEOPTERINA.....  | 42 |
| <b>1.2.1.</b> | <b>Efeitos biológicos da neopterina</b> .....  | 45 |
| <b>2.</b>     | <b>HIPÓTESE</b> .....  | 49 |
| <b>3.</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 50 |
| 3.1.          | OBJETIVO GERAL.....  | 50 |
| 3.2.          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 50 |
| <b>4.</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 52 |
| 4.1.          | EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....  | 52 |
| <b>4.1.1.</b> | <b>Animais</b> .....   | 52 |
| <b>4.1.2.</b> | <b>Administração intracerebroventricular (i.c.v.) de neopterina</b> .....                      | 53 |
| <b>4.1.3.</b> | <b>Administração intraperitoneal de LPS</b> .....  | 53 |
| <b>4.1.4.</b> | <b>Parâmetros comportamentais</b> .....  | 53 |
| 4.1.4.1.      | Teste do campo aberto.....   | 54 |
| 4.1.4.2.      | Teste da esQUIVA inibitória.....   | 54 |
| 4.1.4.3.      | Teste do labirinto em cruz elevado.....  | 55 |
| 4.1.4.4.      | Teste do medo condicionado.....  | 55 |
| 4.1.4.5.      | Desafio locomotor farmacológico induzido pela D-anfetamina.....                                | 56 |
| <b>4.1.5.</b> | <b>Parâmetros de eletrofisiologia</b> .....  | 56 |
| <b>4.1.6.</b> | <b>Parâmetros bioquímicos</b> .....  | 57 |
|               | Quantificação de substâncias reativas ao ácido   |    |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| 4.1.6.1.      | tiobarbitúrico.....  | 57        |
| 4.1.6.2.      | Determinação das atividades da glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).....                       | 58        |
| 4.1.6.3.      | Determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH).....  | 58        |
| 4.1.6.4.      | Determinação do conteúdo de tióis livres (NPSH).....   | 58        |
| 4.1.6.5.      | Determinação da concentração de citocinas por imunoenensaio enzimático.....  | 58        |
| <b>4.1.7.</b> | <b>Parâmetros moleculares</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>4.1.8.</b> | <b>Dosagem de proteínas</b> .....  | <b>60</b> |
| 4.2.          | EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....   | 60        |
| 4.2.1.        | <b>Cultivos primários de células do sistema nervoso central</b> .....  | <b>60</b> |
| 4.2.2.        | <b>Manutenção da linhagem celular do astroglioma C6</b> .....  | <b>61</b> |
| 4.2.3.        | <b>Cultura primária de astrocitos estriatais e hipocampais</b> .....   | <b>61</b> |
| 4.2.4.        | <b>Cultura primária de neurônios dos gânglios da raiz dorsal</b> .....   | <b>62</b> |
| 4.2.5.        | <b>Preparação de homogenatos a partir das culturas celulares</b> .....   | <b>62</b> |
| 4.2.6.        | <b>Taxa de oxidação da diclorofluoresceína</b> .....   | <b>62</b> |
| 4.2.7.        | <b>Mensuração da concentração de lactato</b> .....   | <b>63</b> |
| 4.2.8.        | <b>Mensuração da concentração de neopterina</b> .....  | <b>63</b> |
| 4.2.9.        | <b>Análise de proteínas por Western Blot</b> .....   | <b>63</b> |
| 4.2.10.       | <b>Marcação para Nrf2 por citometria de fluxo</b> .....  | <b>64</b> |
| 4.2.11.       | <b>Captação de glutamato</b> .....   | <b>65</b> |
| 4.2.12.       | <b>Mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular</b> .....   | <b>65</b> |
| 4.2.13.       | <b>Análise da malha mitocondrial por imunofluorescência</b> .....  | <b>65</b> |
| 4.2.14.       | <b>Análise do número de mitocôndrias por microscopia eletrônica</b> .....  | <b>66</b> |
| 4.3.          | <b>Análise estatística</b> .....   | <b>66</b> |
| 5.            | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>68</b> |
| 5.1.          | SEÇÃO I – EFEITO DA NEOPTERINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES CEPAS DE ROEDORES..... | 69        |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 5.2. | SEÇÃO II – PRODUÇÃO E EFEITOS DA<br>NEOPTERINA <i>IN VITRO</i> EM DIFERENTES<br>TECIDOS E CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO<br>CENTRAL..... | 79  |
| 6.   | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 90  |
| 7.   | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 97  |
| 8.   | <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | 98  |
| 9.   | <b>ANEXOS</b> .....  | 99  |
| 10.  | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 102 |



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PROCESSOS COGNITIVOS

Processos cognitivos são aqueles subjacentes à elaboração do conhecimento. Entre eles estão a percepção, o aprendizado, a memória e a consciência. O aprendizado é o processo pelo qual novas informações são adquiridas, resultantes da interação do indivíduo com o meio, e novas relações são estabelecidas com aquilo que foi previamente aprendido. O aprendizado, ainda, confere ao indivíduo a capacidade de modificar seu comportamento em consequência da prática ou da experiência (Izquierdo, 2011; Squire and Kandel, 2003).

Inerente ao processo do aprendizado está a memória, que possibilita reter o aprendido para responder adequadamente às situações do presente ou projetar o futuro. Por esta razão, a memória é um processo cognitivo que compreende a capacidade de adquirir, reter e evocar, quando necessárias, informações que de alguma forma são relevantes (Izquierdo, 2011).

#### 1.1.1 Memória

A memória compreende o conjunto de mecanismos que operam no sistema nervoso central (SNC) para que o aprendizado ocorra. Tais mecanismos operam em sequência e correspondem às diferentes fases da memória. Para que ocorra a formação da memória, deve acontecer primeiramente a aquisição da informação relativa a esta memória, seja esta decorrente de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção). A etapa de aquisição corresponde à aprendizagem. Após o aprendizado, pode ocorrer a retenção da informação, a qual pode ser de curta ou de longa duração. Enquanto estiver retida, a informação pode ser recuperada, e esta etapa é chamada de evocação. A retenção de curta duração (minutos, horas) pode ser convertida em memória de longa duração (dias, semanas, anos), pelo processo denominado de consolidação, que se inicia imediatamente após a aquisição (Abel and Lattal, 2001; McGaugh, 2000).

As memórias podem ser classificadas utilizando-se diferentes critérios, sendo que os dois principais são o conteúdo e a duração. De acordo com o conteúdo, as memórias são divididas em declarativas (explícitas) ou procedurais (implícitas). As memórias declarativas são aquelas que registram fatos, eventos e conhecimentos e requerem a consciência para sua expressão; são memórias que nos seres humanos

podem ser declaradas que existem e relatadas como foram adquiridas. Por outro lado, as memórias procedurais compreendem as capacidades ou habilidades motoras e sensoriais, as quais são inconscientes, exemplos típicos, nos seres humanos, são as memórias de como andar de bicicleta ou nadar (Izquierdo, 2011; Squire and Kandel, 2003).

As memórias podem também ser classificadas pelo tempo que duram em três categorias: memória de trabalho, que corresponde aquela que dura de segundos a poucos minutos, apenas para manter a informação ativa enquanto esta é preparada para ser codificada; a memória de curta duração (STM – do inglês *short term memory*), que dura de minutos a poucas horas, e funciona como uma memória temporária, permanecendo ativa apenas durante o tempo necessário para que a memória de longa-duração (LTM – do inglês *long term memory*), que dura horas, dias ou anos, seja formada em sua forma final (Izquierdo, 2011).

#### 1.1.1.1 Mecanismos de formação da memória

As memórias não são adquiridas imediatamente na sua forma final. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, são suscetíveis à interferência por outras memórias, por drogas ou por tratamentos (Izquierdo, 1989a; McGaugh, 2000; McGaugh and Izquierdo, 2000). A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos em regiões cerebrais como o hipocampo, córtex entorrinal e perirrinal (McGaugh and Izquierdo, 2000), porém os mecanismos envolvidos na formação e na consolidação da memória ainda não estão totalmente elucidados (Izquierdo, 2011).

Grande parte do que se conhece atualmente ao respeito dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na consolidação de memórias deve-se ao fenômeno da potenciação de longa duração, LTP (do inglês – *long term potentiation*) descrito por Bliss & Lomo, em 1973. A descoberta da LTP no hipocampo representou um grande avanço para as investigações relacionadas a memória, pois pela primeira vez tornou-se possível mensurar mudanças eletrofisiológicas causadas por eventos específicos (Bliss and Lomo, 1973; McGaugh and Izquierdo, 2000). Por definição, a LTP consiste em um aumento persistente na eficiência da transmissão sináptica em resposta a intensa estimulação de uma sinapse química (Cooke and Bliss, 2006). As alterações moleculares decorrentes da LTP estão intimamente relacionadas com a plasticidade estrutural das células nervosas (Cooke and Bliss, 2006; Lamprecht and LeDoux, 2004).

A neuroplasticidade é definida como a capacidade de adaptação do sistema nervoso. No caso específico de aprendizado e formação de memórias, a plasticidade neural refere-se a alterações estruturais e funcionais das sinapses, de modo a possibilitar a codificação dessas memórias para posterior acesso. Mudanças na efetividade sináptica podem aumentar ou diminuir a eficiência de transmissão de impulsos entre neurônios, podendo, conseqüentemente, acarretar uma modulação do comportamento (Bliss and Collingridge, 1993; Citri and Malenka, 2008). Assim, comportamentalmente, a plasticidade se manifesta através da aquisição de um aprendizado e da formação da memória. Eletrofisiologicamente, através da manifestação da LTP (Izquierdo, 2011).

Ao longo dos anos comprovou-se que a LTP compartilha inúmeras e importantes características com o aprendizado e a memória (Bliss and Collingridge, 1993; Izquierdo and Medina, 1997; Medina and Izquierdo, 1995). Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória e da LTP incluem o sistema glutamatérgico (Izquierdo and Medina, 1997; Medina and Izquierdo, 1995).

#### *1.1.1.1.1. Sistema glutamatérgico*

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, sendo que aproximadamente 80-90% das sinapses no cérebro são glutamatérgicas. Sua ação ocorre através da ativação dos seus receptores ionotrópicos do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), do tipo NMDA (N-metil- D- aspartato) e dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) (Kandel, 2014).

##### *- Receptores glutamatérgicos do tipo AMPA*

Os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA são responsáveis pela transmissão sináptica basal e pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico (Stone e Addae, 2002; Li, Chen, Smit, 2013). Estes receptores são formados por 4 subunidades, GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 que constituem um tetrâmero. A composição destas subunidades varia de acordo com a região cerebral do receptor, influenciando diretamente a sua conformação e participação na LTP (Malinow and Malenka, 2002). As subunidades GluR1 e GluR2 são descritas como as mais importantes na plasticidade sináptica e medeiam o influxo de sódio, responsável por despolarizar a célula garantindo o início da LTP. Além disso, inúmeros estudos demonstram a importância da translocação de receptores AMPA internalizados para a membrana celular, o que favorece a manutenção da LTP (Lamprecht and LeDoux,

2004; Lopez et al., 2015; Malinow and Malenka, 2002).

- *Receptores glutamatérgicos do tipo NMDA*

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são responsáveis pelo aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, mantendo assim a despolarização do potencial pós-sináptico iniciada pelos receptores AMPA (Riedel et al., 2003). Estes receptores são compostos por uma subunidade obrigatória NR1 e outras unidades modulatórias, incluindo NR2 (com subtipos A, B, C e D) e NR3 (com subtipos A e B) e, localizam-se na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias (Sheng et al., 1994). Estes canais encontram-se bloqueados por íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) que impedem o influxo de  $Ca^{2+}$  para o terminal pós-sináptico. No entanto, sob despolarização (originada principalmente pela ativação dos receptores do tipo AMPA) os íons  $Mg^{2+}$  são expulsos, o que permite o influxo de  $Ca^{2+}$  a favor do seu gradiente de concentração.

- *Receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR)*

Receptores glutamatérgicos metabotrópicos são ativados mais tardiamente na LTP em relação aos receptores AMPA e NMDA, e sua função está relacionada com a manutenção do potencial e da fase tardia da LTP.

Atualmente são descritos 8 tipos de mGluR acoplados a proteína-G, nomeados de mGlu1 ao 8. O grupo I (mGlu1 e mGlu5) está predominantemente localizado nas membranas pós-sinápticas e estão acoplados à proteína Gq, a qual estimula a ativação da fosfolipase C, resultando na formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), bem como na liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares e na consequente ativação da proteína quinase C (PKC) (Piers, Kim et al. 2012).

O grupo II de receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu2 e mGlu3) é encontrado tanto pré como pós-sinápticamente e estão acoplados à proteína Gi, inibindo a atividade da adenilato ciclase. Por último, o grupo III de receptores mGlu (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) está predominantemente localizado pré-sinápticamente, onde atua como autorreceptor e também está acoplado às proteínas-Gi, inibindo a atividade da adenilato ciclase (Kim et al., 2008).

#### ***1.1.1.1.1.1. Potenciação de longa duração***

O gatilho para a indução da LTP esta relacionado a um aumento pós-sináptico das concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$ , mediado por

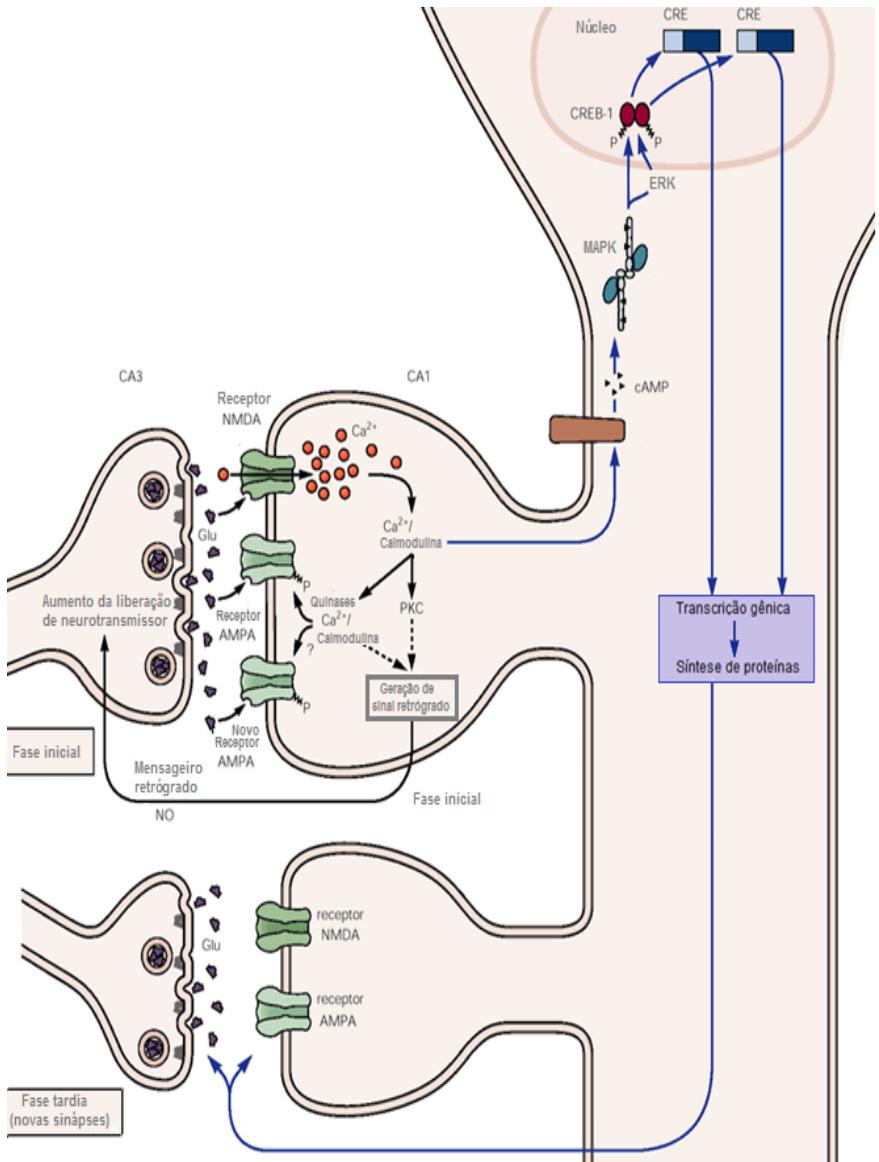
receptores AMPA e NMDA (Malenka and Nicoll, 1999). Conforme ilustrado na Figura 1, o glutamato liberado nas sinapses leva a uma despolarização persistente da célula com influxo de sódio ( $\text{Na}^{2+}$ ) através dos receptores AMPA. Como consequência da despolarização, o receptor do tipo NMDA abre seus canais permitindo a saída do íon  $\text{Mg}^{2+}$  que bloqueava o mesmo, permitindo ao receptor conduzir cátions e contribuir para a depolarização pós-sináptica. O influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  então ocorre através de ambos receptores. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula direta e indiretamente proteínas quinase cálcio / calmodulina dependentes (CaMKI, I, II, III e IV); PKC); proteínas quinase dependente do GMPc (PKG) e de AMPc (PKA); e ainda proteínas quinase ativáveis extracelularmente (ERKs).

A ativação da CaMKII ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS) que produz óxido nítrico (NO – do inglês *nitric oxide*), que age como um mensageiro retrógrado no terminal pré-sináptico. Esta fase inicial de otimização da eficiência pré-sináptica caracteriza a fase imediata da LTP (Squire & Kandel, 2003). O glutamato que permanece disponível na fenda sináptica une-se a receptores mGlu1 e mGlu5 contribuindo para o aumento persistente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que liga-se à calmodulina. A CaMKII e a PKC fosforilam e ativam outras proteínas, dentre as quais, as enzimas da via das MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos), que fosforila CREB-1 e ativa a transcrição de alvos (contendo o elemento CRE) (Walz et al., 2000a; Walz et al., 2000b).

A adenilil-ciclase sintetiza cAMP a partir de ATP. O cAMP liga-se à subunidade regulatória da PKA, que se separa da subunidade catalítica desta proteína. Todos estes eventos culminam na fosforilação do fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP), ativando-o. O CREB ativado, liga-se ao DNA promovendo a transcrição de genes imediatos que codificam o mRNA para outros fatores de transcrição, que se ligarão aos promotores de um outro conjunto de genes, os chamados genes tardios, ativando sua transcrição. Por outro lado, genes tardios codificam o mRNA para proteínas estruturais, de adesão ou receptores (AMPA, NMDA, metabotrópicos), que serão requisitadas para a produção de novos sítios sinápticos que irão reforçar especificamente as sinapses que desencadearam todo este processo. Esta última etapa caracteriza a chamada fase tardia da LTP, que dura de dias a semanas (Squire e Kandel, 2003; (Abel and Lattal, 2001; Izquierdo, 2011).

Assim como a fase inicial da LTP, a memória de curta duração é transitória, não necessita de alterações morfológicas para ser mantida e

não necessita de síntese proteica. A fase tardia, é estável e auto sustentável, implica em alterações morfológicas e necessita de nova síntese de mRNA e de proteínas (Lynch, 2003; Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo e Medina, 1995).



**Figura 1.** Processo de formação da LTP. Fase inicial: a estimulação de receptores amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA) promove o influxo de Ca<sup>2+</sup> na célula pós-sináptica, que provoca a ativação de proteínas quinases dependentes do complexo

$\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina aumentando o tráfego de receptores do tipo AMPA desde o citosol até a membrana pós-sináptica. Ainda, a persistente atividade pós-sináptica do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina leva à síntese de óxido nítrico (NO), que atua como mensageiro retrógrado, facilitando a resposta pré-sináptica à estímulos subsequentes por promover o aumento no número de vesículas sinápticas e sua posterior liberação na fenda sináptica. Fase tardia: a persistente ativação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) estimula fatores de transcrição, como a proteína de ligação a elementos de resposta ao AMPc (CREB1), que promove a transcrição gênica e síntese de proteínas. LTP – potenciação de longa duração; NO – óxido nítrico; AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; Glu - glutamato; NMDA - N-metil-D-aspartato; cAMP – monofosfato de adenosina cíclico; MAP – proteína ativada por mitógeno; CREB1 – proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP; CRE - elemento de resposta ao cAMP. Adaptado de Kandel et al. (2000).

#### *1.1.1.1.2. Sistema colinérgico*

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial nos processos de aprendizado e memória (Winkler et al., 1995). O neurotransmissor acetilcolina (ACh) age nos receptores colinérgicos nicotínicos (nACh), de ação ionotrópica, e nos receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR), de ação metabotrópica (Kandel, 2014).

Os nACh são canais iônicos, formados por subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) distintas. A ativação deste tipo de receptores resulta diretamente no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e despolarização da membrana. O acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal pré-sináptico facilita a liberação de neurotransmissores (Giovannini et al., 2015).

Os mAChR são membros da classe de receptores acoplados à proteína G, e atualmente são descritos cinco subtipos de receptores (M1 a M5) com localização variada em todo o cérebro, incluindo o hipocampo. mAChR dos tipos M1, 3 e 5 são acoplados a proteína Gq e são descritos por ativar canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente, ativar PKC e IP3 e aumentar as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Giovannini et al., 2015). Os mAChR pré-sinápticos do tipo M2 e M4 são acoplados a proteína Gi e descritos por inibir canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente, diminuir a sinalização mediada por cAMP e inibir a liberação de neurotransmissores colinérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos (Giovannini et al., 2015).

Os efeitos de antagonistas muscarínicos como a escopolamina e a atropina são amplamente reportado como amnésico e representam uma ferramenta no estudo de processos cognitivos relacionados ao sistema colinérgico (Brown, 2010; Izquierdo, 1989b; Klinkenberg and Blokland, 2010). Além disso o uso de inibidores da enzima de degradação de

ACh, acetilcolinesterase, é utilizado na clínica para prevenir e atenuar prejuízos cognitivos (Rodrigues Simoes et al., 2014; Volger, 1991)

#### 1.1.1.2. Déficits na memória

Déficits no aprendizado e na memória estão associados com diferentes condições neurológicas e neurodegenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer, esquizofrenia, depressão, doença de Parkinson e declínios cognitivos relacionados ao envelhecimento (Costa and Silva, 2002; Ehninger et al., 2008; Harwood and Agam, 2003; Li et al., 2007; Rosenzweig and Barnes, 2003; Selkoe, 2001; Thomas and Beal, 2007).

O déficit gradual de memória durante estágios avançados da fase adulta é comum mesmo na condição saudável (Glisky, 2007). O envelhecimento é descrito como uma combinação de processos estocásticos e randômicos que levam ao acúmulo de danos celulares irreparáveis e, as células nervosas são particularmente suscetíveis à esses danos (Hindle, 2010). Os declínios cognitivos apresentados por cada indivíduo parece ser determinado ainda por fatores ambientais e genéticos (Petersen et al., 2001). Achados específicos como redução da eficiência em sinápses, diminuição da resposta de receptores do tipo NMDA e alterações na homeostase de  $Ca^{2+}$  estão relacionados ao envelhecimento, os quais podem resultar em alterações na plasticidade sináptica e na geração da LTP (Rosenzweig and Barnes, 2003).

Por outro lado, os déficits no aprendizado e memória podem estar relacionados com a morte celular em regiões específicas do cérebro, como ocorre nas doenças neurodegenerativas, em particular a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. (Blandini et al., 2000; German et al., 1987; Jellinger, 1988). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como análises de autópsias de cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, demonstram o envolvimento da ativação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais (caspases, Bax e Bcl-2) neste processo (Jellinger, 2006). Ainda, a presença de agregados proteicos insolúveis intracitoplasmáticos parece estimular processos oxidativos através de reações de nitração e oxidação de proteínas celulares, as quais provocariam a ativação das células microgliais (Heales et al., 2004; Lipton et al., 2007). A ativação da microglia favorece o depósito destes agregados proteicos principalmente por estimular um microambiente caracterizado pela presença de mediadores inflamatórios (Chao et al., 1995; Griffin et al., 1989). Neste cenário, tem sido demonstrado uma significativa perda neuronal após a ativação persistente do sistema

imune de defesa neural, especialmente da microglia (Diestel et al., 2003; Newman et al., 2001).

### 1.1.1.3. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processos relacionados a disfunções cognitivas

#### *1.1.1.3.1. Produção de radicais livres e estresse oxidativo mitocondrial*

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela maior produção líquida de energia, a qual contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular com concomitante geração de energia (Kennedy and Lehninger, 1949; Lehninger and Smith, 1949). A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo de Krebs) e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória). Os genomas nuclear e mitocondrial são responsáveis por codificar os complexos proteicos envolvidos na formação de energia e respiração celular. Os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais geradores de espécies reativas de oxigênio (ERs) em condições fisiológicas (Di Donato, 2000).

ERs são os radicais formados pela redução incompleta do oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ), e também alguns compostos não radicalares derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singleto (Halliwell and Gutteridge, 1999). Além destas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo o NO e o peroxinitrito os principais representantes (Halliwell, 2001). No complexo I, o superóxido é liberado para a matriz mitocondrial, já no III a liberação pode ser tanto na matriz, no espaço intermembranas e no espaço extramitocondrial (Han et al., 2001; St-Pierre et al., 2002).

As ERs e ERNs ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos no organismo e apresentam diversas funções (Bergendi et al., 1999). Por exemplo, em quadros de infecção onde há um aumento na geração de ERs por parte dos neutrófilos, estes atuam como linha de defesa e proporcionam um efeito benéfico para as células do hospedeiro através da eliminação de microorganismos pela produção de substâncias tóxicas (Delanty and Dichter, 1998). As ERs também participam de processos de sinalização celular, bem como na síntese e regulação de algumas proteínas (Ward and Peters, 1995). Ainda, o NO desempenha funções importantes no sistema nervoso central, tais como neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Heales et al., 2004). Por outro lado, as ERs quando produzidas em

excesso ou de forma persistente podem desencadear efeitos prejudiciais, como por exemplo, a peroxidação lipídica e oxidação proteica, levando à inativação de biomoléculas e consequente alteração da função celular (Delanty e Dichter, 1998).

A defesa celular contra danos provocados por ERs e ERNs é realizada pela utilização de reservas antioxidantes. Os antioxidantes têm como função primária reduzir a velocidade de iniciação e/ou propagação dos processos oxidativos, suprimindo a geração de ERs e ERNs ou, eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo, o dano oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Neste sentido, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) removem ERs e ERNs cataliticamente, enquanto moléculas de baixo peso molecular como a glutathione (GSH) e a bilirrubina agem sequestrando as espécies reativas (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Situações nas quais a geração de ERs ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis são caracterizadas como estresse oxidativo (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O cérebro é particularmente vulnerável às reações de oxidação devido a diversos fatores: (i) contém altas concentrações de lipídios poli-insaturados, que servem como substrato para peroxidação lipídica; (ii) utiliza uma porcentagem muito alta de oxigênio em relação a outros tecidos; (iii) possui grandes quantidades de íon ferro; (iv) a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato que na via de sinalização através do receptor específico glutamatérgico induz uma cascata de reações que resultam na formação de ERs; (v) a formação de espécies reativas durante a auto-oxidação de neurotransmissores; (vi) as baixas concentrações das enzimas antioxidantes em relação a outros órgãos como o fígado; e ainda (vii) a incapacidade de replicação das células neuronais, fato que leva a acumular danos oxidativos com o passar do tempo (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Numerosas evidências sugerem que as ERs e o estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas. Tem sido proposto que o peptídeo  $\beta$ -amilóide tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente (Lovell et al., 2000; Markesbery and Carney, 1999; Nourooz-Zadeh et al., 1999; Smith et al., 1991).

Adicionalmente, o estresse oxidativo pode ocasionar mudanças reativas em astrócitos situados próximos a áreas lesadas, levando a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como, a uma alteração na homeostase de íons extracelulares e de aminoácidos

neurotransmissores (Maccioni et al., 2001). Além disso, nas doenças neurodegenerativas tem sido demonstrada a ativação de células da microglia, levando a produção de substâncias potencialmente neurotóxicas (Block et al., 2007; Maccioni et al., 2001).

#### 1.1.1.3.2. Neuroinflamação

A inflamação é uma resposta biológica que ocorre em vários tipos de tecidos, e é direcionada para evitar lesões adicionais e/ou remoção das áreas danificadas, buscando promover a regeneração tecidual. Quando este tipo de resposta ocorre no SNC, é chamada de neuroinflamação (Heneka et al., 2014).

O processo inflamatório pode ser mediado tanto por células imunes residentes, quanto por células oriundas de infiltrações de vasos sanguíneos (Witte et al., 2010). No SNC as células da microglia atuam como as células residentes, representando a primeira e principal defesa imunológica. A microglia é um tipo de célula glial originada de células mielóides, composta por macrófagos residentes no cérebro e na medula espinhal, com predominante localização na substância cinzenta e apresentando-se em maiores concentrações no hipocampo, gânglios basais e substância negra (Block et al., 2007).

Em condições fisiológicas a microglia é caracterizada por uma morfologia ramificada, e está associada à produção de fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias para a manutenção da homeostase cerebral (Block et al., 2007; Streit, 2002). A microglia é altamente sensível a qualquer perturbação no microambiente neural, como por exemplo, a invasão de algum agente patogênico ou dano tecidual, por causas autoimunes, ou de maneira idiopática e sua ativação ocorre gradualmente. A microglia ativada expressa diferentes moléculas de superfície como CD14, complexo maior de histocompatibilidade (MCH) e receptores de quimiocinas (Cho et al., 2006). A expressão destas moléculas de superfície promove a resposta inflamatória e inicia o reparo tecidual. Na maioria dos casos esta resposta é limitada a reparar danos ou a eliminar os agentes infecciosos. Apesar dos estímulos inflamatórios induzirem efeitos benéficos, como a fagocitose de debris e células apoptóticas, a inflamação descontrolada, com a microglia em estado de persistente ativação, pode resultar na produção de fatores citotóxicos como o  $O_2^{\cdot-}$  (Colton and Gilbert, 1987), NO (Liu et al., 2002; Moss and Bates, 2001) e TNF- $\alpha$  (Lee et al., 1993; Sawada et al., 1989). Além disso, a microglia ativada também tem sido relacionada com comportamento do tipo doentio (*sickness behaviour*), o qual provoca alterações comportamentais tais como fraqueza, apatia, mal-

estar, anorexia, fadiga e alterações cognitivas e do humor (Dantzer et al., 1998; Polazzi and Contestabile, 2002).

Evidências diretas do envolvimento da resposta inflamatória em patologias que cursam com quadros de neurodegeneração como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson são descritas na literatura (Akiyama, 1994) (Hunot and Hirsch, 2003), assim como, no processo natural do envelhecimento e nos quadros depressivos (Glass et al., 2010; Overmyer et al., 1999; von Bernhardt et al., 2015).

Neste sentido, tem sido explorada a descoberta de fármacos e substâncias que previnem e/ou revertem, pelo menos parcialmente, os déficits cognitivos, como por exemplo compostos nootrópicos (Parton et al., 2005).

### **1.1.2. Compostos nootrópicos**

O termo nootrópico foi proposto em 1972 quando a droga piracetam foi utilizada em testes clínicos e apresentou a propriedade de potencializar a cognição (Giurgea, 1972). A descoberta do efeito nootrópico do piracetam ocorreu por acaso e seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Evidências apontam que este composto poderia atuar como um modulador positivo dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA com conseqüente aumento no influxo celular de  $Ca^{2+}$  (Copani et al., 1992; Froestl et al., 2012). O uso do piracetam foi aprovado na Europa nos anos 1970 inicialmente para o tratamento de déficits cognitivos relacionados com o envelhecimento (Gualtieri et al., 2002; Neznamov and Teleshova, 2009).

Neste contexto, a meta análise de dezenove estudos do tipo duplo-cego realizados entre 1972 e 2001 demonstraram que o piracetam teve um efeito benéfico em 60,9% dos indivíduos que apresentavam comprometimentos cognitivos relacionados com a idade quando comparados com os indivíduos que receberam placebo (Waegemans et al., 2002).

Além disso, foi demonstrado que o pramiracetam, um congênere do paramiracetam, aumenta a atividade de NOS em homogenato de cérebros de ratos Wistar tratados com a droga, mecanismo que, por aumentar NO, poderia contribuir com o efeito nootrópico desta classe de fármacos (Corasaniti et al., 1995). O composto nootrópico piracetam e seus congêneres não são aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA).

Dentre os fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de déficits cognitivos, principalmente na doença de Alzheimer, se

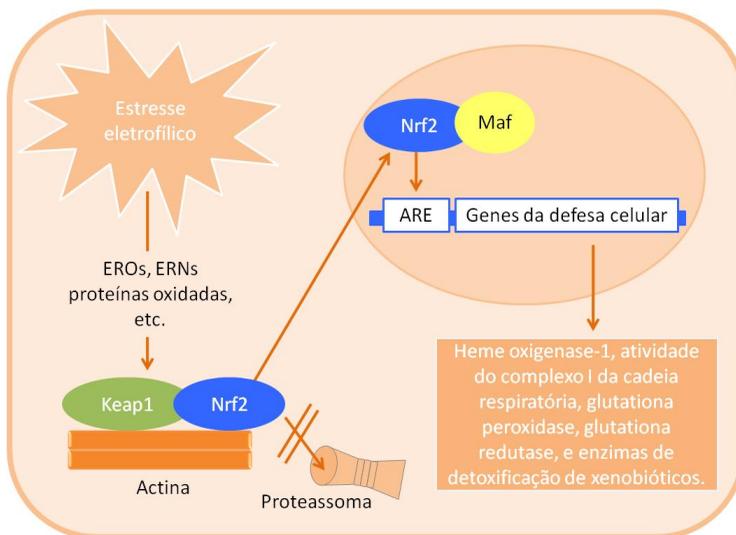
destacam a rivastigmina e a galantamina. Estes fármacos tem seus mecanismos de ação baseados na inibição da acetilcolinesterase, promovendo o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, apresentando assim melhoras cognitivas (Fond et al., 2015).

Em adição, compostos naturais com propriedades antioxidantes, como os flavonóides por exemplo, tem sido amplamente estudados e propostos como nootrópicos. Os mecanismos exatos para a ação desta classe de compostos nos efeitos cognitivos não está completamente elucidada, porém as evidências incluem: (i) modulação de cascatas de sinalização intracelular envolvidas com o controle de sobrevivência, morte e diferenciação neuronal (Mandel et al., 2008); (ii) expressão de genes envolvidos na defesa celular, como o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2); e (iii) interações com a mitocôndria (Mandel et al., 2008; Scapagnini et al., 2011; Schroeter et al., 2007; Schroeter et al., 2001; Vauzour et al., 2007).

O *fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2* (Nrf2) é um fator de transcrição que regula o elemento de resposta antioxidante (ARE), presente nas regiões promotoras de diversos genes (Kobayashi and Yamamoto, 2006; Osburn and Kensler, 2008). A partir da interação do Nrf2 com o ARE, enzimas antioxidantes e de detoxificação de fase 2 - envolvidas no metabolismo de xenobióticos eletrofílicos - são expressas em diferentes tecidos (Nguyen et al., 2003; Zhu et al., 2005). Em condições basais, o Nrf2 encontra-se conjugado com a proteína associada ao citoesqueleto Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que suprime sua atividade, tanto por mantê-lo no citoplasma como por facilitar sua poliubiquitinação, facilitando sua degradação pelo proteossoma. A exposição a diferentes estressores, como por exemplo, estresse eletrofílico, oxida o resíduo cisteína que confere a ligação do complexo Nrf2-Keap1 levando a translocação de Nrf2 para o núcleo, onde o fator de transcrição se dimeriza com um membro da família de proteínas conhecidas como Maf. A ligação deste dímero à sequência ARE resulta na ativação transcricional de uma variedade de enzimas antioxidantes e de proteínas de detoxificação, onde podemos citar a heme oxigenase-I, atividade do complexo I mitocondrial, GPx, e enzimas de detoxificação de xenobióticos (figura 2) (Yirmiya and Goshen, 2010).

A indução de genes dependentes de Nrf2 é demonstrada por ser dependente de NO (Dhakshinamoorthy and Porter, 2004). Neste sentido, recentemente foi observado *in vitro* que macrófagos apresentando deleção da principal enzima de biossíntese do cofator obrigatório para a

NOS, tetrahydrobiopterina, tiveram redução da indução dos genes dependentes de Nrf2 (McNeill et al., 2015).



**Figura 2. Papel do sistema Keap1-Nrf2-ARE na regulação do resposta antioxidante.** Adaptado de Goldring et al., (2006).

## 1.2. TETRAHIDROBIOPTERINA

A BH4 é a forma totalmente reduzida (6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina) e funcional da pterina denominada biopterina (6-(L-eritro-1',2'-diidroxipropil)-2-amino-4-hidroxipteridina).

Biologicamente a BH4 atua como cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado, assim como as etapas limitantes da biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina (Kaufman, 1963). Além disso, a BH4 também atua como cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas da óxido nítrico sintase (Mayer et al., 1990; Werner et al., 1998), sendo essencial para a síntese de NO (Mayer et al., 1990; Tayeh and Marletta, 1989). Ainda, a BH4 está envolvida na clivagem de ésteres lipídicos pela enzima *alquilglicerol monooxigenase* (Thony et al., 2000).

As concentrações intracelulares de BH4 são mantidas através de três vias metabólicas, a biosíntese *de novo*, a via de reciclagem e a via de salvação (Figura 3).

### 1.2.1. Biossíntese *de novo*

A biossíntese *de novo* de BH4 ocorre a partir de guanosina trifosfato (GTP) e requer a participação de três enzimas. Na primeira etapa, o GTP é convertido a dihidroneopterina trifosfato através da GTP ciclohidrolase I (GTPCH). Na etapa seguinte, a 6-piruvoil tetrahydrobiopterina sintase (PTPS) converte a dihidroneopterina trifosfato em 6-piruvoil tetrahydropterina (Thony et al., 2000). O último passo na biossíntese da BH4 envolve a sepiapterina redutase (SR), que converte a 6-piruvoil tetrahydropterina em BH4 (Thony et al., 2000).

A enzima GTPCH representa o passo limitante da biossíntese de BH4 (Levine et al., 1990), e é regulada transcricionalmente por concentrações de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) (Franscini et al., 2003), fator de necrose tumoral alpha (TNF $\alpha$ ) (D'Sa et al., 1996), fator de crescimento do nervo (NGF) (Bauer et al., 2002) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ishii et al., 2005), entre outros. Durante condições de inflamação, a atividade da GTPCH é estimulada podendo aumentar em até 100 vezes, enquanto a PTPS e a SR permanecem em concentrações basais (Kerler et al., 1989, Werner et al., 1990, Werner-Felmayer et al., 1993a). Em consequência, o metabólito intermediário 7,8-dihidroneopterina trifosfato é acumulado e convertido em neopterina, (Chittiprol et al., 2010; Hagberg et al., 2010; Ota et al., 2007).

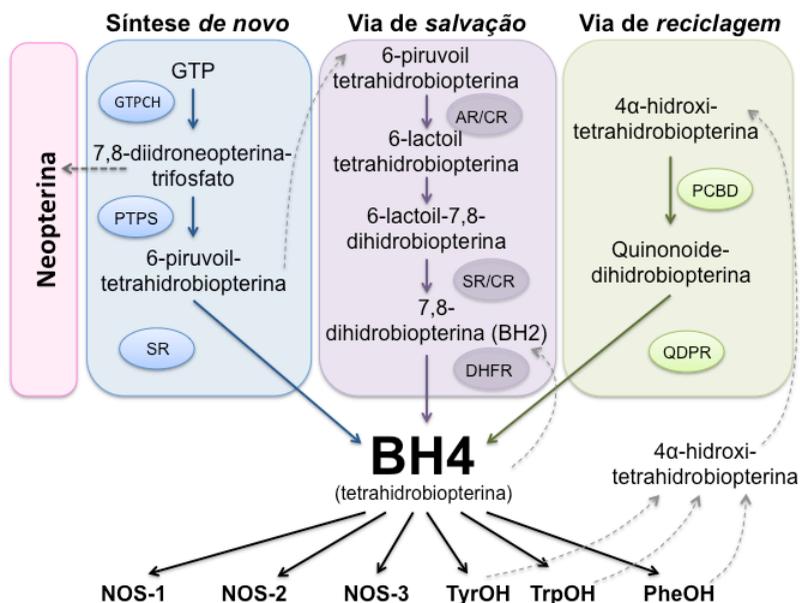
### 1.2.2. Via de reciclagem

A BH4 pode ser produzida também através de uma via de reciclagem, onde a molécula de BH4 cede um par de elétrons para alguns aminoácidos (fenilalanina, tirosina e arginina), e concomitantemente é oxidada em BH2, a qual é reciclada em BH4 a partir da enzima quinonoide dihydrobiopterina redutase (QDPR) e/ou dihydrofolato redutase (DHFR) (esta agindo principalmente no fígado) (Thony et al., 2000; Longo, 2009).

### 1.2.3. Via de salvação

Além disso, a produção de BH4 pode ocorrer através da via de salvação. Nesta via, a 6-piruvoil tetrahydrobiopterina pode ser transformada em intermediários instáveis (1'-hidroxi-2'-oxo

tetrahydropterina ou também chamado de 6-lactoil tetrahydropterina) por um grupo de enzimas inespecíficas denominadas de aldoses / carbonil redutases ou pela sepiapterina redutase, que favorecem i) a formação direta de BH4 ou ii) a formação não enzimática de sepiapterina, e desta em BH2 que será convertida em BH4 pela DHFR (Blau et al., 2001).



**Figura 3. Vias metabólicas (*de novo*, salvação e reciclagem) envolvidas na produção de BH4.** As concentrações de BH4 são mantidas por três vias metabólicas distintas, a via de síntese *de novo*, a via de salvação e a via de reciclagem. GTP: guanosina trifosfato, GTPCH: GTP ciclohrolase, PTPS: 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase, SR: sepiapterina redutase, AR: aldose redutase, CR: carbonil redutase, DHFR: dihidrofolato redutase, PCBD: pterina-4α-carbinolamina desidratase, QDPR: quinonoide-dihydrobiopterina redutase, NOS-1: óxido nítrico sintase neuronal, NOS-2: óxido nítrico sintase induzível, NOS-3: óxido nítrico sintase endotelial, TyrOH: tirosina hidroxilase, TrpOH: triptofano hidroxilase e PheOH: fenilalanina hidroxilase. Adaptado de Costigan et al., (2012).

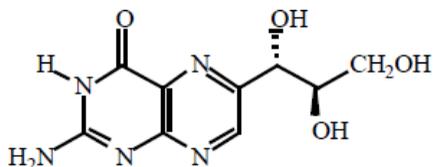
Em condições fisiológicas, o metabolismo da BH4 é minuciosamente controlado para manter o adequado balanço homeostático desta molécula. Algumas doenças multifatoriais de curso

crônico, como por exemplo aterosclerose e o Diabetes Mellitus, apresentam um comprometimento nas concentrações intracelulares de BH4 (Channon, 2004). Além disso, mutações genéticas nas enzimas que participam do metabolismo da BH4, geralmente levam a diminuição na concentração de aminas biogênicas, como por exemplo de serotonina no líquor e, em alguns casos, ao aumento nas concentrações de fenilalanina, síndrome conhecida como hiperfenilalaninemia ou fenilcetonúria (Thony e Blau, 2006). Neste sentido, a deficiência de serotonina, norepinefrina e/ou dopamina e ainda altas concentrações de fenilalanina no cérebro durante o desenvolvimento, podem ocasionar distúrbios cognitivos, como retardo mental (Longo, 2009; Neville et al., 2005) e ainda alterações motoras, como distonia e tremores (Furukawa et al., 1998; Nagatsu and Ichinose, 1996).

Um dos metabólitos secundários da via de síntese de BH4, a neopterina, recentemente também ganhou grande importância nas síndromes psiquiátricas e neurodegenerativas, quando, foi observado que indivíduos acometidos por essas alterações do sistema nervoso central apresentaram concentrações aumentadas de neopterina no líquor e na corrente sanguínea (Chittiprol et al., 2010; Hagberg et al., 2010; Ota et al., 2007).

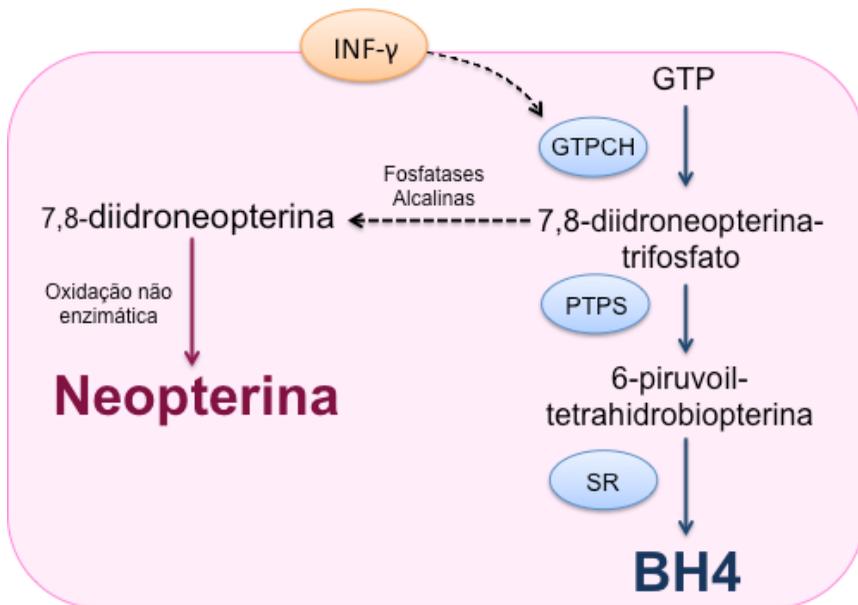
### 1.3. NEOPTERINA

A neopterina, *2-amino-4-hidroxi-6-(D-eritro-1',2'3'-trihidroxi-propil)-pteridina* (figura 4), é uma pteridina gerada durante diversos processos inflamatórios, incluindo os neuroinflamatórios. É produzida principalmente por células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, tendo como fator estimulante mais importante, as citocinas inflamatórias (Franscini et al., 2003). Em indivíduos adultos saudáveis, a concentração basal de neopterina é de  $5,2 \pm 2,5$  nmol/L no plasma ou soro,  $4,5 \pm 1,0$  nmol/L no líquor (Hagberg et al., 1993) e oscila entre 123 e 230  $\mu\text{mol/mol}$  creatinina na urina (Werner et al., 1987). O aumento das concentrações desta pterina nos fluidos biológicos correlaciona-se positivamente com patologias associadas a processos inflamatórios e, por esta razão, atualmente é considerada um marcador sensível da ativação do sistema imune (Fuchs et al., 1989).



**Figura 4.** Estrutura da neopterina (Murr et al., 2002).

Como citado anteriormente (no tópico 1.2.1. Biossíntese *de novo* de BH4), estímulos inflamatórios (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ) provocam o aumento do mRNA que codifica para a GTPCH a qual é expressa na maioria das células e representa o passo limitante na biossíntese *de novo* da BH4. O aumento da atividade de GTPCH repercute no aumento do fluxo da síntese de BH4. No entanto, alguns tipos celulares, principalmente aqueles de linhagem macrocítica, apresentam baixa expressão da enzima PTPS, o que proporciona o acúmulo do metabólito intermediário, 7,8-diidroneopterina trifosfato. Desta forma a atividade da PTPS é a segunda etapa que controla o fluxo da biossíntese da BH4. Em células macrocíticas, o aumento na expressão de GTPCH resulta principalmente na síntese de neopterina através da desfosforilação de 7,8-diidroneopterina trifosfato em 7,8-NH2 por ação de fosfatases alcalinas e a oxidação de 7,8-NH2 em neopterina (Figura 5) (Hagberg et al., 2010).



**Figura 5. Indução da síntese de neopterina.** GTP: guanosina trifosfato; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; GTPCH, GTP ciclohidroxilase; PTPS, 6-piruvil tetrahidrobiopterina sintase. Adaptado de Hagberg et al. (2010).

Por outro lado, a produção de neopterina no SNC não é totalmente conhecida. As concentrações de neopterina encontradas no líquido foram, por muitos anos, associadas aos valores de neopterina circulante no plasma ou no soro (Fuchs et al., 1989). Porém, em condições de traumatismo cranioencefálico grave ou em infecções das meninges cerebrais, as concentrações de neopterina no líquido são mais elevadas em relação as concentrações plasmáticas (Lenzlinger et al., 2001; Yoshida et al., 1999; Azumagawa et al., 2003), indicando a possibilidade de produção local desta pterina. Em concordância, Kuehne e colaboradores (2013) não encontraram correlação entre as concentrações de neopterina no plasma e no líquido de pacientes acometidos por esquizofrenia com função normal da barreira hematoencefálica. Estes achados corroboram com a teoria de que possa haver síntese local de neopterina no SNC (Kuehne et al., 2013).

Em adição, a microglia, um tipo de célula glial originada de células mielóides, localiza-se na substância cinzenta e apresenta maior concentração no hipocampo, gânglios basais e na substância negra. A microglia corresponde em torno de 10% do total das células do SNC e,

por responder a estímulos com IFN- $\gamma$  e expressar NOS de uma maneira semelhante aos macrófagos periféricos (Block et al., 2007), a torna uma candidata para a produção de neopterina.

Da mesma maneira, os astrócitos também respondem a estímulos com IFN- $\gamma$  e podem induzir a expressão de NOS2 em resposta a ativação imune, representando mais uma possível fonte da produção de neopterina. Além disso, considerando que a neopterina é um bioproduto da ativação da biossíntese *de novo* de BH4, células nervosas que produzem aminas biogênicas poderiam, ainda, complementar a síntese de neopterina no SNC. Estas possibilidades estão em concordância com um estudo que demonstrou que regiões do cérebro dependente de BH4 para sintetizar neurotransmissores incluindo, hipocampo, amígdala, substância negra, núcleos da rafe e accumbens, caudado e putâmem de humanos sem histórico de disfunções neurológicas, apresentam concentrações elevadas de neopterina quando comparados com as de biopterina, corroborando com a possibilidade da produção neural desta pteridina (Sawada et al., 1987).

Além disso, recentemente foi demonstrado que após lesão de nervo periférico, a transcrição do gene *Gch1* que codifica a enzima GTPCH, é aumentada tanto em macrófagos quanto em neurônios periféricos lesionados, com consequente aumento da produção local de BH4 e neopterina (Latremoliere et al., 2015).

### **1.3.1. Efeitos biológicos da neopterina**

Atualmente existem mais de 3000 referências no PubMed que mostram as concentrações periféricas de neopterina como um marcador da ativação do sistema imune em diferentes condições inflamatórias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> acessado em 09/09/2015). Entretanto, poucos trabalhos demonstram os efeitos relacionados a esta pteridina (ver tabelas 1 e 2). Os dados existentes são, em algumas vezes, contraditórios e difíceis de relacionar com a fisiologia humana, principalmente porque as concentrações testadas podem ultrapassar até duas mil vezes as concentrações plasmáticas de neopterina da população saudável (Hagberg et al., 1993, Widner et al., 2002, Casal et al., 2003, Kuehne et al., 2013, Hytonen et al., 2014). Em geral, estes estudos mostram que a neopterina e o seu precursor defosforilado 7,8-diidroneopterina (7,8-NH2) induzem efeitos similares *in vitro*, incluindo a translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, produção de ERs, indução da expressão de protooncogenes, apoptose e redução na viabilidade celular em diferentes células, tanto de origem humana quanto animal (tabelas 1 e 2). No

entanto, quando células de origem neural foram expostas a estes metabólitos, a 7,8-NH<sub>2</sub> induziu toxicidade em concentrações que a neopterina induziu proteção, ou então não apresentou efeitos (tabelas 1 e 2). É ainda importante ressaltar que não existem estudos relatando o acúmulo de altas concentrações de 7,8-NH<sub>2</sub> em fluidos biológicos, mesmo em situações onde a via de biossíntese de BH<sub>4</sub> está completamente comprometida por uma deficiência de PTPS e, desta maneira, o acúmulo de 7,8-NH<sub>2</sub> parece não ocorrer *in vivo* (Leuzzi et al., 2010).

Por outro lado o acúmulo de neopterina é relatado no líquido de pacientes de doença de Parkinson e de pacientes com patologias neurológicas crônicas (Dale et al., 2009; Fujishiro et al., 1990). Hoffmann et al. (2003) sugere ainda que a neopterina poderia agir como um modulador bioquímico e de funções biológicas na defesa do hospedeiro. A neopterina promoveria a produção de estresse oxidativo, com amplificação dos efeitos citotóxicos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contra o patógeno invasor (Dale et al., 2009; Hoffmann et al., 2003). Neste contexto, tem sido demonstrada uma estreita correlação entre as concentrações de neopterina liberada pelas células do sistema imune e a produção de ERs (Nathan, 1986; Weiss et al., 1993).

Tabela 1

**Efeitos extracelulares da neopterina *in vitro***

| <b>Espécie</b>                              | <b>Tipo celular</b>                               | <b>Tratamento</b>   | <b>Efeitos</b>   |
|---|---|---|--|
| Roedores                                    | Células do músculo liso vascular                  | 20 $\mu$ M;<br>2 horas  | Aumento da expressão do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e da oxido nítrico sintase induzível (NOS2). (Hoffmann et al., 1996). |
|   | Linhagem celular de epitélio alveolar             | 1 - 1000 $\mu$ M;<br>24 horas   | Indução de apoptose (Schobersberger et al., 1996).   |
|   |   | 1 - 1000 $\mu$ M;<br>6 - 24 horas   | Aumento da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (Hoffmann et al., 1999).  |
|   |   | 1 - 1000 $\mu$ M;<br>1 hora   | Aumento da expressão de NF- $\kappa$ B (Hoffmann et al., 1999).  |
|   |   | 100 nM;<br>10 min   | Inibição da liberação de cálcio induzida por ATP. (Hoffmann et al., 2002).   |
| Linhagem celular de fibroblasto embrionário | 400 nM;<br>18 horas                               | Indução da expressão do gene <i>c-fos</i> em presença de cGMP (Uberall et al., 1994). |  |
| Humanos                                     | Linhagem celular de monócitos THP-1               | 1 $\mu$ M;<br>1 min   | Aumento nas concentrações intracelulares de Ca <sup>2+</sup> (Woll et al., 1993).  |
|   | Células endoteliais da artéria coronária          | 10 - 100 nM;<br>30 min  | Aumento da expressão de NF- $\kappa$ B (Cirillo et al., 2006).   |
|   | Cultura primária de neutrófilos                   | 400 $\mu$ M;<br>3 min   | Inibição da liberação de oxigênio singlete induzida por zimosan opsonizado (Mori et al., 2010).                                      |
|   | Linhagem celular derivada de linfoma histiocítico | 0,5 - 1000 $\mu$ M;<br>24 horas   | Indução de morte celular programada (Baier-Bitterlich et al., 1995).   |
|   | Astrogloma U373MG                                 | 1 mM;<br>2 ou 5 dias  | Neopterina não alterou a morfologia e a proliferação celular (Speth et al., 2000).   |
|   | Microglia CHME                                    | 0,1 - 1 mM;<br>5 dias   | Neopterina não alterou a proliferação celular (Speth et al., 2000).  |
|   | Neural SK-N-SH                                    | 0,1 - 1 mM;<br>5 dias   | Neopterina não alterou a proliferação celular (Speth et al., 2000).  |

**Tabela 1.** Compilação dos efeitos extracelulares da neopterina *in vitro*.

Tabela 2

| <b>Comparação dos efeitos extracelulares de neopterina (NEO) e 7,8-diidroneopterina (7,8-NH2) <i>in vitro</i></b>   |            |                |
|---|------------|----------------|
| <b>Efeito induzido pela pterina</b>   | <b>NEO</b> | <b>7,8-NH2</b> |
| Apoptose em bactérias (200 µM; 24 h) (Weiss et al., 1993).  | +          | -              |
| Apoptose em alvéolo epitelial de rato (200µ M; 24h) (Schobersberger et al., 1996).  | +          | +              |
| Apoptose em células de feocromocitoma (PC12) (5 e 1mM; 48 h) (Enzinger et al., 2002).   | -          | +              |
| Comprometimento da viabilidade celular e alterações morfológicas em células astrocitárias (U373MG), microglial (CHME) e neurais (SK-N-SH) (0,1 to 5 mM; 5 dias) (Speth et al., 2000).           | -          | +              |
| Indução de genes relacionados com o crescimento celular em fibroblastos (NIH3T3) (NEO ou 7,8-NH2 400 nM em combinação com monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) 20 µM) (Uberall et al., 1994) | +          | +              |

**Tabela 2.** Comparação dos efeitos extracelulares da neopterina e do seu precursor defosforilado 7,8-dihidroneopterina (7,8-NH2) *in vitro*.

## **2. HIPÓTESE**

Com base nos achados bibliográficos aqui expostos, hipotetizamos que as células do SNC teriam a capacidade de sintetizar e liberar neopterina. Além disso, propomos que a neopterina além de ser um marcador da ativação do sistema imune, em concentrações adequadas possua propriedades citoprotetoras através ativação de Nrf2 por estresse eletrofilico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e o efeito da neopterina sobre o aprendizado e memória e sobre parâmetros de citoproteção, com o intuito de melhor entender seu possível papel de potencializador cognitivo.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.2.1. Objetivos específicos relacionados com estudos *in vivo*

- a) Investigar o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de neopterina em camundongos Suíços machos adultos sobre a memória no teste comportamental de esQUIVA inibitória e sobre parâmetros de locomoção no teste do campo aberto;
- b) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina em Ratos Wistar sobre a formação da memória através do teste comportamental da esQUIVA inibitória e na formação de LTP e sobre o comportamento ansiolítico através do teste comportamental do labirinto em cruz elevado;
- c) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina em animais nocautes para IL-10 (IL-10<sup>(-/-)</sup>) e camundongos C57BL/6 administrados com o indutor inflamatório lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), intraperitonealmente (i.p.) sobre a memória no teste comportamental de esQUIVA inibitória; e sobre parâmetros de locomoção no teste do campo aberto;
- d) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina em camundongos C57BL/6 sobre a locomoção espontânea induzida pela administração de anfetamina no teste do campo aberto;
- e) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina sobre o teste comportamental do medo condicionado em camundongos C57Bl/6 e em animais geneticamente modificados (camundongos VGV) que possuem o receptor 2C de serotonina completamente editado;
- f) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina em camundongos Suíços machos adultos em um modelo de amnésia induzida pela administração de escopolamina (i.p.) sobre a memória no teste comportamental da esQUIVA inibitória;
- g) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterina em camundongos Suíços machos adultos sobre parâmetros de estresse oxidativo através da mensuração de grupamentos tiólicos livres (NPSH), substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBA-RS), atividades da glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) e concentrações de glutatona reduzida (GSH);

h) Investigar o efeito da administração i.c.v. de neopterinina em camundongos IL-10<sup>(-/-)</sup> e camundongos C57BL/6 administrados com LPS (i.p.) sobre as concentrações cerebrais das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6;

i) Investigar o efeito da administração de LPS (i.p.) em camundongos C57BL/6 sobre a expressão gênica cerebral das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e das enzimas *GCHI* e *SPR* envolvidas na síntese *de novo* da BH4.

### 3.2.2. Objetivos específicos relacionados com estudos *in vitro*

a) Investigar a produção e liberação de neopterinina em fatias hipocâmpais de camundongos Suíços expostas à azida sódica e em culturas primárias de células nervosas humanas expostas aos indutores inflamatórios IFN- $\gamma$  e LPS;

b) Investigar o efeito de concentrações crescentes de neopterinina (0 - 5 $\mu$ M), bem como da coincubação de neopterinina com azida sódica e/ou peróxido de hidrogênio sobre os parâmetros de viabilidade celular, liberação de lactato, conteúdo proteico de heme oxigenase-1 e produção de espécies reativas em culturas de células gliais C6 e culturas primárias de astrócitos estriatais de rato Wistar;

c) Investigar o efeito da incubação de neopterinina em células C6 sobre o conteúdo de Nrf2;

d) Investigar o efeito da incubação de neopterinina em culturas primárias de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar sobre as concentrações intracelulares de Ca<sup>2+</sup>;

e) Investigar o efeito da incubação de neopterinina em culturas primárias de neurônios dos gânglios da raiz dorsal de camundongos C57BL/6 sobre a malha mitocondrial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 4.1.1. Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* os seguintes animais foram empregados:

- Camundongos Suíços, machos adultos de 60 dias de vida (45-50g), obtidos do Biotério Central da UFSC, Florianópolis, Brasil.
- Ratos Wistar, machos adultos de 60 dias de vida (190-260g), obtidos do Biotério Central da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Camundongos C57BL/6 e nocautes para IL-10 (IL-10<sup>(-/-)</sup>) obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC.
- Camundongos C57BL/6, machos adultos de 60 dias de vida (20-25g), obtidos do Biotério Central do Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Hospital Pitié Salpêtrière, Paris, França, assim como de uma colônia de expansão (3ª geração, irmão/irmã) mantida pelo Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.
- Camundongos VGV (expressam a isoforma totalmente editada do receptor 2C de serotonina; background C57BL/6), machos adultos de 60 dias de vida (15-20g), obtidos do Biotério Central do INSERM, Hospital Pitié Salpêtrière, Paris, França.

Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, a  $24 \pm 1$  °C, com acesso livre à água e ração. Cabe salientar que durante todos os procedimentos foram seguidos os princípios básicos do uso de animais em toxicologia (adotados pela Sociedade de Toxicologia em Julho de 1989), minimizando o número de animais bem como seu sofrimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA N° PP00425).

#### **4.1.2. Administração intracerebroventricular (i.c.v) de neopterinina**

Camundongos Suíços machos, camundongos C57BL/6, camundongos nocautes para IL-10<sup>(-/-)</sup> e animais VGV receberam veículo ou neopterinina i.c.v. nas doses de 0,4 ou 4 pmol através de injeções transcraniais com base nas coordenadas relativas de acordo com o atlas de Paxinos (Paxinos and Franklin, 2001).

Ratos Wistar foram canulados estereotáxicamente para implantação de cânula no ventrículo lateral esquerdo para administração de neopterinina 4 pmol. O posicionamento da cânula no ventrículo lateral foi realizado através do uso de coordenadas relativas ao bregma (anteroposterior = -0,8 mm, latero-lateral = +/-1,5 mm, dorsoventral = -4,0 mm) (Paxinos and Watson, 1982). A cânula foi fixada ao crânio com cimento acrílico dental. Após a cirurgia os animais se recuperaram por 7 dias antes da realização dos experimentos.

As doses de 0,4 e 4 pmol de neopterinina utilizadas neste trabalho foram baseadas na concentração final que aproximadamente se atingiria no líquido cefalorraquidiano de 15 e 150 nM, no momento da administração da mesma. Nos experimentos em ratos Wistar, somente a dose de 4 pmol foi testada, pois estes animais tem o volume de líquido 10 vezes maior que os camundongos.

Para preparação das soluções de neopterinina (Sigma) nas concentrações desejadas, a droga foi diluída em líquido artificial (aCSF) constituído por NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O) 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM e de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,27 mM. Os animais do grupo controle receberam aCSF.

#### **4.1.3. Administração intraperitoneal de LPS**

Os animais receberam administração intraperitoneal (i.p.) de salina ou de lipopolissacarídeo bacteriano (*Escherichia coli* LPS; 0,33 mg/kg; sorotipo 0127:B8). A dose utilizada foi de acordo com Henry et al. (2009).

#### **4.1.4. Parâmetros comportamentais**

As avaliações comportamentais referentes ao teste de campo aberto e teste da esQUIVA inibitória foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC, sob coordenação do Prof. Rui Daniel S. Prediger.

As avaliações comportamentais referentes ao teste da esQUIVA inibitória e labirinto elevado em cruz em ratos Wistar foram realizados em colaboração com o Departamento de Farmacologia da Universidade

Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, sob coordenação da professora Dra. Mariela Pérez.

As avaliações comportamentais referentes ao teste do medo condicionado e o desafio locomotor farmacológico induzido pela D-anfetamina foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Physiopathologie des Troubles de l'Humeur et de l'Addiction, localizado no Centro de Pesquisa em Psiquiatria e Neurociências na Université Paris Descartes, Hospital Pitié-Salpêtrière, em Paris, França, sob coordenação da professora Dra. Laurence Lanfumey.

#### **4.1.4.1. Teste do campo aberto**

Para avaliar alterações locomotoras induzidas pelos diferentes tratamentos utilizados os animais foram avaliados por 5 minutos na arena do campo aberto seguindo o protocolo descrito por Hall and Ballachey (1932). O teste foi gravado e a distância total percorrida foi analisada posteriormente através do software ANY-maze™ software (Stoelting Inc., Wood Dale, IL, USA).

#### **4.1.4.2. Teste da esQUIVA inibitória**

A memória aversiva pode ser avaliada através do modelo de esQUIVA inibitória. Nesta tarefa o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esQUIVA ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorá-la. Este aprendizado envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual.

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico (camundongos: 30 x 20 x 20 cm; ratos: 50 x 25 x 25 cm) contendo uma base condutora de energia (grade com barras de bronze com 1mm de diâmetro e espaçamento de 1cm entre elas) e uma plataforma em acrílico (camundongos: 10 cm<sup>2</sup> de superfície e 2 cm de altura localizada no centro do assoalho; ratos: 7 x 25 cm de superfície e 2,5 cm de altura localizada no lado esquerdo do assoalho). O animal foi posto sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrado. Na sessão de treino, após o teste de campo aberto no momento que o animal desce sobre a grade o animal é estimulado com um leve choque nas patas (0.3 mA) durante 2,0 segundos. Cada animal foi testado 1,5 e 24 horas após o treino para avaliação de memória de curta e de longa duração (STM e LTM, respectivamente), realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo também cronometrado o tempo que o animal demora

em descer da plataforma. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior que o observado quando desce da plataforma pela primeira vez (Roesler et al., 1999).

#### **4.1.4.3. Teste do labirinto em cruz elevado**

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar o comportamento ansiolítico dos animais. O aparato consiste de um labirinto de madeira recoberto por fórmica preta composto de dois braços abertos (50 x 10 cm) unidos a dois braços fechados com paredes forradas de preto, elevados a 50 cm do solo por um suporte de madeira. O animal é colocado no centro do aparato voltado para um dos braços fechados sendo permitido explorar livremente o aparato durante 5 minutos. O número de entradas e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos foi analisado (Pellow et al., 1985).

#### **4.1.4.4. Teste do medo condicionado**

O medo condicionado foi avaliado através de três dias consecutivos de testes comportamentais realizados em uma câmara operante (26 x 18 x 22 cm) com paredes laterais de alumínio, paredes anterior e posterior de acrílico, e um piso com grade de aço inoxidável (MED Associates, St Albans, VT). No primeiro dia, todos os animais (camundongos C57BL/6 ou VGV) foram colocados individualmente na câmara de condicionamento contendo odor de baunilha e permaneceram ambientando durante 3 minutos. Em seguida, um som (estímulo condicionado; CS - do inglês, conditioned stimulus) de 2500 Hz de frequência e intensidade de 85 dB apresentado por 30 segundos e seguido de um choque de 0,75 mA por 2 segundos (estímulo não-condicionado; US - do inglês, unconditioned stimulus). Logo após, um intervalo inter-trial (ITI - do inglês, inter trial interval) se estendeu por 2 minutos. O ciclo de CS-US-ITI repetiu-se por seis vezes. Vinte e quatro horas após (segundo dia), o condicionamento do medo contextual foi avaliado. Os animais retornaram para a mesma câmara onde ocorreu o condicionamento permitindo-se a exploração do ambiente durante 20 minutos, sem apresentação de CS ou US. No terceiro dia, a memória do medo condicionado foi avaliada. Os animais retornaram para a câmara após alteração do contexto (nenhum odor à baunilha, adição de papel quadriculado nas paredes posterior e anterior, bem como alteração do padrão de luz dentro da câmara). Nesta última etapa, apenas o CS foi apresentado 40 vezes separados por um ITI de 2 segundos. Todas as sessões foram gravadas usando câmeras infravermelhas e controladas

por interface de um sistema informatizado (MED Associates, St Albans, VT). O comportamento de congelamento (do inglês, *freezing*), definido como ausência completa de movimentos voluntários, exceto para a respiração, foi medido manualmente a cada 2 segundos e expresso através da percentagem de tempo em que o animal permaneceu em congelamento. A neoptertina (0,4 pmol i.c.v.) foi administrada 30 minutos após o condicionamento.

#### **4.1.4.5. Desafio locomotor farmacológico induzido pela D-anfetamina**

A medida de locomoção também foi analisada sobre a hiperlocomoção causada pela administração de D-anfetamina (Sigma; 3 mg/kg; intraperitoneal). Os animais foram avaliados em arena quadrada 10 minutos antes da administração de anfetamina e 180 minutos após a injeção da mesma (50 x 50 x 50 cm, Viewpoint Life Sciences Inc., Lyon, França). O teste foi gravado e a distância total percorrida foi analisada posteriormente através do software ANY-maze™ software (Stoelting Inc., Wood Dale, IL, USA).

#### **4.1.5. Parâmetros de eletrofisiologia**

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

Para as análises eletrofisiológicas, ratos Wistar machos adultos foram eutanasiados 24 horas após a administração *in vivo* de neoptertina (4 pmol; i.c.v.) e fatias hipocâmpais (400 µm) foram colocadas em uma câmara de registro (BSC - BU Harvard Apparatus), perfundidas com tampão Krebs (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glicose 10 mM e CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM) saturado com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>. A taxa de perfusão foi de 1,6 mL/minuto enquanto que a temperatura da solução do banho foi mantida a 28°C por um regulador de temperatura (TC - 202A Harvard Apparatus). Potenciais pós-sinápticos excitatórios (*fEPSPs* - do inglês, *field excitatory postsynaptic potentials*) foram evocados com um eletrodo estimulante introduzido na via perfurante (*PP* - do inglês, *perforant pathway*) e um eletrodo de registro inserido na camada de células granulares do corpo denteado. Somente fatias que mostraram uma resposta estável foram incluídas. Os *fEPSPs* que responderam a pulsos de 0,2 Hz (0,5 ms, 10 mA cada) foram amostrados a cada 5 minutos durante um período de 20-30 minutos (*baseline*). Uma vez que não

foram observadas alterações na amplitude dos *fEPSPs*, o protocolo de estimulação foi aplicado para determinar a frequência geradora de LTP. O protocolo de estimulação consistiu em um trem de pulsos (0,5 ms, 10 mA cada) de 2 segundos de duração (tétano), com aumento de frequência variável (5-200 Hz), que foi entregue a *PP* por um gerador de pulso A310 Accupulser (World Precision Instruments Inc. , EUA). Após o tétano, um novo *fEPSP* médio foi registrado a 0,2 Hz e quando a formação de LTP não foi observada, uma nova estimulação com frequência mais elevada foi aplicada. A LTP foi considerada existente quando a amplitude do *fEPSP* aumentou em pelo menos 30 %, quando comparada ao *fEPSP* basal, e persistiu durante 60 minutos. Uma vez formada a LTP, nenhum outro tétano foi aplicado. Para cada animal, uma segunda fatia hipocampal foi avaliada para confirmar o limiar de geração de LTP através da aplicação do tétano na mesma frequência em que a LTP foi induzida anteriormente. Não foram observadas diferenças na geração de LTP entre fatias.

#### **4.1.6. Parâmetros bioquímicos**

Para a mensuração das medidas de estresse oxidativo, o cérebro foi homogeneizado em dez volumes de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo cloreto de potássio 140 mM. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e acondicionado em eppendorfs, armazenado e utilizado para análises referentes a estresse oxidativo (Latini et al., 2007).

Para a mensuração das citocinas inflamatórias no momento da eutanásia o cérebro foi dissecado e um hemisfério foi armazenado em eppendorffs a -80°C até o dia da análise. No dia das determinações, a estrutura foi homogeneizada em cinco volumes de tampão Tris 10 mM contendo 1mM ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), Triton 1%, inibidores de protease aprotinina 1µ / mL, quimostatina 1µ / mL e leupeptina 1 µ / mL e 1 µ / mL de fenil metil sulfonil fluoride. Após a homogeneização a amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi separado para a quantificação de citocinas.

##### **4.1.6.1. Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

A concentração tecidual de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi determinado pelo método de Ohkawa (1979). O malondialdeído é o produto final da peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando complexos coloridos.

Alíquotas de homogenatos teciduais foram incubadas, a temperatura de 100°C por 40 minutos, em tampão ácido acético 1,4M, pH 3.5, contendo dodecil sulfato de sódio 0,45% e TBA 0,6%. Posteriormente, o pigmento formado foi extraído com butanol e lido espectrofotometricamente à 540 nm. Os resultados foram expressos em nmol / mg proteína.

#### **4.1.6.2. Determinação das atividades da glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)**

A atividade da enzima GPx foi determinada de acordo com Wendel (1981) utilizando *tert*-butila como substrato da enzima. A atividade da enzima GR foi determinada de acordo com Carlberg e Mannervik (1985). A oxidação de NADPH para NADP<sup>+</sup> foi monitorado por 5 min à 340 nm. As atividades enzimáticas foram expressas como U / mg proteína.

#### **4.1.6.3. Determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)**

As concentrações teciduais de GSH foram medidas através de ensaio fluorimétrico conforme previamente descrito por Hissin e colaboradores (1976), empregando o-ptaldialdeído como derivatizante. O conteúdo de GSH foi calculado utilizando uma curva padrão de GSH e a concentração foi expressa em µmol de GSH / mg proteína.

#### **4.1.6.4. Determinação do conteúdo de tióis livres (NPSH)**

O conteúdo de NPSH, cujas concentrações são representadas principalmente pela GSH (cerca de 90%), foi determinado usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (Ellman, 1959). Uma fração do sobrenadante foi tratada com igual volume de TCA 10%. Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em tampão fosfato de sódio 800 mM. A absorvância foi determinada em 412 nm. Os resultados foram expressos em mmol / mg de proteína.

#### **4.1.6.5. Determinação da concentração de citocinas por imunoensaio enzimático**

A mensuração das citocinas IL-1β e IL-6 foram realizadas por imunoensaio enzimático usando kit comercial (R&D System®).

#### **4.1.7. Parâmetros moleculares**

A determinação da expressão gênica da IL-1 $\beta$ , IL-6, GTPCH e SR por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa foi determinado em tempo real (RT-PCR).

O RNA total foi isolado a partir de córtex cerebral, estriado e hipocampo de camundongos C57BL-6 após 4 horas da administração do LPS, seguindo as instruções indicadas pelo fabricante do produto TRI Reagent (Sigma). A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260 nm e a 280 nm. O cDNA foi construído a partir de 1  $\mu$ g de RNA, utilizando-se o kit “M-MLV Reverse Transcriptase” (Sigma). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo o tampão da enzima M-MLV transcriptase reversa, 0,1 M DTT, RNase OUT, OligodT, 10 mM dNTP e a enzima M-MLV transcriptase reversa (e quantidade de água suficiente para completar 20  $\mu$ L). Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 4°C por 10 minutos, seguindo as instruções do manual do produto e descrito previamente (Jiang et al., 2006). A reação foi realizada utilizando o kit “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), contendo cerca de 10-100 ng de cDNA, em um volume final de 15  $\mu$ L e na presença de 0,3  $\mu$ M de primers dos tipos forward ou reverse. Foram utilizados primers específicos, conforme descritos na tabela a seguir:

| Gene alvo    |         | Sequência do primer (5' $\rightarrow$ 3') |
|--------------|---------|---|
| IL-1 $\beta$ | Forward | GCCCATCCTCTGTGACTCAT                      |
|              | Reverse | AGGCCACAGGTATTTTGTCG                      |
| IL-6         | Forward | AGTTGCCTTCTTGGGACTGA                      |
|              | Reverse | TCCACGATTTCCAGAGAAC                       |
| Gch1         | Forward | TGCTTACTCGTCCATTCTGC                      |
|              | Reverse | CCTTACAATCACCATCTCG                       |
| SR           | Forward | AAAGGCTTCCTCAACGTGAA                      |
|              | Reverse | CAGGGCACACAGAGATGAGA                      |

**Tabela 3.** Sequência de primers utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real

Os primers utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” disponível em <http://blast.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína.

Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems versão 2.4. Os dados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina, empregado como padrão (housekeeping gene). Os dados foram expressos em conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

#### **4.1.8. Dosagem de proteína**

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

### **4.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO***

Para realização dos experimentos *in vitro* foram utilizados cultivos primários de células do sistema nervoso central (neurônios, astrócitos e microglia), células C6 com características astrogliais e culturas de astrócitos primários de córtex ou de hipocampo de ratos neonatos.

#### **4.2.1. Cultivos primários de células do sistema nervoso central**

Os cultivos humanos primários foram realizados a partir de tecido cerebral humano proveniente de fetos doados por clínicas de aborto, prática essa, legal na Austrália. O tecido foi recebido logo após o procedimento abortivo. O SNC foi dissecado e cultivado conforme um protocolo desenvolvido no Laboratório de Neuroinflamação, coordenado pelo Prof. Gilles Guillemin na University of New South Wales (UNSW, Austrália). Nesta instituição foi realizado um estágio doutoral (Doutorado Sanduíche) no período fevereiro a outubro de 2012.

Os cérebros fetais humanos incluídos neste estudo foram obtidos de fetos abortados entre a 14<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semana de gestação coletados após aborto espontâneo ou terminação terapêutica, seguida de consentimento informado. Brevemente, porções cerebrais foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), e homogeneizadas mediante o uso de uma malha de nylon de 100 $\mu$ m. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e o concentrado da mistura de células cerebrais foi utilizado para a preparação dos cultivos conforme descrito abaixo:

Os astrócitos foram preparados da mistura de células cerebrais utilizando o protocolo previamente descrito por Guillemin et al. (2001). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina, 0,5% de glicose e 1% de penicilina/

estreptomicina. O meio foi trocado duas vezes por semana e quando confluentes as células foram tratadas com 0.05 % de tripsina em EDTA e semeadas em placas de 24 poços ( $10 \times 10^5$  células / poço), 24 horas antes da realização de cada experimento.

As culturas neuronais foram preparadas da mistura total de células cerebrais. As células foram plaqueadas diretamente nas placas de 24 poços previamente revestidas com Matrigel (1/20 em meio neurobasal) e mantidas em meio Neurobasal suplementado com 1% de suplemento B-27, 1% de glutamina, e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas neuronais foram mantidas por até 4 semanas e o meio de cultura substituído uma vez por semana (Guillemin et al., 2007).

A microglia foi preparada a partir da mistura de células neuronais, a qual foi agitada a 220 rpm por 2 horas, as células não-aderidas foram centrifugadas e transferidas para lâminas Permax na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL e cultivadas em DMEM contendo 10% de soro fetal de bovino, 1% de glutamina, 0,5% de glicose, e 1% de penicilina/estreptomicina (Guillemin et al., 2005).

As culturas de ambos os tipos celulares foram mantidas a 37°C com um mínimo de 95 % de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.2. Manutenção da linhagem celular de astroglioma C6**

A linhagem celular de astroglioma C6 foi obtida de American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, EUA). Estas células adotam características de astrócitos (células 99% GFAP positivas). As células foram semeadas em frascos e cultivadas em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 2,5 mg / mL de Fungizone® e 100 U / L de gentamicina, suplementadas com 5 % (V/V) de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 37°C com um mínimo de 95 % de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram tratadas com 0.05 % de tripsina em EDTA e semeadas em placas de 24 poços ( $10 \times 10^3$  células / poço). Após confluência, o meio foi trocado por DMEM livre de SFB e foram adicionadas diferentes concentrações de neopterina (0 – 5mM).

#### **4.2.3. Cultura primária de astrócitos estriatais e hipocampais**

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de estriados ou hipocampos de ratos de 1 – 2 dias de idade, de acordo com Cassina et al., (2008; 2005). Os astrócitos foram plaqueados ( $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) e mantidos em DMEM suplementado com 10% de SFB, HEPES 3 g/L, penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

Depois do enriquecimento, os astrócitos tiveram sua pureza determinada em pelo menos 98%, através de imunoreatividade para GFAP. Os experimentos foram realizados após uma semana de plaqueamento, quando as células atingiram a confluência.

#### **4.2.4. Cultura primária de neurônios dos gânglios da raiz dorsal**

As culturas primárias de neurônios dos gânglios da raiz dorsal foram preparadas a partir de cérebro de camundongos C57BL/6 com sonda GFP fluorescente para o marcador ATF3 (do inglês - *cyclic AMP-dependent transcription factor* – marca neurônios neste tipo de cultura). A metodologia utilizada foi de acordo com Sisignano et al. (2012). Os neurônios foram cultivados em meio de cultura Neurobasal, contendo 2 mM de L- glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, B-27 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas em uma estufa a 37°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.5. Preparação de homogenatos a partir das culturas celulares**

Após a retirada do sobrenadante os poços foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após as lavagens, foram adicionado 400 µL de PBS em cada poço e o conteúdo celular foi levantado e homogeneizado. O homogenato foi acondicionado em tubos eppendorff e armazenado a -20°C até o momento da análise.

#### **4.2.6. Taxa de oxidação da diclorofluoresceína**

O conteúdo de ERs foi mensurada através da taxa de oxidação do composto não-fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este é hidrolisado por esterases intracelulares à diclorofluoresceína (DCFH), que é incorporada pela célula. Esta molécula não fluorescente é oxidada a diclorofluoresceína fluorescente (DCF), por ação de oxidantes presentes na célula. Células C6 e células de cultura primária de astrócitos estriatais expostas à neopterin foram tratadas com DCFH-DA 10µM por 30 minutos a 37°C. Após este tempo, as células foram diluídas em PBS contendo Triton X-100 0,2%. A fluorescência foi mensurada nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485nm e 520nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0,25 - 10 mM) (Vieira de Almeida et al., 2008). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

#### **4.2.7. Mensuração da concentração de lactato**

A formação e liberação de lactato foram mensuradas no sobrenadante das culturas de células, através de analisador específico (YSI 2700 STAT, Yellow Springs, Ohio, USA). Os resultados foram expressos em nmol / L.

#### **4.2.8. Mensuração da concentração de neopterina**

O sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado em eppendorfs a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. No dia da análise, as proteínas foram precipitadas pela adição de igual volume de TCA 5%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a  $14.000 \times g$  por 10 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ , e  $20 \mu\text{L}$  do sobrenadante foi utilizado para as determinações. A mensuração foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se cromatógrafo Waters composto por módulo de separação Waters e2695 e detector fluorescente Multi  $\lambda$  Waters 2475. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa (Tracer® C18, com dimensões de  $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ). A fase móvel foi composta por acetato de sódio ( $50 \text{ nM}$ ), ácido cítrico ( $5 \text{ mM}$ ), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ( $48 \mu\text{M}$ ) e ditioeritritol (DTE) ( $160 \mu\text{M}$ ) com um fluxo de  $0,7 \text{ mL/minuto}$ . A identificação e quantificação de neopterina foram realizadas por fluorescência com comprimento de onda de excitação de  $350 \text{ nm}$  e emissão de  $430 \text{ nm}$ . Os resultados foram expressos em nmol/L (de Lucas et al., 2014).

#### **4.2.9. Análise de proteínas por Western Blot**

O homogenato celular foi preparado em tampão de homogeneização (Tris  $50 \text{ mM}$  pH  $7,0$  contendo EDTA  $1 \text{ mM}$ , NaF  $100 \text{ mM}$ , PMSF  $0,1 \text{ mM}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $2 \text{ mM}$ , Triton X-100 a  $1\%$ , glicerol a  $10\%$  e coquetel inibidor de protease [Sigma]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $10.000 \times g$ , durante  $10 \text{ min}$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris  $100 \text{ mM}$ , pH  $6,8$  contendo EDTA  $4 \text{ mM}$  e SDS a  $8\%$ . Após, as amostras foram aquecidas a  $100^{\circ}\text{C}$  durante  $5 \text{ minutos}$  e o tampão de diluição (Tris  $100 \text{ mM}$ , com  $40\%$  de glicerol e azul de bromofenol, pH  $6,8$ ), numa proporção  $25:100$  (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol (na concentração final de  $8\%$ ), foram adicionados nas amostras.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se gel de separação de acrilamida  $12\%$  e gel de entrada  $4\%$ . A eletroforese foi realizada com corrente fixa de  $30 \text{ mA}$  e voltagem

máxima de 140 mV durante aproximadamente duas horas. Após a corrida os géis foram submetidos à eletrotransferência.

As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45  $\mu\text{m}$ ) em tampão Tris-glicina contendo Tris / HCl 25 mM pH 7,0; glicina 192mM e 20% de metanol, com corrente fixa de 350 mA, por 1 hora. Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% em tampão Tris 10 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM (TBS) e a seguir lavadas com Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (TBS-T). Por fim, as membranas foram incubadas com o anticorpo específico anti-HO-1 (1:3000; Santa Cruz). Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário específico (anti-rabbit, 1:1000) conjugado à peroxidase. Após lavagens com TBS-T, as imunodeteções foram realizadas pelo método de quimioluminescência, seguida da revelação em filme autorradiográfico. As bandas protéicas imunorreativas foram analisadas por densitometria óptica através da utilização do software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

#### **4.2.10. Expressão de Nrf2 por citometria de fluxo**

Após tratadas, as células foram lavadas com PBS, coletadas e resuspendidas em 0,5 mL de PBS com formaldeído na concentração final de 16% para fixação e incubadas por 10 minutos à 37°C. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com saponina 4% (incubação de 30 minutos). As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo primário para Nrf2 (Cell Signaling – anti-rabbit) na diluição de 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente. Nova lavagem com PBS foi realizada e as células foram resuspendidas em solução com o anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo (Invitrogen – anti-rabbit conjugado com aloficocianina (APC)) na diluição de 1:1000 e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. As células foram lavadas e resuspendidas em 0,5 mL de PBS e transferidas para tubos de citometria para análise da intensidade de fluorescência. As amostras foram analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) usando-se o programa CellQuest 2.8 (BD). A análise da porcentagem das diferentes populações marcadas foi realizada usando-se o programa ModFit 3 (Verity Software House). As células controle foram tratadas somente com PBS.

#### 4.2.11. Captação de glutamato

A captação de L-[3H] glutamato foi realizada segundo descrito por Quincozes-Santos et al. (2009) com algumas modificações. As fatias hipocâmpais foram mantidas em um meio contendo tampão Krebs (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glicose 10 mM e CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM) saturado com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> por 30 minutos, antes do tratamento com neoptertina e/ou azida sódica. Após os tratamentos, tanto as fatias hipocâmpais quanto as células C6 foram lavadas com HBSS e em seguida, incubados com HBSS (CaCl<sub>2</sub> 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,65 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM). A captação foi iniciada após a adição de 0,33 µCi/ml de L-[3H] glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100 µM, por 10 minutos. Após esse período o meio foi descartado e as fatias ou células foram lavadas 2 vezes com HBSS gelado. Em seguida, as fatias ou as células foram solubilizadas em uma solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01 % e incubadas overnight. A determinação do conteúdo intracelular de L-[3H] glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

#### 4.2.12. Mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular

Variações nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular foram avaliadas em culturas de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar. O protocolo foi realizado seguindo o protocolo de De Melo Reis et al. (2011) com algumas modificações. As células foram incubadas por 40 minutos com 5 µM de Fura-2/AM (Molecular Probes) diluído com solução de Krebs (132mM NaCl, 4mM KCl, 1,4mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, glicose 6 mM, 10mM HEPES, pH 7.4) contendo 0,1 % de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA) e 0,01 % de ácido plurônico 0,01% em incubadora à 37°C com um mínimo de 95 % de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após estes 40 minutos de incubação, as lâminas contendo as células permaneceram por mais 10 minutos em temperatura ambiente expostas ao meio Krebs para a completa hidrólise da sonda (FURA). Logo após, as lâminas foram montadas em uma câmara especial (RC-20 chamber - Warner Instruments, Hamden, CT) para o posicionamento no microscópio de fluorescência invertida (Eclipse Ti-U; Nikon). As células foram continuamente perfundidas com Krebs e estimuladas com ATP ou neoptertina. As variações nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular foram avaliadas em intervalos de 500 milissegundos e quantificadas individualmente em cada célula pela quantificação da razão entre a fluorescência emitida em 510 e a excitação alternativa em 340 e 380

nm, utilizando um sistema de iluminação Lambda DG4 (Sutter Instrument, Novato, CA), objetiva de 40x e um filtro a 510 nm (Semrock, Rochester, NY), localizado antes da câmara para a aquisição das imagens (Photometrics, Tuscon, AZ). As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o software MetaFluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### **4.2.13. Análise da malha mitocondrial por imunofluorescência**

Após o tratamento com neopterinina (50 nM), as células foram lavadas com PBS e incubadas com a sonda fluorescente MitoTracker® Deep Red por 30 minutos e após fixadas com paraformaldeído 4%, durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, e os antígenos inespecíficos foram bloqueados usando-se uma solução de PBS contendo BSA a 5%.

A seguir foi realizado a marcação nuclear com DAPI, seguida de lavagens com PBS e montagem da lâmina utilizando-se Gel Mount (Sigma). As análises foram realizadas em microscópio confocal de fluorescência.

#### **4.2.14. Análise do número de mitocôndrias por microscopia eletrônica**

As células tratadas com neopterinina (50 nM), após 24 ou 48 horas de incubação, foram tripsinizadas, centrifugadas e fixadas em uma solução contendo 4% de paraformaldeído e 1,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M durante 24 horas. Posteriormente, as células foram submetidas a três lavagens de 30 minutos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, estas amostras foram colocadas em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, e foram novamente lavadas em tampão cacodilato. O material foi posteriormente desidratado em concentrações crescentes de acetona (30; 50; 10; 90 e 2 vezes em 100% durante 20 minutos, a temperatura ambiente) e imerso em solução de acetona e resina Spurr ou araldita, a temperatura ambiente (2:1; 1:1 e 1:2). Finalmente, as peças foram tratadas com resina pura (24 horas em estufa a 58-60°C, para solidificação) para posterior microtomia, a qual foi realizada em ultramicrotomo na espessura de 60 – 70 nm.

A obtenção das imagens foi realizadas em microscópio eletrônico de transmissão.

### **4.3. Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e a média foi usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste *post hoc* de Tukey, quando o valor de  $F$  foi significativo. Somente os valores significantes de  $F$  são mostrados no texto. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

O tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória não obedece a uma distribuição normal. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal foi realizado análise não paramétrica onde são demonstradas as medianas (intervalo interquartis) das latências de descida da plataforma e analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn, através do GraphPad Prism 4® Software Inc. Para comparação dos tempos de latência de descida da sessão treino *versus* o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal foram analisados pelo teste da soma de postos de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste “ $t$ ” pareado. Para as análises envolvendo diferentes tratamentos, como no caso da coadministração de neopterinina e LPS, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias).

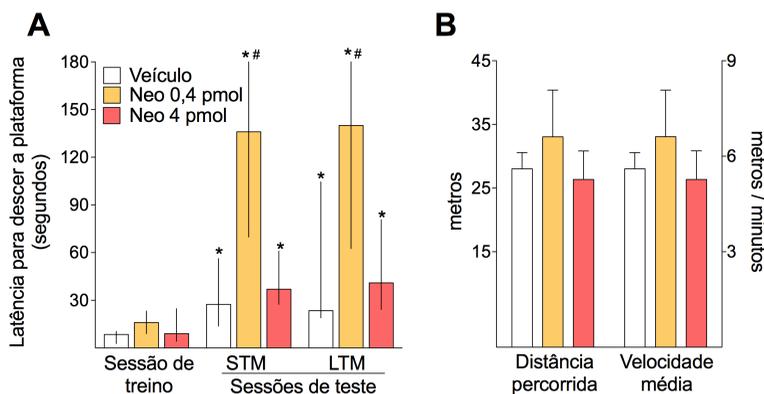
## **5. RESULTADOS**

Para a elaboração desta tese, os resultados foram organizados em duas seções. A primeira seção corresponde aos efeitos *in vivo* da neopterina em diferentes cepas de roedores, enquanto que a segunda seção agrupa os resultados relacionados com a produção e os efeitos *in vitro* da neopterina em diferentes tecidos e células do sistema nervoso central.

## 5.1. SEÇÃO I

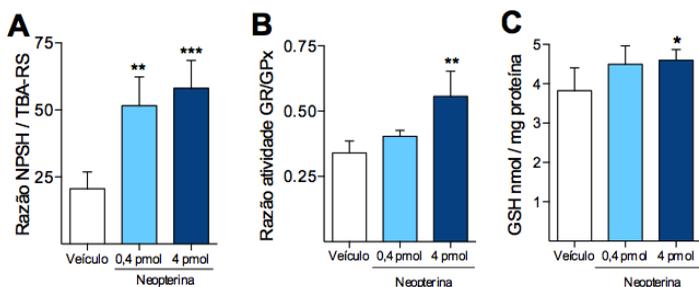
## I - EFEITO DA NEOPTERINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM DIFERENTES CEPAS DE ROEDORES

A Figura 6 mostra o efeito da administração i.c.v. de neopterina sobre as tarefas comportamentais de esquila inibitória e de campo aberto em camundongos Suíços machos de 60 dias de vida. A Figura 6A mostra que a administração de 0,4 pmol de neopterina aumentou significativamente o tempo de latência em descer da plataforma no teste da esquila inibitória. Esta diferença foi observada após 1,5h (memória de curto prazo; STM) e 24 h (memória de longo prazo; LTM) da administração da neopterina (STM = [H(2, N=30)= 9,83;  $P < 0,05$ ]; LTM = [H(2, N=30)= 8,79;  $P < 0,05$ ]). A dose de 4 pmol não provocou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle. A Figura 6B mostra que a administração de neopterina não modificou a atividade locomotora espontânea dos animais, medida através da distância percorrida e da velocidade média, no teste de campo aberto.



**Figura 6.** Efeito da administração única e intracerebroventricular de neopterina (Neo; 0,4 e 4 pmol) sobre a memória aversiva (A) e locomoção espontânea (B) em camundongos Suíços machos de 60 dias de vida. As barras representam o tempo de latência para descer da plataforma após 1,5 h (memória de curto prazo; STM) e 24 h (memória de longo prazo; LTM) da sessão de treino (A). A locomoção espontânea foi medida através dos parâmetros de distância total percorrida e velocidade média (B). Os dados representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil (A) ou média  $\pm$  erro padrão da média (B). \* $P < 0,05$ , vs. treino; # $P < 0,05$ , vs. veículo (Kruskal-Wallis seguido de Dunn como teste *post hoc*).

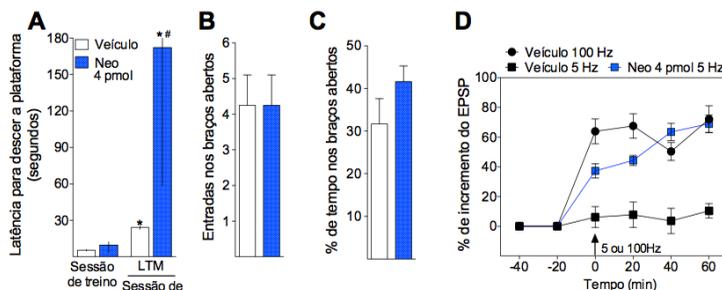
As Figuras 7A-C mostram o efeito da injeção i.v.c. de neoptertina (0,4 e 4 pmol) sobre a resistência tecidual ao estresse oxidativo em córtex cerebral de camundongos Suíços machos de 60 dias de vida. A resistência tecidual ao estresse oxidativo foi calculada como a razão entre o conteúdo de tióis livres (medida do NPSH) e a peroxidação lipídica (medida do TBA-RS), e com a razão entre as atividades da GR e GPx. Pode ser observado na Figura 7A que a administração de neoptertina provocou uma redução significativa do estresse oxidativo tecidual avaliado através da razão NPSH/TBA-RS, sendo este efeito dependente da dose administrada [ $F_{(2,11)} = 23,19$ ;  $P < 0,001$ ;  $\beta = 0,66$ ;  $P < 0,01$ ]. A Figura 7B mostra que a dose de 4 pmol de neoptertina também aumentou a relação GR/GPx [ $F_{(2,6)} = 9,41$ ;  $P < 0,05$ ] em córtex cerebral. Adicionalmente, a Figura 7C mostra que as concentrações de GSH também se encontraram significativamente aumentadas em córtex cerebral de camundongos Suíços de 60 dias de vida [ $F_{(2,14)} = 4,69$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 7.** Efeito da administração de neoptertina (Neo 0,4 e 4 pmol; intracerebroventricular) sobre a resistência tecidual ao estresse oxidativo em córtex cerebral de camundongos Suíços adultos de 60 dias de vida. A resistência tecidual ao estresse oxidativo foi estimada como a razão entre o conteúdo de tióis livres (NPSH) vs. a peroxidação lipídica (TBA-RS) (A), a razão entre as atividades de GR/GPx (B), e como a concentração de glutatona (GSH) (C). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. veículo (ANOVA de uma via seguido de Tukey como teste *post hoc*).

A Figura 8 mostra o efeito da administração i.c.v. de neoptertina (4 pmol) em ratos Wistar machos de 60 dias de vida sobre as tarefas comportamentais de esquiva inibitória, labirinto elevado em cruz e parâmetros de eletrofisiologia. A Figura 8A mostra que a dose de 4 pmol de neoptertina facilitou significativamente a retenção da memória

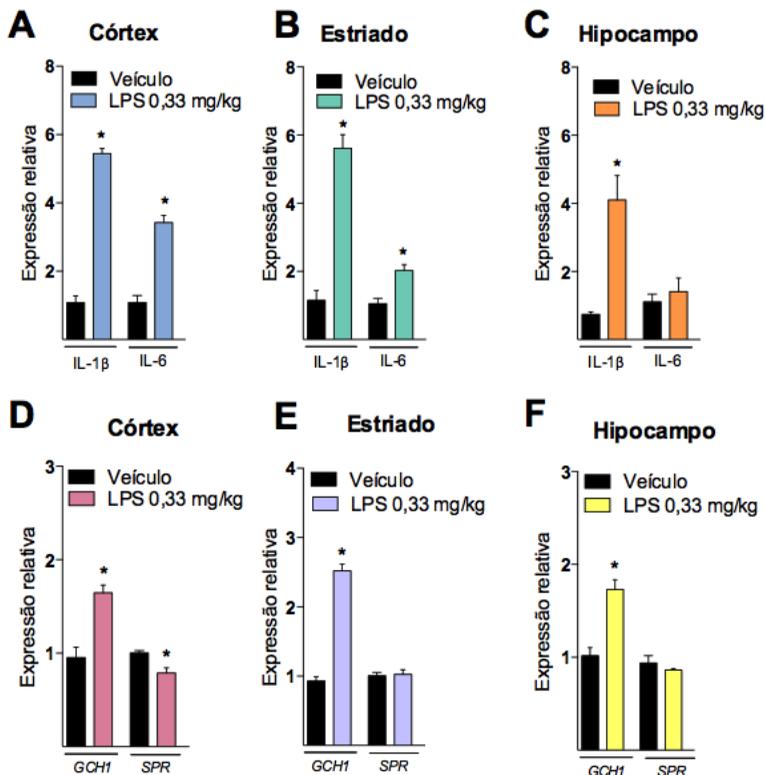
de longo prazo (24h; LTM) no teste da esQUIVA inibitória [ $F_{(3,14)} = 12,09$ ;  $P < 0,05$ ]. As Figuras 8B e C mostram que a administração de 4 pmol de neopterina não provocou efeitos ansiogênicos visto que não houve diferenças significativas no número de vezes que o animal entrou nos braços abertos e nem no tempo que o animal se manteve nos braços abertos do aparato do labirinto elevado em cruz. A Figura 8D mostra o efeito da neopterina na memória na diminuição do limiar para geração do LTP. A amplitude dos potenciais pós-sinápticos do tipo excitatórios (fEPSP), foi medida em intensidades desde o mínimo até o supramáximo (100 Hz). Na Figura 8D pode ser observado que nas fatias provenientes dos animais que tiveram tratamento com neopterina o LTP foi gerado com um estímulo de 5 Hz na mesma magnitude que os controles que receberam o estímulo de 100 Hz.



**Figura 8.** Efeito da administração de neopterina (Neo 4 pmol; intracerebroventricular) sobre as tarefas de memória aversiva (A) número de entradas do animal nos braços abertos do labirinto elevado em cruz; (B) tempo de permanência nos braços abertos do labirinto elevado em cruz (C) e sobre a formação do potencial de longa duração (LTP; D), em ratos Wistar machos adultos. O tempo de latência para descer da plataforma após 24 h (memória de longo prazo; LTM) da administração de neopterina, foi empregado para avaliar a memória aversiva nos animais; enquanto a porcentagem de tempo que o animal permaneceu nos braços abertos do labirinto elevado em cruz 24 h após a administração de neopterina foi empregado para avaliar efeitos ansiogênicos do tratamento. O efeito da neopterina sobre a geração de fEPSP foi determinado mediante um estímulo mínimo de 5Hz ou supramáximo de 100 Hz numa curva temporal. Os símbolos representam a média  $\pm$  desvio padrão do fEPSP gerado de quatro experimentos independentes. \* $P < 0,05$ , vs. sessão de treino; \*\* $P < 0,05$  vs. veículo (Mann-Whitney).

A Figura 9A-F mostra o efeito da administração intraperitoneal de LPS (0,33 mg/kg) sobre a expressão gênica das citocinas

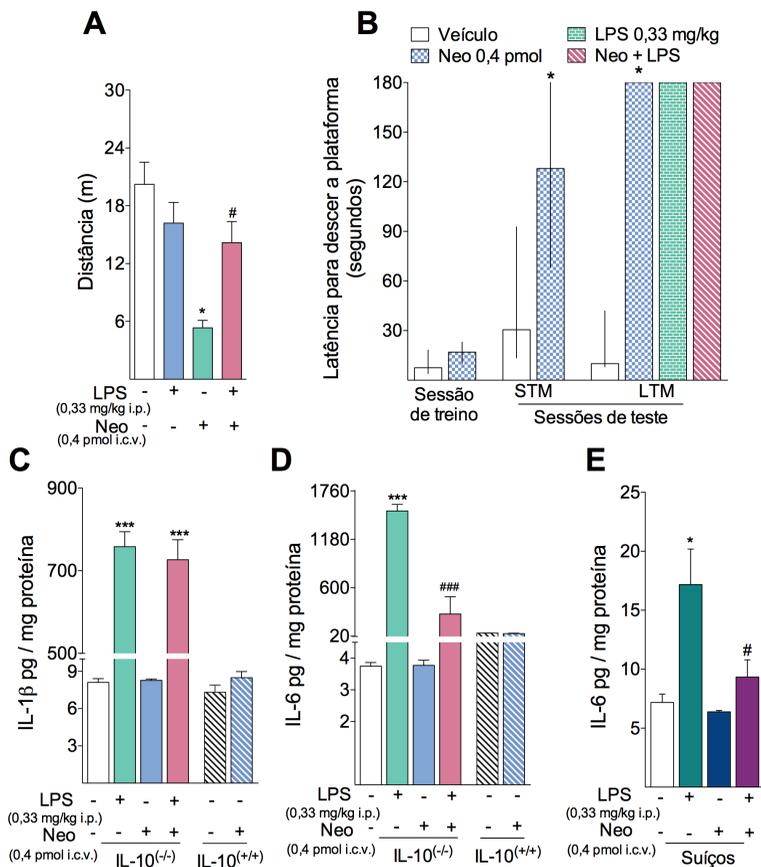
inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6, e das enzimas *GCHI* e *SPR* envolvidas na síntese *de novo* da BH4, no cérebro de camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida. Pode ser observado nas Figuras 9A-C que a dose de LPS aumentou significativamente a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no córtex cerebral [ $t_{(9)} = 16,89$ ;  $P < 0,05$ ], estriado [ $t_{(10)} = 8,95$ ;  $P < 0,05$ ] e hipocampo [ $t_{(6)} = 4,65$ ;  $P < 0,05$ ]. Um efeito similar foi observado na expressão gênica de IL-6 no córtex [ $t_{(9)} = 8,05$ ;  $P < 0,05$ ] e estriado [ $t_{(10)} = 4,16$ ;  $P < 0,05$ ]. As figuras 9D-F mostram o aumento da expressão relativa de *GCHI* induzido por LPS no córtex [ $t_{(8)} = 5,01$ ;  $P < 0,05$ ], estriado [ $t_{(8)} = 13,69$ ;  $P < 0,05$ ] e hipocampo [ $t_{(10)} = 5,28$ ;  $P < 0,05$ ], enquanto a *SPR* teve uma diminuição somente no córtex [ $t_{(10)} = 3,45$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 9.** Efeito da administração periférica de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg; intraperitoneal) sobre a expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 e sobre as enzimas GCH1 e SPR envolvidas na síntese *de novo* de BH4 em córtex (A e D), estriado (B e E) e hipocampo (C e F) de camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida. O dados representam a média  $\pm$  o erro padrão da média. \* $P < 0.05$ , vs. veículo. (Teste *t* de Student para amostras independentes).

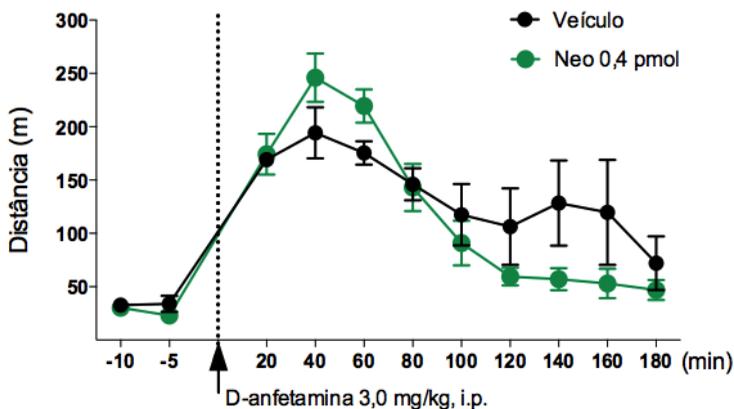
A Figura 10A-D mostra o efeito da administração i.c.v. de neopterinina nas tarefas comportamentais de campo aberto e esquiwa inibitória; e sobre a expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 em camundongos IL-10<sup>(-/-)</sup> tratados com LPS. A Figura 10A mostra que a administração de LPS diminuiu a atividade locomotora, evidenciada por uma redução significativa na distância percorrida [ $F_{(1,16)} = 9,51$ ;  $P < 0,01$ ], e este efeito inibitório foi significativamente prevenido pela administração prévia de neopterinina (interação neopterinina

x LPS [ $F_{(1,16)} = 5,28$ ;  $P < 0,05$ ]). A Figura 10B mostra que o efeito da neopterina no aprendizado de memória aversiva foi preservado nos animais IL-10<sup>(-/-)</sup>, tanto na STM quanto na LTM nas sessões de teste. Além disso, pode ser observado que a atividade locomotora diminuída induzida pela administração de LPS ocasionou um aumento na latência dos animais em descer da plataforma. Enquanto que nos animais que receberam a administração de neopterina prévia ao LPS, o aprendizado facilitado foi o responsável pelo tempo aumentado de latência, uma vez que estes animais mantiveram a locomoção espontânea preservada. As Figuras 10C e D mostram que a administração de LPS aumentou as concentrações cerebrais de IL-1 $\beta$  e IL-6, e a administração prévia de neopterina preveniu significativamente o aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 [ $F_{(1,3)} = 46,664$ ;  $P < 0,001$ ]. O feito anti-inflamatório da neopterina sobre IL-6 também foi observado em camundongos Suíços (Figura 10E).



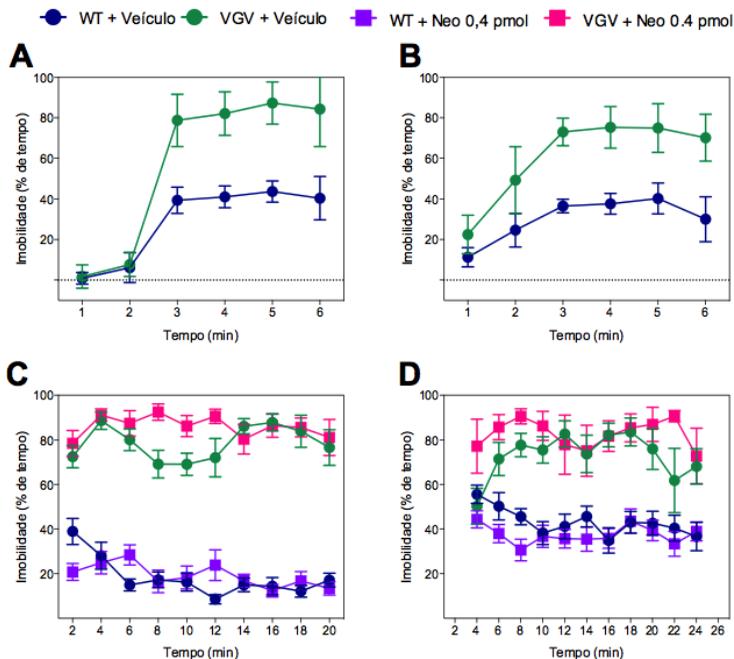
**Figura 10.** Efeito da administração de neopterin (Neo, 0,4 pmol; intracerebroventricular) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS 0,33 mg / kg; intraperitoneal) sobre a locomoção espontânea (A) e memória aversiva (B) e sobre a produção de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  (C) e IL-6 (D), em camundongos nocaute para a IL-10<sup>(-/-)</sup> de 17 meses de idade. Camundongos Suíços de 60 dias de vida foram empregados como controles para a quantificação de IL-6 (E). A locomoção espontânea foi medida através do parâmetro distância total percorrida; enquanto que o tempo de latência para descer da plataforma após 1,5 h (memória de curto prazo; STM) e 24 h (memória de longo prazo; LTM) da administração de neopterin, foi empregado para avaliar a memória aversiva nos animais. Os dados representam a média  $\pm$  erro da média (A) ou mediana  $\pm$  desvio interquartil (B, C, D e E). A: \*  $P < 0,05$ , vs. Veículo; #  $P < 0,05$ , vs. LPS (test  $t$  para amostras independentes). \*\*\*  $P < 0,001$ , vs. veículo; ###  $P < 0,001$ , vs. LPS (ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste *post hoc*).

A Figura 11 mostra o efeito da administração i.c.v. de neoptertina (0,4 pmol) em camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida no teste de desafio locomotor com a administração de D-anfetamina (3,0 mg/kg; i.p.). A figura mostra que a administração de neoptertina não alterou a locomoção dos animais.



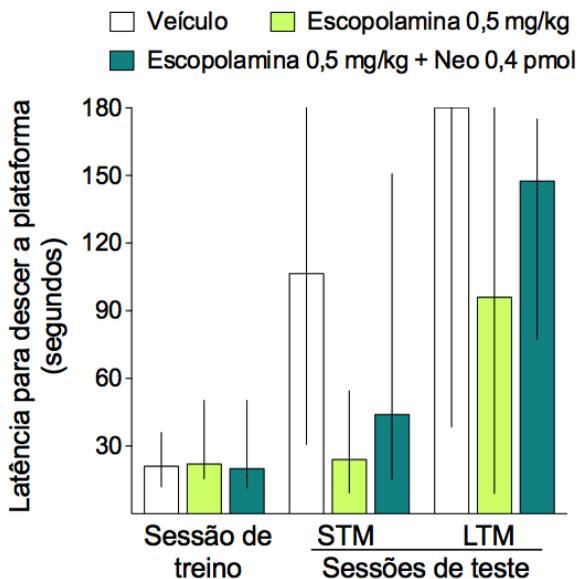
**Figura 11.** Efeito da administração de neoptertina (Neo 0,4 pmol, intracerebroventricular) sobre a locomoção espontânea e induzida por D-anfetamina (3,0 mg/kg; intraperitoneal) em camundongos C57BL-6 de 60 dias de vida. A locomoção espontânea foi medida através do parâmetro de distância total percorrida. Os símbolos representam a média  $\pm$  o erro padrão da média da distância percorrida. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas).

A figura 12 A-D mostra o efeito da administração i.c.v. de neoptertina (0,4 pmol) em camundongos VGV machos adultos na tarefa comportamental do medo condicionado. As Figuras 12A e B mostram o condicionamento dos animais durante o estímulo condicionado (CS; pista sonora de 2500 Hz de frequência e intensidade de 85 dB apresentada por 30 segundos; Figura 12A) e o intervalo inter-trial (ITI; Figura 12B). Pode ser observado que camundongos VGV apresentam uma porcentagem de tempo de imobilidade (*freezing*) superior aos animais selvagens (C57BL-6; Figura 12A-B). As Figuras 10C e D mostram que a administração de neoptertina logo após a fase de aquisição da memória (consolidação) não alterou a consolidação de memórias relacionadas ao medo nos momentos do teste de condicionamento do medo contextual (Figura 12C) e do teste de extinção da memória do medo condicionado (Figura 12D).



**Figura 12.** Efeito da administração de neopterina (Neo 0,4 pmol; intracerebroventricular) sobre o comportamento de congelamento em camundongos VGV machos adultos. A porcentagem do tempo de imobilidade dos animais foi mesurada durante: (A) CS no momento do condicionamento, (B) ITI no momento do condicionamento, (C) durante o teste de condicionamento do medo contextual, (D) durante o teste de extinção da memória do medo condicionado. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas).

A Figura 13 mostra um experimento representativo da administração de neopterina 0,4 pmol (i.c.v.) 30 min após o tratamento com escopolamina (0,5 mg/kg i.p). Embora se trate de um resultado preliminar (n=4), pode ser observado que a neopterina poderia reverter o efeito amnésico causado por este antagonista colinérgico.

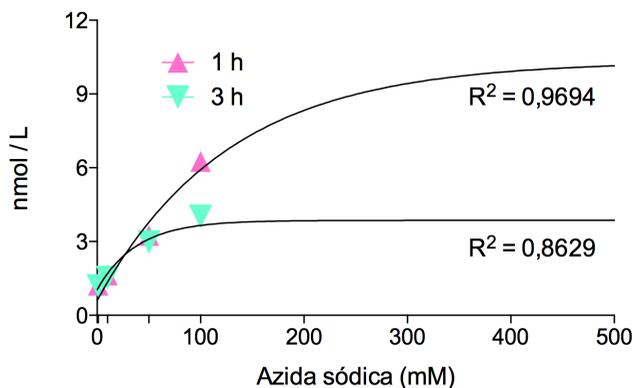


**Figura 13.** Efeito da administração de escopolamina (0,5 mg/kg, intraperitoneal) e/ou de neopterina (Neo 0,4 pmol, intracerebroventricular) sobre a memória aversiva em camundongos Suíços de 60 dias de vida. As barras representam o tempo de latência para descer da plataforma após 1,5 h (memória de curto prazo; STM) e 24 h (memória de longo prazo; LTM) da administração de neopterina, no teste comportamental de esquila inibitória. Os dados representam a mediana  $\pm$  desvio interquartil. Dados preliminares (n = 4 animais por grupo).

## 5.1. SEÇÃO II

## II – PRODUÇÃO E EFEITOS DA NEOPTERINA *IN VITRO* EM DIFERENTES TECIDOS E CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A Figura 14 mostra a concentração de neopterina no sobrenadante de fatias hipocampais expostas a concentrações crescentes de azida sódica (1 a 500 mM). Pode ser observado que o tratamento por 1 e 3 horas estimulou a produção e liberação de neopterina no meio de incubação. O efeito seguiu um comportamento exponencial (Figura 14).



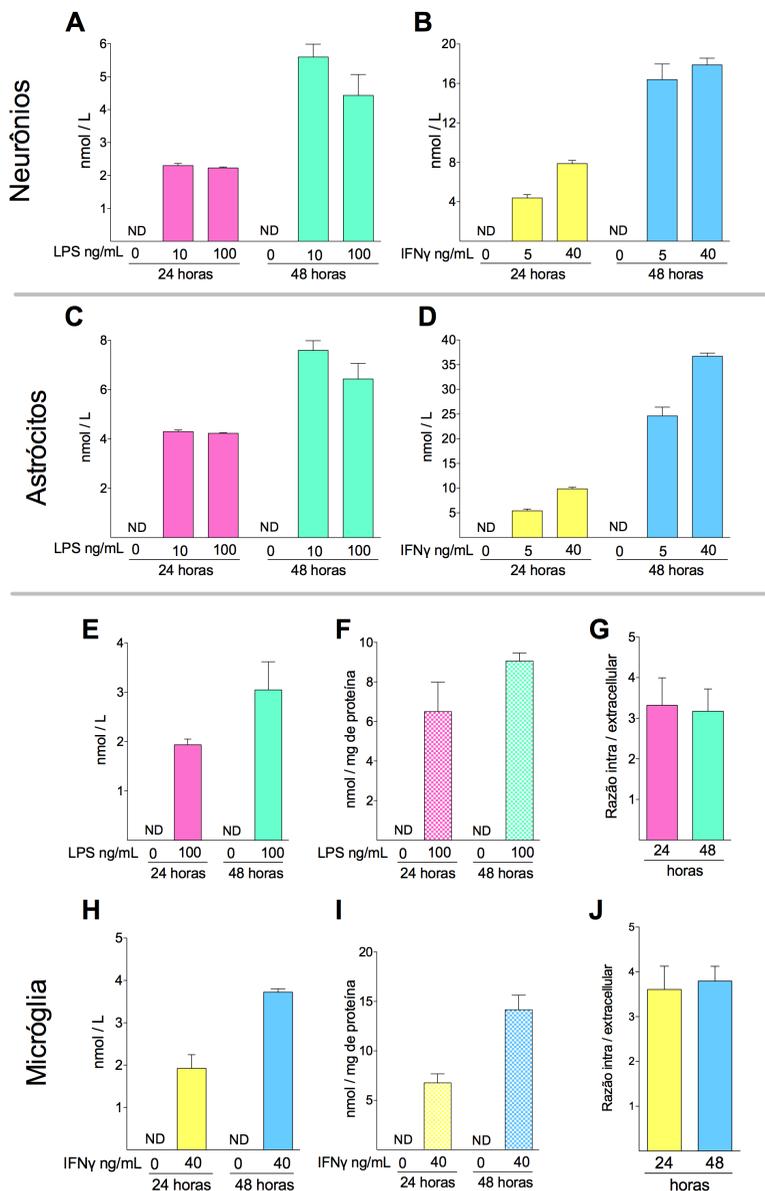
**Figura 14.** Efeito da azida sódica (0 – 500 mM) sobre a liberação de neopterina a partir de fatias hipocampais obtidas de cérebro de camundongos adultos suíços. As fatias foram expostas ao composto durante 1h e 3h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes. Os valores de  $R^2$  indicados correspondem à melhor curva de regressão que definem o fenômeno de liberação de neopterina (regressão exponencial).

As Figuras 15A, C, E mostram o efeito de 10 e/ou 100 ng/mL de LPS sobre a liberação de neopterina por culturas primárias de células nervosas humanas. A Figura 15A mostra que este tratamento provocou a liberação de  $2,2 \pm 0,09$  nmol/L e  $5,0 \pm 1,1$  nmol/L de neopterina no sobrenadante das culturas neuronais após 24h e 48h de exposição ao LPS, respectivamente. Na Figura 15C pode ser observado que o efeito do mesmo tratamento com LPS provocou a liberação de aproximadamente o dobro de concentrações de neopterina em células astrogliais.

A Figura 15E mostra que a liberação de neopterinina atingiu concentrações de  $1,9 \pm 0,2$  nmol/L e  $3,0 \pm 0,9$  nmol/L no sobrenadante de culturas microgliais, após 24h e 48h de exposição ao LPS.

As Figuras 15B, D e H mostram o efeito de 5 e/ou 40 ng/mL de IFN-  $\gamma$  sobre a liberação de neopterinina por células nervosas humanas. Pode ser observado nas figuras, que o estímulo com 40 ng/mL por 48 horas deste mediador sempre gerou concentrações maiores de neopterinina no sobrenadante das culturas celulares de neurônios ( $17,8 \pm 1,6$  nmol/L), astrócitos ( $36,7 \pm 1,7$  nmol/L) e micróglia ( $3,7 \pm 0,1$  nmol/L), quando comparado com 24h ou com o agente inflamatório LPS.

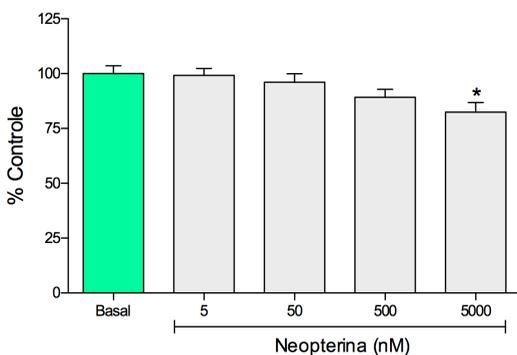
As Figuras 15F e I mostram que 100 ng/mL de LPS e 40 ng/mL de INF- $\gamma$  provocam a produção intracelular de neopterinina em células microgliais, com uma relação constante entre produção/liberação de 3,3 em 24h e de 2,9 em 48h (Figura 15 G e J).



**Figura 15.** Efeito do tratamento com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS 10 e/ou 100 ng/mL; **A**, **C**, **E** e **F**) e do interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  5 e/ou 40 ng/mL; **B**, **D**, **H** e **I**) sobre a produção e liberação de neopterin em células do sistema nervoso central obtidas a partir de fetos humanos. **A** e **B**

correspondem a sobrenadante de cultura primária de neurônios; **C** e **D** sobrenadante de culturas de astrócitos e **E** e **H** sobrenadante de culturas de células microglicais; **F** e **H** correspondem a homogenato de cultura de células microglicais. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (6 experimentos independentes). Em **G** e **J** está indicada a relação entre produção e liberação de neopterina por células microglicais.

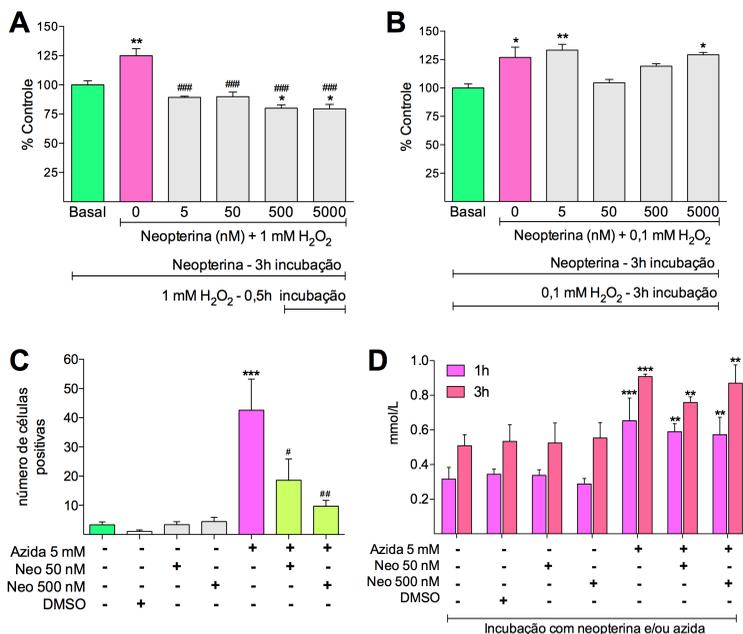
A Figura 16 mostra o efeito da exposição de células C6 a concentrações crescentes de neopterina (0 – 5  $\mu$ M) durante 3 horas, sobre a taxa de oxidação do DCFH. Pode ser observado que a neopterina *per se* não aumentou o conteúdo de espécies reativas; no entanto foi observado um leve efeito sequestrador na máxima concentração empregada [ $F_{(4,10)} = 3,97$ ;  $P < 0,05$ ]. Esta significância estatística teve um tamanho de efeito 0,61, indicando pouca a moderada relevância fisiológica deste achado.



**Figura 16.** Efeito de concentrações crescentes de neopterina (Neo 0 – 5000 nM; 3 h) sobre a taxa de oxidação do diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) em culturas de células glias C6. A exposição das células ao metabólito foi de 3 h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  vs. basal (ANOVA de uma via seguido de Tukey como teste *post hoc*).

A figura 17A-D mostra o efeito do tratamento com concentrações crescentes de neopterina (0 – 5000 nM; 2,5 h) frente ao estresse oxidativo induzido pela exposição a peróxido de hidrogênio (0,1 mM e 1mM; 3 h e 0,5h, respectivamente) sobre a oxidação do DCFH em culturas de células glias C6 e astrócitos corticais obtidos a partir de cérebro de rato neonato. A Figura 17A mostra que o pré-tratamento das células C6 com neopterina por 2,5 horas preveniu significativamente o efeito tóxico, e consequentemente o estresse

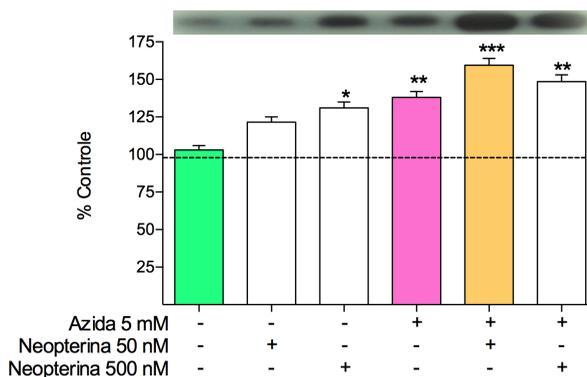
oxidativo, induzido pela exposição a peróxido de hidrogênio por 0,5 horas. Pode ser observado ainda na figura, que o efeito protetor da neopterinina foi significativo em todas as concentrações testadas [ $F_{(5,12)}= 19,24$ ;  $P < 0,001$ ]. A Figura 17B mostra que a exposição simultânea a neopterinina (0 – 5  $\mu\text{M}$ ) e peróxido de hidrogênio (0,1 mM) durante 3 h em células C6 provocou uma curva em U, demonstrando que as concentrações de 50 e 500 nM de neopterinina foram as mais eficientes na prevenção do efeito oxidante do peróxido de hidrogênio. A Figura 17C mostra o efeito da incubação de azida sódica e/ou neopterinina em astrócitos primários preparados a partir de córtex cerebral de ratos neonatos. Pode ser observado que a exposição a azida sódica aumentou significativamente a taxa de oxidação do DCFH e que o tratamento com neopterinina diminuiu significativamente este efeito [ $F_{(5,12)}= 9,66$ ;  $P < 0,001$ ]. A Figura 17D mostra que o tratamento com neopterinina não alterou o aumento na concentração de lactato no sobrenadante dos grupos expostos à azida sódica em relação ao controle.



**Figura 17.** Efeito de concentrações crescentes de neopterin (0 – 5000 nM; 2,5 h) frente ao estresse oxidativo induzido pela exposição a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,1 mM e 1mM; 3 h e 0,5h, respectivamente), sobre a oxidação do diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) em culturas de células glias C6 e astrócitos corticais obtidos a partir de cérebro de rato Wistar neonato. Oxidação de DCFH em células C6 (A) com pré-tratadas com neopterin (0 – 5000 nM) e expostas a um pulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM; (B) tratamento simultâneo de concentrações crescentes de neopterin (0 – 5000 nM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM) durante 3h. (C) Oxidação de DCFH em culturas de astrócitos primários de córtex de ratos neonatos com tratamento de neopterin (50 e 500 nM) e/ou azida sódica 5 mM por 3h. (D) Tratamento de neopterin (50 e 500 nM) e/ou azida 5 mM por 1 ou 3h sobre as concentrações de lactato em culturas de astrócitos primários de córtex de ratos neonatos. Os dados representam a média ± desvio padrão (6 experimentos independentes). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , vs. o basal; ###  $P < 0,001$ , vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM (ANOVA de uma via seguido de Tukey como teste *post hoc*).

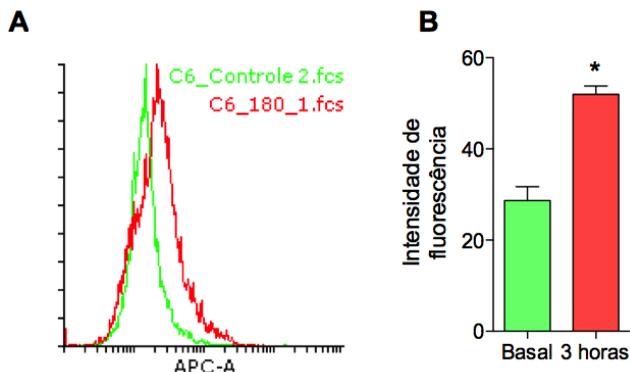
Figura 18 mostra o efeito da incubação de neopterin (50 ou 500 nM) e/ou azida sódica (5mM) durante 3 horas sobre o conteúdo de heme oxigenase-1 (HO-1) em culturas de astrócitos primários de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos. Pode ser observado que a incubação

de neoptertina 500 nM e/ou azida sódica 5 mM alterou significativamente o conteúdo de HO-1 [ $F_{(5,6)} = 25,62$ ;  $P < 0,001$ ].



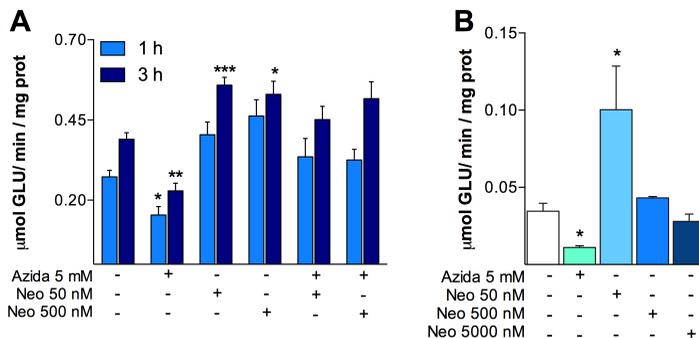
**Figura 18.** Efeito da neoptertina (50 e 500 nM) e/ou azida sódica 5 mM por 3h sobre o conteúdo de heme oxigenase-1 (HO-1) em culturas de astrócitos primários de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos. A carga protéica foi controlada mediante a quantificação do conteúdo de proteínas no homogenato das células astrocitárias. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. basal (ANOVA de uma via seguido de Tukey como teste *post hoc*).

A Figura 19 mostra o efeito do tratamento com neoptertina (50 nM) por 3 h na intensidade de fluorescência da marcação para Nrf2 em células C6. A figura 19A mostra o histograma ilustrativo e a figura 19B a quantificação da intensidade de fluorescência. A figura mostra que o tratamento com 50 nM de neoptertina por 3 h provocou um aumento no conteúdo de Nrf2 [ $t_{(7)} = 6,79$ ;  $P < 0,05$ ].



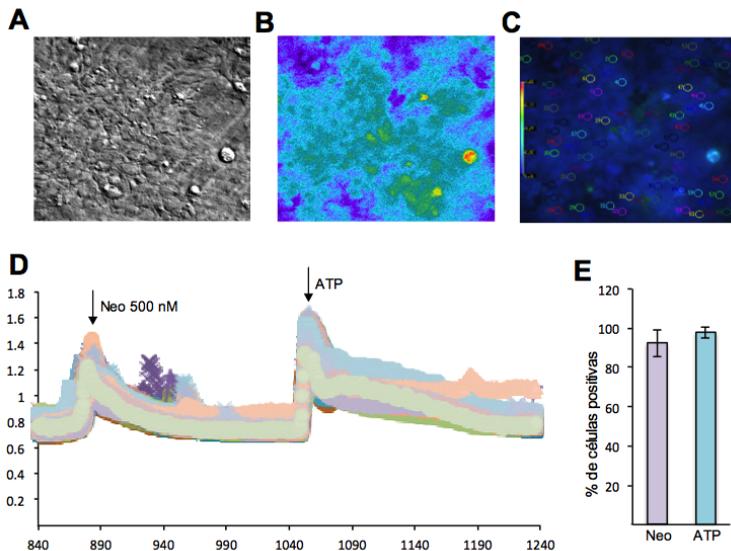
**Figura 19.** Efeito da neopterina (50 nM) por 3h sobre o conteúdo de Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) em culturas de células C6. A quantificação da marcação para o anticorpo foi realizada por citometria de fluxo. **(A)** Histograma representativo da fluorescência. **(B)** Quantificação da intensidade de fluorescência do anticorpo secundário conjugado com alofocianina (APC) ligado ao anticorpo para Nrf2. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$  vs. basal (Teste *t* de Student).

As Figuras 20A e B mostram o efeito da neopterina na captação de glutamato. A Figura 20A mostra que o tratamento com 50 e 500 nM de neopterina aumentou significativamente a captação de glutamato e ainda reverteu o prejuízo induzido por azida sódica em células C6. A figura 20B mostra que a neopterina (50 nM) aumentou a captação de glutamato também em fatias hipocâmpais de camundongos Suíços adultos machos, quando tratadas por 3 horas.



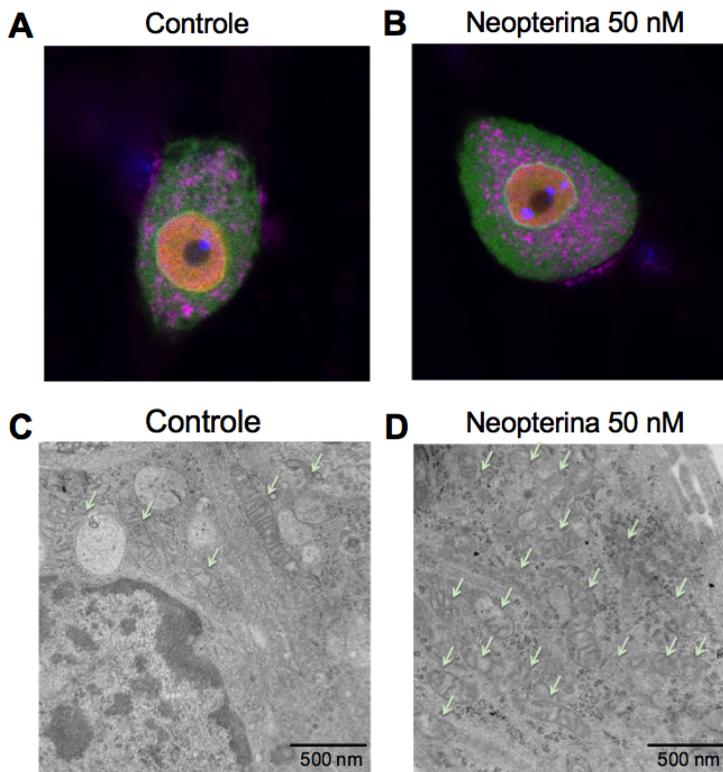
**Figura 20.** Efeito da neopterina (50 – 5000 nM) e/ou azida sódica (5 mM) sobre a captação de glutamato em células C6 e fatias hipocâmpais de camundongos Suíços. **(A)** Captação de glutamato em células C6 tratadas com neopterina (50 ou 5000 nM) e/ou azida sódica (5mM) por 1 ou 3 h. **(B)** Captação de glutamato em fatias hipocâmpais de camundongos Swiss tratadas com neopterina (50 - 5000 nM) e/ou azida (5mM) por 3 h. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , vs. controles (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

As Figuras 21A-E mostram o efeito da neopterina (500 nM) na mobilização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar. As Figuras 21D e E mostram que o estímulo com neopterina mobilizou o cálcio intracelular de forma semelhante ao ATP.



**Figura 21.** Efeito da neopterina (500 nM) sobre o influxo de cálcio em astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar. (A) Representação da cultura em campo claro. (B) Imagem ilustrando a incorporação da fluorescência pela adição da sonda Fura-2. (C) Os círculos representam as células selecionadas para serem monitoradas durante o experimento. A intensidade da fluorescência é demonstrada em (D) e quantificada em (E). As setas em D indicam o momento da adição de neopterina (500 nM) e de ATP (100  $\mu$ M). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. Dados preliminares.

As Figuras 22A-D mostram o efeito da neopterina (50 nM) sobre a massa mitocondrial e o número de mitocôndrias em neurônios dos gânglios da raiz dorsal. Nas Figuras 21A e B pode ser observado que a neopterina aumentou a massa mitocondrial e promoveu uma disposição mais perinuclear das mesmas. As figuras 21C e D mostram que a neopterina provocou um aumento no número de mitocôndrias.



**Figura 22.** Efeito da neopterina (50 nM; 24h) sobre a quantidade e a localização de mitocôndrias em neurônios dos gânglios da raiz dorsal. Imunofluorescência (A e B) e análise ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão na magnificação de 11.000x (C e D). A massa mitocondrial esta representada em rosa em A e B. As setas em C e D indicam as mitocôndrias. GFP: verde, Mitotracker: rosa, DAPI: azul.

## 6. DISCUSSÃO

O declínio de funções cognitivas básicas, como o aprendizado e a memória, é uma condição associada tanto com o processo natural de envelhecimento quanto com diferentes patologias neurológicas e neurodegenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer, esquizofrenia, depressão e doença de Parkinson (Costa and Silva, 2002; Ehninger et al., 2008; Harwood and Agam, 2003; Li et al., 2007; Rosenzweig and Barnes, 2003; Selkoe, 2001; Thomas and Beal, 2007). Algumas estratégias farmacológicas têm sido aplicadas para atenuar os déficits observados nessa condição, e alguns compostos já obtiveram a aprovação pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), porém, a descoberta de novas ferramentas nootrópicas continua sendo . O termo nootrópico é utilizado desde a descoberta do piracetam para classificar substâncias neuroativas que aumentam as habilidades cognitivas de forma significativa e sustentada (Malykh and Sadaie, 2010). O presente trabalho investigou o efeito da neopterina como um possível nootrópico.

O efeito de compostos nootrópicos como o piracetam e a vitamina E sobre o aprendizado e a memória demonstraram que o tratamento com essas substâncias facilita a aquisição e a consolidação de memórias aversivas (Kosta et al., 2013), em concordância, no presente estudo foi observado uma ação facilitadora da neopterina sobre a aquisição deste tipo de memória. Foi demonstrando que a administração de neopterina i.c.v. previamente a aquisição (sessão de treino) aumentou o tempo de latência dos animais em descer da plataforma, tanto na avaliações de memória de curta quanto de longa duração (STM e LTM) na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória em camundongos Suíços adultos. Efeitos da similares aos observados em camundongos foram encontrados também em ratos Wistar adultos. Efeitos ansiolíticos da neopterina foram descartados através do teste comportamental do labirinto em cruz elevado. A tarefa da esQUIVA inibitória é descrita como dependente da integridade funcional do hipocampo (Izquierdo et al., 2008; Whitlock et al., 2006) e a geração da LTP hipocampal é o mecanismo molecular mais indicado como o responsável pelo aumento da plasticidade sináptica e consequente formação da LTM, uma vez que a memória adquirida passa da forma lábil para a forma estável por remodelações sinápticas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006; Cooke e Bliss, 2006). Estudos utilizando técnicas eletrofisiológicas através de potenciais pós-sinápticos excitatórios demonstram que a intensidade do estímulo necessária para gerar a LTP é proporcional as medidas de memória em

testes comportamentais (Lamprecht and LeDoux, 2004). Neste sentido, uma diminuição no limiar para a geração da LTP em fatias hipocâmpais de ratos previamente tratados com neopterinina e testados na tarefa comportamental de esquivar inibitória foi observada em nosso estudo. Este dado indica um efeito da neopterinina na plasticidade sináptica.

Déficits no aprendizado e na memória estão associados a declínios cognitivos relacionados com a idade e com diferentes condições neurológicas e neurodegenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer, esquizofrenia, depressão, doença de Parkinson (Costa and Silva, 2002; Ehninger et al., 2008; Harwood and Agam, 2003; Li et al., 2007; Rosenzweig and Barnes, 2003; Selkoe, 2001; Thomas and Beal, 2007). Estas condições frequentemente estão associadas com inflamação crônica com consequente neuroinflamação e aumento de estresse oxidativo celular (Amor et al., 2014). A prevenção e/ou atenuação destes fatores foi observada na administração de neopterinina. Em camundongos Suíços a administração i.c.v. de neopterinina resultou em efeitos benéficos à função celular, por aumentar a resistência ao estresse oxidativo indicado pelo aumento das razões NPSH/TBA-RS e GR/GPx, bem como por aumentar as concentrações de GSH. No SNC a GSH constitui a principal defesa antioxidante, sendo produzida e secretada principalmente por astrócitos e por neurônios (Dringen, 2000; Pope et al., 2008). Concentrações aumentadas de GSH, bem como a prevenção da sua depleção causada por agentes indutores da neuroinflamação (LPS), foram descritas após o tratamento com o agente nootrópico donepezil, um dos principais tratamentos utilizados para potencializar a memória em pacientes de doença de Alzheimer (Umukoro et al., 2014). Além disso este mesmo fármaco diminuiu a lipoperoxidação em cérebro de ratos (Umukoro et al., 2014).

O efeito da neopterinina foi ainda avaliado em animais IL-10<sup>(-/-)</sup>. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que diminui a propagação da inflamação por inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (Richwine et al., 2009). Modelos experimentais de IL-10<sup>(-/-)</sup> são relacionados com resposta inflamatória exacerbada. Os resultados observados neste trabalho em animais IL-10<sup>(-/-)</sup> tratados com LPS estão de acordo com os dados já existentes na literatura que descrevem prejuízos locomotores acentuados e aumento nas concentrações cerebrais das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 (Richwine et al., 2009). Concentrações endógenas de IL-6 aumentadas podem ter um papel fisiológico na inibição da geração da LTP, e nos efeitos deletérios envolvidos com a ativação persistente da microglia (Cojocaru et al., 2009, Hilsabeck et al., 2010, Yirmiya e Goshen, 2010). Em

concordância, estudos utilizando animais com deleção do gene para IL-6 demonstraram que a ausência desta citocina pró-inflamatória confere aos animais resistência aos déficits comportamentais causados por quadros inflamatórios como abscessos teciduais, infecções virais (Kozak et al., 1997), ou ainda desafios com LPS (Sparkman et al., 2006). A administração prévia de neopterinina em animais IL-10<sup>(-/-)</sup> preveniu o comportamento tipo doentio causado pelo LPS evidenciado através da manutenção do perfil de locomoção espontânea e das concentrações cerebrais diminuídas de IL-6 quando comparadas com animais que não receberam a neopterinina. A ação da neopterinina na locomoção parece estar relacionada com a prevenção de prejuízos provocados pelo LPS, visto que a neopterinina *per se* não influenciou a locomoção nem quando esta foi superestimulada pela D-anfetamina. O prejuízo locomotor ocasionado pelo LPS refletiu nos resultados encontrados no teste de memória aversiva nos animais IL-10<sup>(-/-)</sup>, aumentando do tempo de latência destes animais em descer da plataforma, não pelo aprendizado, mas pela incapacidade de locomoção. No entanto, o efeito da neopterinina sobre a memória se manteve nestes animais, indicando que mesmo em condições de neuroinflamação esta pteridina mantém seu efeito. Pode-se concluir que o efeito agudo da neopterinina sobre os aspectos comportamentais está, em parte, devido à capacidade desta molécula em modular positivamente as defesas antioxidantes celulares, bem como em reduzir as concentrações cerebrais de IL-6.

A depressão é um distúrbio neuropsiquiátrico com incidência aumentada em idosos e em indivíduos portadores de doenças crônicas, incluindo as neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Alzheimer (Thompson et al., 1987). A coexistência da condição depressiva com outras patologias neurológicas está associada a um maior déficit cognitivo (Papakostas and Culpepper, 2015). Buscando analisar se os efeitos da neopterinina sobre a memória seriam mantidos em um contexto de depressão foram utilizados animais geneticamente modificados que expressam a isoforma totalmente editada do receptor 2C de serotonina (animais nulos para o receptor 5-HT2c). Estes animais são conhecidos como VGV pelo fato da alteração genética resultar em um códon que codifica Valina-Glicina-Valina (Kawahara et al., 2008). Esta modificação gera um fenótipo comportamental relacionado à ansiedade e a depressão (Mombereau et al., 2010; Olaghere et al., 2010) e os nossos resultados demonstraram que os animais VGV apresentam uma porcentagem de imobilidade elevada (máxima) no teste do medo condicionado. Por estratégia experimental, neste caso a neopterinina foi administrada após a aquisição (condicionamento) na tentativa de avaliar

seu efeito também na consolidação da memória. Diferentemente de quando administrada antes da aquisição no teste da esQUIVA inibitória, a neopterina administrada após o condicionamento no teste do medo condicionado não alterou a porcentagem de tempo de imobilidade dos animais.

Ainda, é importante salientar a relevância do sistema colinérgico nos processos cognitivos. O efeito de fármacos como a rivastigmina e a galantamina que, baseados na inibição da acetilcolinesterase, promovem o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, apresentando assim melhoras cognitivas é descrita tanto na clínica de pacientes de Alzheimer quanto em experimentos com animais (Fond et al., 2015(Noda et al., 2010). O efeito do potencializador cognitivo galantamina foi demonstrado também em um modelo animal da doença de Alzheimer, que de uma maneira dose dependente preveniu os prejuízos causados pela administração i.c.v. do peptídeo  $\beta$ -amilóide na tarefa comportamental de medo condicionado (Wang et al., 2007). A neopterina também parece atuar no sistema colinérgico, apesar de nossos resultados serem preliminares ( $n = 4$ ) a neopterina parece reverter parcialmente o efeito amnésico causado pela administração de escopolamina, um antagonista competitivo e reversível de receptores muscarínicos.

Após a realização dos estudos *in vivo* com a neopterina e levando em consideração que esta pteridina endógena tem suas concentrações aumentadas em fluídos biológicos nos casos de ativação do sistema imune incluindo infecções virais, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas (Fuchs et al., 1989b, Widner et al., 2002, Wirleitner et al., 2002, Parker et al., 2013), o próximo passo deste trabalho investigou a produção de neopterina no SNC.

Existem apenas duas publicações na literatura mundial investigando a produção de neopterina em células do SNC, a primeira é um estudo de Speth et al. (2000) utilizando linhagens de astrócitos, neurônios e microglia estimuladas com IFN- $\gamma$ . No estudo de Speth et al. (2000) a produção de neopterina não foi observada, porém o mesmo grupo 8 anos depois publicou um novo trabalho demonstrando a ocorrência da liberação de neopterina por astrócitos utilizando IFN- $\gamma$  como agente indutor (Cano et al., 2008). Neste sentido, os achados apresentados sobre a liberação de neopterina no sobrenadante de astrócitos corroboram com a publicação de Cano et al. (2008). Em nossos experimentos demonstramos a liberação de neopterina no sobrenadante de culturas primárias de astrócitos, neurônio e microglia provenientes de tecido humano após estímulos inflamatórios com LPS

ou IFN- $\gamma$ . Estes resultados são inéditos por serem, por um lado realizados em culturas primárias de células nervosas humanas, e por outro pela identificação que os estímulos inflamatórios utilizados provocam a liberação desta pteridina em neurônios. Suportando a ideia de que neurônios tem a capacidade de produzir neopterina recentemente foi demonstrado que após injúria de nervo periférico, a transcrição do gene *Gch1* que codifica a enzima GTPCH, é aumentada tanto em macrófagos quanto em neurônios periféricos lesionados e o aumento da produção local de BH4 e neopterina foi observado (Latremoliere et al., 2015).

Ainda, nas culturas de células primárias humanas microgliais, além de analisar as concentrações de neopterina no sobrenadante foi analisado também a concentração de neopterina no homogenato das células. Foi observado que a concentração de neopterina intracelular era superior em relação a concentração daquela encontrada no sobrenadante, indicando assim que o acúmulo celular do metabólito precede a sua liberação. Além disso, sob estímulos inflamatórios em uma taxa de produção e liberação relativamente constante ao longo do tempo (24h e 48h) foi mantida.

Neste cenário, pode ser especulado que a liberação de neopterina é consequência da ativação de uma determinada cascata de sinalização, podendo envolver a ativação de fatores de transcrição como por exemplo o Nrf2 ou bem a formação de AMPc (como consequência de ativação de receptores glutamatérgicos). Ainda, pode ser sugerido que a liberação de neopterina não ocorra por mera difusão, principalmente pelo caráter polar do composto, e ainda pelas maiores concentrações de neopterina (3 vezes) encontradas intracelularmente.

O efeito antioxidante da neopterina encontrado nos experimentos *in vivo* foi verificado também em sistemas *in vitro*. Os resultados encontrados indicam que o efeito antioxidante da neopterina parece estar relacionado com a ativação de mecanismos celulares que levam a um aumento da atividade antioxidante celular, e não a uma propriedade antioxidante ou antiradicalar *per se* da molécula. Esta afirmação é feita levando em consideração que quando as células C6 foram expostas exclusivamente ao composto, o efeito protetor foi só observado em concentrações muito altas, não encontradas *in vivo* (5000 nM).

Ainda, este efeito protetor foi mais evidente quando as células gliais foram pré-tratadas com neopterina e posteriormente expostas aos toxicantes. Por outro lado, foi verificado que este efeito protetor não está relacionado com a capacidade de neutralizar, por exemplo, a

inibição da azida sódica sobre os complexos III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, visto que a completa inibição da transferência de elétrons foi caracterizada pelo um aumento de mais de 100% da glicólise anaeróbica (aumento da formação e liberação de lactato).

Uma das formas de promover proteção celular de alguns antioxidantes, como o resveratrol (Chen et al., 2005; Quincozes-Santos et al., 2013), é através da estimulação de um grupo chamado enzimas antioxidantes de fase II, exemplos de enzimas desta classe incluem a GPx, N-acetiltransferase, tioredoxina redutase e a HO-1 (Zhang et al., 2013). A HO-1 é a isoforma induzível da enzima HO e é responsável por degradar o grupamento pró-oxidante heme em biliverdina/bilirrubina, ambos conhecidos como antioxidantes (Dore et al., 1999a; Dore et al., 1999b; Zhang et al., 2013). A regulação transcricional dos genes de fase II ocorre via Nrf2, através da ligação desse fator de transcrição com genes ARE (Zhang et al., 2013). A translocação de Nrf2 para o núcleo é induzida pela exposição a diferentes estressores, como por exemplo, estresse eletrofilico, que oxida a ligação entre Nrf2 e Keap1 permitindo a translocação de Nrf2 para o núcleo (Osburn and Kensler, 2008). Em concordância, em nossos resultados foi demonstrado que a exposição de astrócitos estriatais ao estresse eletrofilico causado pelo inibidor da cadeia respiratória, azida sódica, ocasionou um aumento do conteúdo celular de HO-1, e este aumento foi potencializado pela coexposição com a neopterina. Além disso, a incubação com neopterina sozinha também aumentou o conteúdo de HO-1 e de Nrf2 após três horas de exposição, dessa forma, a ativação da via Nrf2/ARE/HO-1 parece apresentar a chave principal para os efeitos antioxidantes da neopterina.

Estes resultados contribuem ainda, para a elucidação dos achados relacionados com a memória *in vivo*, uma vez que o envolvimento da via Nrf2/ARE no aprendizado e na memória já foi demonstrado tanto em modelos animais quanto em estudos com humanos. Estudos em modelo de demência vascular cerebral demonstraram que a administração de compostos naturais, como o resveratrol e flavanóides, preveniu os prejuízos cognitivos do modelo através da ativação da via proterota Nrf2/ARE (Liu et al., 2015; Ma et al., 2013). Em humanos foi demonstrado ainda, que a suplementação com resveratrol induziu melhoras na memória associada a um aumento na conectividade funcional do hipocampo (analisado por neuroimagem) (Witte et al., 2014).

A ativação da via Nrf2 é ainda responsável pela indução de genes essenciais para a função e biogênese mitocondrial, o fator

respiratório nuclear 1 e 2 (NRF1 e NRF2) (Whelan e Zuckerbraun, 2013; Piantadosi et al., 2008), podendo ser essa a explicação pela qual o número de mitocôndrias em neurônios dos gânglios da raiz dorsal aumentou após 24 horas de exposição. Além disso, foi observado que a neopterina induziu uma reorganização da malha mitocondrial de uma maneira mais perinuclear.

Finalmente, correlacionando-se com os resultados benéficos da neopterina na memória, foi demonstrado um aumento da captação de glutamato por neurônios, através dos resultados obtidos em fatias, uma vez que a captação de glutamato neste modelo corresponde 80% àquela realizada por este tipo celular (Oldenziel et al., 2007). Além disso, a neopterina aumentou esta captação também em um modelo glial, comprovando seu efeito em diferentes tipos celulares nervosos. Em concordância com a captação de glutamato foi demonstrado que a neopterina ocasionou ainda um aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  em culturas de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar. Sabe-se que o neurotransmissor glutamato e seus receptores medeiam os processos de aprendizado (Kim et al., 2008; McHugh et al., 2007; Morris et al., 1986; Nakazawa et al., 2003). A ativação dos receptores do tipo AMPA em especial, é observada nos tratamentos com o grupo de agentes nootrópicos piracetam, oxiracetam e aniracetam, favorecendo o aumento nas concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Malykh and Sadaie, 2010). Além disso, o aumento do  $Ca^{2+}$  pode ocorrer pre-sinápticamente aumentando a atividade da PKC e fosforilando CREB de maneira semelhante a que ocorre na formação da LTP (Izquierdo et al., 2008).

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a neopterina atua como facilitadora na aquisição da memória. Mecanicamente, esse efeito parece estar relacionado com a participação da neopterina na captação de glutamato e na mobilização de cálcio intracelular e por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Neste sentido, a neopterina representa uma molécula citoprotetora via ativação de Nrf2 com potencial efeito nootrópico .

## 8. PERSPECTIVAS

1) Investigar o envolvimento do sistema colinérgico no efeito da potenciação da memória promovida pela neopterina através de experimentos com administração i.p. de escopolamina em camundongos Suíços submetidos a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória. Como demonstrado na sessão de resultados este experimento já encontra-se em andamento.

2) Investigar o efeito da neopterina no processo de formação e consolidação da memória em camundongos Suíços, através da administração de neopterina nos estágios após a aquisição na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória.

3) Caracterizar quais os receptores glutamatérgicos são estimulados por neopterina através do uso de inibidores específicos em experimentos captação de glutamato em fatias hipocâmpais de ratos Wistar.

4) Investigar se as propriedades citoprotetoras da neopterina dependem exclusivamente da ativação de Nrf2 através de silenciamento do fator de transcrição em linhagem celular de astroglioma C6.

## 9. ANEXO

Manuscritos relacionados aos resultados desta tese:

### Publicados:

**Ghisoni, K., Latini, A., 2015.** Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D., Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, Volume 47, Issue 10, October 2013, Pages 1417-1422. *Journal of psychiatric research* 63, 141-142.

### Submetidos:

#### **Ao Journal of Psychiatric Research**

**Título:** Neopterin as a Potential Cytoprotective Brain Molecule

**Autores:** Karina Ghisoni<sup>1</sup>, Roberta de Paula Martins<sup>1</sup>, Luiz Barbeito<sup>2</sup>, Alexandra Latini<sup>1</sup>

**Resumo:** Neopterin, a byproduct of the tetrahydrobiopterin *de novo* pathway, is found in increased levels in cerebrospinal fluid and plasma and significantly increases upon damage, infection or during immune system activation. The production of this compound seems almost restricted to the monocyte/macrophage lineage cells, in response to interferon- $\gamma$  stimulation. However, it is unclear whether and which nervous cells are able to synthesize neopterin, respond to any stressor applied extracellularly, or even the role of the compound in the central nervous system. Here we propose a potential cytoprotective role of neopterin in the brain, and show evidence that cultured rat astrocytes are responsive to the molecule; the pterin elicited increased hemoxygenase-1 cellular content and decreased oxidative stress induced by mitochondrial dysfunction. Further studies are needed to clarify neopterin's citoprotective effects in the central nervous system, and its potential role in different neuroinflammatory diseases.

#### **Ao Journal Brain, Behavior, and Immunity**

**Título:** Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer

**Autores:** Karina Ghisoni<sup>1</sup>, Paulo Alexandre de Oliveira<sup>2</sup>, Filipe Carvalho Matheus<sup>2</sup>, Laura Gabach<sup>3</sup>, Mariela Perez<sup>3</sup>, Valeria P. Carlini<sup>4</sup>, Aderbal Aguiar<sup>1</sup>, Luiz Barbeito<sup>5</sup>, Raymond Mongeau<sup>6,7</sup>, Laurence Lanfumey<sup>6</sup>, Rui Daniel Prediger<sup>2</sup>, Alexandra Latini<sup>1\*</sup>

**Resumo:** Neopterin, a byproduct of the tetrahydrobiopterin *de novo* pathway, is found at increased levels in biological fluids from individuals with inflammatory disorders. The biological role of this pteridine remains undefined; however, due to its capacity to increase hemeoxygenase-I content, it has been proposed as a protective agent during cellular stress. Therefore, in order to understand its *in vivo* effects, we investigated the effect of neopterin on cognition. To address this question, neopterin (0.4 and/or 4 pmol) was injected intracerebroventricularly before or after the training sessions of step-down and fear conditioning tests, respectively, and memory-related behaviors were assessed in Swiss and C57BCL/6 mice, as well as in Wistar rats. The putative effects of neopterin on cognitive performance were also investigated under an inflammatory state induced by intraperitoneal lipopolysaccharide administration (0.33 mg/kg) in interleukin-10 knockout mice (IL-10<sup>-/-</sup>). It was consistently observed across rodent species that neopterin facilitated aversive memory acquisition by increasing the latency to step-down in the inhibitory avoidance task. This effect was related to a reduced threshold to generate the long-term potentiation (LTP) process in hippocampus, and reduced IL-6 brain levels after the LPS challenge. However, neopterin administration after acquisition did not alter the consolidation of fear memories. In conclusion, neopterin facilitated cognitive processes, probably by inducing an antioxidant / anti-inflammatory state and by facilitating LTP generation. To our knowledge, this is the first evidence demonstrating that endogenous pteridine enhances cognition.

### **Em elaboração:**

Um manuscrito envolvendo os resultados *in vitro* sobre a produção e o efeito da neopterin está em elaboração e será submetido ao **Journal of Neurochemistry** com o título **Production of neopterin in human nerve cells and its protective activity**.

### **Trabalhos de colaboração durante o doutorado:**

Castro, A.A., Ghisoni, K., Latini, A., Quevedo, J., Tasca, C.I., Prediger, R.D., 2012. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 229, 208-215.

Participação: dosagem de aminas biogênicas

de Lucas, R.D., Caputo, F., Mendes de Souza, K., Sigwalt, A.R., Ghisoni, K., Lock Silveira, P.C., Remor, A.P., da Luz Scheffer, D., Guglielmo, L.G., Latini, A., 2014. Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *Journal of sports sciences* 32, 22-30.

Participação: dosagem de neopterina

## 10. REFERÊNCIAS

Abel, T., Lattal, K.M., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology* 11, 180-187.

Akiyama, H., 1994. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 174, 295-303.

Amor, S., Peferoen, L.A., Vogel, D.Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., van Noort, J.M., 2014. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology* 142, 151-166.

Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865-1874.

Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E., 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 62, 63-88.

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

Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 232, 331-356.

Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.S., 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.

Brown, D.A., 2010. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *Journal of molecular neuroscience : MN* 41, 340-346.

Cano, O.D., Neurauter, G., Fuchs, D., Shearer, G.M., Boasso, A., 2008. Differential effect of type I and type II interferons on neopterin production and amino acid metabolism in human astrocyte-derived cells. *Neurosci Lett* 438, 22-25.

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113, 484-490.

Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., Radi, R., 2008. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 4115-4122.

Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M.R., Castellanos, R., Barbeito, A.G., Estevez, A.G., Thompson, J.A., Beckman, J.S., Barbeito, L., 2005. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron

apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 93, 38-46.

Channon, K.M., 2004. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* 14, 323-327.

Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., Peterson, P.K., 1995. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun* 9, 355-365.

Chen, C.Y., Jang, J.H., Li, M.H., Surh, Y.J., 2005. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 993-1000.

Chittiprol, S., Venkatasubramanian, G., Neelakantachar, N., Babu, S.V., Reddy, N.A., Shetty, K.T., Gangadhar, B.N., 2010. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. *J Psychiatr Res* 44, 310-313.

Cho, B.P., Song, D.Y., Sugama, S., Shin, D.H., Shimizu, Y., Kim, S.S., Kim, Y.S., Joh, T.H., 2006. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53, 92-102.

Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33, 18-41.

Colton, C.A., Gilbert, D.L., 1987. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223, 284-288.

Cooke, S.F., Bliss, T.V., 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659-1673.

Copani, A., Genazzani, A.A., Aleppo, G., Casabona, G., Canonico, P.L., Scapagnini, U., Nicoletti, F., 1992. Nootropic drugs positively modulate alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-sensitive glutamate receptors in neuronal cultures. *Journal of neurochemistry* 58, 1199-1204.

Corasaniti, M.T., Paoletti, A.M., Palma, E., Granato, T., Navarra, M., Nistico, G., 1995. Systemic administration of pramiracetam increases nitric oxide synthase activity in the cerebral cortex of the rat. *Functional neurology* 10, 151-155.

Costa, R.M., Silva, A.J., 2002. Molecular and cellular mechanisms underlying the cognitive deficits associated with neurofibromatosis 1. *Journal of child neurology* 17, 622-626; discussion 627-629, 646-651.

Costigan, M., Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2012. Analgesia by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis. *Current opinion in pharmacology* 12, 92-99.

Dale, R.C., Brilot, F., Fagan, E., Earl, J., 2009. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation. *Dev Med Child Neurol* 51, 317-323.

de Lucas, R.D., Caputo, F., Mendes de Souza, K., Sigwalt, A.R., Ghisoni, K., Lock Silveira, P.C., Remor, A.P., da Luz Scheffer, D., Guglielmo, L.G., Latini, A., 2014. Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *Journal of sports sciences* 32, 22-30.

De Melo Reis, R.A., Schitine, C.S., Kofalvi, A., Grade, S., Cortes, L., Gardino, P.F., Malva, J.O., de Mello, F.G., 2011. Functional identification of cell phenotypes differentiating from mice retinal neurospheres using single cell calcium imaging. *Cellular and molecular neurobiology* 31, 835-846.

Delanty, N., Dichter, M.A., 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98, 145-153.

Dhakshinamoorthy, S., Porter, A.G., 2004. Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 20096-20107.

Di Donato, S., 2000. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *Journal of inherited metabolic disease* 23, 247-263.

Diestel, A., Aktas, O., Hackel, D., Hake, I., Meier, S., Raine, C.S., Nitsch, R., Zipp, F., Ullrich, O., 2003. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med* 198, 1729-1740.

Dore, S., Sampei, K., Goto, S., Alkayed, N.J., Guastella, D., Blackshaw, S., Gallagher, M., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Koehler, R.C., Snyder, S.H., 1999a. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Molecular medicine* 5, 656-663.

Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Zakhary, R., Hester, L.D., Guastella, D., Snyder, S.H., 1999b. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2445-2450.

Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62, 649-671.

Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D.J., Ramesh, V., Silva, A.J., 2008. Reversal of learning deficits in a Tsc2<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nature medicine* 14, 843-848.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Fond, G., Micoulaud-Franchi, J.A., Brunel, L., Macgregor, A., Miot, S., Lopez, R., Richieri, R., Abbar, M., Lancon, C., Repantis, D., 2015. Innovative mechanisms of action for pharmaceutical cognitive enhancement: A systematic review. *Psychiatry research* 229, 12-20.

Franscini, N., Blau, N., Walter, R.B., Schaffner, A., Schoedon, G., 2003. Critical role of interleukin-1beta for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, e50-53.

Froestl, W., Muhs, A., Pfeifer, A., 2012. Cognitive enhancers (nootropics). Part 1: drugs interacting with receptors. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 32, 793-887.

Fuchs, D., Spira, T.J., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Felmayer, G.W., Wachter, H., 1989. Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical chemistry* 35, 1746-1749.

Fujishiro, K., Hagihara, M., Takahashi, A., Nagatsu, T., 1990. Concentrations of neopterin and biopterin in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Biochemical medicine and metabolic biology* 44, 97-100.

Furukawa, Y., Kish, S.J., Bebin, E.M., Jacobson, R.D., Fryburg, J.S., Wilson, W.G., Shimadzu, M., Hyland, K., Trugman, J.M., 1998. Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Annals of neurology* 44, 10-16.

German, D.C., White, C.L., 3rd, Sparkman, D.R., 1987. Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles in nuclei that project to the cerebral cortex. *Neuroscience* 21, 305-312.

Giovannini, M.G., Lana, D., Pepeu, G., 2015. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory* 119, 18-33.

Giurgea, C., 1972. [Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology]. *Actualites pharmacologiques* 25, 115-156.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934.

Glisky, E.L., 2007. Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle, D.R. (Ed.), *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, Boca Raton (FL).

Goldring, C., Kitteringham, N., Jenkins, R., Copple, I., Jeannin, J.F., Park, B.K., 2006. Plasticity in cell defence: access to and reactivity of

critical protein residues and DNA response elements. *The Journal of experimental biology* 209, 2337-2343.

Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, C.L., 3rd, Araoz, C., 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7611-7615.

Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M.N., Ghelardini, C., 2002. Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs. *Current pharmaceutical design* 8, 125-138.

Guillemin, G.J., Cullen, K.M., Lim, C.K., Smythe, G.A., Garner, B., Kapoor, V., Takikawa, O., Brew, B.J., 2007. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 12884-12892.

Guillemin, G.J., Kerr, S.J., Smythe, G.A., Smith, D.G., Kapoor, V., Armati, P.J., Croitoru, J., Brew, B.J., 2001. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *Journal of neurochemistry* 78, 842-853.

Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., Brew, B.J., 2005. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49, 15-23.

Hagberg, L., Cinque, P., Gisslen, M., Brew, B.J., Spudich, S., Bestetti, A., Price, R.W., Fuchs, D., 2010. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS research and therapy* 7, 15.

Hagberg, L., Dotevall, L., Norkrans, G., Larsson, M., Wachter, H., Fuchs, D., 1993. Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. *The Journal of infectious diseases* 168, 1285-1288.

Hall, C., Ballachey, E.L., 1932. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology* Vol 6, 1-12.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York.

Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.

Halliwell, B., Gutteridge, M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc., New York.

Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *The Biochemical journal* 353, 411-416.

Harwood, A.J., Agam, G., 2003. Search for a common mechanism of mood stabilizers. *Biochemical pharmacology* 66, 179-189.

Heales, S.J., Lam, A.A., Duncan, A.J., Land, J.M., 2004. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29, 513-519.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Immunology* 14, 463-477.

Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A.M., Godbout, J.P., 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, behavior, and immunity* 23, 309-317.

Hissin, P.J., Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74, 214-226.

Hoffmann, G., Wirleitner, B., Fuchs, D., 2003. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res* 52, 313-321.

Hunot, S., Hirsch, E.C., 2003. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S49-58; discussion S58-60.

Izquierdo, I., 1989a. Different forms of post-training memory processing. *Behavioral and neural biology* 51, 171-202.

Izquierdo, I., 1989b. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends in pharmacological sciences* 10, 175-177.

Izquierdo, I., 2011. *Memória*. Artmed Editora, Porto Alegre.

Izquierdo, I., Cammarota, M., Da Silva, W.C., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Mello, P., Benetti, F., Costa, J.C., Medina, J.H., 2008. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80, 115-127.

Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory* 68, 285-316.

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

Jellinger, K.A., 2006. Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res* 3, 377-391.

Kandel, E.R., 2014. *Princípios de Neurociências* AMHG Editora Porto Alegre.

Kaufman, S., 1963. The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50, 1085-1093.

Kennedy, E.P., Lehninger, A.L., 1949. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 179, 957-972.

Kim, C.H., Lee, J., Lee, J.Y., Roche, K.W., 2008. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *Journal of neuroscience research* 86, 1-10.

Klinkenberg, I., Blokland, A., 2010. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34, 1307-1350.

Kobayashi, M., Yamamoto, M., 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in enzyme regulation* 46, 113-140.

Kosta, P., Mehta, A.K., Sharma, A.K., Khanna, N., Mediratta, P.K., Mundhada, D.R., Suke, S., 2013. Effect of piracetam and vitamin E on phosphamidon-induced impairment of memory and oxidative stress in rats. *Drug and chemical toxicology* 36, 48-54.

Kuehne, L.K., Reiber, H., Bechter, K., Hagberg, L., Fuchs, D., 2013. Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *J Psychiatr Res* 47, 1417-1422.

Lamprecht, R., LeDoux, J., 2004. Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 45-54.

Latini, A., Ferreira, G.C., Scussiato, K., Schuck, P.F., Solano, A.F., Dutra-Filho, C.S., Vargas, C.R., Wajner, M., 2007. Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cellular and molecular neurobiology* 27, 423-438.

Latremoliere, A., Latini, A., Andrews, N., Cronin, S.J., Fujita, M., Gorska, K., Hovius, R., Romero, C., Chuaiphichai, S., Painter, M., Miracca, G., Babaniyi, O., Remor, A.P., Duong, K., Riva, P., Barrett, L.B., Ferreira, N., Naylor, A., Penninger, J.M., Tegeder, I., Zhong, J., Blagg, J., Channon, K.M., Johnsson, K., Costigan, M., Woolf, C.J., 2015. Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. *Neuron* 86, 1393-1406.

Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W., 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150, 2659-2667.

Lehninger, A.L., Smith, S.W., 1949. Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *The Journal of biological chemistry* 181, 415-429.

Leuzzi, V., Carducci, C.A., Carducci, C.L., Pozzessere, S., Burlina, A., Cerone, R., Concolino, D., Donati, M.A., Fiori, L., Meli, C., Ponzone, A., Porta, F., Strisciuglio, P., Antonozzi, I., Blau, N., 2010. Phenotypic variability, neurological outcome and genetics background of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Clinical genetics* 77, 249-257.

Li, W., Zhou, Y., Jentsch, J.D., Brown, R.A., Tian, X., Ehninger, D., Hennah, W., Peltonen, L., Lonnqvist, J., Huttunen, M.O., Kaprio, J., Trachtenberg, J.T., Silva, A.J., Cannon, T.D., 2007. Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18280-18285.

Lipton, S.A., Gu, Z., Nakamura, T., 2007. Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82, 1-27.

Liu, B., Gao, H.M., Wang, J.Y., Jeohn, G.H., Cooper, C.L., Hong, J.S., 2002. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 962, 318-331.

Liu, H., Zhao, M., Yang, S., Gong, D.R., Chen, D.Z., Du, D.Y., 2015. (2R,3S)-Pinobanksin-3-cinnamate improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Journal of natural medicines* 69, 358-365.

Longo, N., 2009. Disorders of biopterin metabolism. *Journal of inherited metabolic disease* 32, 333-342.

Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., Nader, K., 2015. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 2465-2475.

Lovell, M.A., Xie, C., Markesbery, W.R., 2000. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855, 116-123.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.

Ma, X., Sun, Z., Liu, Y., Jia, Y., Zhang, B., Zhang, J., 2013. Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Neural regeneration research* 8, 2050-2059.

Maccioni, R.B., Munoz, J.P., Barbeito, L., 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32, 367-381.

Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285, 1870-1874.

Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 25, 103-126.

Malykh, A.G., Sadaie, M.R., 2010. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs* 70, 287-312.

Mandel, S.A., Amit, T., Kalfon, L., Reznichenko, L., Weinreb, O., Youdim, M.B., 2008. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 15, 211-222.

Markesbery, W.R., Carney, J.M., 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9, 133-146.

Mayer, B., John, M., Bohme, E., 1990. Purification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters* 277, 215-219.

McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.

McGaugh, J.L., Izquierdo, I., 2000. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in pharmacological sciences* 21, 208-210.

McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanelow, M.S., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2007. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94-99.

McNeill, E., Crabtree, M.J., Sahgal, N., Patel, J., Chuaiphichai, S., Iqbal, A.J., Hale, A.B., Greaves, D.R., Channon, K.M., 2015. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. *Free radical biology & medicine* 79, 206-216.

Medina, J.H., Izquierdo, I., 1995. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain research. Brain research reviews* 21, 185-194.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.

Moss, D.W., Bates, T.E., 2001. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *The European journal of neuroscience* 13, 529-538.

Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., Fuchs, D., 2002. Neopterin as a marker for immune system activation. *Current drug metabolism* 3, 175-187.

Nagatsu, T., Ichinose, H., 1996. GTP cyclohydrolase I gene, tetrahydrobiopterin, and tyrosine hydroxylase gene: their relations to dystonia and parkinsonism. *Neurochemical research* 21, 245-250.

Nakazawa, K., Sun, L.D., Quirk, M.C., Rondi-Reig, L., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2003. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38, 305-315.

Nathan, C.F., 1986. Peroxide and pteridine: a hypothesis on the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon gamma. *Interferon* 7, 125-143.

Neville, B.G., Parascandolo, R., Farrugia, R., Felice, A., 2005. Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa-responsive motor and cognitive disorder. *Brain : a journal of neurology* 128, 2291-2296.

Newman, T.A., Woolley, S.T., Hughes, P.M., Sibson, N.R., Anthony, D.C., Perry, V.H., 2001. T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 124, 2203-2214.

Neznamov, G.G., Teleshova, E.S., 2009. Comparative studies of Noopept and piracetam in the treatment of patients with mild cognitive disorders in organic brain diseases of vascular and traumatic origin. *Neuroscience and behavioral physiology* 39, 311-321.

Noda, Y., Mouri, A., Ando, Y., Waki, Y., Yamada, S.N., Yoshimi, A., Yamada, K., Ozaki, N., Wang, D., Nabeshima, T., 2010. Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors and dopaminergic-ERK1/2 systems. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 13, 1343-1354.

Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H., Yhlen, B., Anggard, E.E., Halliwell, B., 1999. F4-isoprostanol as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 72, 734-740.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.

Osburn, W.O., Kensler, T.W., 2008. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutation research* 659, 31-39.

Ota, A., Kaneko, Y.S., Mori, K., Nakashima, A., Nagatsu, I., Nagatsu, T., 2007. Effect of peripherally administered lipopolysaccharide (LPS) on GTP cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin and norepinephrine in the locus coeruleus in mice. *Stress* 10, 131-136.

Overmyer, M., Helisalme, S., Soininen, H., Laakso, M., Riekkinen, P., Sr., Alafuzoff, I., 1999. Reactive microglia in aging and dementia: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Acta neuropathologica* 97, 383-392.

Papakostas, G.I., Culpepper, L., 2015. Understanding and managing Cognition in the Depressed Patient. *The Journal of clinical psychiatry* 76, 418-425.

Paxinos, G., Franklin, K., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.

Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods* 14, 149-167.

Polazzi, E., Contestabile, A., 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13, 221-242.

Pope, S.A., Milton, R., Heales, S.J., 2008. Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochemical research* 33, 1410-1418.

Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D.O., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2013. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PloS one* 8, e64372.

Quincozes-Santos, A., Nardin, P., de Souza, D.F., Gelain, D.P., Moreira, J.C., Latini, A., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2009. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotoxicity research* 16, 30-41.

Richwine, A.F., Sparkman, N.L., Dilger, R.N., Buchanan, J.B., Johnson, R.W., 2009. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity* 23, 794-802.

Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research* 140, 1-47.

Rodrigues Simoes, M.C., Dias Viegas, F.P., Moreira, M.S., de Freitas Silva, M., Riquiel, M.M., da Rosa, P.M., Castelli, M.R., dos Santos, M.H., Soares, M.G., Viegas, C., Jr., 2014. Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease. *Mini reviews in medicinal chemistry* 14, 2-19.

Roesler, R., Walz, R., Quevedo, J., de-Paris, F., Zanata, S.M., Graner, E., Izquierdo, I., Martins, V.R., Brentani, R.R., 1999. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain research. Molecular brain research* 71, 349-353.

Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in neurobiology* 69, 143-179.

Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., Marunouchi, T., 1989. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491, 394-397.

Scapagnini, G., Vasto, S., Abraham, N.G., Caruso, C., Zella, D., Fabio, G., 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology* 44, 192-201.

Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., Williams, R.J., 2007. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 101, 1596-1606.

Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., Williams, R.J., 2001. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The Biochemical journal* 358, 547-557.

Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* 81, 741-766.

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144-147.

Sisignano, M., Park, C.K., Angioni, C., Zhang, D.D., von Hehn, C., Cobos, E.J., Ghasemlou, N., Xu, Z.Z., Kumaran, V., Lu, R., Grant, A., Fischer, M.J., Schmidtke, A., Reeh, P., Ji, R.R., Woolf, C.J., Geisslinger, G., Scholich, K., Brenneis, C., 2012. 5,6-EET is released upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 6364-6372.

Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10540-10543.

Sparkman, N.L., Buchanan, J.B., Heyen, J.R., Chen, J., Beverly, J.L., Johnson, R.W., 2006. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 10709-10716.

Speth, C., Stockl, G., Fuchs, D., Wirleitner, B., Widner, B., Wurzner, R., Mohsenipour, I., Lass-Flörl, C., Dierich, M.P., 2000. Inflammation marker 7,8-dihydroneopterin induces apoptosis of neurons

and glial cells: a potential contribution to neurodegenerative processes. *Immunobiology* 202, 460-476.

Squire, L.R., Kandel, E.R., 2003. *Memory: From Mind to Molecules*. Roberts & Company.

St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 277, 44784-44790.

Streit, W.J., 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139.

Tayeh, M.A., Marletta, M.A., 1989. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *The Journal of biological chemistry* 264, 19654-19658.

Thomas, B., Beal, M.F., 2007. Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 16 Spec No. 2, R183-194.

Thompson, L.W., Gong, V., Haskins, E., Gallagher, D., 1987. Assessment of depression and dementia during the late years. *Annual review of gerontology & geriatrics* 7, 295-324.

Thony, B., Auerbach, G., Blau, N., 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *The Biochemical journal* 347 Pt 1, 1-16.

Umukoro, S., Adewole, F.A., Eduviere, A.T., Aderibigbe, A.O., Onwuchekwa, C., 2014. Free radical scavenging effect of donepezil as the possible contribution to its memory enhancing activity in mice. *Drug research* 64, 236-239.

Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rice-Evans, C., Williams, R.J., Spencer, J.P., 2007. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 103, 1355-1367.

Vieira de Almeida, L.M., Pineiro, C.C., Leite, M.C., Brolese, G., Leal, R.B., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2008. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res* 33, 8-15.

Volger, B.W., 1991. Alternatives in the treatment of memory loss in patients with Alzheimer's disease. *Clinical pharmacy* 10, 447-456.

von Bernhardt, R., Eugenin-von Bernhardt, L., Eugenin, J., 2015. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience* 7, 124.

Waegemans, T., Wilsher, C.R., Danniau, A., Ferris, S.H., Kurz, A., Winblad, B., 2002. Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 13, 217-224.

Walz, R., Lenz, G., Roesler, R., Vianna, M.M., Martins, V., Brentani, R., Rodnight, R., Izquierdo, I., 2000a. Time-dependent

enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *The European journal of neuroscience* 12, 2185-2189.

Walz, R., Roesler, R., Quevedo, J., Sant'Anna, M.K., Madruga, M., Rodrigues, C., Gottfried, C., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2000b. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiology of learning and memory* 73, 11-20.

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Mouri, A., Mizoguchi, H., Nitta, A., Chen, W., Nabeshima, T., 2007. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32, 1261-1271.

Ward, R., Peters, T.J., 1995. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. Churchill Livingstone.

Weiss, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Semenitz, E., Dierich, M.P., Wachter, H., 1993. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Lett* 321, 89-92.

Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77, 325-333.

Werner, E.R., Bichler, A., Daxenbichler, G., Fuchs, D., Fuith, L.C., Hausen, A., Hetzel, H., Reibnegger, G., Wachter, H., 1987. Determination of neopterin in serum and urine. *Clinical chemistry* 33, 62-66.

Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Mayer, B., 1998. Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 219, 171-182.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093-1097.

Witte, A.V., Kerti, L., Margulies, D.S., Floel, A., 2014. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 7862-7870.

Witte, M.E., Geurts, J.J., de Vries, H.E., van der Valk, P., van Horsen, J., 2010. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 10, 411-418.

Yirmiya, R., Goshen, I., 2010. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25, 181-213.

Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R.K., Chen, J., Zhang, F., 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in neurobiology* 100, 30-47.