

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA MESTRADO
EM MEDICINA**

**MODELO ANIMAL NO ESTUDO DE PORFIRIAS:
PERFIL DE ALTERAÇÕES NEUROPSIQUIÁTRICAS E
DISAUTONÔMICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Fernandes de Barros

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA MESTRADO
***STRICTO SENSU* EM MEDICINA**

**MODELO ANIMAL NO ESTUDO DE PORFIRIAS:
PERFIL DE ALTERAÇÕES NEUROPSIQUIÁTRICAS E
DISAUTONÔMICAS**

Dissertação apresentada a Universidade Nove de Julho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti

Mestrando: Rodrigo Fernandes de Barros

São Paulo
2016

Barros, Rodrigo Fernandes.

Modelo animal no estudo de porfirias: Perfil de alterações neuropsiquiátricas e disautonômicas. 2016.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2016, São Paulo, 2016

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti

1. Porfíria; 2. ALA; 3. Comportamento agressivo; 4. Disautonomia cardiovascular.

São Paulo, 10 de março de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

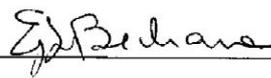
Aluno: Rodrigo Fernandes de Barros

Título da Dissertação: **“Modelo animal no estudo de porfirias: perfil de alterações neuropsiquiátricas e desautonômicas”.**

Presidente: Prof. Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti



Membro: Prof. Dr. Etelvino José Henrique Bechara



Membro: Profa. Dra. Kátia de Angelis



Dedico esse projeto ao meu filho Guilherme

“Um filho faz o amor mais FORTE, os dias mais CURTOS, as noites mais LONGAS, a conta bancária MENOR, a sua casa mais FELIZ, as suas roupas mais LARGAS, o passado ESQUECIDO e o futuro Digno de ser VIVIDO.”

Autor desconhecido

Agradecimentos

- Primeiramente à Deus, pois sem ele nada seria possível!
- À minha família:
- Minha amada esposa Renata, pelo amor, amizade e compreensão e que esteve sempre ao meu lado na correia do trabalho e mestrado;
- Ao meu bebê Guilherme que é meu maior presente de Deus;
- À minha mãe e sogra Sônia;
- Aos meus pais Alice e Alceu;
- Ao grupo de neurocomportamento:
- Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti, pela dedicação, paciência e amizade. Que sempre teve uma palavra amiga quando a situação ficava complicada;
- À Juciara da Costa Silva (minha irmã científica), que me deu um empurrão para realizar o mestrado, me apresentou o professor Penatti e sempre me ajudou;
- Aos meus caros amigos da Iniciação Científica Ismael Ribeiro dos Santos e Raphael Del Picchia, que me ajudaram na realização dos experimentos;
- Gostaria de agradecer à veterinária Caroline Augusto pela realização do ultrassom nos ratos, e que disponibilizou seu tempo para me ajudar.
- Universidade Nove de Julho - Pela oportunidade de poder trabalhar e cursar a pós-graduação, por fornecer o espaço, aos programas de pós-graduação e aos professores e funcionários:
- Em especial:
- À Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim Colombo do Programa de Pós-graduação em Medicina, à Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes do Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, que permitiram que mesmo sendo funcionário realiza-se o mestrado;

- Ao Laboratório de Fisiologia Translacional, Profa. Dra. Kátia De Angelis e Profa. Dra. Iris Callado Sanches e à Sarah pela realização da 'canulação' nos ratos;
- Ao Professor Paulo de Tarso pelo empréstimo do analgesímetro;
- Às secretárias do setor de pós-graduação da Universidade Nove de Julho por toda competência! Agradeço à Denise, Andréia, Camila e Lígia;
- À minha chefe Profa. Dra. Karin Marie van der Heijden Cardenes, Responsável pelo biotério da Universidade Nove de Julho pelo incentivo na realização do projeto e permitir a realização do mesmo;
- Aos meus queridos amigos estagiários que me deram e dão uma força no biotério;
- Ao Laboratório de Pesquisa: Ângela e Giovanni;
- Aos meus eternos amigos do Laboratório de Biociências: André, Camila, Carla, Karen, Regina, Raphael, Ricardo e Roberta;
- Por fim, um agradecimento mais que especial aos animais (ratos e camundongos) que foram parte da pesquisa, e que de alguma forma contribuíram para o bem daqueles que sofrem de porfiria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via da biossíntese do heme	21
Figura 2 – Oxidação do ALA e geração de ROS e DOVA	27
Figura 3 – Cronograma experimental	35
Figura 4 – Campo aberto circular	36
Figura 5 – Camundongo na periferia do campo aberto	36
Figura 6 – Caixa com as 20 esferas para o teste de ‘ <i>marble burying</i> ’	37
Figura 7 – Esferas cobertas mostrando a compulsão animal	37
Figura 8 – Padrão comportamental do teste de agressividade ofensiva	39
Figura 9 – Anestesiômetro digital da Insight®	40
Figura 10 – Caixa de contenção com suporte para teste de analgésímetro da Insight®	40
Figura 11 – Tempo de permanência na periferia do campo aberto	44
Figura 12 – Taxa de ambulação campo aberto	45
Figura 13 – Efeito do ALA no teste de ‘ <i>marble burying</i> ’	46
Figura 14 – Nível de sensibilidade por contato	47
Figura 15 – Número de animais que atacaram no teste de residente-intruso....	48
Figura 16 – Cronograma experimental em ratos.....	56
Figura 17 – Rato Wistar submetido a ultrassonografia com Doppler colorido ...	56
Figura 18 – Esquema da incisão e a carótida direita do rato para a implantação da cânula	58
Figura 19 – Rato com a cânula exteriorizada no dorso da região cervical e fixada com fio de algodão na pele	58
Figura 20 – Equipamentos para registros dos animais canulados	59
Figura 21 – Fluxo sanguíneo da veia porta através de ultrassonografia com Doppler	63
Figura 22 – Variância do intervalo de pulso.....	65
Figura 23 – Variância da pressão arterial sistólica.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das Porfirias.....	18
Tabela 2 – Tempo de permanência na periferia do campo aberto em machos	43
Tabela 3 – Tempo de permanência na periferia do campo aberto em fêmeas	43
Tabela 4 – Latência de ataque no teste de agressividade	48
Tabela 4 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência nos machos	64
Tabela 5 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência em fêmeas	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Porfirias	13
1.2 História das Porfirias	13
1.3 Folclores e mitos	16
1.4. Classificação das porfirias	17
1.5. Biossíntese do grupo heme	18
1.6 Regulação e produção na biossíntese do heme pelo ALAS	19
1.7 Porfíria Aguda Intermitente (PAI)	22
1.8 Manifestações neuropsiquiátricas da PAI	23
1.9 Manifestações disautonômicas em PAI	24
1.10 ALA como um pró-oxidante endógeno	25
1.11 Modelos animais de porfirias	27
2 DIVISÃO DOS ESTUDOS	30
3 JUSTIFICATIVA	31
ESTUDO 1 - ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivos específicos	33
5 METODOLOGIAS	34
5.1 Modelo experimental com camundongos C57Bl/6	35
5.1.1 Paradigmas comportamentais	35
5.1.1.1 Campo aberto	35
5.1.1.2 'Marble burying'	36
5.1.1.4 Agressividade ofensiva	37
5.1.2 Teste eletrônico de Von Frey	39
5.1.3 Identificação da fase do ciclo estral	40
5.2 Eutanásia dos animais	41
5.3 Análises estatísticas	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Ciclo estral	42

6.2	Campo aberto	42
6.3	' <i>Marble burying</i> '	45
6.4	Teste eletrônico de Von Frey	46
6.5	Agressividade ofensiva	46
7	DISCUSSÃO	49
ESTUDO 2 - ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS		53
8	OBJETIVOS	54
8.1	Objetivos específicos	54
9	METODOLOGIAS	55
9.1	Modelo experimental com ratos Wistar	55
9.1.1	Ultrassonografia com Doppler	56
9.1.2	Avaliações hemodinâmicas	
56	9.1.2.1 Avaliação da variabilidade da pressão arterial sistólica e variabilidade de frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência (análise espectral)	59
9.1.3	Identificação da fase do ciclo estral	60
9.2	Eutanásia dos animais	60
9.3	Análises estatísticas	60
10	RESULTADOS	62
10.1	Ultrassonografia com Doppler	62
10.2	Avaliações hemodinâmicas	63
	10.2.1 modulação autonômico cardiovascular	63
11	DISCUSSÃO	67
12	CONCLUSÃO	70
13	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMO

Porfirias são desarranjos bioquímicos advindos de deficiências enzimáticas congênitas ou adquiridos na formação do grupo heme. Porfiria aguda intermitente (PAI) está entre as principais formas de hepatoporfiria congênita, indivíduos acometidos podem manifestar disfunções hepáticas, sintomas neuropsiquiátricos e neuroviscerais, estes últimos de predomínio hemodinâmico. Muitos destes efeitos patológicos na PAI assumidamente acontecem pelo acúmulo do ácido 5aminolevulínico (ALA) e carecem de melhor caracterização fenomenológica e mecanística.

A partir de um modelo experimental de PAI com roedores expostos a altas concentrações do ALA, análogo ao que ocorre nas crises clínicas de porfirias em humanos, nosso objetivo foi verificar e avaliar o comportamento social destes animais através de paradigmas comportamentais, determinar as alterações hemodinâmicas decorrentes dos efeitos neuroviscerais descritos na PAI de forma mensurável e ainda quantificar a sensibilidade dolorosa como parte da lesão neuropática descrita nas crises porfíricas. Em todos os experimentos, os roedores foram tratados cronicamente com ALA 40 mg/kg intraperitonealmente. Para os estudos comportamentais e de dor periférica, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos e fêmeas. Ratos da linhagem Wistar de ambos os sexos foram utilizados na experimentação para o acesso aos parâmetros hemodinâmicos. Ao final do tratamento, os animais foram testados de forma organizada e sequencial com os paradigmas comportamentais de exploração ao meio/nível de ansiedade (teste de campo aberto) e compulsividade (teste do *'marble burying'*), de dor neurogênica (método de Von Frey eletrônico) e agressividade ofensiva (teste do residente-intruso). Os parâmetros hemodinâmicos foram identificados tanto de forma não-invasiva através da ultrassonografia com *doppler* colorido como invasivamente para o registro direto da pressão arterial, frequência cardíaca e da modulação autonômica cardiovascular pela análise espectral. Os paradigmas comportamentais mostraram que os animais tratados com ALA apresentaram maior locomoção associada a uma redução importante de propensão para agressão. Em adição, houve aumento a percepção dolorosa de caráter neurogênico.

Na ultrassonografia/doppler, a investigação do sistema mesentérico-portal mostrou com um menor fluxo sanguíneo, sem variações hemodinâmicas basais como determinado pelo registro de canulação. Contudo, a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão sistólica (VPS) no domínio do tempo e da frequência evidenciaram um descontrole do sistema autonômico simpático e parassimpático, compatível com a disautonomia da doença.

Os resultados destes estudos permitem não somente aprimorar o entendimento clínico dos aspectos neuropsiquiátricos e na disautonomia cardiovascular, mas sobretudo, permitir o avanço na intervenção fisiopatológica destes sinais e sintomas para o auxílio clínico dos indivíduos acometidos.

Palavras-chave: Porfiria; ALA; comportamento agressivo; disautonomia cardiovascular.

ABSTRACT

Porphyrias are clinical conditions arising from congenital or acquired enzyme deficiencies in the biochemical pathway of heme. Acute intermittent porphyria (AIP) is one of the main forms of congenital hepatoporphyria, which affects individuals causing liver and autonomic nerve dysfunctions, and neuropsychiatric symptoms, leading to neuropathic pain and hemodynamic instability as well as hallucinations and social behavior problems. Many of these pathological effects on AIP occur due to accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA), an early residue in the biosynthesis of heme.

Using two rodent models of AIP, our goal was to search for and characterize changes in social behavior in parallel to determine the disarrangements in hemodynamic response and pain threshold described in patients with acute AIP symptoms. For the behavioral and pain studies, we used the mouse strain C57BL/6 with both males and females. Male and female Wistar rats were used on experimental trials for accessing the hemodynamic parameters.

At the end of the treatment, where animals were chronically exposed to high concentrations of ALA (40 mg/ml), we sequentially tested behavioral paradigms of motor locomotion, exploratory behavior and anxiety level (open field and marble burying paradigms), neuropathic pain (Von Frey's electronic method) and offensive aggressiveness (resident-intruder paradigm). The hemodynamic parameters were assessed both non-invasively with ultrasound/color Doppler and invasively with direct recordings blood pressure, heart rate and cardiovascular autonomic modulation by spectral analysis.

Behavioral paradigms showed that long-term treatment with ALA promoted an important reduction in motor locomotion in both males and females and very low propensity for offensive aggression in males relative to controls. In addition, there was marked increase in the perception of pain of neurogenic condition.

Our method with ultrasound/Doppler allowed the investigation of the mesentericportal venous system, which presented lower blood flow in ALA-treated subjects than male and female measures in animal controls. Although we did not notice any changes in the main cardiovascular parameters (e.g.; blood pressure and heart rate), spectral analysis of heart rate variability and systolic blood pressure in time and frequency domains showed altered autonomic sympathetic and parasympathetic controls.

Altogether, our findings reveal the effects of long-term exposure of ALA as an important mechanism for central and peripheral nervous system disarrangements in porphyria-like conditions. They also may advance not only diagnostic tools and methods to access porphyrias and heme disorders-related clinical signs and symptoms but also the medical and rehabilitation care of the neuropsychiatric aspects and cardiovascular dysautonomia of affected individuals.

Keywords: porphyria; ALA; aggressive behavior; cardiovascular dysautonomia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Porfiria

As porfirias inatas que ocorrem em todas as etnias em 5 a cada 100 mil pessoas são um de grupo de oito doenças com manifestações clínicas bastante variadas e costumam ser divididas em neuropsiquiátricas e cutâneas (tabela 1) (Karim, et al., 2015).

Como condições geneticamente determinadas, caracterizam-se do ponto de vista bioquímico por interrupção na formação de alguns intermediários tetrapirrólicos na biossíntese do grupo heme. Esses intermediários possuem quatro anéis heterocíclicos (I, II, III, IV) que estão ligados entre si por grupos metano (-CH=) (**figura 1**). Este importante grupo prostético liga-se à hemoglobina como transportador de oxigênio para os tecidos, à mioglobina para reserva de oxigênio nos músculos e ao citocromo c responsável pelo transporte de elétrons, 15% do heme é produzido nos hepatócitos, e 80% são usados para a produção de diferentes citocromos (Nelson et al., 2004). Ainda, constituem grupos bioquímicos chave nas enzimas respiratórias, responsáveis pelo transporte de oxigênio, de elétrons, e pelo sistema do citocromo P450 (Zhang e Sessoms, 2011) e desenvolvimento de células eritróides na medula óssea (Besur et al., 2014).

1.2 História da porfiria

A primeira descrição de porfiria é atribuída ao médico e filósofo Hipócrates na Grécia antiga, que descreveu alguns sintomas em uma paciente de natureza provavelmente neurológica e psiquiátrica: crises convulsivas, sensação de terror, diminuição do nível de consciência associados à febre e eliminação de urina

escurecida. A palavra porfiria é oriunda do grego “*porphyrus*” que tem como significado “cor púrpura” (Rimington, 1993).

Através de relatos médicos antigos e outros documentos particulares e públicos, foram possíveis o pós-diagnóstico de porfiria nas famílias reais escocesa, inglesa e portuguesa. Alguns historiadores têm especulado que o rei George III da Inglaterra (1738-1820) sofria de porfiria variegada. Segundo relatos, este começou a sofrer ataques agudos com dor abdominal, vômito, taquicardia, urina escura e episódios de distúrbio mental. Há também relatos de que outros membros da família real britânica apresentavam sintomas semelhantes (McAlpine e Hunter, 1966; American Porphyria Foundation, 2016).

Outro relato é o do pintor Vincent van Gogh (1853-1890), cuja insanidade fez-lhe cortar a própria orelha, apresentava períodos de extrema criatividade intercalados por episódios de uma doença debilitante, provavelmente saturnismo, ou seja, intoxicação por chumbo que tem mecanismos compartilhados com as porfirias congênitas. Esta última condição era exacerbada por má nutrição, trabalho intenso e abuso de álcool, particularmente na forma de absinto, bebida, muito popular no século XIX na França, que continha um grau elevado de álcool (74%) e uma variedade de óleos essenciais (Loftus e Arnold, 1991).

Somente em 1874, o bioquímico Felix Hoppe Seyler descreveu bioquimicamente a porfiria. Nesse mesmo ano o médico alemão J.H. Schultz relatou um homem que sofria de sensibilidade de pele, aumento do baço e urina avermelhada desde que ele era uma criança, constituindo a primeira descrição de protoporfiria (History of Porphyria, 2015; American Porphyria Foundation, 2016).

A primeira descrição de porfiria aguda como uma síndrome clínica foi em 1889 por Joseph Stokvis, após a administração de sulfona I (sulfonmethane), uma droga

que tinha sido introduzida como um hipnótico. Uma epidemia de porfirinúria, na Europa, na década de 1890, estimulou os estudos clínicos de porfiria (Stokvis, 1889).

Gunther (1911) classificou as porfirias, incluindo a porfiria eritropoiética congênita, a mais rara, que ele chamou de hepatoporfiria congênita. Dois anos depois, Friedrich Meyer Betz injetou em si próprio hematoporfirinas para determinar o impacto fotodinâmico. Em seguida, se expôs ao sol e o efeito da fotosensibilização foi extremamente doloroso, perdurando por vários meses. A. E. Garrod em seu manuscrito "Erros Inatos do Metabolismo" reconheceu que a "hematoporfiria" era um problema metabólico hereditário (Dronamraju, 1992). A porfiria eritropoiética foi identificada, e foi a primeira vez que o termo "erros inatos de metabolismo" foi utilizado em 1923 para um grupo de doenças metabólicas hereditárias. Com o avanço dos estudos em metabolismo, em 1930 Hans Fischer ganhou o prêmio Nobel com a descrição do grupo bioquímico heme (History of Porphyria, 2015).

Em 1937, Jan G. Waldenstrom sugeriu que as doenças do metabolismo das porfirinas deveriam ser denominadas porfirias em vez de hematoporfiriase. Neste mesmo ano ele publicou na Suécia os achados sobre a porfiria aguda intermitente (PAI). Waldenstrom identificou 103 pacientes com porfiria aguda através de testes de urina e observando a cor vermelha. Descobriu que os familiares assintomáticos desses pacientes também tinham a mesma reação se ingerissem, mesmo em pequenas quantidades, barbitúricos e sulphonal (Waldenstrom, 1987).

Entre 1940 a 1960, vários estudos de porfiria na Europa e EUA foram desenvolvidos para diagnóstico e tratamento, e nos dias atuais as técnicas de biologia molecular começam a ser usadas para identificar as mutações e engenharia genética no tratamento (History of Porphyria, 2015; American Porphyria Foundation, 2016).

1.3 Folclores e mitos

A porfiria tem sido implicada na origem dos mitos dos vampiros e lobisomens pelas similaridades entre suas manifestações clínicas e o folclore. A porfiria cutânea tarda e a Protoporfiria X apresentam-se clinicamente como uma hipersensibilidade da pele à luz, levando à formação de lesões, cicatrização e desfiguração. Também provoca anemia, palidez e hipersensibilidade à luz solar, que são características do mito do vampiro. As desfigurações em casos mais avançados, acompanhados de distúrbios mentais poderiam ter levado também ao mito do lobisomem (Lorenzo, 2014).

Existem relatos que no passado, antes da descrição científica da doença, o tratamento básico para a porfiria era feita através da sangria: método de medicina medieval que consistia em fazer uma punção da veia para retirada do que era considerado “sangue ruim”. O procedimento era realizado através de uma secção em uma veia com a inserção de um cateter (Tecchio, 2013).

Outro tipo de tratamento da época era a ingestão de carne crua e sangue fresco pelos vitimados pela doença. Acreditava-se que ao se consumir grandes quantidades de sangue e carne, a doença seria retardada ou mesmo curada por completo. Pacientes com perturbações mentais poderiam atacar outras pessoas para tentar beber seu sangue e existem até mesmo casos de canibalismo realizados por pessoas vitimadas pela porfiria (Lorenzo, 2014).

1.4 Classificação das porfirias

As porfirias são classificadas dependendo do local primário da superprodução e acúmulo de precursores. O ácido delta-aminolevulínico (ALA) e porfobilinogênio (PBG) são precursores acumulados em porfirias chamadas de hepáticas agudas com acúmulo no fígado. Porfirias eritropoiéticas ocorrem principalmente nas células da medula óssea (Balwani & Desnick, 2012), com as manifestações clínicas neurovisceral e/ou cutânea (Besur et al., 2014). Porém, não há uma única classificação simples de porfirias e as diferentes características clínicas podem ser semelhantes. As porfirias hepáticas chamadas de porfirias agudas ou induzidas incluem: porfiria aguda intermitente (PAI), coproporfiria hereditária (CPH), porfiria variegata (PV) e porfiria devido à deficiência grave de ALA desidratase (ALAD). As porfirias hepáticas crônicas são porfiria cutânea tardia (PCT) e porfiria hepatoeritropoiética (HPE), (Siegesmund et al., 2010) (**tabela 1**).

Tabela 1 - Classificação das Porfirias

Porfirias	Genética	Deficiência enzimática	Local de expressão metabólica
Porfirias agudas: <i>Porfirias produzindo sintomas neurológicos</i>			
Porfiria aguda intermitente	Autossômica dominante	PBG deaminase	Fígado
Deficiência de ALA desidratase	Autossômica recessiva	ALA deaminase (PBG sintase)	Fígado
<i>Porfirias produzindo manifestações neurológicas e cutâneas</i>			
Porfiria variegata	Autossômica dominante	PROTO-XIDASE	Fígado
Coproporfiria hereditária	Autossômica dominante	COPRO-XIDASE	Fígado
Porfiria cutânea eritropoiética: <i>Porfiria com lesões cutâneas</i>			
Porfiria congênita eritropoiética	Autossômica recessiva	Uroporfobilinogêneo (URO) III sintase	Células eritropoiéticas
Porfiria cutânea tardia	Esporádica e autossômica dominante	URO descarboxilase	Fígado
Protoporfiria eritropoiética	Autossômico dominante	Ferroquelatase	Células eritropoiéticas e fígado.
Porfiria hepatoeritropoiética	Autossômica recessiva	URO descarboxilase	Células eritropoiéticas e fígado.

Adaptado de Siegesmund et al., 2010.

1.5 Biossíntese do grupo heme

A biossíntese do grupo heme ocorre principalmente na medula óssea e no fígado. Envolve diversas enzimas, algumas das quais são fabricadas na mitocôndria e algumas no citoplasma (**figura 1**) (Nelson et al., 2004).

No interior das mitocôndrias, na matriz mitocondrial, as reações são principalmente de oxirredução, enquanto que no citoplasma ocorrem as condensações, normalizações e descarboxilações. Na mitocôndria, a enzima

succinilCoA e o aminoácido glicina (Gly) se juntam através atividade da ácido deltaaminolevulinico sintetase (ALAS). A enzima ALAS é limitante da velocidade de síntese. Atuando com menos atividade do que as outras enzimas sintéticas da via e controla a velocidade do fluxo de produção do anel do heme. Em contrapartida, o gHEME sintetizado retro-inibe diretamente a atividade da ALAS, o que regula a via de produção. A primeira fase de síntese de heme é resultante de um mecanismo de “feedback” negativo, ou seja, quanto maior a concentração de heme, maior será a inibição de ALAS e da via biossintética correspondente (Zhang e Sessoms, 2011).

ALA é liberado para o citoplasma saindo da mitocôndria através das membranas mitocondriais. Após uma série de etapas enzimáticas citosólicas, cujas deficiências constitutivas podem gerar diferentes padrões de porfirias (**tabela 1**), ocorre a quelação de protoporfirina com ferro II para formar o heme catalisado pela enzima ferroquelatase, (Zhang e Sessoms, 2011; Layer et al., 2010) (**figura 1**).

1.6 Regulação e produção na biossíntese do heme pela ALAs

A enzima ALAs encontra-se em todos os tipos celulares e especialmente nos hepatócitos como isoforma ALAS1 e uma isoforma que atua no desenvolvimento de eritrócitos como ALAS2. A regulação da síntese do heme pode ser feita por feedback negativo de intermediários e outros agentes, mas a regulação também é feita em maior parte pelo heme, através um apo-repressor que regula e inibe a transcrição de genes para ALAs (Malik et al., 2014)

O aumento dos níveis hepáticos da ALAS1 é induzido pela atividade reduzida da PBG deaminase como etapa limitante, o que resulta no acúmulo dos precursores de porfirina e elevados níveis de ALA e PBG (Strand, et al., 1970; Meyer, et al., 1972;

Anderson, et al., 1990; Anderson, et al., 2001 Bissell et al., 2015). O acúmulo de ALA ocorre também na inibição da enzima sintetase pela succinilacetona

(Karbownik & Reiter, 2002).

A produção de ALAS pode ser estimulada causando vários '*ataques*' agudos de porfiria. Entre os estímulos à síntese de ALA, podemos destacar o jejum prolongado e o uso xenobióticos. Sob condições de jejum prolongado, os níveis de glicose intracelular caem, uma vez que esses estão inseridos no metabolismo que regula a expressão de genes, que por sua vez, na sua ausência pode aumentar a transcrição de ALAS1 (Scassa et al., 2001, Scassa et al., 2004). Por isso o tratamento recomendado para atenuar a gravidade dos ataques de porfiria aguda é infusão de glicose. Já drogas ou substâncias químicas de metabolização hepática podem estimular a transcrição do gene ALAS1 induzindo a crises agudas de porfiria (Besur et al., 2014).

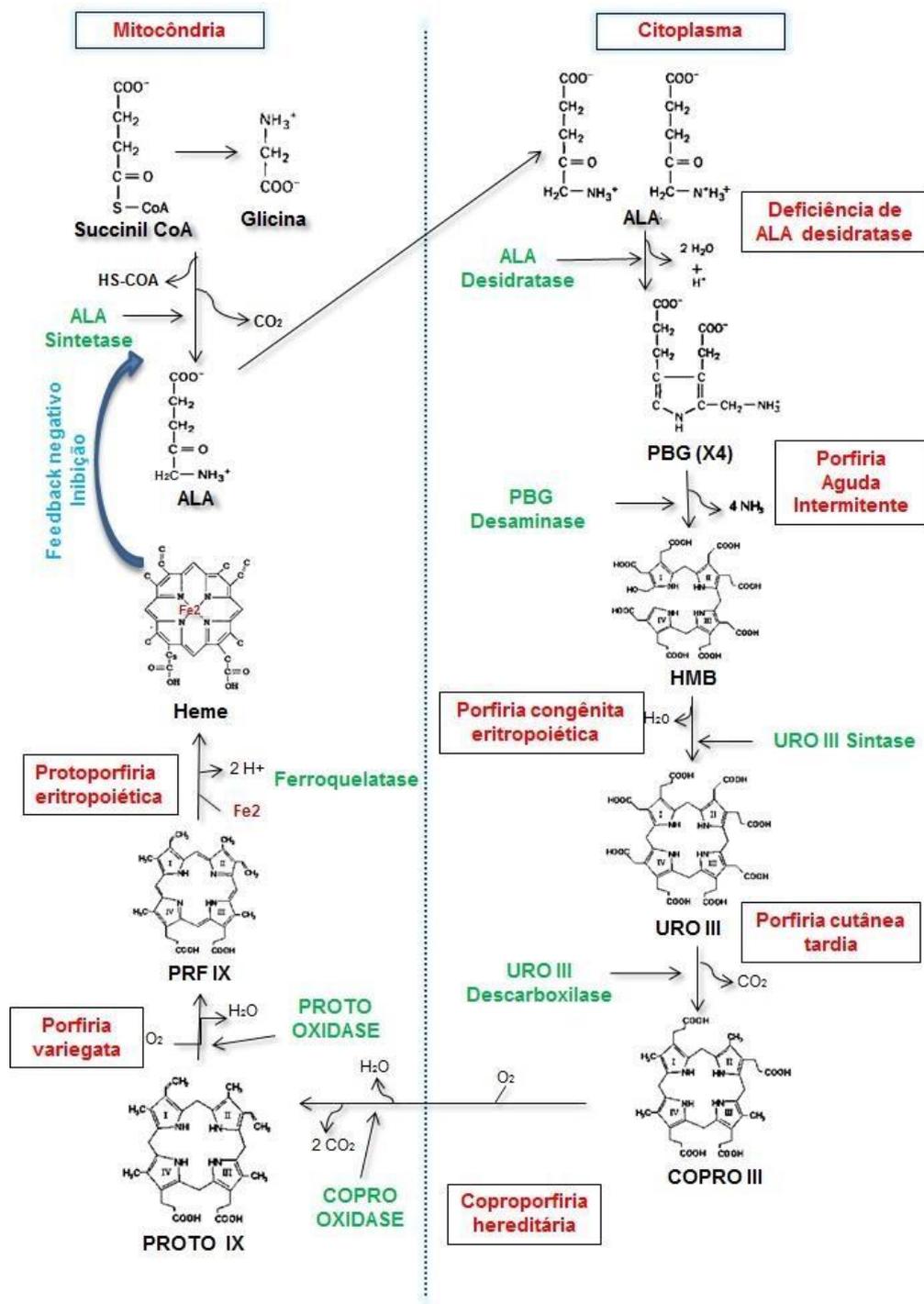


Figura 1 – Via da biossíntese do heme: enzimas envolvidas (verde) e as porfirias envolvidas (vermelho). (ALA) ácido delta-aminolevulinico; (PBG) porfobilinogênio; (HMB) hidroximetilbilano; (URO) uroporfirinogênio; (COPRO) coproporfirinogênio; (PROTO) protoporfirinogênio; (PRF) protoporfirina; Adaptado de Zhang e Sessoms, 2011 e Karim, et al., 2015.

1.7 Porfiria Aguda Intermitente (PAI)

Entre todas as porfirias, a PAI é a mais comum. É considerada rara, pois ocorre em uma a duas pessoas a cada 100 mil habitantes e com prevalência aumentada na Europa, principalmente na Suécia. Ocorre em ambos os sexos, mas é maior a prevalência em mulheres de 20 a 40 anos, cujas crises álgicas estão muitas vezes ligadas aos ciclos menstruais e curiosamente mulheres gestantes não sofrem ataques severos (Kauppinen e Mustajoki, 1992).

As crises agudas estão relacionadas a fatores ambientais, estresse, variação hormonal, drogas, infecção, jejum e na tirosinemia hereditária, que tem como produto a succinilacetona e culmina em acúmulo de ALA, sendo importante agente iniciante (Moore, 1980; Moore e Disler, 1983).

As características comuns dos ataques são dor abdominal aguda (95%), taquicardia (60%), hipertensão (40%), obstipação (60%), neuropatias (60%) e mudanças comportamentais (50%) (Hindmarsch, 1986; Bissell et al., 2015). Manifestações neurológicas incluem paresia e neuropatia periférica: na crise grave a fraqueza muscular progride rapidamente para quadriparesia e insuficiência respiratória aguda, dificuldade em engolir, delírio e convulsões, especialmente se o diagnóstico não for correto (Besur et al., 2014; Bissell et al., 2015). Paralisia residual, hipertensão, e insuficiência renal são sequelas em longo prazo (Hindmarsch, 1986). Outra complicação rara, mas grave, é o hepatocarcinoma (Schneider-Yin, 2015).

O diagnóstico laboratorial é a investigação urinária de PBG qualitativo ou semi-quantitativo, e quando em alta concentração, o diagnóstico é de PAI, confirmada através da medição quantitativa de ALA e PBG (Puy, 1997). Quando a excreção urinária de ALA (em mg/g de creatinina) excede a de PBG, deve-se realizar um diagnóstico alternativo, como outras porfirias, envenenamento por chumbo ou

tirosinemia hereditária para verificar qual tratamento seguir (Bonkovsky e Barnard, 1998; Hahn e Bonkovsky, 1998). Na confirmação de PAI, realiza-se a análise genética de PBG deaminase e a identificação de outros portadores da mutação na família. O tratamento geralmente é com ingesta de carboidratos, analgésicos opiáceos e fenotiazinas. Em crises moderadas a graves de PAI, o heme intravenoso é o tratamento de escolha na forma de hematina: este reduz a atividade do ALAS1 resultando na rápida diminuição do excesso de produção hepática de ALA e PBG (Besur et al., 2014). Quando os ataques são recorrentes e a evolução para cirrose acontece, faz-se necessário o transplante hepático (Seth et al., 2007, Soonawalla et al., 2004).

1.8 Manifestações neuropsiquiátricas da PAI

O mecanismo exato pelo dano neurológico da PAI não está completamente esclarecido. Várias hipóteses, incluindo níveis elevados de ALA, defeitos de síntese do heme no tecido neural e níveis elevados de triptofano e serotonina têm sido propostos como possíveis causas para as manifestações neuropsiquiátricas durante os '*ataques*' de porfiria aguda. Os achados favorecem ALA (ou um metabólito do ALA) atuando como uma neurotoxina (Bonkovsky et al., 1998; Puy et al., 2010; Besur et al., 2014).

Os sintomas neuropsiquiátricos que podem ocorrer nos indivíduos com PAI mostram-se como desordens de humor, agressividade, alucinações, convulsões, dificuldade progressiva de memória e concentração (Sassa e Kappas, 1983). Não está bem estabelecido o mecanismo como o ALA é transportado para o cérebro, embora há relatos de que ALA alcança o cérebro pelo transporte facilitado de transportadores de aminoácidos/peptídeos na barreira sangue/cérebro (Ennis et al., 2003). A

toxicidade devido ao aumento da concentração do ALA no cérebro induz convulsões e envolve também vias glutamatérgicas, uma vez que o ALA inibe irreversivelmente a captação de glutamato em astrócitos através da inibição da proteína GLT-1 (i.e.; transportador de glutamato) (Emanuelli et al., 2003). Receptores de GABA tem sua capacidade de ligação alterada por ALA (Demasi et al., 1996), que atua funcionalmente como um antagonista de GABA (Pierach e Edwards, 1978) para também estimular a liberação de glutamato (Brennan e Cantrill, 1979). Estes sugerem que o ALA pode estar envolvido na morte celular neuronal devido o influxo de cálcio (Choi, 1994).

Monteiro e colaboradores (1986) foi o primeiro a sugerir que o ALA age como um pró-oxidante endógeno, cuja oxidação é catalisada por ferro em um pH fisiológico, levando à produção de espécies reativas de oxigênio e de ácido 4,5dioxovalérico (DOVA) (**figura 2**).

Relatórios anteriores indicam que o ALA pode perturbar a função de receptores GABA-A e organelas neuronais através oxirradicais formados durante a oxidação de ALA (Demasi et al., 1996). ALA pode de fato desempenhar um papel significativo nas manifestações neuropsiquiátricas dessas síndromes, tendo em vista que promove liberação de ferro de ferritina (Oteiza et al., 1995), e agrava a lesão oxidativa.

1.9 Manifestações disautonômicas em PAI

As manifestações disautonômicas são sintomas ou sinais clínicos derivados de um funcionamento anormal do sistema nervoso simpático e parassimpático em funções como a respiração, circulação, batimentos cardíacos, digestão, pressão arterial e temperatura do corporal.

Em meados dos anos 60 e 70 não eram totalmente esclarecidas as causas da disautonomia na PAI, (Ridley et al., 1968; Waldenstrom e Haeger-Aronsen, 1963).

Hoje já se sabe que os sintomas são atribuíveis à neuropatia autonômica onde sugere uma alta vulnerabilidade dos nervos autonômicos para acúmulo anormal de metabolitos tóxicos, levando os indivíduos a quadros de taquicardia, bradicardia e arritmias, além de hipertensão seguida de episódios de hipotensão (Nabin et al., 2013). A taquicardia é devida a uma disfunção na atividade do sistema Simpático e devido a danos vagal e a hipertensão é o resultado de deafferentação dos barorreceptores, devido a dano vagal e nervo glossofaríngeo (Pischik, e Kauppinen, 2009).

De acordo com Thachil (2008), estudando a depleção de óxido nítrico na porfiria e supôs que este tem contribuindo para as manifestações clínicas, uma vez que, o óxido nítrico é um regulador do músculo liso e tônus de vasomotor: desempenhando deste modo um papel central na regulação da pressão arterial, defeitos na regulação neuronal de óxido nítrico sintase podem levar a vaso espasmo ou hipertensão e alguns dos efeitos cerebrais na porfiria.

1.10 ALA como um pro-oxidante endógeno

A patogênese das manifestações clínicas e lesões em tecidos nervoso central (i.e.; levando a alteração comportamental) e periférico (i.e; repercutindo na disautonomia dolorosa e hemodinâmica) tem como base o acúmulo de ALA e este sendo um agente pro-oxidante. O ALA atua como um pro-oxidante pela enolização e conseqüentemente ocorre a reação por oxidação pelo oxigênio molecular com formação do radical enoil ALA^{\bullet} , enquanto oxigênio é reduzido a ânion radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ e junto com o ALA^0 podem difundir-se na cadeia de reação. A oxidação

de ALA[•] produz a imina de ALA (ALA_{imino}) que, após hidrólise, produz DOVA e NH₄⁺ em quantidades estequiométricas em relação ao O₂ consumido, enquanto O₂^{•-} pode sofrer dismutação ou redução a H₂O₂ (Bechara, et al., 1993; Onuki et al., 2002) (**figura 2**).

Bechara e colaboradores (1993) demonstraram experimentalmente tanto *in vitro* como *in vivo* que o ALA é de fato capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e DOVA, os quais são capazes de oxidar várias biomoléculas e estruturas biológicas: 1) a oxidação do ALA ocorre no cérebro, músculos e fígado de portadores de porfirias e *in vitro*, compromete estrutura e função tanto de proteínas quanto de lipossomos, mitocôndrias, sinaptossomas e DNA, além de provocar liberação de ferro de ferritina e ativar a proteína reguladora de ferro IRP-1. 2) *in vivo*, em ratos injetados com ALA ou com o éster metílico da succinilacetona (SAME, um forte inibidor da ALA desidratase), ALA mobiliza ferro para o fígado e para o cérebro, degrada mitocôndrias do fígado e dos músculos, peroxida membranas de vários tecidos, modifica receptores iônicos gabaérgicos e induz a biossíntese de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase). Já o DOVA, produto final de oxidação do ALA, promove a substituição de um átomo de hidrogênio nas bases do DNA assim como outros derivados carbonílicos, tais como malondialdeído, acetaldeído e metilglioxal. Segundo Douki, Bretonniere e Cadet (2000), DOVA atua como um eficiente agente alquilante de resíduos de guanina do DNA. Foi sugerido que a primeira etapa da alquilação do DNA envolve a formação de uma base de Schiff entre o amino grupo N₂ da 2'-deoxoguanosina (dGuO) e a carbonila do DOVA (Costa et al., 1997; Rocha et al., 2003; Onuki et al., 2002; Bechara, 2006).

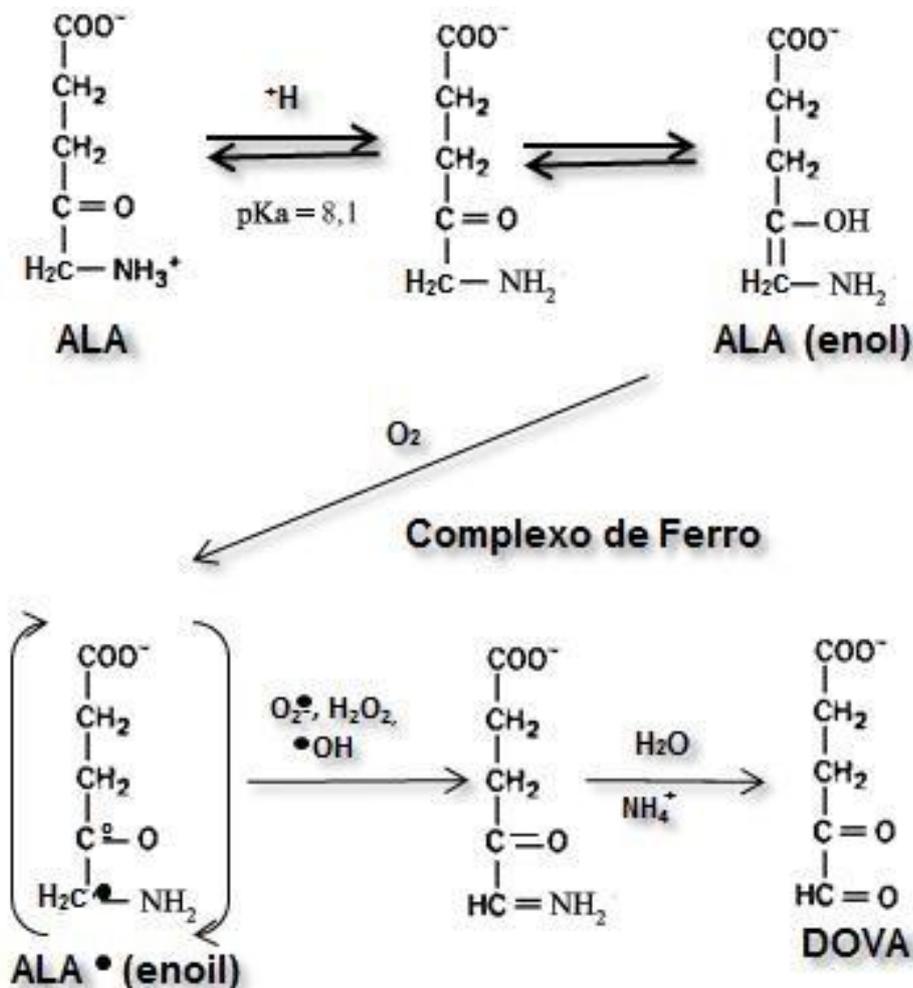


Figura 2 – Oxidação do ALA e geração de ROS e DOVA. Adaptado de Onuki e colaboradores, 2002.

1.11 Modelos animais de porfirias

Estudos de porfiria conduzidos com modelos animais partem da premissa de que, nestes as respostas às alterações bioquímicas seguem as características neuropatológicas semelhantes aos observados nos seres humanos (Yasuda et al., 2010). A porfiria reproduzida experimentalmente baseia-se no tratamento de animais com injeção intraperitoneal de ALA sintetizado (McGillion, Thompson e Goldberg, 1975) e também o tratamento com ester metil succinilacetona (SAME) que inibe a ALA desidratase (Rocha et al., 2000). A administração aguda de altas doses de ALA promove em animais efeitos excitatórios transientes e mudanças comportamentais.

Ratos deficientes em PBG deaminase (PBGD) (Lindberg et al., 1996), apresentam características bioquímicas de PAI bem como o aumento da excreção urinária de ALA e desenvolvem neuropatias periféricas muito semelhantes às porfirias agudas humanas sugerindo que a deficiência de heme e a consequente disfunção de hemeproteínas poderiam ser as causas dessas neuropatias (Lindberg et al., 1999). Jover e colaboradores (2000) relataram uma diminuição da atividade e dos níveis de RNA mensageiro do citocromo P450 nesses ratos deficientes em PBGD, induzida por fenobarbital. O fenobarbital é um importante indutor da expressão ALAS1, aumentando os níveis de ALA (20 a 30 vezes) e PBG (40 a 90 vezes) superior no plasma, imitando a patologia em '*ataques*' humanos (Yasuda et al., 2014).

ALA também exerce um papel pro-oxidativo *in vivo*: ratos tratados com ALA cronicamente sofreram alterações metabólicas, enzimáticas e fisiológicas, indicando o aumento do metabolismo glicolítico associado ao dano mitocondrial do fígado e do músculo esquelético estriado; o efeito pro-oxidante do ALA também foi demonstrado em tecido cerebral de ratos (Pereira et al., 1992). Após duas semanas de tratamento com ALA (40 mg/kg peso corporal) vários parâmetros indicadores de estresse oxidativo apresentaram níveis aumentados: atividade de superóxido dismutase (CuZnSOD), quantidade de ferro total, ferritina, carbonilas proteicas e captação de Ca²⁺ por sinaptossomas corticais (Pereira et al., 1992).

Rocha e colaboradores (2000) relataram que ratos tratados com SAME apresentaram aumento do nível plasmático de ALA, do nível de ferro livre no fígado e no cérebro. A mobilização de ferro também foi indicada pelo aumento de ferro plasmático e da saturação da transferrina no plasma. Aumento no nível de ferritina no fígado também ocorreu. Foram evidentes também indicações do estresse oxidativo

como o aumento dos níveis de carbonilas proteicas reativas no fígado, aumento de produtos de lipoperoxidação e da atividade de CuZnSOD no cérebro (Ames et al., 1995).

O uso de animais geneticamente modificados ajudou a demonstrar uma similaridade dos distúrbios bioquímicos e as características patológicas da neuropatia periférica da PAI em humanos (Onuki et al., 2002). Alguns modelos animais já foram desenvolvidos em laboratório, como para porfirias eritrocitárias e hepáticas como a PCT (De Verneuil et al., 1995; Lindberg et al., 1996; Phillips et al., 2001; Onuki et al., 2002). Em modelos experimentais de PAI, foram criados em laboratório camundongos transgênicos: C57BL/6-PBGD^{tm1(neo)Uam} descritos como (T1), que são animais homocigóticos: PBGD -/- com perda de 55,3% da atividade de PBGD no fígado e perturbações bioquímicas subsequentes; C57BL/6PBGD^{tm2(neo)Uam} (T2) heterocigóticos são animais PBGD +/- com perda de 56,6% da atividade de PBGD, também com perturbações bioquímicas subsequentes; e o cruzamento dos camundongos T1 com o T2 que forma um heterocigoto composto com perda de 30,7% da atividade de PBGD também no fígado. As alterações bioquímicas na via do heme nestes animais demonstraram deficiências motoras e achados histológicos em tecido neural de longo prazo com a idade (Vaquer et al., 2013). Destes vários modelos animais de porfirias e suas aplicabilidades, resta a exploração fina e bem detalhada das manifestações neuroautônômicas e neuropsiquiátricas com implicações para a evolução e manejo clínico.

2 DIVISÃO DOS ESTUDOS

Para facilitação a compreensão foi prudente dividir esta dissertação em dois estudos, utilizando-se de dois modelos experimentais afim de avaliarmos as alterações neuropsiquiátricas centrais e hemodinâmicas por disautonomia:

Estudo 1: Neste estudo verificamos e quantificamos as alterações comportamentais e dor neuropática em camundongos, onde buscamos explorar o comportamento social destes animais através de paradigmas comportamentais, quantificar a sensibilidade dolorosa como parte da lesão neuropática descrita nas crises porfíricas.

Estudo 2: Para se identificar e mensurar a disautonomia com a disfunção do sistema nervoso autônomo: simpático ou parassimpático e determinar as alterações hemodinâmicas utilizou-se ratos, pois este modelo animal permitiu um melhor acesso aos parâmetros hemodinâmicos devido ao seu tamanho e anatomia.

3 JUSTIFICATIVA

Em função da demonstração experimental ainda insuficiente na fenomenologia dos efeitos crônicos e de regulação do acúmulo do ALA tecidual no paralelo dos sintomas clínicos em pacientes com porfirias e aproveitando a versatilidade e caracterização prévia do modelo animal de PAI com o tratamento crônico de ALA em altas doses, novos estudos são necessários para compreender de forma aprofundada os distúrbios neuropsiquiátricos (i.e.; mudanças de perfil e expressão do comportamento social) e a disautonomia (i.e.; dor visceral e disfunção de parâmetros hemodinâmicos). Esse projeto visa facilitar uma melhor compreensão fenotípica tecidual e comportamental para propiciar ainda que indiretamente o avanço médico e de saúde na evolução e seguimento de indivíduos afetados com porfiria.

ESTUDO 1
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

4 OBJETIVO

O objetivo geral foi verificar e avaliar o comportamento social de camundongos machos e fêmeas inoculados com ALA quando comparados com os animais-controle através da investigação de paradigmas comportamentais quantificáveis e específicos de forma concatenada.

4.1 Objetivos Específicos

- Comparar comportamento exploratório e ansioso em camundongos através dos testes de campo aberto e '*marble burying*';
- Avaliar e comparar a sensibilidade dolorosa dos animais inoculados com ALA e controle, utilizando a hiperalgesia mecânica com o teste de Von Frey;
- Conferiremos o nível de agressividade dos animais machos pelo paradigma residente-intruso;
- Determinaremos as fases do ciclo estral e verificar se existe influência do ciclo estral no comportamento social observado, bem como níveis de hiperalgesia apresentados pelas fêmeas nesta avaliação.

5 METODOLOGIA

Foram utilizados 83 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, sendo 60 machos e 24 fêmeas, com 60 dias de idade.

Os grupos experimentais:

Grupo 1a: Machos inoculados intraperitoneal com 40,8 mg de ALA (n=15);

Grupo 1b: Machos inoculados intraperitoneal com água ultrapura (n=15). Para o teste de residente-intruso utilizamos (n=30) machos sem qualquer manipulação.

Grupo 2a: Fêmeas inoculadas intraperitoneal com 40,8 mg de ALA (n=12);

Grupo 2b: Fêmeas inoculadas intraperitoneal com água ultrapura (n=12).

Os animais foram inoculados com cloridrato de ácido 5-aminolevulinico (ALA.HCl) com aproximadamente 98% de pureza adquiridos com a Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA). Aplicamos 40,8 mg/kg, durante 30 dias, 3 vezes por semana em dias alternados. A solução foi preparada ajustando o pH entre 7 e 8, utilizando uma solução salina de hidróxido de sódio NaOH e mantida a – 20 °C até à sua utilização. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada Milli Q da Millipore.

Os camundongos foram mantidos em salas separadas (macho e fêmeas) próprias e em gaiolas (30 x 20 x 13 cm) em condições controladas de umidade e temperatura (22 ± 1°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas e a comida e água ad libitum. Todos os experimentos foram realizados mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEUA AN0012/2015).

5.1 Modelo experimental com camundongos C57Bl/6

Após os 30 dias de inoculação, submetemos os camundongos aos paradigmas comportamentais seguindo uma ordem metodológica, evitando qualquer interferente no comportamento. Obedecemos a sequência: campo aberto (CA), 'marble Burying', teste de pressão crescente nas patas (Von Frey eletrônico) e agressividade ofensiva (figura 3). Nas fêmeas antes de cada teste, verificamos as fases do ciclo estral.

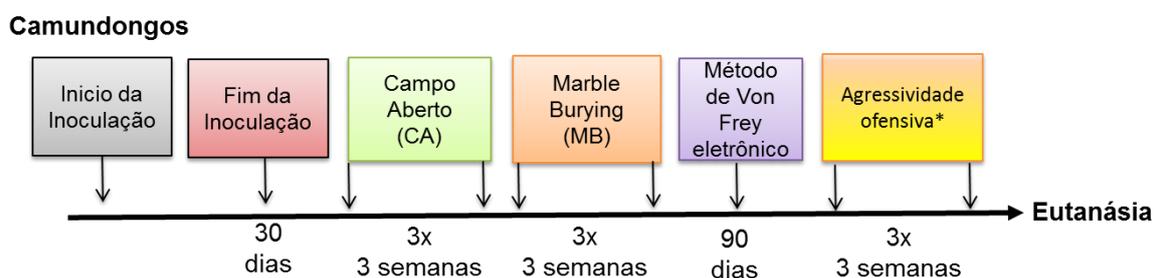


Figura 3 – Cronograma experimental. *teste realizado somente em machos.

5.1.1 Paradigmas comportamentais

5.1.1.1 Campo aberto

Os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto para determinar a atividade exploratória e a movimentação espontânea. Durante 5 minutos cada camundongo era posicionado na parte central da arena circular com 12 quadrantes, 30 cm de diâmetro por 30 cm de altura da Scienlabor® (figura 4). O comportamento foi monitorado através de filmagem com um *tablet* Samsung Galaxytab II® e posteriormente os dados tabulados e quantificados e quantificado com auxílio do software OPEN FLD.

Cada animal desempenhou 3 vezes o teste, uma vez por semana. Determinamos os tipos de movimentações, como ato de levantar-se com as patas traseiras, tempo na periferia (figura 5), tempo no centro, exploração ou imobilidade.



Figura 4 – Campo aberto circular com 12 quadrantes, 30 cm de diâmetro por 30 cm de altura.



Figura 5 – Camundongo na periferia do campo aberto.

5.1.1.2 'Marble burying'

É um paradigma utilizado para investigação do comportamento compulsivo, neofobia e ansiedade (Gyertyan 1995; Ho et al., 2002; Borsini, Podhorna e Marazziti, 2002). Para a realização, utilizamos uma caixa transparente, sendo aplicado 5 cm de maravalha, e após a aplicação de aproximadamente vinte pequenas esferas de vidro com cerca de um 1 cm no diâmetro, sendo formadas cinco fileiras com quatro esferas cada e com intervalos de aproximadamente 1,5 cm (Kedia e Chattarji, 2014).

Para a determinação do perfil de ansiedade, um camundongo foi posicionado no centro da caixa e permanece durante 30 minutos. Segue-se com a retirada do animal e o resultado pode ser analisado por um avaliador sem a ciência da condição experimental. Os dados tabulados foram a quantidade de esferas cobertas: mais esferas cobertas sugerem um grau ansioso maior. Para tal acesso de significado: a quantificação foi realizada através de vídeos com a análise das esferas cobertas durante o período de realização do teste, sendo atribuída a cobertura de 2/3 da esfera (Amadeo et al., 2014) (**figura 6 e 7**).

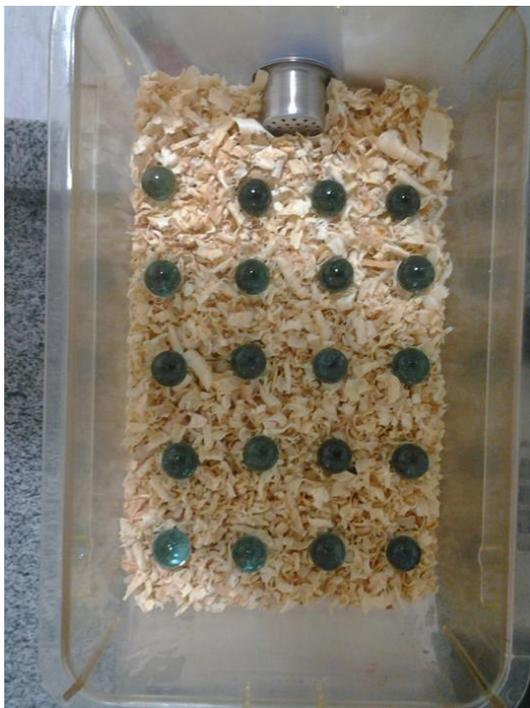


Figura 6 – Caixa com as 20 esferas **Figura 7** – Esferas cobertas para o teste de ‘*marble burying*’. mostrando a compulsão animal.

5.1.1.3 Agressividade ofensiva

O teste é realizado em camundongos, e escolhido como ultimo teste, uma vez que este pode causar algum dano ao animal interferindo assim nos outros parâmetros. Este teste consiste no pareamento de um camundongo macho ‘residente’ em relação

a um macho 'intruso' (i.e., o 'intruso' é escolhido randomicamente não tratado vindo de uma gaiola coletiva e colocado na gaiola do 'residente' controle e do inoculado com ALA), até a observância e documentação do tempo para o ataque do residente ao intruso. Todo o período do teste foi documentando e filmado com um *tablet* Samsung Galaxytab II® e com o tempo de observação estabelecido de 10 minutos por caixa, observando a latência para o primeiro ataque (minutos/segundos) e o tempo total de ataques, bem como a duração de cada ataque (minutos/segundos) e o número de ataques/ intervalos (segundos), (Ogawa et al., 1997; De Boer, 1999; Defensor et al., 2012; Kasten-Jolly et al., 2012; Weathington, Arnold e Cooke, 2012; Robinson, Penatti e Clark, 2012) (**figura 8**).

Para o desenvolvimento da técnica, as gaiolas foram trocadas de dois em dois dias para a garantia da estabilidade comportamental dos animais. Na semana que precede o teste, as gaiolas dos animais chamados residentes não são trocadas. Os machos residentes ficam em adaptação por 5 minutos, após esse período o animal intruso será colocado na gaiola do animal residente.

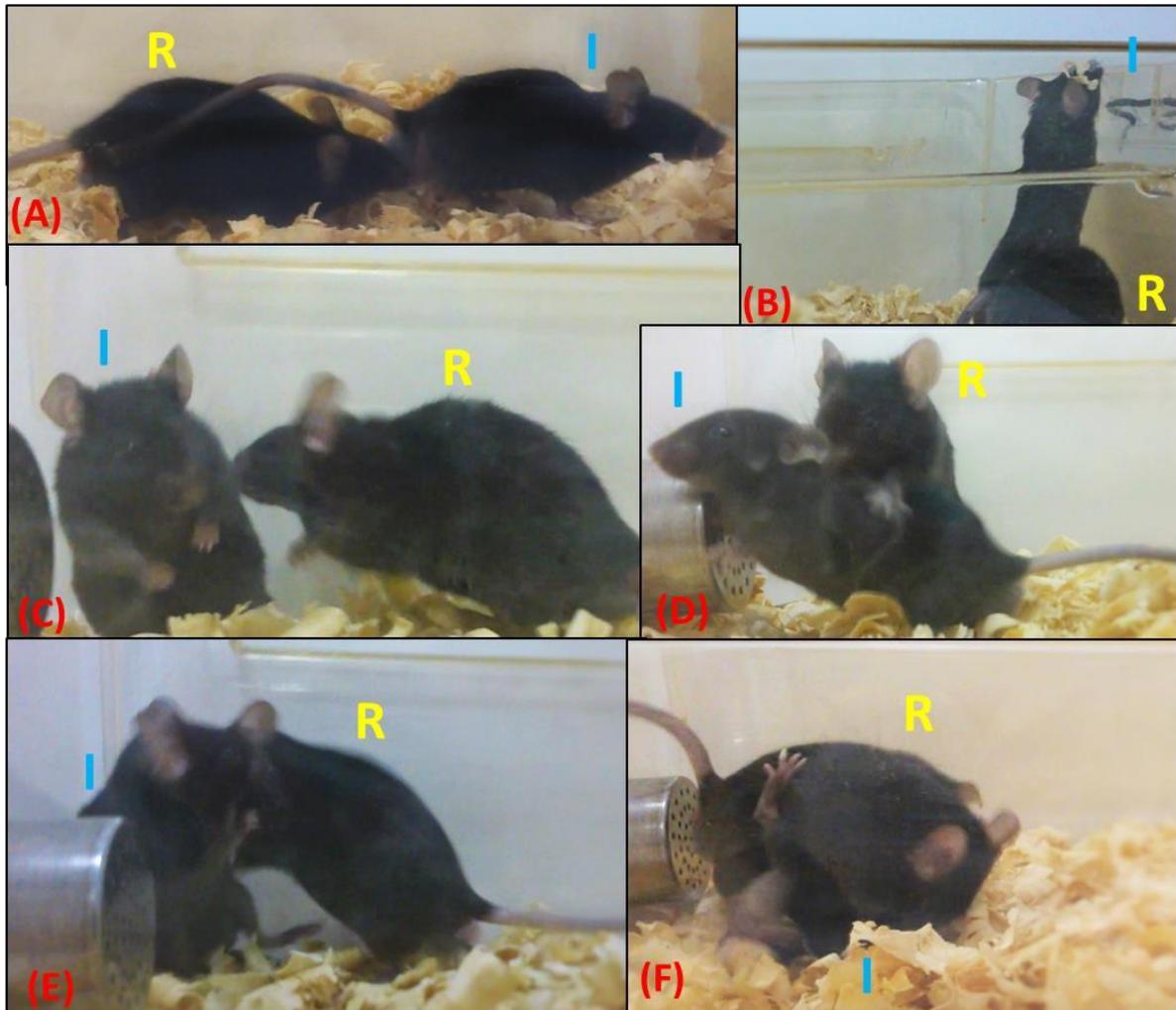


Figura 8- Padrão comportamental do teste de agressividade ofensiva. **(A)** Macho Residente **(R)** cheirando o intruso **(I)**; **(B)** tentativa de fuga do Intruso; **(C)** intruso na defensiva; **(D, E e F)** ataque do residente ao intruso.

5.1.2 Teste de Von Frey eletrônico.

Von Frey é um método para avaliarmos a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico (Vivancos et al., 2004). Este teste foi realizado em camundongos com auxílio de um analgesímetro digital da Insight® (gentilmente cedido pelo Professor Paulo de Tarso), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g (**figura 9**). O contato do transdutor de pressão à pata dos roedores será realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este.

Os animais são colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura da Insight©, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais e aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata dos roedores até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada (**figura 10**). Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata, (Cunha, 2004).



Figura 9 – Analgesímetro digital **Figura 10** – Caixa de contenção da Insight©.

com suporte para teste de

analgesímetro da Insight©.

5.2 Identificação da fase do ciclo estral

Nos grupos controle e inoculadas com ALA de fêmeas de camundongos, realizamos a identificação da fase do ciclo estral antes de cada análise com o intuito

de evitarmos qualquer influência da oscilação dos hormônios sexuais femininos nos resultados.

A secreção vaginal foi retirada com uma pipeta plástica com 5 µL de solução salina (NaCl 0,9%) introduzida superficialmente na vagina do camundongo fêmeas. Colocamos o fluido vaginal em uma lâmina de vidro para a observação do material em um microscópio óptico, nos aumentos de 10x e 40x. A caracterização da fase do ciclo estral foi baseada na proporção de três tipos de células da secreção vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

5.3 Eutanásia dos animais

Após as avaliações nos camundongos os animais de todos os grupos, serão eutanasiados através da superdose de quetamina 300 mg/kg e de xilazina 30 mg/kg e os órgãos serão pesados e congelados para futuras avaliações.

5.4 Análises estatísticas

Primeiramente verificamos a normalidade dos dados com o teste de *Kolmogovor e Smirnov*. Para os dados paramétricos, utilizamos a análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste *pos-hoc* de comparações múltiplas de *Turkey* ou análise de variância ANOVA de duas vias quando adequado. O nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi considerado e os dados expressos em números absolutos como média \pm erro padrão (SEM). Para os dados não paramétricos, aplicamos o teste de *Mann-Whitney* com nível de significância também de 5% ($p < 0.05$), os dados expressos em mediana. Para a análise dos resultados obtidos bem como a sua associação com os dados, utilizamos o software OriginPro versão

9.1.

6 RESULTADOS

A descrição dos resultados segue a ordem dos testes experimentais, uma vez que estes buscaram uma complementaridade. Os experimentos também ocorreram em dois ciclos ou 'rodadas', onde o primeiro estudo foi realizado no período de janeiro a abril de 2015 e o segundo no período de agosto a novembro de 2015. Pretendemos observar se haveria qualquer tipo de influência externa no comportamento dos camundongos como temperatura, umidade e sazonalidade e, assim, ter o efeito de reprimir ou mascarar o comportamento "padrão" dos camundongos.

Os dados apresentam-se como um comparativo dos animais controles e tratados com ALA. Os resultados contam ainda com tabelas e gráficos identificados sempre pelas cores: pretas para machos controle; cinza para fêmeas controle; azul para machos ALA; vermelho para fêmeas ALA.

6.1 Ciclo Estral

Ao realizarmos a identificação do ciclo estral, notamos que não houve alteração no ciclo pela administração do ALA, quando comparado com as fêmeas controle.

6.2 Campo Aberto

O teste de campo aberto é um paradigma usado para determinar a atividade exploratória e a movimentação espontânea. Desta maneira, buscamos determinar as taxas de ambulação e/ou permanência nos círculos (periféricos e centrais), uma vez que, a elevação da taxa de ambulação e as explorações de setores mais centrais tendem a indicar uma condição de menor resposta emocional de medo.

Nos grupos controles, tanto machos quanto fêmeas foram comparados quanto ao tempo gasto na periferia do campo aberto, por períodos diferentes. Através de ANOVA de uma via, os grupos controle-macho ($p=1,28 \times 10^{-1}$) e controle-fêmea ($p=4,74 \times 10^{-1}$) não são diferentes (**Tabela 2 e 3**).

Tabela 2 - Tempo de permanência na periferia do campo aberto em segundos, durante três semanas em dois estudos separados com camundongo macho-controle.

Grupo Controle Machos	Semana 1*	Semana 2	Semana 3
Estudo 1 (n= 7)	227 ± 5,7	254 ± 8,6	252 ± 10
Estudo 2 (n= 8)	239 ± 4,8	255 ± 5,8	277 ± 5,3

* $p=1,28 \times 10^{-1}$

Tabela 3 - Tempo de permanência na periferia do campo aberto em segundos, durante três semanas em dois estudos separados com camundongo fêmea-controle.

Grupo Controle Fêmeas	Semana 1*	Semana 2	Semana 3
Estudo 1 (n= 7)	222 ± 14	221 ± 7,5	247 ± 12
Estudo 2 (n= 8)	235 ± 12	215 ± 3,5	254 ± 6,6

* $p=4,74 \times 10^{-1}$

Uma vez que os grupos controle tanto machos quanto fêmeas são iguais, independente do grupo em cada estudo (i.e.; estudo 1 ou 2) quanto ao tempo de permanência na periferia do campo aberto, comparamos conjuntamente os grupos pelo tratamento ALA para cada sexo (ANOVA de uma via) durante a terceira semana. Escolhemos a terceira semana, pois os animais já estavam adaptados ao campo aberto. Observamos uma diferença no tempo gasto na periferia entre os camundongos-controle inoculados com solução salina versus os camundongos inoculados com ALA, tanto em machos (* $p=3,87 \times 10^{-9}$), quanto em fêmeas

($**p=2,96 \times 10^{-5}$) mostrando que o ALA age de algum modo nesses animais onde não permanecem por muito tempo na área periférica do campo aberto (**Figura 11**).

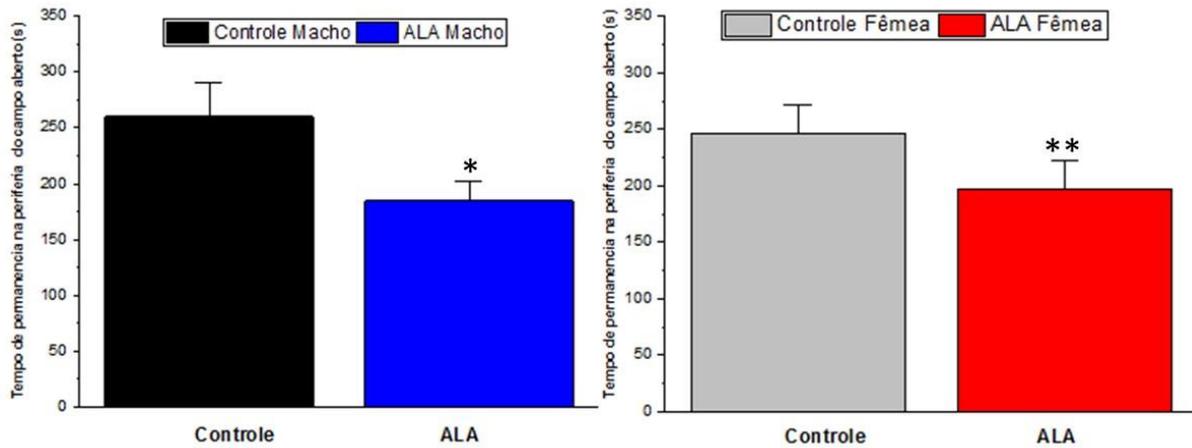


Figura 11 – Tempo de permanência na periferia do campo aberto em segundos para machos ($*p=3,87 \times 10^{-9}$) e fêmeas ($**p=2,96 \times 10^{-5}$).

Verificamos a taxa de ambulação dos camundongos com o deslocamento com a medida do cruzamento da periferia para o centro no campo aberto. Comparando os grupos de camundongos machos-controle, fêmeas-controle e machos ALA, fêmeas ALA, e notamos que os grupos de machos foram expressivamente mais ativos do que os dois grupos de fêmeas na atividade exploratória durante as três semanas de teste (ANOVA de uma via) ($*p=1,43 \times 10^{-7}$ e $**p=1,3 \times 10^{-3}$) comprovando nas **figuras 12 A e B**, pela atividade de locomoção no campo aberto. Quando comparados com os grupos controle versus ALA machos e controle versus ALA fêmeas (**figura 12 C e D**), os animais inoculados com ALA também se mostraram mais ativos que os controles ($***p=1,11 \times 10^{-16}$ e $****p=1,89 \times 10^{-5}$).

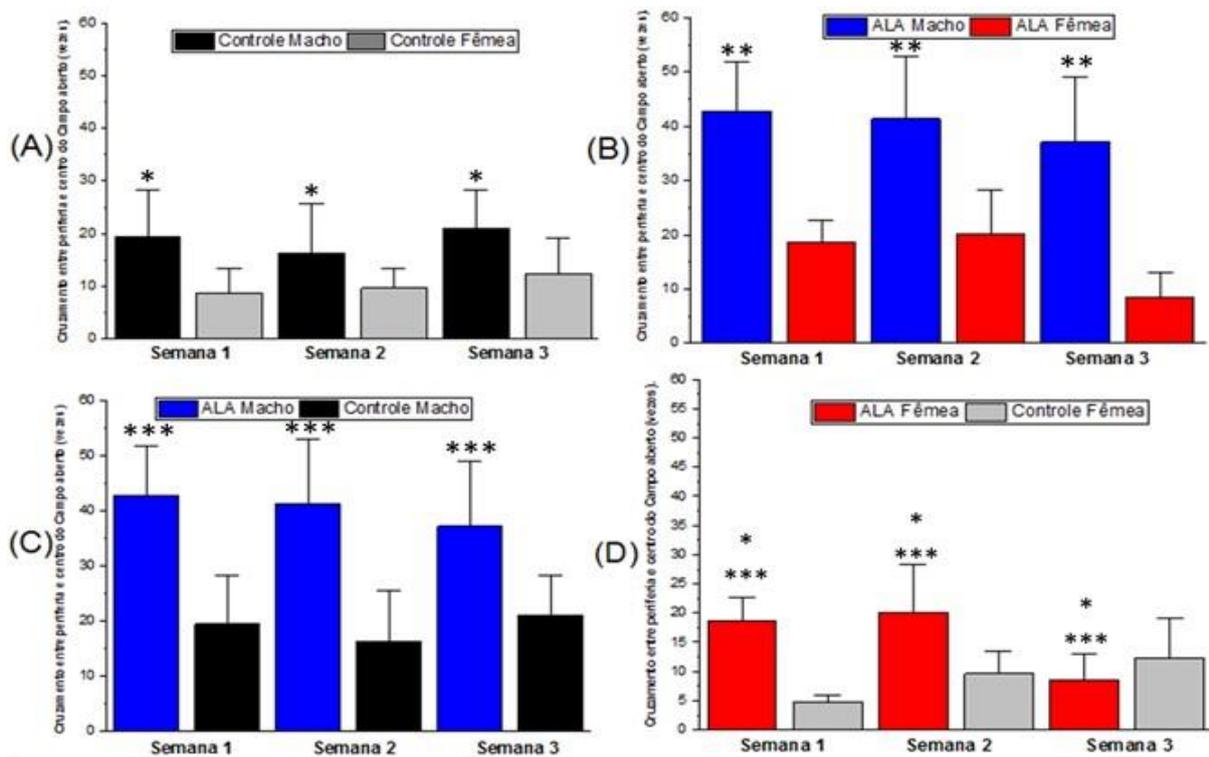


Figura 12 – Taxa de ambulação com cruzamento da periferia e centro do campo aberto durante três semanas no campo aberto. **(A)** Comparação entre controle macho e fêmea ($*p=1,43 \times 10^{-7}$); **(B)** comparação entre ALA macho e fêmea ($**p=1,3 \times 10^{-3}$); **(C)** controle versus ALA machos ($***p=1,11 \times 10^{-16}$); **(D)** controles versus ALA fêmeas ($****p=1,89 \times 10^{-5}$).

6.2 'Marble Burying'

De acordo com o teste anterior, realizamos a técnica de 'marble burying' que é um paralelo na avaliação de compulsão animal ou de inferência de agitação motora. Na comparação entre os grupos controle e ALA analisados estatisticamente por meio do teste de *Mann-Whitney*, observamos um aumento no número de esferas enterradas nos animais tratados com ALA tanto entre grupos machos ($*p=4,88 \times 10^{-2}$) como nas fêmeas ($**p=1,19 \times 10^{-5}$). Isto indica que apesar de maior locomoção pelo número de cruzamentos centro-periferia por ambos os sexos, não foi possível correlacionar maior grau de ansiedade ou agitação neste modelo (**Figura 13**). A redução ainda poderia ser explicada por algum outro fenômeno ou sintoma.

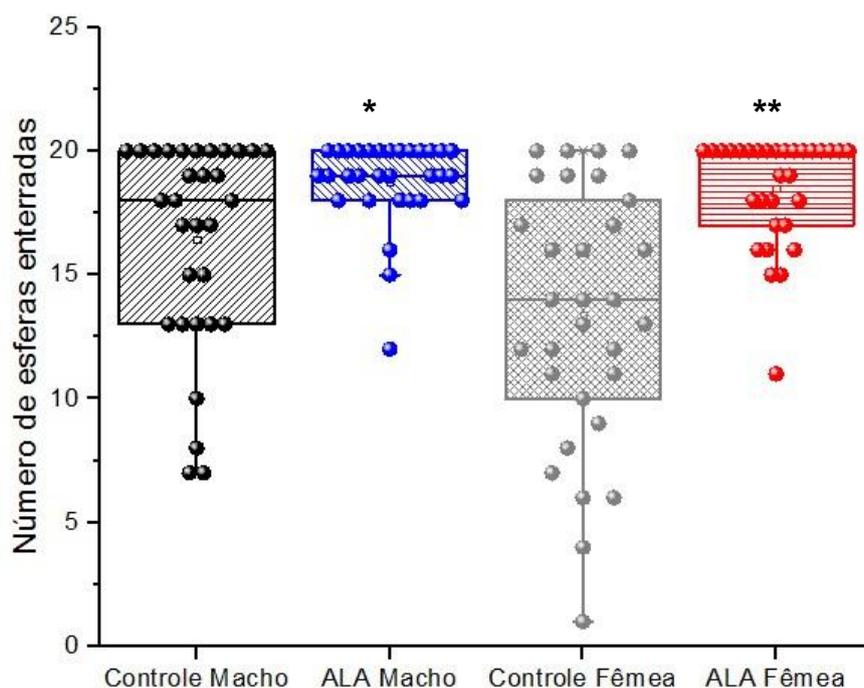


Figura 13 – Efeito do ALA no teste de ‘*marble burying*’ pela quantidade de esferas enterradas quando comparados os grupos controles machos versus ALA (* $p=4,88 \times 10^{-2}$) e controle fêmeas versus ALA (** $p=1,19 \times 10^{-5}$)

6.3 Von Frey eletrônico

Dor neurovisceral é um fenômeno comum em pacientes com PAI. E este quadro está associado com posturas antálgicas e limitações mecânicas (Rodrigues et al., 2008). O teste de dor neuropática com pressão crescente nas patas dos camundongos pelo método de Von Frey eletrônico demonstrou que os animais tratados se mostraram mais sensíveis à dor (i.e.; sentem mais dor ou apresentam hiperalgesia) tanto no grupo dos machos ($p=1,93 \times 10^{-5}$; via Mann-Whitney) como no grupo das fêmeas ($p=3,32 \times 10^{-5}$) quando comparados com os controles respectivos (figura 14).

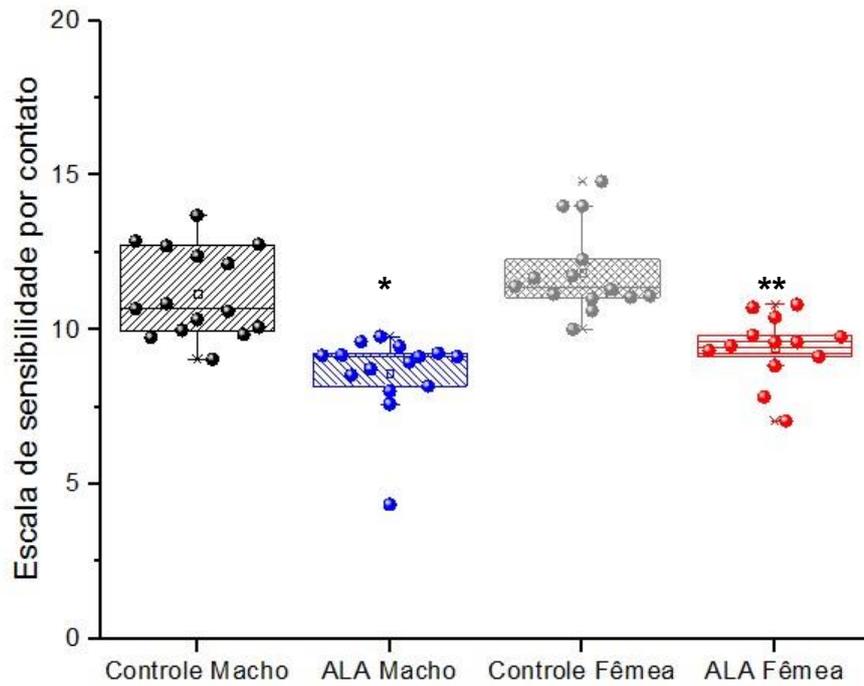


Figura 14 - Nível de sensibilidade por contato em machos (* $p=1,93 \times 10^{-5}$) e fêmeas (** $p=3,32 \times 10^{-5}$).

6.4 Agressividade ofensiva

O estudo de agressividade ofensiva pelo paradigma do residente-intruso só pode ser avaliado em machos. Desta forma, realizamos este estudo também em dois momentos independentes. Estudando os machos controle separadamente e comparando com os dois períodos, quanto à latência do ataque, ou seja, o tempo em segundos que o camundongo macho residente deu o primeiro ataque no intruso, verificamos que os controles são iguais ($p=1,81 \times 10^{-1}$, tabela 4), e com isto utilizamos o conjunto dos dois estudos para as comparações com o efeito de ALA.

Tabela 4 – Latência de ataque no teste de agressividade em segundos, durante três semanas, em dois estudos separados com camundongos machos.

Grupo Controle	Semana 1*	Semana 2	Semana 3
Estudo 1	171 ± 29	184 ± 30	140 ± 37
Estudo 2	273 ± 46	257 ± 59	243 ± 38

* $p=1,81 \times 10^{-1}$

Comparando os grupos controle e ALA, notamos que existe uma diferença notável em relação aos ataques e indivíduos que lutaram ou não. Segundo **Figura 15** abaixo, demonstramos que os animais inoculados com ALA tem um nível muito baixo de agressão (* $p=1,0 \times 10^{-4}$, por X^2).

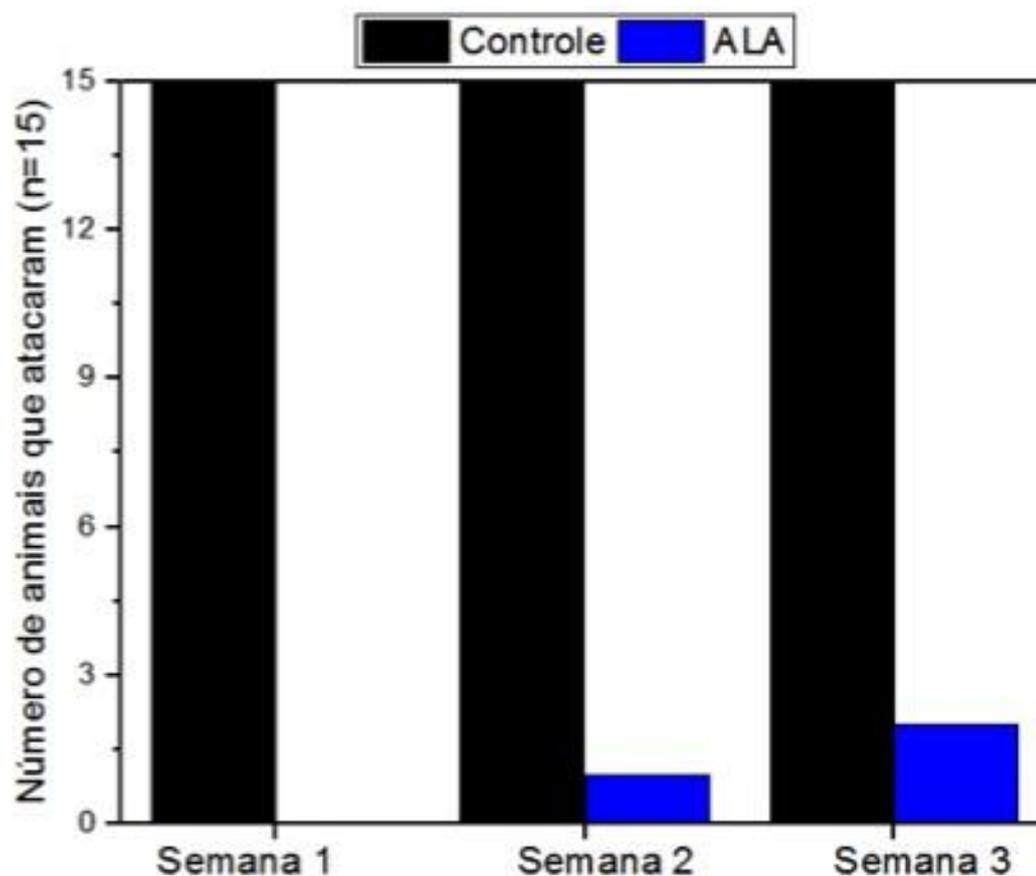


Figura 15 – Número de animais que atacaram no teste residente-intruso. Notamos uma intensa supressão da propensão à luta após o tratamento crônico com ALA em machos.

7. DISCUSSÃO

No paradigma de campo aberto buscamos identificar as atividades exploratórias dos grupos de camundongos e identificamos o tempo de permanência de cada grupo no centro e na periferia do aparato junto com a mensuração da taxa de ambulação ou cruzamento entre os quadrantes. Normalmente na inferência do comportamento de maior ansiedade, os animais têm uma maior preferência pelos cantos evitando a área central (Lamprea, et al., 2008 e Martinez, 2004). Entretanto a apesar da expectativa de podermos já observar alguma mudança de aspectos comportamentais em favor de uma maior tendência ao isolamento e mesmo padrão ansioso, os nossos resultados mostraram o inverso: os grupos machos e fêmeas expostos ao ALA apresentam consistentemente maior atividade motora e permaneceram por mais tempo no centro do campo quando comparados aos animais controle independente do período ou época que os testes foram conduzidos.

Segundo Poucet e colaboradores (1986), certos danos cerebrais podem induzir hiperatividade em ratos, o que nos instiga a propor correlação com os nossos achados de elevação da atividade motora no paradigma do campo aberto ainda dentro de uma atividade social não-normal como compatível pelo teste de *marble burying* com o maior número de esferas enterradas. Fazendo um paralelo, os dados apresentados podem ter correspondência aos relatos observados em indivíduos com PAI (Lopes et al., 2010). Algumas das características clínicas da AIP têm sido atribuídas à hiperatividade adrenérgica com explicações clínico-patológicas de achados morfológicos, incluindo alterações no hipotálamo (Suarez et al., 1997). Uma evidente demonstração da ação em sistema nervoso central neste desarranjo metabólico.

Estudando o perfil de agressividade nos camundongos machos separadamente nos dois períodos, verificamos que este comportamento tem é altamente reprodutível em ambos os grupos controle de machos. Na agressividade ofensiva, quando comparamos todos os grupos, notamos que existe uma diferença marcante na quantidade de ataques nos camundongos controle versus ALA. Houve uma profunda redução de agressividade ou tendência à luta (impulsividade?!) e possível inibição do comportamento normal de territorialidade nestes animais pelo ALA. Cherek e Lane (1999) relataram que o aumento dos níveis de serotonina, reduz a agressividade em camundongos. Comparavelmente os níveis de serotonina estão elevados nas crises

de PAI dosados a partir dos níveis séricos serotoninérgicos, o que pode sugerir a correlação a essa não-agressividade observada no nosso modelo (Lecha et al. 2009).

O chumbo pode interferir na via biossintética do heme, aumentando o ALA e concentrações de protoporfirina IX. Como vimos anteriormente, pode contribuir para o desencadeamento de distúrbios de comportamento como em pacientes portadores de porfirias congênitas, como na PAI (Olympio et al., 2009). Nestes distúrbios, Dietrich (2001) e Needleman (1996) e colaboradores estudaram crianças com elevados níveis de chumbo e os correlacionaram com o déficit de atenção, agressividade e delinqüência apresentados. Segundo os autores, a exposição a altos níveis de chumbo pode realmente desencadear comportamento anti-social, o que reivindica políticas públicas para evitar o envenenamento por chumbo no país. Estranhamente, não observamos tais características de ataque no nosso modelo que não podemos simplesmente justificar pela diferença entre espécies.

Pacientes com porfirias podem sofrer crises constantes e desenvolver dor neuropática crônica nas extremidades, bem como dor crônica visceral abdominal. Com isso buscamos determinar através do teste de Von Frey, se haveria de fato a quantificação da hiperalgesia nos camundongos através da sensibilização e a ativação de nociceptores. Os resultados mostram claro aumento de sensação dolorosa com baixo limiar mecânico, sugestivo de mecanismo de lesão neuropática. A neuropatia periférica causada na porfiria é também motora. Pode ocorrer paresia simétrica que começa nas extremidades proximais superiores, mas pode ser focal e envolver nervos cranianos. A fraqueza muscular pode progredir até paralisia respiratória, bulbar e morte, especialmente se o diagnóstico for tardio (Abínzano, et al., 1999). Mesmo a paralisia avançada é reversível com tratamento adequado, mas demanda muitos meses de reabilitação. A dor pode ser intensa e com frequência exige o uso de opioides para controle (Santos et al., 2010). A neuropatia periférica da PAI ocorre pela perda axonal com degeneração do axônio distal e áreas de desmielinização mais a ruptura axonal (Denny-Brown e Sciarra 1945). A neuropatia na intoxicação por chumbo também é semelhante à PAI pode envolver tanto fibras nervosas motoras como as fibras sensoriais (Laiwah e Mccoll, 1987).

Relatos de casos de PAI nem sempre têm seu perfil clínico esclarecido na tríade clássica: (i.e.; dor abdominal, características neurológicas e manifestações psiquiátricas). Os transtornos mentais acompanham os ataques agudos em 25-75 % dos casos e os sintomas psiquiátricos podem ser mais evidentes (Abínzano et al.,

1999). O espectro de sintomas psiquiátricos na PAI foi relatado casos onde os pacientes apresentaram desorientação, atividade psicomotora tendências violentas, negligência do auto-cuidado/higiene, atitude não cooperante e negativista, olhar vago, comportamento alucinatório e delírios de perseguição (Narang et al., 2003).

Muitas hipóteses foram propostas para explicar os mecanismos ação no sistema nervoso central, mas nenhuma tem sido aceita com a preponderante. Dentre todas, nosso modelo aposta no ALA como um deflagrador das crises e sintomas na PAI. Como precursor comum a todas as porfirias, durante um ataque, ALA aparece em quantidades mensuráveis no líquido cefalorraquidiano na observação de Laiwah, Moore e Goldberg (1987). De acordo com Ellefson e Ford (1996) e do grupo do professor Etelvino Bechara (vide citações várias nesta dissertação), ALA é uma fonte endógena de espécies reativas de oxigênio que podem produzir dano oxidativo para estruturas celulares em geral, sobretudo em tecido nervoso (Demasi et al., 1996). Há evidência experimental que ALA induz a morte celular necrótica de astrócitos em ratos (Juknat, et al., 2003). Pelas evidências demonstradas nestes vários modelos e trabalhos de experimentação, fica fortalecida a hipótese do mecanismo de lesão neuronal crônico-oxidativa facilitado pelo acúmulo do ALA tecidual como peça central no modelo experimental desta dissertação.

ESTUDO 2
ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES

8 OBJETIVO

O objetivo geral é identificar e mensurar parâmetros hemodinâmicos que possa identificar a disfunção do sistema nervoso autônomo: simpático ou parassimpático em ratos machos e fêmeas inoculados com ALA.

8.1 Objetivos Específicos

- Determinar as fases do ciclo estral antes de cada experimento;
- Avaliar e comparar através de parâmetros hemodinâmicos como frequência cardíaca, pressão arterial sistólica, diastólica e média;
- Caracterizar anormalidades da função autonômica do sistema cardiovascular através da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial, estimadas através de análise espectral;
- Avaliar através de ultrassonografia abdominal acoplada ao *doppler* as alterações teciduais e vasculares em fígado e território mesentérico no modelo de PAI e poder traçar a correlação destes achados com o observado na clínica em humanos.

9 METODOLOGIA

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, 20 machos e 20 fêmeas, pesando 100 a 115g.

Grupo 1: Machos inoculados IP com 40,8 mg de ALA (n=10)

Grupo 2: Machos inoculados IP com água ultrapura (n=10).

Grupo 3: Fêmeas inoculadas IP com 40,8 mg de ALA (n=10);

Grupo 4: Fêmeas inoculadas IP com água ultrapura (n=10).

Serão inoculados com a solução de ácido 5-aminolevulinico (ALA) de pH corrigido favorecendo a formação do enol com tampão fosfato, como descrito na seção de metodologia do estudo 1 em camundongos.

Os ratos são mantidos em salas separadas (machos e fêmeas) próprias e em gaiolas (49 x 34 x 16 cm) em condições controladas de umidade e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas e a comida e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados mediante a aprovação do comitê de ética em pesquisa da instituição (CEUA AN0012/2015).

9.1 Modelo experimental com ratos Wistar

Após os 30 dias de inoculações, os ratos foram anestesiados e realizou-se a ultrassonografia com *doppler* colorido. Em seguida, os mesmos foram submetidos à canulação para as avaliações hemodinâmicas (**figura 16**).

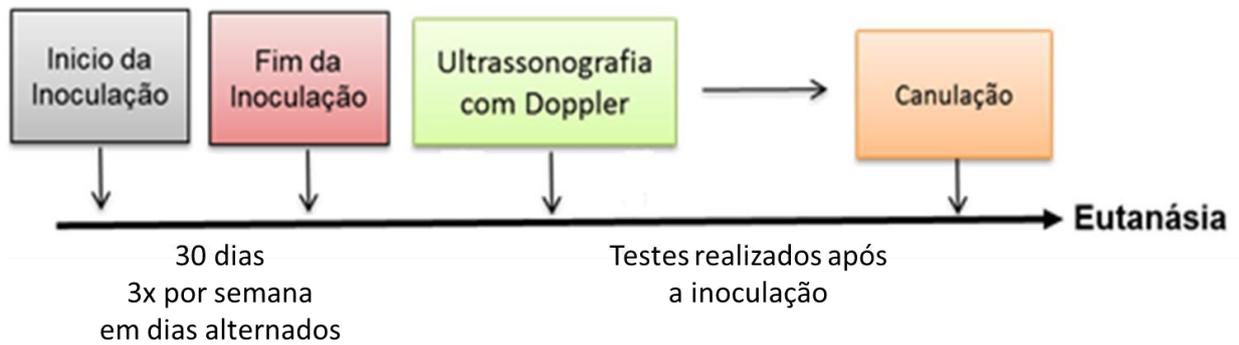


Figura 16– Cronograma experimental em ratos.

9.1.1 Ultrassonografia com *doppler*

Para esta técnica, os animais foram sedados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg). Foram colocados em decúbito ventral para realização da tricotomia abdominal por cerca de 15 minutos. Este exame foi realizado com o aparelho de ultrassom vascular Esaote MyLab Gamma XVision pela médica veterinária Caroline Augusto. Investigamos o território venoso esplênico-mesentérico-portal, as veias hepáticas, a artéria hepática e a veia cava inferior, e outros vasos identificáveis, com alterações no calibre e fluxo sanguíneo, bem como possíveis alterações teciduais em parênquima hepático (**figura 17**).



Figura 17 – Rato Wistar sendo submetido a ultrassonografia com Doppler colorido.

9.1.2 Avaliações hemodinâmicas

Após 30 dias de inoculação os ratos foram anestesiados intraperitonealmente

(i.p.) com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg). Em decúbito dorsal, os animais receberam uma pequena incisão na região do pescoço seguida da implantação de uma cânula na artéria carótida em direção ao ventrículo esquerdo para o registro direto da pressão arterial (PA) (**figura 18**). Após implantação das cânulas na artéria carótida, as extremidades mais calibrosas das cânulas foram passadas pelo subcutâneo, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. As cânulas foram confeccionadas com tubos de policloreto de vinila (Abbott) equivalente ao polietileno PE10 e PE50. As cânulas ficaram preenchidas com solução fisiológica e mantidas ocluídas com pinos de aço inoxidável (De Angelis et al., 1999, De Angelis et al., 2000; Irigoyen et al., 2005) (**figura 19**).

No dia seguinte à canulação, com o rato acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Blood Pressure XDCR, Kent[®] Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, esteve conectado a um pré-amplificador (STEMTECH BPMT-2, Quintron Instrument[®] Inc, Milwaukee, EUA). Sinais de PA gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) permitiram a análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) (**figura 20**).

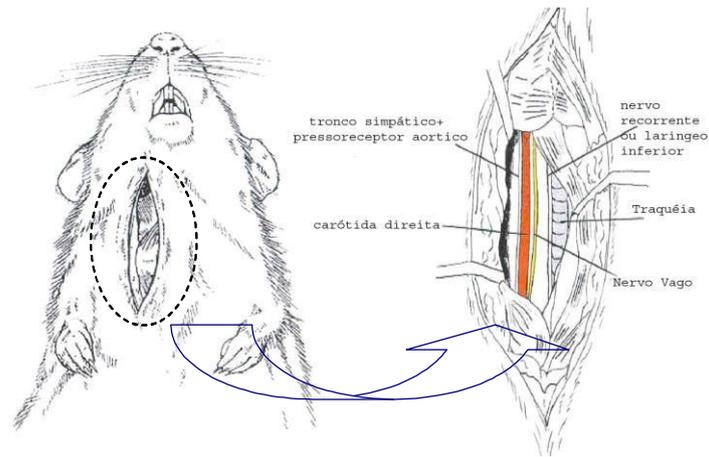


Figura 18– Esquema mostrando a incisão e a carótida direita do rato para a implantação da cânula (foto cedida pelo Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Nove de Julho).



Figura 19– Rato com a cânula exteriorizada no dorso da região cervical e fixada com fio de algodão na pele (foto cedida pelo Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Nove de Julho).



Figura 20– Equipamentos para registros dos animais canulados (foto cedida pelo Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Nove de Julho).

9.1.2.1 Avaliação da variabilidade da pressão arterial sistólica e variabilidade de frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência (análise espectral).

Está análise foi realizada pela professora Dra. Iris Callado Sanches, onde a partir do registro basal dos animais acordados, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade da pressão sistólica (VPS) e da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios da PAS e FC, sendo as suas variabilidades quantificadas pela média dos desvios padrão. A análise no domínio da frequência constituiu da decomposição do sistograma pela transformada rápida de fourier. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF), de 0,20-0,75 Hz, (Soares et al., 2004 apud. Sanches, 2012). A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, onde a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Além do componente de baixa frequência, outro componente

foi obtido na análise espectral: alta frequência (AF) de 0,75-3,0 Hz. O componente BF é usado como um índice da atividade simpática. O componente AF é usado como um índice da atividade parassimpática. A relação BF/AF indica o balanço simpato-vagal (Sanches, 2012).

9.2 Identificação da fase do ciclo estral

Nos grupos de ratas fêmeas controle e os tratados com ALA, realizamos a identificação da fase do ciclo estral antes de cada análise com o intuito de conhecer qualquer influência da oscilação dos hormônios sexuais femininos nos resultados.

O procedimento seguiu a mesma técnica como descrita na seção de metodologia do estudo 1 em camundongos desta dissertação.

9.3 Eutanásia dos animais

Ao término das avaliações hemodinâmicas, os animais de todos os grupos foram eutanasiados através da superdose de cloridrato quetamina 300 mg/kg e cloridrato de xilazina 30 mg/kg, os órgãos foram pesados e congelados para futuras avaliações.

9.4 Análises estatísticas

Primeiramente foi verificada a normalidade de cada grupo de resultados pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*. Posteriormente o teste *t* de student para amostras independentes. O nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi considerado e os dados expressos em números absolutos como média \pm erro padrão (SEM). Para a análise dos resultados obtidos e sua associação com os dados, foram realizadas através do software OriginPro versão 9.1.

10 RESULTADOS

Ao realizar a identificação do ciclo estral, notamos que as ratas, tanto controle como expostas ao ALA encontravam-se em fases não-ovulatórias como: diestro (predominância de leucócitos) e metaestro (igual proporção de leucócitos, células epiteliais e cornificadas) sem influência, portanto, do tratamento com ALA.

A seguir, apresentaremos os dados comparativos dos animais controles e tratados com ALA. Os resultados contam com tabelas e gráficos identificados sempre pelas cores: pretas para machos controle; cinza para fêmeas controle; azul para machos ALA; vermelho para fêmeas ALA.

10.1.1 Ultrassonografia-doppler de território hepático e mesentérico

Investigamos o fluxo sanguíneo na veia porta dos ratos de todos os grupos e a análise seguiu-se com o teste *t*. Houve uma diferença no baixo fluxo sanguíneo na veia porta dos animais inoculados com ALA, tanto em machos ($p=1,3 \times 10^{-3}$), (**figura 21 A**), quanto em fêmeas ($p=2,3 \times 10^{-2}$), (**figura 21 B**). Entretanto, não foi possível identificar qualquer diferença na artéria hepática e na veia cava inferior, bem como possíveis alterações teciduais de volume hepático.

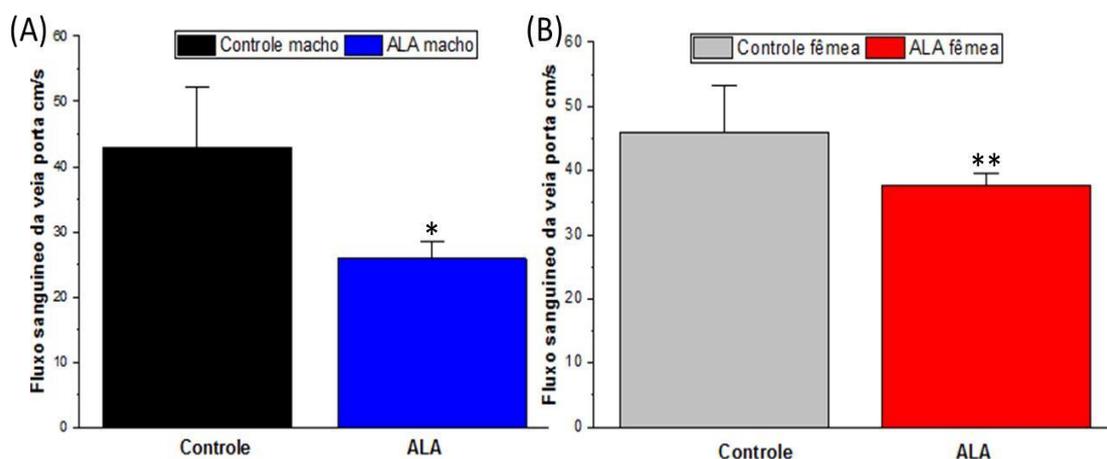


Figura 21 - (A) Fluxo sanguíneo da veia porta através de ultrassonografia com *doppler* em machos ($p=1,3 \times 10^{-3}$). **(B)** Fluxo sanguíneo da veia porta através de ultrassonografia com *doppler* em fêmeas ($p=2,3 \times 10^{-2}$).

10.1.2 Avaliações hemodinâmicas

Nas avaliações hemodinâmicas sistêmicas, os animais inoculados com ALA não apresentaram diferença nos parâmetros de pressão (PAD, PAS e PAM), quando comparadas com os animais controles, o que sugere que a redução vascular de fluxo no território da veia porta-hepática demonstrada pelo estudo ultrassonográfico ocorre regionalmente como um efeito direto e específico da exposição crônica ao ALA. Como na PAI, o fígado é um dos órgãos-alvo da cascata radicalar induzida pelo ALA-enol oxidado, é concebível admitir uma associação direta deste mecanismo redox ao dano hepato-portal na interrupção da via biossintética do heme. Restava, contudo, investigar a manifestação hemodinâmica causada em função da disfunção autonômica reportada nas porfirias.

10.2 Modulação autonômico cardiovascular

As análises a partir da coleta dos registros hemodinâmicos descritas a seguir buscam justamente endereçar as possíveis alterações autonômicas hemodinâmicas de âmbito sistêmico decorrentes da exposição crônica ao ALA.

Quando comparados os grupos controle e ALA em ratos machos, estes apresentaram diferenças nos parâmetros do desvio padrão do intervalo de pulso (DP), da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos R-R normais adjacentes (RMSSD), da banda de baixa frequência (BF), do intervalo de pulso e a banda de alta frequência (AF) e do intervalo de pulso. Somente o grupo macho tratado com ALA apresentou alteração da variabilidade cardíaca no domínio do tempo. ALA nos grupos macho e fêmea apresentaram diferença no domínio da

frequência em variabilidade cardíaca como citados abaixo (**tabela 7 e 8**). Na análise do domínio da frequência, também podemos verificar uma diminuição na variância do intervalo de pulso em machos (**figura 22**).

Tabela 5 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência realizados nos grupos dos ratos machos (Valores representados como média \pm erro padrão).

Variabilidade Cardíaca	Controle macho	ALA macho
Domínio do tempo		
DP (ms)	13,4 \pm 1,8	8,90 \pm 0,87*
RMSSD (ms)	13,5 \pm 1,3	9,68 \pm 1,2**
Domínio da frequência		
BF (ms ²)	14,6 \pm 3,1	6,58 \pm 1,6 [#]
AF (ms ²)	47,7 \pm 3,1	21,1 \pm 3,1 ^{##}

(*p=0.035; **p=0.022; #p=0.030; ##p=0.0092)

Tabela 6 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência realizados nos grupos das fêmeas (Valores representados como média \pm erro padrão).

Variabilidade Cardíaca	Controle fêmea	ALA fêmea
Domínio do tempo		
DP (ms)	7,02 \pm 0,76	9,25 \pm 1,6
RMSSD (ms)	7,90 \pm 1,06	8,39 \pm 0,69
Domínio da frequência		

BF (ms²)	5,45 ± 1,4	2,45 ± 0,47
AF (ms²)	21,9 ± 7,9	10,8 ± 1,7

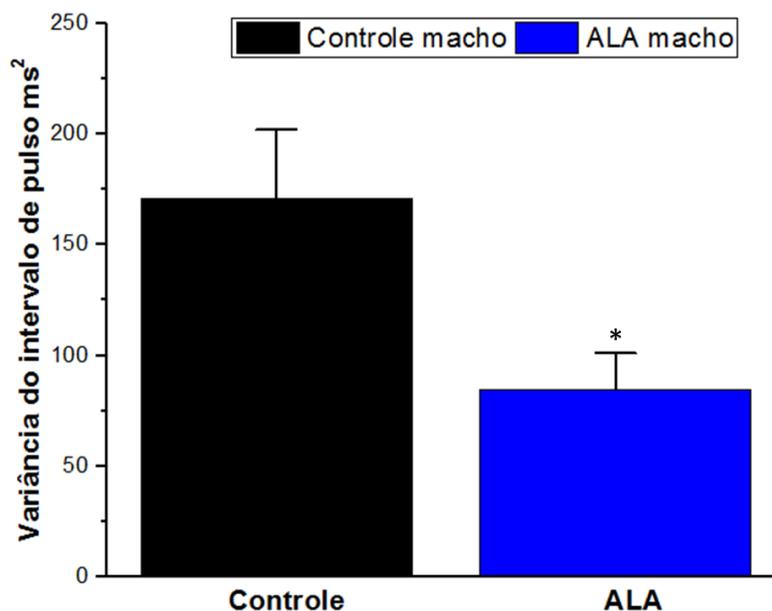


Figura 22 - Variância do intervalo de pulso no grupo controle versus ALA (* $p=3,5 \times 10^{-2}$).

Quanto aos parâmetros de variabilidade da pressão arterial sistólica, não houve diferença no desvio da pressão arterial sistólica em machos em dois ciclos de experimentos. Interessantemente, somente no grupo das fêmeas ALA observamos o aumento na média de variância da PAS (**figura 23**). Não foi observado diferença entre os grupos na variância da PAD.

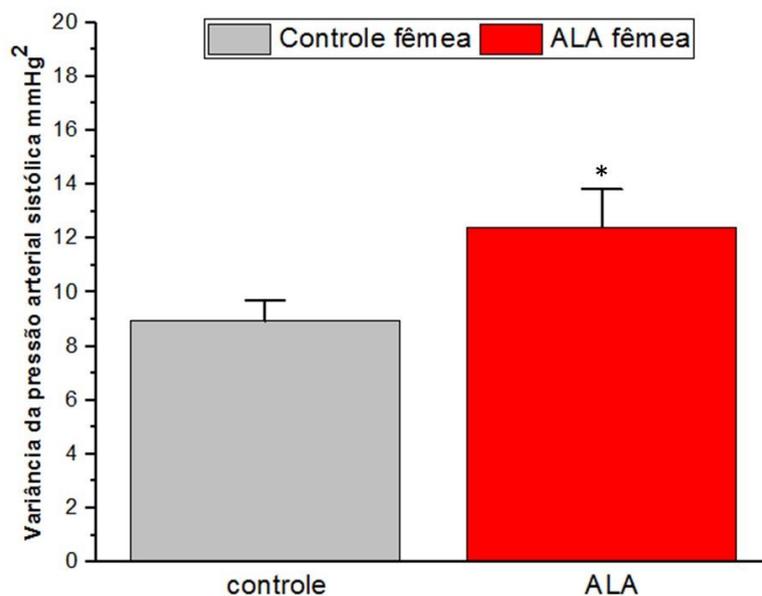


Figura 23 - Variância da PAS nos grupos controle e ALA em fêmeas.

Estas alterações todas combinadas apontam para um desarranjo autonômico ou na disautonomia vascular sem, no entanto, evidenciar sensivelmente um predomínio simpático ou parassimpático em função da multiplicidade de parâmetros acometidos.

11 DISCUSSÃO

Primeiramente, nossos estudos mostraram que ambas abordagens para se verificar a presença da lesão hemodinâmica no nosso modelo de PAI apresentaram

vantagens e limitações. A ultrassonografia/*doppler* em ratos é uma vantagem por ser de baixo custo na aquisição de imagem em tempo real, tem ótima portabilidade e fidedignidade de leitura dos parâmetros vasculares arteriais e venosos do território esplâncnico, mas baixa resolução tecidual. A capacidade de fornecer informações sobre o fluxo sanguíneo com reprodutibilidade, a técnica é sensível em determinar a velocidade do sangue na macrocirculação nos principais vasos. Deste modo buscamos, através deste método evidenciar todas as alterações tangíveis que poderíamos relacionar com quadros de porfirias em seres humanos e assim evidenciamos, pela primeira vez em um modelo experimental de porfiria, o baixo fluxo sanguíneo na veia porta independente do sexo. Esta veia é uma importante transportadora de sangue dos órgãos abdominais para o fígado. Permitindo que todas as substâncias absorvidas no trato digestivo passem primeiro pelo fígado onde são transformadas, antes de passarem à circulação sistêmica pela veia hepática (Alves et al., 2012). Em paciente com porfirias, podem ocorrer doenças hepáticas, entre as quais incluem inflamação, fibrose hepática, cirrose e trombose hepática, (Kauppinen & Mustajoki, 1988). Estes dados corroboram com as manifestações clínicas relacionadas à diminuição do fluxo portal, que se destacam sinais de hipotensão ortostática e a dor abdominal em casos de trombose hepática (Schettino, 2006). A patogênese pode ser explicada por anomalias no metabolismo decorrente dos subprodutos intermediários com a interrupção da via biossintética do heme, sobretudo o ALA. Adicionalmente, a produção de substâncias mutagênicas intrínsecas pelo desequilíbrio redox pode aumentar a deficiência de reparo de DNA e biomoléculas e promover a lesão das células do fígado. Cirrose do fígado parece ser mais frequente em doentes de PAI e pode ser uma etapa preliminar do câncer hepatocelular (Andersson, Bjersing e Lithner, 1996).

Sarkany e Norris, (1994) constataram que existe uma grande variação na gravidade das manifestações clínicas em pacientes com porfirias e doenças hepáticas. Onde existem pequenas anormalidades nos marcadores bioquímicos da função hepática com elevados níveis de transaminases, fosfatase alcalina e gamaglutamil transferase. Em pacientes com função hepática normal, porém, há deposição de porfirinas sem evidência de fibrose, fibrose leve ou fibrose portal e periportal, (Elder, 1984). Em casos mais graves, o transplante de fígado tem sido usado para tratar alguns indivíduos com PAI que não conseguiram responder a outras opções de tratamento. O transplante de fígado em indivíduos com PAI é a opção de último recurso (Dowman, 2012; Stewart, 2012).

O registro hemodinâmico basal não permitiu avaliar no nosso modelo as alterações nos grandes parâmetros vasculares como o de pressão arterial e na frequência cardíaca, tais quais descritos em indivíduos acometidos com porfirias. Porém a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) forneceu um sensível indicador de anormalidade do sistema nervoso autonômico (SNA), que indica fortemente a presença de disautonomia (Pumprla et al., 2002). A VFC representa as medições com intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R) em um espectro de variabilidade em frequência cardíaca. Trata-se de uma medida em que uma baixa variabilidade é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, implicando a presença de mau funcionamento fisiológico interno ou visceral para o indivíduo. Diante da sua importância como um marcador funcional hemodinâmico, reflete a atividade do SNA sobre o nó sinusal e torna-se uma ferramenta clínica para se avaliar e identificar comprometimentos cardiovasculares disautonômicas (Vanderlei et al., 2009). Nos ratos machos inoculados com ALA, os índices de VFC encontram-se reduzidos. Menezes et al., (2004) encontrou essa mesma diminuição da VFC em

indivíduos hipertensos, quando comparados a normotensos ao analisar os índices DP, RMSSD, HF e LF, provavelmente por uma hiperatividade simpática.

Contudo e de acordo com Leonhardt (1981), indivíduos acometidos com porfiria sofrem de desarranjos autonômicas podendo provocar sintomas cardiovasculares graves. Eles descrevem taquicardias supraventriculares seguidas de hipertensão ou, raramente, hipotensão, cardioarritmias e cardiomiopatia. Enquanto a taquicardia, distúrbios de pressão arterial e cardioarritmias indicam hiperatividade simpática, alterações cardiomiopáticas podem sugerir disfunção coronária funcional e/ou estrutural. Não temos dados relacionados aqui para aventar uma suposta alteração em território vascular coronariano, mas pode ser um foco de estudo posterior ainda para investigação em modelo animal de PAI.

12 CONCLUSÃO

O objetivo do nosso trabalho foi elaborar um modelo animal que pudesse elucidar as principais manifestações neuropsiquiátricas e de alterações hemodinâmicas, possivelmente hemodinâmicas, na PAI. Para isso usamos duas

espécies de roedores: o camundongo (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 e o rato (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. A escolha das espécies foi baseada em seus comportamentos de sociabilidade bem explorados como no camundongo e anatômico para acesso aos parâmetros hemodinâmicos no caso do rato (Andrade, Pinto e De Oliveira, 2006).

O camundongo C57BL/6 tem sido bem estudado e atende bem aos paradigmas comportamentais. Estes animais uma vez expostos cronicamente ao ALA, apresentaram um padrão locomotor alterado no teste de campo aberto complementado por padrão ansioso sugerido no teste de '*marble burying*'. A nossa expectativa pela literatura era um aumento da volição agressiva como nas descrições de pacientes em "surto" ou crises agudas na PAI. Surpreendentemente, verificamos no paradigma específico para agressividade ofensiva do residente intruso, a baixa agressividade em machos expostos ao ALA, sendo esses animais extremamente territorialistas. Apesar de ser um resultado aparentemente conflitante ao interpretado na clínica da porfíria, isto talvez indique também que será preciso rever ou melhor caracterizar as manifestações neuropsiquiátricas em humanos para definir critérios objetivos para a agressividade e/ou ímpeto agressivo que pode ser modulado por tônus ansioso alterado. Podemos inferir claramente que o ALA causa uma alteração cerebral nesses animais com impacto direto ao desempenho comportamental social, porém serão necessários mais estudos estruturais para ver quais são as lesões neuronais e de conectividade sináptica nesses animais.

Estudando a sensibilidade dolorosa dos animais inoculados com ALA, verificamos que os camundongos apresentaram uma hipersensibilidade à dor (excesso de dor) por pressão mecânica indicativo de um mecanismo neuropático. Isto pode ocorrer pela agressão bioquímica do ALA em nervos periféricos comum em

pacientes com porfiria (Denny-Brown e Sciarra 1945), compatível com o mesmo processo de lesão que acarretaria as manifestações autonômicas como descontrole da variabilidade hemodinâmica em ratos.

A escolha de ratos no modelo hemodinâmico foi devido ao seu tamanho corporal e foi possível realizar as avaliações vasculares com um método nãoinvasivo através de ultrassonografia abdominal associada ao *doppler* além da canulação também complementar e fundamental para registro dos aspectos genuinamente disautômicos pela análise espectral. Os efeitos cardiovasculares intrínsecos e extrínsecos demonstrados pelo ALA neste estudo caracterizam a disfunção de sistema nervoso periférico, o que pode ser visto com grande avanço na compreensão do que ocorre os pacientes com porfirias.

O intuito dos nossos modelos experimentais foi revelar os efeitos focais orgânicos causados pelo ALA acumulado cronicamente. Finalmente, estas evidências experimentais comprovadamente alicerçam a evidência de lesões e alterações de prejuízo funcional e poderão ajudar no entendimento da fisiopatologia destes sintomas para melhorar o manejo clínico ainda relativamente restrito em indivíduos acometidos com porfirias e outras disfunções da via biossintética do grupo heme, caracterizado pelo excesso de ALA circulante.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍNZANO, G. M. L. et al. Acute intermittent porphyria with neurologic manifestations. **Anales de medicina interna (Madrid, Spain: 1984)**. v. 16. n. 10. 1999.

ALVES, R. L. J. et al. Trombose de veia porta: revisão de literatura e relato de caso. **Cadernos Unifoa**, Volta Redonda, n. 18, p.101-108, abr. 2012.

AMERICAN PORPHYRIA FOUNDATION: **PAI, CPH, PV e PAD**. 2008. Disponível em: <<http://www.porphyrifoundation.com>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

AMES, B. N. et al. Mitochondrial decay in aging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1271, n. 1, p. 165-170, 1995.

AMODEO, D. A. et al. Oxotremorine treatment reduces repetitive behaviors in BTBR T+ tf/J mice. **Front Synaptic Neurosci**, v. 6, p. 17, 2014. ISSN 1663-3563.

ANDERSSON, C.; BJERSING, L.; LITHNER, F. The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. **Journal of internal medicine**, v. 240, n. 4, p. 195-201, 1996.

ANDERSON, K. E. et al. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemias and the porphyrias. In: SCRIVER, C R et al. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. 8. ed. New York: Mcgraw-hill, 2001. p. 2991.

ANDERSON, K. E. et al. A gonadotropin releasing hormone analogue prevents cyclical attacks of porphyria. **Archives of Internal Medicine**, v. 150, n. 7, p. 1469-1474, 1990.

ANDRADE, A; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: criação e experimentação. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2006.

BALWANI, M.; DESNICK, R. J. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4496-504, Nov 29 2012. ISSN 0006-4971.

BECHARA, E. J. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quimica Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.

BECKER, D. M.; KRAMER, S. The neurological manifestations of porphyria: a review. **Medicine**, v. 56, n. 5, p. 411-424, 1977.

BESUR, S. et al. Clinically Important features of porphyrin and heme Metabolism and the Porphyrins. **Metabolites**, v. 4, n. 4, p. 977-1006, 2014.

BISSELL, D. M. et al. Role of delta-aminolevulinic acid in the symptoms of acute porphyria. The **American Journal of Medicine**, v. 128, n. 3, p. 313-7, Mar 2015. ISSN 0002-9343.

BONKOVSKY, H. L.; BARNARD, G. F. Diagnosis of porphyric syndromes: a practical approach in the era of molecular biology. **Seminars in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 57-65, 1998. ISSN 0272-8087 (Print) 0272-8087.

BRENNAN, M. J.; CANTRILL, R. C. The effect of delta-aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of [3H]GABA in rat brain synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1781-6, Jun 1979. ISSN 0022-3042 (Print) 00223042.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, n. 2, p. 121-41, Sep 2002. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158.

CHEREK, D. R.; LANE, S. D. Effects of d,l-fenfluramine on aggressive and impulsive responding in adult males with a history of conduct disorder. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 146, n. 4, p. 473-81, Oct 1999. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158.

CHOI, D. W. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. **Progress Brain Research**, v. 100, p. 47-51, 1994. ISSN 0079-6123 (Print) 00796123.

COSTA, C. A. et al. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1196-202, Jul 1997. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-7, Mar 2004. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

DE ANGELIS, K. L. et al. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 635-41, Jun 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

DE ANGELIS, K. L. et al. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained LNAME-hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 768-72, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911x.

DE BOER, S. F. et al. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1125-33, Mar 1999. ISSN 0022-3565 (Print) 00223565 (Linking).

DE VERNEUIL, H. et al. Porphyrins: animal models and prospects for cellular and gene therapy. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 2, p. 239-48, Apr 1995. ISSN 0145-479X (Print) 0145-479x.

DEFENSOR, E. B. et al. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiology & Behavior**, v. 107, n. 5, p. 680-5, Dec 5 2012. ISSN 1873507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).

DEMASI, M. et al. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 291-9, 1996. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

DENNY-BROWN, Derek; SCIARRA, Daniel. Changes in the nervous system in acute porphyria. **Brain**, v. 68, n. 1, p. 1-16, 1945.

DIETRICH K. N. et al. Early exposure to lead and juvenile delinquency. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 23, n. 6, p. 511-8, 2001.

DRONAMRAJU K. Biography - Profiles in genetics: Archibald E. Garrod (1857-1936). **The American Journal of Human Genetics**. v. 51, p. 216-9, 1992.

DOUKI, T.; BRETONNIERE, Y.; CADET, J. Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. **Radiation Research**, v. 153, n. 1, p. 2935, Jan 2000. ISSN 0033-7587 (Print) 0033-7587.

DOWMAN, J. K. et al. Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis. **Liver Transplantation**, v. 18, n. 2, p. 195-200, Feb 2012. ISSN 1527-6465.

ELDER, G. H. Clinical disorders of porphyrin metabolism. **Royal College of Physicians and Surgeons of Canada**, v. 17 p. 605-7, 1984.

ELLEFSON, R. D.; FORD, R. E. The Porphyrias: Characteristics and Laboratory Tests [corrected title]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. S119-S125, 1996.

EMANUELLI, T. et al. Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. **Neurochemistry International**, v. 42, n. 2, p. 115-21, Jan 2003. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186.

ENNIS, S. R. et al. Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. **Brain research**, v. 959, n. 2, p. 226-234, 2003.

HO, Y. J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 136, n. 1, p. 1-12, Oct 17 2002. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.

GUNTHER, H. Die haematoporphyrie. **Deutsches Archiv für klinische Medizin**, v. 105, p.89–146, 1911.

GYERTYAN, I. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. **Behavioural Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 24-31, Jan 1995. ISSN 0955-8810.

HINDMARSH, J. T. The porphyrias: recent advances. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1255-63, Jul 1986. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147.

HISTORY OF PORPHYRIA: **A Little Bit of History**. Disponível em: <http://www.porphyrifoundation.com/about-porphyrin/history-of-porphyrin>. Acessado em: 15/10/2015.

HAHN, M.; BONKOVSKY, H. L. Disorders of porphyrin metabolism. In: **Diseases of the Liver and Bile Ducts**: Springer, p.249-272, 1998.

HO, Y. J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 136, n. 1, p. 1-12, Oct 17 2002. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.

IRIGOYEN, M. C. et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998-1003, Oct 2005. ISSN 0194-911x.

JOVER, R. et al. Limited heme synthesis in porphobilinogen deaminase-deficient mice impairs transcriptional activation of specific cytochrome P450 genes by phenobarbital. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 24, p. 7128-37, Dec 2000. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956.

KAUPPINEN, R.; MUSTAJOKI, P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. **British journal of cancer**, v. 57, n. 1, p. 117, 1988.

KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Melatonin protects against oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid: implications for cancer reduction. **Cancer Investigation**, v. 20, n. 2, p. 276-86, 2002. ISSN 0735-7907 (Print) 0735-7907.

KARIM, Z. et al. Porphyrias: a 2015 update. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, v. 39, n. 4, p. 412-425, 2015.

KASTEN-JOLLY, J. et al. Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female BALB/cAnNTac mice. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1005-20, Oct 2012. ISSN 1872-9711 (Electronic) 0161-813X (Linking).

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal of neuroscience methods**, v. 233, p. 150-154, 2014.

LAIWAH, A. C. Y.; MCCOLL, K. E. L. Management of attacks of acute porphyria. **Drugs**, v. 34, n. 5, p. 604-616, 1987.

LAIWAH, A. C. Y., MOORE, M. R., & GOLDBERG, A. Pathogenesis of acute porphyria. **QJM**, v. 63, n. 2, p. 377-392, 1987.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 41, n. 2, p. 135-40, Feb 2008. ISSN 0100879x.

LAYER, G. et al. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v.19, n. 6, p. 1137–1161, 2010.

LECHA, M; PUY, H; DEYBACH, J. C. Erythropoietic protoporphyria. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, n. 19, 2009.

LEONHARDT, K. F. Cardiovascular disorders in acute intermittent porphyria (AIP) **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 93 n. 18 p. 580-584, 1981.

LINDBERG, R. L. et al. Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 8, p. 1127-34, Apr 1999. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

LINDBERG, R. L. et al. Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. **Nature Genetics**, v. 12, n. 2, p. 195-9, Feb 1996. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036.

LOFTUS, L. S.; ARNOLD, W. N. Vincent van Gogh's illness: acute intermittent porphyria? **BMJ**, v. 303, n. 6817, p. 1589-91, Dec 21-28 1991. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-535x.

LOPES, D. et al. Porfíria aguda intermitente: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 4, p. 429-434, 2010.

LORENZO, Clara Brunete et al. Porfirias y vampirismo. **Más dermatología**, n. 22, p. 16-21, 2014.

MALIK, Z. et al. ALA Induced Heme Synthesis: Fine Tuning Mechanisms of PBG Deaminase and ALA Dehydratase. **Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases**, v. 2, n. 135, p. 2, 2014.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609-14, Nov 2002. ISSN 1519-6984 (Print) 1519-6984.

MARTINEZ, R. C. R. **Efeitos da estimulação espacial de um campo aberto no comportamento exploratório de ratos adultos e filhotes**. 2004. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Usp, São Paulo, 2004.

MCGILLION, F.; THOMPSON, G.; GOLDBERG, A. Tissue uptake of δaminolaevulinic acid. **Biochemical pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 299-301, 1975.

MACALPINE, I.; HUNTER, R. The "insanity" of King George 3d: a classic case of porphyria. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5479, p. 65-71, Jan 8 1966. ISSN 00071447 (Print) 0007-1447.

MEYER, U. A. et al. Intermittent acute porphyria--demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v. 286, n. 24, p. 1277-82, Jun 15 1972. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793.

MENEZES et al., Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina II. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 2, p. 165-168, 2004.

MONTEIRO, H. P. et al. Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and delta-aminolevulinic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 881, n. 1, p. 100-6, Mar 19 1986. ISSN 0006-3002 (Print) 00063002.

MOORE, M. R.; DISLER, P. B. Drug-induction of the porphyrias. **Adverse Drug Reaction Reportin**, v. 2, p. 149-89, 1983.

MOORE, M. R. International review of drugs in acute porphyria--1980. **International Journal of Biochemistry**, v. 12, n. 5-6, p. 1089-97, 1980. ISSN 0020-711X (Print) 0020-711x.

NABIN, A. et al. Acute intermittent porphyria with SIADH and fluctuating dysautonomia. **Kathmandu University medical journal**, v. 10, n. 2, p. 96-99, 2013.

NARANG, N. et al. Psychiatric manifestations in three cases of acute intermittent porphyria. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 59, n. 2, p. 171-173, 2003.

NELSON, D.L. et al. Principles of Biochemistry, 4.ed. New York: **W.H. Freeman Publishers**, p. 1100, 2004.

NEEDLEMAN, Herbert L. et al. Bone lead levels and delinquent behavior. **Journal of the American Medical Association**, v. 275, n. 5, p. 363-369, 1996.

OGAWA, S. et al. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1476-81, Feb 18 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

OLYMPIO, Kelly Polido Kaneshiro et al . Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children: a review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington , v. 26, n. 3, p. 266-275, Sept. 2009.

ONUJI, J et al. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 594-608, 2002.

OTEIZA, P. I. et al. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 316, n. 1, p. 607-11, Jan 10 1995. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861.

PHILLIPS, J. D. et al. A mouse model of familial porphyria cutanea tarda. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 1, p. 259-64, Jan 2 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

PERCY, V. A.; SHANLEY, B. C. Studies on haem biosynthesis in rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1267-1274, 1979.

PEREIRA B. et al. 5-Aminolevulinic acid induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercised-trained rats. **J. Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 226–230, 1992.

PIERACH, C. A.; EDWARDS, P. S. Neurotoxicity of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen. **Experimental Neurology**, v. 62, n. 3, p. 810-4, Dec 1978. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886.

PISCHIK, E.; KAUPPINEN, R. Neurological manifestations of acute intermittent porphyria. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 55, n. 1, p. 72-83, 2009.

POUCET, B. et al. A study of exploratory behavior as an index of spatial knowledge in hamsters. **Animal Learning & Behavior**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 1986.

PUGLIA, P. M. K. **Porfiria Aguda Intermitente: Estudo Clínico de 37 casos** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - Departamento de Neurologia, 2001.

PUMPRLA, J. et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **International Journal of Cardiology**, v. 84, n. 1, p. 1-14, Jul 2002. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273.

PUY, H. et al. Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria. **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 6, p. 1373-83, Jun 1997. ISSN 0002-9297 (Print) 0002-9297.

PUY, H. et al. Porphyrias. **Lancet**, v. 375, p. 924–937. 2010.

RIDLEY, A. et al. The tachycardia and the neuropathy of porphyria. **Lancet**, v. 2, p. 708, 1968.

RIMINGTON, C. Was Hippocrates the first to describe a case of acute porphyria? **International Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1351-2, Oct 1993. ISSN 0020-711X (Print) 0020-711x.

ROCHA, M. E. et al. Iron mobilization by succinylacetone methyl ester in rats. A model study for hereditary tyrosinemia and porphyrias characterized by 5aminolevulinic acid overload. **Free Radical Research**, v. 32, n. 4, p. 343-53, Apr 2000. ISSN 1071-5762 (Print) 1029-2470.

ROCHA, M. E. et al. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 409, n. 2, p. 349-56, Jan 15 2003. ISSN 00039861 (Print) 0003-9861.

RODRIGUES, D. F. et al. Atuação da fisioterapia na porfiria aguda intermitente: relato de caso: Contribution of physical Therapy to accute intermittent. **Fisioterapia em Movimento**, São José do Rio Preto, v. 2, n. 21, p.47-52, 2008.

ROBINSON, S.; PENATTI, C. A.; CLARK, A. S. The role of the androgen receptor in anabolic androgenic steroid-induced aggressive behavior in C57BL/6J and Tfm mice. In: (Ed.). **Hormones and Behavior**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.61, 2012. p.67-75. ISBN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking).

SARKANY, R. P. E.; NORRIS, P. G. Hepatic complications of erythropoietic protoporphyria. **British Journal of Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 258-259, 1994.

SANCHES, I. C. Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabéticas: efeitos do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado. 2012. **Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental)** - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANTOS, B. O.; GOZZANI, J. L.; GROKE, D. F. Dor neuropática em paciente com porfiria: relato de caso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n. 6, p. 636638, 2010.

SASSA, S.; KAPPAS, A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. **Journal of Clinical Investigation**, v. 71, n. 3, p. 625-34, Mar 1983. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

SIEGESMUND, M. et al. The acute hepatic porphyrias: current status and future challenges. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 5, p. 593-605, Oct 2010. ISSN 1521-6918.

SCASSA, M. E. et al. Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5aminolevulinic acid synthase gene expression and are involved in insulin repression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28082-92, Jul 2 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

SCASSA, M. E. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinate synthase gene expression by insulin. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 2, p. 201-13, Dec 10 2001. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827.

SCULLY, R. E. et al. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 20-1997. A 74-year-old man with progressive cough, dyspnea, and pleural thickening. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 26, p. 1895-1903, 1997.

SCHNEIDER-YIN, X. et al. Biallelic inactivation of protoporphyrinogen oxidase and hydroxymethylbilane synthase is associated with liver cancer in acute porphyrias. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 734-8, Mar 2015. ISSN 0168-8278.

STEWART, M. F. Review of hepatocellular cancer, hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient follow-up. **Journal of clinical pathology**, v. 65, n. 11, p. 976-980, 2012.

SCHETTINO, Graziela C. M. et al. Trombose de veia porta em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 82, n. 3, June 2006.

SETH, A. K. et al. Liver transplantation for porphyria: who, when, and how? **Liver Transplantation**, v. 13, n. 9, p. 1219-27, Sep 2007. ISSN 1527-6465 (Print) 15276465.

STRAND, L. J. et al. Heme biosynthesis in intermittent acute porphyria: decreased hepatic conversion of porphobilinogen to porphyrins and increased delta aminolevulinic acid synthetase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 67, n. 3, p. 1315-20, Nov 1970. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

STOKVIS, B. J. Over twee zeldsame Kleuerstoffen in Urine van Zieken. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 13, p. 409-411.1889.

SOONAWALLA, Z. F. et al. Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. **Lancet**, v. 363, n. 9410, p. 705-6, Feb 28 2004. ISSN 0140-6736.

SUAREZ, J. I. et al. Acute intermittent porphyria Clinicopathologic correlation: Report of a case and review of the literature. **Neurology**, v. 48, n. 6, p. 1678-1683, 1997.

THACHIL, J. Nitric oxide and the clinical manifestations of acute porphyria. **Internal Medicine Journal**, v. 38, n. 9, p. 732-735, 2008.

TECCHIO, I. Vivendo na morte: a história dos vampiros e seu lugar na cultura popular. **Revista escrita: Revista do Curso de Letras da UNIABEU**, v. 4, n. 3, p. 303-312, 2013.

VANDERLEI, L. C. M. et al . Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto , v. 24, n. 2, p. 205-217, June 2009.

VAQUER, G. et al. Animal models for metabolic, neuromuscular and ophthalmological rare diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 4, p. 287-305, 2013.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004.

WALDENSTROM J. The porphyrias. In: MOORE M. R. et al. **Disorders of porphyrin metabolism**. New York: Plenum Medical, 1987.

WALDENSTROM, J. & HAEGER-ARONSEN, B. - Different patterns of human porphyria. *Brit. Med. J.* 15:272, 1963.

WEATHINGTON, J. M.; ARNOLD, A. R.; COOKE, B. M. Juvenile social subjugation induces a sex-specific pattern of anxiety and depression-like behaviors in adult rats. In: (Ed.). **Hormones and Behavior**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.61, 2012. p.91-9. ISBN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking).

YASUDA, M. et al. AAV8-mediated gene therapy prevents induced biochemical attacks of acute intermittent porphyria and improves neuromotor function. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 1, p. 17-22, Jan 2010. ISSN 1525-0016.

YASUDA, M. et al. RNAi-mediated silencing of hepatic *Alas1* effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 21, p. 7777-82, May 27 2014. ISSN 0027-8424.

ZHANG, L.; SESSOMS, R. Heme biosynthesis and degradation: What happens when it goes haywire? In: ZHANG, L. **Heme biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2011.