



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas

PAULO DAUBIAN RUBINI DOS SANTOS NOSÉ

Efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono.

Effects of physical exercise and iron supplementation on the locomotor activity of an animal model of sleep-related movement disorders.

Limeira
2018

PAULO DAUBIAN RUBINI DOS SANTOS NOSÉ

Efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono.

Effects of physical exercise and iron supplementation on the locomotor activity of an animal model of sleep-related movement disorders.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na área de concentração de Metabolismo e Biologia Molecular.

Orientadora: ANDREA MACULANO ESTEVES

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé e orientada pela Professora Dra. Andrea Maculano Esteves.

Limeira
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2015/09490-6

ORCID: 0000-0001-9376-0540

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

N841e Daubian-Nosé, Paulo, 1991-
Efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono / Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Andrea Maculano Esteves.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Síndrome das pernas inquietas. 2. Modelos animais em pesquisa. 3. Exercícios físicos. 4. Suplementação alimentar. 5. Ferro no organismo. 6. Prenhez. I. Esteves, Andrea Maculano, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of physical exercise and iron supplementation on the locomotor activity of an animal model of sleep-related movement disorder

Palavras-chave em inglês:

Restless legs syndrome

Animal models in research

Physical exercises

Food supplementation

Iron in the body

Pregnancy, animal

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Andrea Maculano Esteves [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Data de defesa: 27-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa de dissertação de mestrado realizada na cidade de Limeira - SP no dia 27/02/2018 às 14h na sala UL70A da Faculdade de Ciências Aplicadas - Unicamp.

Membros da banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Prof. Dra. Andrea Maculano Esteves

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Com muito amor, carinho e alegria dedico este trabalho à minha família, em especial à minha querida mãe, que perpetuamente me deu apoio moral e financeiro para que pudesse concretizar este trabalho que é um dos grandes sonhos da minha vida. Toda e qualquer conquista, não está e nunca estará ao encalço do capital que por ela me foi feito. Sou eternamente grato e um dia hei de fazer jus a este investimento!

AGRADECIMENTOS

Este é o sublime momento que posso expressar todo o carinho, alegria e felicidade ao fim de mais um ciclo de minha estrada por esta grande jornada da vida. Nesta presente ocasião sobretudo, posso proferir minhas profundas palavras de gratidão a todos os indivíduos que puderam e fizeram parte efetiva da construção deste trabalho, e que em momento algum poderiam passar em anonimato, pessoas essas que me engrandeceram como profissional e mais do que tudo como ser humano. Errei por diversas vezes durante este processo, mas sempre me foi fomentado a gana do acerto. Os erros serviram como exemplo, mostraram-me como se deve fazer diferente em uma próxima oportunidade. Todavia os acertos, esses sim me colocaram no apogeu mostrando-me que também tenho brio, e que necessito sempre trabalhar para conseguir zelar-me com pés no chão, humildade, e desejo de prosperar o bem, sempre com competência e responsabilidade. Desta forma, sempre preguei e enalteci a palavra gratidão, que segundo o dicionário “é o reconhecimento de algo, pelo bem que nos fez”. Portanto, o suprasumo da minha gratidão será expresso de forma cronológica nos parágrafos abaixo.

DEUS – Glória a Deus, este é o meu pioneiro e mais genuíno agradecimento, por toda saúde, paz, alegria e amor que tenho em minha vida. Minha enorme gratidão ao Senhor por tudo que tenho aprendido e assimilado nestes meus dias de existência e em minha passagem por esta dimensão.

FAMÍLIA – Meus singelos e genuínos votos de gratidão aos meus familiares. Meu pai e meu amado irmão que infelizmente não estão em minha vida com tamanho volume como anos atrás, mas que mesmo à distância torcem por mim e pelo meu sucesso. Aos meus avós, que ajudaram a fundamentar meu caráter e minha dignidade como ser humano, infelizmente dois deles estão me olhando junto ao papai do céu, mas ainda tenho o privilégio de ter o carinho dos que aqui estão, e absorver o máximo do conhecimento que eles têm a me transmitir. Meus tios, tias, primos, primas e padrinhos que sempre estiveram ao meu lado me dando forças e me proporcionando grandes momentos de convívio, sempre com grandes conselhos e um carinho imenso por mim. E por encerrar os agradecimentos a minha família, nada menos importante minha querida mãe, mamãe, que sempre será o maior dos meus agradecimentos, foi ela quem me deu à luz, me ilumina e ora por mim todos os dias de sua vida, trabalha, batalha, sofre meus lutos e soleniza minhas vitórias; eu devo a ela tudo o que sou hoje.

COLÉGIO MONTESSORI SANTA TEREZINHA – Vivi os primeiros 17 anos de minha vida dentro do Montessori, então não posso deixar de agradecer o carinho e o cuidado ímpar que todo o quadro de funcionários (desde limpeza e segurança até o financeiro, docentes e diretoria) que sempre se preocuparam com meu crescimento, desenvolvimento e amadurecimento enquanto estive em minha infância e adolescência. E ainda em especial as minhas duas coordenadoras pedagógicas (Branca Denigres Fausto e Ivete Fierro Segabinazzi) que tanto me ensinaram por esta caminhada da vida. Lá pude fazer protuberantes amizades (Piu, Vitu, Lenharo, Lincoln, Marião, Lu, Mu, Rafitz e Didi) das quais carrego comigo hoje e tenho certeza que carregarei por toda minha passagem pela terra. Amigos verdadeiros que sempre me apoiaram e estiveram comigo nos momentos em que mais precisei.

FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS – Os 4 anos seguintes de minha vida pude aprender a estudar e crescer de uma forma distinta, um pouco mais liberal, sem a supervisão direta de professores. Mas devo muitos agradecimentos ao quadro docente da FMU que me fomentaram, e me forjaram o professor, pesquisador e treinador que sou hoje. A graduação em educação física me proporcionou um enorme crescimento profissional, me trouxe colegas de profissão e amigos incríveis (Vitinho, Magrão, Tárík, Paulinho, Bruno Gion e Sheilinha) dos quais tenho certeza que posso contar para toda minha vida. Com a 14/200A pude trocar muitas experiências, ajudar e ser ajudado para a formação de grandes profissionais que estão hoje atuando de forma resplandecente no mercado de trabalho e no meio acadêmico. Devo agradecer em especial à alguns docentes, como os Professores Mes. Mário Augusto Charro e Rodrigo Chaves que sempre me inspiraram com suas didáticas e seus respectivos carismas em sala de aula, tenho meus votos de gratidão também à quem me orientou com muita atenção no trabalho de conclusão de curso, Professora Me. Ester Francisca Mendes Bôscolo, e também me apresentou ao Professor Me. Gilberto Pantiga Júnior, professor este que não tive a oportunidade de sentar em classe de aula, mas que me ensinou muito nos bastidores e me indicou aos estudos na Universidade Estadual de Campinas.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Primeiramente devo agradecer a Professora Me. Miriam Kannebley Frank por ter me ajudado a conquistar espaço no Laboratório de Sono e Exercício Físico que desde o início me recebeu de braços abertos e me proporcionou as melhores experiências possíveis no meio acadêmico e me ensinou a fazer ciência. Agradeço também a todos os membros que frequentaram e ainda frequentam o LASEF com atenção especial para Beatriz da Silva Franco que me acompanhou em meus experimentos e me ajudou muito em atividades laboratoriais. Ao quadro docente em especial as Professoras Dras.

Rosângela Maria Neves Bezerra, Adriana Souza Torsoni e Fúlvia de Barros Manchado Gobatto pela colaboração em meu projeto e ao Professor Dr. Luciano Allegretti Mercadante pelos conselhos. Grande agradecimento aos quadros de limpeza, segurança e manutenção (em especial ao Erik e a Marisa) que sempre proporcionaram grande infraestrutura para que eu pudesse desenvolver e me dedicar ao meu projeto de forma integral e consistente. Aos funcionários da DAC que colaboraram com trâmites internos e aos funcionários da cantina, aonde tive muitos momentos de descontração.

OS MERCENÁRIOS – Um apelido descontraído para uma genuína amizade que nasceu em 2014 e que eu sou eternamente grato. Os Professores Drs. Rodolfo Marinho e Lucas Dantas Maia Forte, que enquanto alunos de doutorado, me ajudaram muito a traçar meu perfil crítico como professor e pesquisador, além de grandes momentos de descontração extra acadêmicos. Adjunta aos mercenários está Carolina Uerlings Maffra uma grande amiga que me proporcionou apoio moral e colaborou fortemente com minha coleta de dados, a qual eu sou eternamente grato.

REPÚBLICA VENTANIA – Uma república liderada pelo aluno de engenharia e esporte Gabriel Baueb, que sempre me proporcionou grandes momentos, com discussões extra acadêmicas e o eterno time de futebol. Neste parágrafo posso salientar a presença de outros grandes membros (André, Boico, Luiz, Márcio, Passarinho, Paulossi, Meiadois e Daleste) que muito me ajudaram com atividades dentro da Unicamp.

ASSOCIAÇÃO ATLÉTICA ACADÊMICA KAMAL ISMAIL – Agradecimentos especiais à atlética que me procurou, me ajudou muito e desde então sempre apostou em mim. Tive a oportunidade de conviver e passar momentos incríveis de alegria, tristeza e descontração durante as competições com os times de futsal feminino e o time de futebol de campo masculino.

BAR PRAIA – Não poderia deixar de agradecer ao Professor Dr. Marcelo Felipe dono do Bar Praia, no qual eu pude passar grandes momentos de descontração junto aos funcionários (Vitão e Renan) e também com os alunos de pós graduação (Chadi, Diogo, Brisola, Wagner, Bolt, Professores Drs. Filipe Sousa, Ivan Masselli dos Reis, Wladimir Beck e José Diego Botezelli) discutindo assuntos acadêmicos e até por muitas vezes redigindo textos em momentos que eu queria “fugir” da universidade.

ANDREA MACULANO ESTEVES – Por final e encerrando com chave de ouro expresso aqui eterna gratidão à minha orientadora do projeto de mestrado Professora Dra.

Andrea Maculano Esteves, a qual tem sido de notável inspiração para mim tanto academicamente quanto como ser humano. Fui muito bem recebido em um momento delicado e de grande desafio. Me ofertou todo o apoio e condição necessária para que eu tomasse realmente a decisão de me mudar para Limeira, me introduziu na Unicamp, e me fez ter autoconfiança para tocar minha vida distante de minha família e me entregando integralmente a pesquisa. Me deu forças e não me deixou desistir no momento que fui reprovado no primeiro processo seletivo e de quebra ainda conseguiu com extrema competência me orientar para que pudéssemos aprovar uma difícil bolsa de estudos que me remunerava para somente me dedicar aos estudos. Hoje mais do que nunca me inspiro na sua forma de encarar o cotidiano, e na sua resolução de problemas. Agradeço por me proporcionar o crescimento como professor e pesquisador, me orientar dentro de sala de aula enquanto tento ser didático em lecionar, e ao mesmo tempo me auxilia dentro do laboratório com o desenvolvimento da pesquisa. Me motiva e fomenta o meu brio, sem deixar de me chamar a atenção quando necessário, e me dar conselhos de como agir em determinadas situações para proporcionar as melhores tomadas de decisões.

Gratidão em forma de carinho, abraço, beijo, sorriso, alegria ou qualquer outro afeto que traduza a palavra amor. O amor é o elo que nos une, é o que nos faz mais fortes, é o norte da bússola, é onde encontramos a válvula de escape para todo e qualquer problema que tenhamos. Assim sendo, não há momento mais pertinente que este para expressar todo o sentimento de gratidão que tenho para com todas estas pessoas, que fizeram, fazem e sempre farão diferença em minha vida.

Obrigado!

RESUMO

Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é um distúrbio do movimento relacionado ao sono, caracterizado (a) por uma sensação desconfortável e o desejo de mover as pernas. Estudos tem evidenciado esta síndrome em crianças, adolescentes, adultos, doadores regulares de sangue e gestantes, e, esta linha tem sugerido investigar a deficiência de ferro. A suplementação de ferro tanto intravenosa quanto via oral tem se provado benéfica no tratamento da síndrome. O exercício físico por sua vez, traz diversos benefícios e também tem sido observado no tratamento da SPI. O presente estudo teve como objetivo a influência do exercício físico e da suplementação de ferro em um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono (SPI). Foram utilizadas ratas Wistar com 60 dias de idade (prenhas aos 70-75 dias), e todos os procedimentos foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética da UNICAMP. Os animais foram distribuídos em 4 grupos após a prenhez: Controles dieta padrão (CTRL/Não Prenhe – CTRL/Prenhe); Dieta com suplementação de ferro (Sfe/P); Exercício físico + dieta padrão (EF/P); Exercício físico + dieta com suplementação de ferro (Sfe+EF/P). O esfregaço vaginal foi realizado, para se estabelecer o ciclo estral das ratas, e, posteriormente emprenha-las para a coleta de dados. A atividade locomotora foi avaliada através do teste *Open Field* (campo aberto). Os animais foram submetidos a um programa de exercício físico aeróbio (natação) durante o período de prenhez, 6 dias por semana, até o 20º dia de prenhez. Para os grupos suplementação de Ferro, foi mantida durante o período de prenhez a dieta de 100 mg/kg de Fe. Para o grupo de dieta padrão foi mantida a dieta de 40 mg/kg de Fe. Ao término do experimento os animais foram eutanasiados individualmente, com a extração do estriado para análise da expressão do receptor D2, DAT, TH. Para avaliar as proteínas de interesse foi utilizada a técnica de *Imunoblot*. Os resultados referentes a atividade locomotora sugerem que a suplementação de ferro não obteve diferença em relação ao grupo controle em nenhuma variável. O exercício físico obteve redução nas variáveis ambulação total e *rearing*, e aumento na variável *grooming*. O tratamento combinado entre suplementação de ferro e exercício físico obteve redução nas variáveis ambulação total, *rearing* e *grooming*, e aumento no tempo total de *freezing*. Através do método *Imunoblot* podemos notar reduções das expressões dos receptor de dopamina D₂ para o grupo Sfe EF P em comparação ao grupo CTR P, o transportador de dopamina (DAT) não mostrou diferença estatística para nenhum dos grupos, a tirosina hidroxilase (TH) por sua vez se mostrou reduzida no grupo Sfe EF P em relação ao CTR P. Portanto podemos concluir que a predominância do tratamento foi positiva, e que os tratamentos não farmacológicos (suplementação de ferro e exercício físico) de forma combinada tiveram eficácia no combate a síndrome.

ABSTRACT

Restless Legs Syndrome (RLS) is a sleep-related movement disorder characterized by uncomfortable feeling and a desire to move the legs. Studies have shown this syndrome in children, adolescents, adults, regular blood donors and pregnant women, and this line has suggested investigating iron deficiency. Both intravenous and oral iron supplementation has been shown to be beneficial in the treatment of the syndrome. Physical exercise in turn has several benefits and has also been observed in the treatment of RLS. The present study aimed to influence the physical exercise and iron supplementation in an animal model of sleep-related movement disorders (RLS). Wistar rats were used at 60 days of age (pregnant at 70-75 days), and all procedures were submitted to the approval of the Ethics Committee of UNICAMP. The animals were divided into 4 groups after pregnancy: standard dietary controls (CTRL / non-pregnant - CTRL / Prenhe); Diet with iron supplementation (Sfe / P); Physical exercise + standard diet (EF / P); Exercise + diet with iron supplementation (Sfe + EF / P). The vaginal smear was performed to establish the estrous cycle of the rats, and then to collect them for data collection. The locomotor activity was evaluated through the Open Field test. The animals were submitted to a program of aerobic physical exercise (swimming) during the pregnancy period, 6 days a week, until the 20th day of pregnancy. For the Iron supplementation groups, a 100 mg / kg Fe diet was maintained during pregnancy. For the standard diet group, the diet was maintained at 40 mg / kg Fe. At the end of the experiment the animals were euthanized individually, with striatal extraction for analysis of D2, DAT, TH receptor expression. To evaluate the proteins of interest, the Immunoblot technique was used. The results regarding locomotor activity suggest that iron supplementation did not differ in relation to the control group in any variable. The physical exercise obtained reduction in the variables total ambulation and rearing, and increase in the variable grooming. The combined treatment between iron supplementation and physical exercise obtained reduction in the variables total ambulation, rearing and grooming, and increase in total freezing time. By the Immunoblot method we can see reductions in dopamine D2 receptor expression for the Sfe EF P group compared to the CTR P group, the dopamine transporter (DAT) showed no statistical difference for any of the groups, tyrosine hydroxylase (TH) by (P <0.05). The results showed that the treatment was predominantly positive, and that non-pharmacological treatments (iron supplementation and physical exercise) in combination were effective in combating the syndrome.

SUMÁRIO

1 – Introdução	14
2 – Objetivo Geral	15
3 – Objetivos Específicos	15
4 – Justificativa	16
5 – Revisão da Literatura	16
6 – Metodologia	25
6.1 – Animais	25
6.2 – Delineamento Experimental	25
6.3 – Procedimentos Experimentais	26
6.3.1 – Campo aberto	26
6.3.2 – Esfregaço Vaginal e Cruzamento	26
6.3.3 – Exercício Físico	27
6.3.4 – Suplementação de Ferro	28
6.3.5 – Eutanásia	31
6.3.6 – Extração de Tecidos	31
6.3.7 – Imunoblot	31
6.3.8 – Análise Estatística	32
7 – Resultados	32
8 – Discussão	38
9 – Conclusão	41
10 – Referências Bibliográficas	42

11 – Anexos	52
-------------------	----

1 – INTRODUÇÃO

Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é um dos Distúrbios do Movimento Relacionados ao Sono (DMRS), caracterizado (a) por uma sensação desconfortável e o desejo de mover as pernas (Grote et al., 2009; García-Borreguero & Williams, 2010). Foi inicialmente descrita pelo médico inglês Sr. Thomas Ekbom Willis em 1685, este, descrevia que os pacientes não conseguiam dormir por conta de contrações de membros inferiores e superiores (Ohayon et al., 2012). Alguns autores se referem a SPI como *Willis-Ekbom Disease*. Segundo Spolador et al. (2005), pacientes com SPI relatam sensações de “rastejar”, “engatinhar”, “formigamentos”, “queimadura”, “dor”, “comichão”, “choques elétricos”, “amarrar”, “tensão” e/ou desconforto nos membros. Os sintomas normalmente surgem em situações de repouso, durante a noite ou antes do sono (Trenkwalder & Paulus, 2010; Thorpy, 2012).

A epidemiologia da síndrome tem sido investigada com maior frequência desde a década de 2000, período em que as pesquisas começaram a delinear um parâmetro epidemiológico mais específico, através do incentivo à produção científica e tecnológica. Segundo Kuchukhidze et al. (2012) a prevalência da síndrome em diferentes proporções pode ser explicada por diferentes estudos, métodos, pré-disposição genética, etnias e fatores ambientais. A literatura estabelece dois tipos de SPI: idiopática (forma isolada) e sintomática (secundária) quando em associação a outras condições e/ou patologias como gravidez, insuficiência renal crônica, deficiência de ferro, déficit de atenção e hiperatividade, distúrbios neurológicos, artrite reumatoide, entre outras (Ekbom, 1945; Winkelmen, 2006; Oner et al., 2007; AASM, 2012).

Estudos têm demonstrado esta síndrome em crianças, adolescentes, adultos, doadores regulares de sangue e gestantes, e, esta linha tem sugerido investigar a deficiência de ferro (Birgegård et al., 2010; Daubian-Nosé et al., 2014). A síndrome se apresenta com frequência em gestantes (aproximadamente 26%), podendo aparecer pela primeira vez, ou tornar-se pior durante a gestação (Pereira Jr et al., 2013). O ferro é importante para uma função neurológica normal, sendo que uma delicada regulação é necessária para que isto ocorra (Dusek et al., 2012). O ferro tem uma distribuição heterogênea em diferentes regiões e células do cérebro (Menegassi et al., 2010), e, segundo Jellen et al. (2009) desequilíbrios em quantidades de ferro podem ocorrer em indivíduos por motivos diversos, não sendo simples de se identificar.

O número de estudos com tratamentos não farmacológicos tem aumentado muito nos últimos anos, e estes tratamentos têm sido muito utilizados para o controle da SPI. A suplementação de ferro intravenosa pode ser usada como um método não farmacológico, sendo uma terapia eficaz (Vadasz et al., 2013). Outra alternativa parece ser o uso de suplementação

de ferro via oral, que vem obtendo resultados positivos no controle da síndrome (Grote et al., 2009; Mohri et al., 2012; Soto-Insuga et al., 2013). O exercício físico por sua vez, traz diversos benefícios e também tem sido observado no tratamento da SPI. Aukerman et al. (2006) encontraram melhoras nos sintomas depois de submeter indivíduos ao treinamento resistido e aeróbio. Esteves et al. (2009, 2011) também demonstraram melhoras nos sintomas da SPI com exercício físico aeróbio.

Estudos em modelos animais dos DMRS vêm sendo conduzidos na tentativa de elucidar a sua relação com os níveis de ferro e a prática do exercício físico (Ganz, 2006; Qu et al., 2007; Vadasz et al., 2013; Cho et al., 2014). Em estudo realizado por Frank et al. (2016) foi demonstrado a eficácia do exercício físico (protocolo de esteira que consistiu em 5 sessões por semana durante 8 semanas) na modulação dos sintomas da síndrome, confirmada pela análise comportamental através do teste campo aberto. Os grupos de animais que realizaram exercício físico (SHR e Wistar) apresentaram redução dos sintomas quando avaliados pelo teste *Open-Field* em relação ao grupo SHR controle. Ko et al. (2013) e Cho et al. (2014) demonstraram aumento nas expressões de receptores D₂ através de um protocolo de exercício físico 1 vez ao dia durante 28 dias. Arnold & Salvatore (2016) conduziram um estudo com ratos Brown-Norway/Fischer envelhecidos e mostraram que 35 minutos de exercício físico durante dois períodos pré-determinados de 12 dias consecutivos foram suficientes para aumentar em 42% as expressões de tirosina hidroxilase em comparação com os ratos não exercitados.

2 – OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono).

3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência de um protocolo de exercício físico na atividade locomotora de ratas prenhes.

Avaliar a influência da dieta de suplementação de ferro, na atividade locomotora de ratas prenhes.

Quantificar as variáveis moleculares (receptor de dopamina D₂, tirosina hidroxilase e transportador de dopamina - DAT) em resposta ao protocolo de exercício físico e dieta de suplementação de ferro.

4 – JUSTIFICATIVA

A atividade física e o exercício físico tem sido estudado na população gestante ao longo de décadas. Todavia, a relação com os níveis séricos de ferro tem sido discutida com maior ênfase nos últimos anos, sendo estes uns dos fatores que mais podem contribuir negativamente para um DMRS (síndrome das pernas inquietas). Desta forma podemos mostrar com maior clareza os benefícios sistêmicos do exercício físico e da suplementação de ferro na população gestante em combate aos sintomas comuns à SPI.

5 – REVISÃO DA LITERATURA

Síndrome das Pernas Inquietas e Movimento Periódico das Pernas

Dentre os Distúrbios do Movimento relacionados ao Sono (DMRS), conforme classificados pela Academia Americana de Medicina do Sono (2012), estão presentes a Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) e o Movimento Periódico das Pernas (MPP). Esses DMRS apresentam características distintas, visto que descrição do MPP foi realizada em função da SPI. No entanto, como a origem desses distúrbios não está totalmente esclarecida, as formas de abordagem terapêutica podem ser apresentadas de maneira concomitante.

Na SPI, a sensação de desconforto pode piorar quando o indivíduo está em repouso ou em inatividade, como sentado ou deitado (Wayne et al., 2004; Ohayon et al., 2012), o que geralmente ocorre durante a noite dificultando o início do sono do paciente. Podem ocorrer picos de intensidade na madrugada, sendo que durante o dia os sintomas podem ser mais leves ou não existir, mostrando uma evidência do caráter circadiano (Trenkwalder et al., 2005). O alívio parcial ou total do desconforto pode ocorrer através de movimentos como caminhar, alongar-se ou correr, e a intensidade e frequência dos sintomas varia de um indivíduo para o outro, sendo que um paciente pode permanecer assintomático por determinados períodos, ou ser acometido pelos sintomas várias vezes ao dia (Masuko et al., 2004; Ohayon et al., 2012).

O MPP se caracteriza pela extensão rítmica dos membros inferiores, seguidos de uma dorsiflexão do tornozelo, ocasionando uma flexão dos joelhos e uma ativação motora generalizada nos membros inferiores, durante o sono. Em média os movimentos duram de 0,5

a 5 segundos, ocorrendo com frequência de um a cada 20 a 40 segundos, sendo que cada episódio de MPP pode ter duração de alguns minutos a horas (AASM, 2012).

A SPI/MPP pode ocorrer de maneira isolada (forma idiopática) ou como em 1/3 dos casos (Trenkwalder et al., 2005) secundariamente, em associação a outras condições e/ou patologias como gravidez, insuficiência renal crônica, deficiência de ferro, déficit de atenção e hiperatividade, distúrbios neurológicos, artrite reumatoide, entre outras (Ekbom, 1945). Existe uma correlação entre a prevalência da SPI/MPP e o aumento da idade, e sua prevalência é maior em mulheres do que em homens (Ohayon, 2002), fato que pode ser relacionado à influência de hormônios como o estrogênio e progesterona. Existe uma relação familiar em 1/3 dos casos, sendo a herança provavelmente autossômica dominante e de penetrância variável (Ondo et al., 1996; Montplaisir et al., 2000).

Evidências nos mostram a forma idiopática ou isolada com grandes componentes hereditários, com ênfase em 5 genes, que em estudos de ligação genética de numerosas famílias com membros afetados identificam a suscetibilidade (Winkelman, 2006; Picchetti & Picchetti, 2010). Trenkwalder & Paulus (2010) dos genes MEIS1, BTBD9, MAP2K5, LBXCOR1 e PTPRD e os relacionaram com a síndrome. Jellen et al. (2009) ainda destacam que BTBD9 é o mais modulado em humanos.

Muitas das causas secundárias associadas à SPI/MPP também estão ligadas à problemas relacionados ao metabolismo do ferro (Fe), o que sugere que a insuficiência de ferro pode ser um fator fisiopatológico para o distúrbio (Richards et al., 2015). Isso também é sugerido pelos níveis séricos de ferritina e transferrina, que podem ser inversamente correlacionados ao agravamento da SPI/MPP (O'keeffe et al., 1994; Sun et al., 1998). Das manifestações secundárias da SPI, a associada à gravidez é a mais comum. A gravidez pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de SPI, pois a probabilidade de se desenvolver a doença nessa condição é de 2 a 4 vezes maior (Manconi et al., 2004a). Os níveis de ferro e folato podem estar associados ao desenvolvimento da SPI durante a gravidez, já que em gestantes sua demanda aumenta consideravelmente e seus níveis plasmáticos diminuem (Manconi et al., 2004a; Minár et al., 2015).

Vários tratamentos vêm sendo descritos na literatura, e dependem da gravidade do distúrbio e dos impactos que podem causar no bem estar do paciente. Entre os não farmacológicos estão atividade física (Aukerman et al., 2006, de Mello et al., 2002, 2004, Esteves et al., 2009, 2011), compressão pneumática (Rajaram et al., 2005; Lettieri et al., 2009), massagem (Gamaldo et al., 2006), terapia com luz infravermelha (Mitchell et al., 2011), medicina alternativa como acupuntura (Cui et al., 2008) e a suplementação de ferro. O ferro

pode ter administração oral ou endovenosa. Em indivíduos afetados pela SPI com baixos níveis séricos de ferritina, a administração oral de ferro parece ser eficiente, com redução dos sintomas após a suplementação (O’Keeffe et al., 1994). Já a terapia com ferro endovenoso pode ser eficiente principalmente em pacientes com níveis séricos de ferritina dentro da faixa normal (Earley et al., 2004).

A deficiência de Fe no cérebro leva a diminuição dos receptores D1 e D2 (Erikson et al., 2000), reduzindo o transporte da dopamina extracelular para o estriado, devido à diminuição da quantidade de ferritina em algumas regiões do cérebro (Allen, 2004), visto que as duas principais hipóteses fisiopatológicas da Síndrome das Pernas Inquietas-SPI envolvem o sistema dopaminérgico (seja por uma alteração no sistema dopaminérgico ou por uma redução no metabolismo do ferro, um co-fator da tirosina hidroxilase - enzima que participa da produção da dopamina).

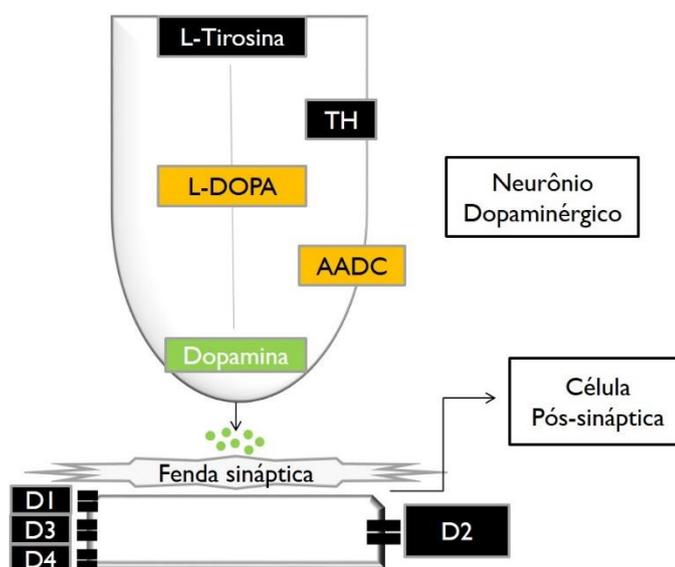


Figura 1. Ilustração resumida da via de síntese da dopamina.

Relação entre Gravidez e Síndrome das Pernas Inquietas

Durante a gravidez, é comum haver alterações no padrão e duração do sono, associadas às mudanças físicas que ocorrem na mulher grávida (Mindell et al., 2015). O tempo total de sono da gestante aumenta durante o primeiro trimestre da gravidez, havendo diminuição das fases 3 e 4 do sono não REM a cada trimestre. Durante o terceiro trimestre de gravidez, há a diminuição na porcentagem do sono de ondas lentas e do sono REM, ocorrendo mais eventos de vigília após o início do sono (Driver et al., 1992; Hertz et al., 1992; Brunner et al., 1994).

Associado a isso, as mulheres relatam nesse período aumento da frequência urinária, despertares noturnos, sono agitado e dificuldade em dormir, além de desconforto nas pernas e

dores nas costas. Nesse período, diversos distúrbios do movimento podem ocorrer como ataxia, coreia, distonia, tremor essencial, doença de Parkinson, síndrome de Tourette, doença de Wilson, além da SPI (Kranick et al., 2010), podendo afetar o desenvolvimento fetal, o trabalho de parto, a lactação e a habilidade de cuidar do recém-nascido.

Os fatores de risco para o aumento de incidência da SPI em gestantes que têm sido mostrados nos estudos incluem multiparidade, histórico familiar positivo, desenvolvimento prévio da SPI, anemia, deficiência de ferro e folato ou mudanças hormonais. De acordo com Paiva et al. (2000) os níveis de ferro devem se encontrar em níveis mais altos que 11g/dL para que não se diagnostique o quadro de anemia. Todavia naturalmente durante a gestação, mulheres reduzem em até 40% a concentração de ferro, havendo assim a necessidade da suplementação de ferro (Souza et al., 2002; Montenegro et al., 2015). Os estudos sobre esse tema se iniciaram em 1945 e desde então a prevalência da SPI em mulheres grávidas varia entre 11 e 32%, avaliada em grupos de 100 a 650 mulheres. Essa variabilidade se deve principalmente à localização geográfica de cada estudo e à fase da gestação das mulheres analisadas (Manconi et al., 2004a). Além disso, os critérios utilizados nos estudos variam, pois muitos deles foram feitos antes da padronização feita pelo Grupo Internacional de Estudos da Síndrome das Pernas Inquietas em 1995 (Allen et al., 2003).

O primeiro estudo, feito por Ekbom, encontrou uma prevalência de 11,3% entre 486 gestantes (Ekbom, 1945). Porém, em 1953 Jolivet analisou um grupo de 100 gestantes, encontrando prevalência de 27% (Jolivet, 1953).

Em 2004, Manconi et al. realizaram uma pesquisa em um grupo de 642 mulheres durante todo o período gestacional e encontraram prevalência de 26% de SPI, incluindo mulheres que já haviam sido afetadas antes da gravidez, que correspondiam a aproximadamente 10%, e as que nunca haviam sido afetadas antes da gravidez (Manconi et al., 2004b).

A prevalência da SPI aumenta progressivamente no 3º ou 4º mês de gestação, havendo um pico durante o terceiro trimestre, especialmente no 8º mês, seguida de diminuição dos sintomas no 9º mês e alívio após o parto. A intensidade e frequência dos sintomas também têm pico no terceiro trimestre, tanto em mulheres já afetadas anteriormente quanto em não afetadas (Manconi et al., 2004a). Em mulheres não afetadas anteriormente, os sintomas da SPI duram aproximadamente 3 a 5 meses. Mulheres que já tiveram várias gestações geralmente reclamam dos mesmos sintomas em todas elas (Goodman et al., 1988).

A deficiência de Fe no cérebro leva a diminuição dos receptores D1 e D2 (Erikson et al., 2000), reduzindo o transporte da dopamina extracelular para o estriado, devido à diminuição da quantidade de ferritina em algumas regiões do cérebro (Allen, 2004), visto que as duas

principais hipóteses fisiopatológicas da Síndrome das Pernas Inquietas-SPI envolvem o sistema dopaminérgico (seja por uma alteração no sistema dopaminérgico ou por uma redução no metabolismo do ferro, um co-fator da tirosina hidroxilase - enzima que participa da produção da dopamina).

Em um estudo feito com 186 mulheres em segunda gestação na França, verificou-se que 32% eram afetadas pela SPI no 3º trimestre da gravidez, demonstrando que o fato da mulher já ter tido outras gestações está estreitamente associado com a incidência da doença nesse período. Em 64,8% das mulheres afetadas, os sintomas desapareceram após o parto, sendo que em metade delas a melhora ocorreu em menos de duas semanas após o parto (Neau et al., 2010).

Em 2010, Alves et al. realizaram uma pesquisa no Brasil, onde foi demonstrada uma prevalência de 13,5% de SPI em grupo de 524 mulheres grávidas entre 18 e 45 anos, sendo que 53,5% das pacientes apresentaram sintomas graves e 15,2% das afetadas apresentaram piora no terceiro trimestre. A relação temporal entre os sintomas da SPI e o terceiro trimestre da gravidez sugere que durante esse período existem fatores que exacerbam a SPI, mas apenas se manifestam em grávidas que tenham predisposição para desenvolver a síndrome. A presença e a duração da SPI dependem principalmente da predisposição individual de cada mulher a apresentar sintomas (Manconi et al., 2004a). Além disso, Wesström et al. (2014) demonstraram que mulheres com sintomas de SPI antes da gravidez apresentam risco aumentado para depressão pré e pós parto.

Modelos Animais e a Síndrome das Pernas Inquietas

A qualidade de um modelo animal é caracterizada pela sua confiabilidade e sua reprodutibilidade (Baier et al., 2007). Para que um modelo animal da SPI/MPP seja desenvolvido, componentes essenciais do fenótipo animal (comportamentais) da síndrome têm de ser definidos e as hipóteses sobre a etiologia da SPI/MPP têm de ser aplicados aos animais, para que seja possível constatar se o fenótipo animal esperado pode ser observado.

Com o maior número de pesquisas sobre os distúrbios do movimento e o desenvolvimento de novos modelos animais utilizando ratos e camundongos, mecanismos e lacunas ainda existentes sobre os distúrbios estão sendo esclarecidas.

Em 2000, Ondo et al. Realizaram um estudo com ratos lesionados na área subcortical A11 com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), onde se encontram corpos de neurônios dopaminérgicos medulares que podem modular respostas nociceptivas. A lesão nesta área

mostrou aumento à latência do sono, que passou a ter menos tempo de sono, além de maior movimentação dos membros, semelhante à inquietação motora encontrada na SPI.

Outra pesquisa teve como intuito estudar consequências de lesões na medula espinhal de ratos e a sua influência na presença de movimentos nas patas durante o sono. Eletrodos foram implantados nos animais para avaliação do sono e para realização do registro eletromiográfico (EMG) das patas posteriores e após isso foi feita a lesão a nível T9 da medula espinhal. Durante 7 dias consecutivos foi feito o exame polissonográfico, e observou-se uma diminuição na eficiência do sono e o surgimento de movimentos das patas durante o sono após a lesão, o que sugere sua influência nos movimentos (Esteves et al., 2004; 2007).

Em estudo realizado em 2007 por Qu et al. foram feitas lesões nos núcleos A11 com 6-OHDA combinadas com dieta deficiente em ferro. Tanto nos ratos lesionados quanto nos ratos não lesionados, os níveis séricos de Fe foram semelhantes, mas os lesionados tiveram uma diminuição nos sítios de Fe do SNC. Já a atividade locomotora foi maior nos ratos lesionados e nos ratos deficientes em Fe, quando comparados aos seus respectivos grupos controles, sendo que os ratos lesionados que foram privados de Fe tiveram um aumento ainda maior da atividade locomotora (Qu et al., 2007), mostrando que o comportamento dos animais observado nesse estudo é consistente com a SPI (Ondo et al., 2007).

Um outro modelo possível para SPI seria o camundongo *knock-out* D3. Alguns estudos têm demonstrado que há altas densidades do receptor D3 expressas nas camadas superficiais do corno dorsal da região lombar e cervical da medula espinhal de ratos, o que sugere que esses receptores podem ter um papel no processo sensorial ou nociceptivo do organismo. Um rato *knock-out* D3, apresenta hiperatividade, aumento de atividade locomotora e hipertensão (Espinar et al., 1997). Este fenótipo lembra algumas das características de paciente com SPI que expressam MPP (Ondo et al., 2007), e pode ser utilizado com modelo animal de SPI.

Foi demonstrado pelo nosso grupo (Lopes et al., 2012) que animais com lesão do núcleo dopaminérgico A11 por 6-OHDA, além de serem considerados como modelos animais de SPI, também apresentam movimentos das patas durante o sono, sendo considerados também um modelo animal de MPP.

Mariano et al. (2014) observaram uma maior atividade locomotora de ratas durante o período de prenhez em um determinado período do dia (descrito por Qu et al (2007); como correspondente ao período crítico dos sintomas de SPI em humanos) ao comparar a ratas não prenhes, caracterizando um modelo animal de SPI de ratas prenhes.

Tratamento não farmacológico para SPI

Vários tratamentos (farmacológicos e não farmacológicos) para a SPI vêm sendo descritos na literatura e variam de acordo com a gravidade dos sintomas e dos impactos que podem causar no bem estar do paciente. Neste contexto, iremos destacar somente dois desses tratamentos: 1) Suplementação de ferro; 2) Exercício Físico.

Suplementação de ferro

A deficiência de ferro (DFe) é a deficiência de micronutriente mais comum no mundo. Em todas as espécies, a concentração do ferro nos fluídos biológicos está estreitamente regulada para prover o ferro quando necessário, e evitar a toxicidade, considerando-se que o excesso de ferro pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a sua diminuição pode levar à anemia (Zhang e Enns, 2008). A DFe durante a gravidez pode ter consequências graves para a mãe e seu bebê. Processos que limitam a disponibilidade de ferro para o feto incluem anemia grave materna, hipertensão materna que restringe o fluxo de nutrientes para a placenta, tabagismo e parto prematuro (Siddappa et al., 2007).

O primeiro estudo que utilizou terapia oral de Fe foi feito em 1994 por O’Keeffe et al. com idosos distribuídos em três grupos de acordo com os níveis séricos de ferritina. Os indivíduos afetados pela SPI com menor nível de ferritina (<18 mcg/L) apresentaram os melhores benefícios na redução de sintomas após a administração oral de 200mg de sulfato de ferro durante dois meses, três vezes ao dia.

Por outro lado, um estudo duplo-cego feito em 2000, onde um grupo recebeu placebo e o outro recebeu sulfato de ferro por três meses, mostrou que a terapia oral com ferro não foi eficiente na reversão dos sintomas da SPI (Davis et al., 2000). Como a absorção de Fe é maior quanto menor o nível de ferritina sérica (Larsen & Milman, 1975), acredita-se que esse resultado ocorreu devido aos altos níveis séricos de ferritina (134,8 mcg/L) do grupo tratado com Fe (Earley, 2009). Já Mehmood et al. (2014) demonstraram que em pacientes com SPI, após um tratamento com Dextran (1000mg) houve uma redução dos sintomas da síndrome, no entanto, 24% desses pacientes não responderam ao tratamento.

Em 2009, um estudo foi feito em pacientes que apresentavam níveis séricos de ferritina entre 15 e 75mcg/L, e que foram distribuídos em 2 grupos, que receberam por 3 meses: 1) sulfato de ferro oral, 2) placebo. O grupo tratado apresentou melhora dos sintomas da SPI e ainda um aumento de 60% de sua ferritina sérica (Wang et al., 2009). Os autores concluíram que a terapia com Fe foi eficaz para pacientes com níveis séricos de ferritina de <45mcg/L até 75mcg/L, e que para pacientes com níveis mais altos de ferritina sérica deve-se pensar em como

maximizar a absorção de Fe no trato digestório, a fim de que esse Fe altere os estoques sistêmicos a ponto de fazer diferença nos sintomas da SPI (Earley, 2009).

Já a demanda de Fe durante a gravidez aumenta de 3 a 4 vezes, e a de folato aumenta de 8 a 10 vezes em relação a uma não-gestante, pois além do crescimento do feto demandar mais Fe, ocorre também a hemodiluição (Manconi et al., 2004a). Em um estudo feito por Lee et al. (2001) com 30 mulheres grávidas, as 7 mulheres que apresentaram SPI durante o terceiro trimestre da gestação tiveram níveis de folato sérico mais baixos antes e durante a gravidez, e níveis de Fe sérico menores no período anterior ao da gravidez, quando comparadas às mulheres não afetadas. Apesar das concentrações plasmáticas serem menores, o Fe e o folato estavam dentro dos valores normais nas mulheres afetadas (Lee et al., 2001). Manconi e seu grupo, em um estudo realizado com mulheres grávidas saudáveis e com SPI, ambas recebendo suplementação de Fe, encontraram valores semelhantes de Fe sérico e hemoglobina entre elas (Manconi et al., 2004b).

Exercício Físico

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando a associação entre a SPI/MPP com a atividade física (Phillips et al., 2000; Ohayon e Roth, 2002). Essas evidências são baseadas em vários fatores e apoiam o papel do exercício físico como uma intervenção não farmacológica para esses DMRS. De Mello et al. (1996, 2002, 2004) avaliaram em lesados medulares, que o exercício físico agudo (teste de esforço máximo) e o exercício crônico (treinamento por 44 dias no limiar ventilatório 1) reduziram significativamente o MPP durante o sono.

Já em estudo realizado em 2009 por Esteves et al. foi verificada uma melhora no padrão do sono e uma redução nos índices de MPP após a prática de exercício físico agudo e crônico, demonstrando também uma correlação negativa entre a liberação da β -endorfina e os índices de MPP, ou seja, os voluntários que apresentaram maiores níveis de β -endorfina plasmática após um teste de esforço máximo foram os que apresentaram maior redução nos índices de MPP. Giannaki et al. (2010) avaliaram os efeitos de uma única sessão de exercício físico nos MPP que ocorrem durante a hemodiálise. Os resultados demonstraram que tanto a sessão de 45 minutos de exercícios físicos sem resistência, quanto à sessão a 60% do consumo de oxigênio foram igualmente eficazes em reduzir significativamente o MPP em pacientes com SPI em relação ao cenário de não-exercício físico. Aukerman et al. (2006) realizaram um estudo envolvendo um programa de exercício físico combinado com o intuito de analisar a sua efetividade nos sintomas da SPI. Os resultados demonstraram que a partir da 6ª semana os sintomas da SPI apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle, não

havendo diferença significativa da 6^a em relação a 12^a semana. Esteves et al. (2011) demonstraram em pacientes com SPI uma redução significativa dos seus sintomas após 36 sessões de exercício físico aeróbio, reafirmando a eficácia dessa prática na diminuição dos efeitos da SPI.

Em modelos animais Ko et al. (2013) e Cho et al. (2014) contextualizaram um protocolo de exercício físico 1 vez ao dia durante 28 dias, e encontraram aumento nas expressões de receptores D₂ em animais SHR, considerados modelos de TDAH. O estudo de Frank et al. (2016) também encontrou aumento nas expressões do receptor D₂ nos animais que realizaram sessões de exercício físico e fizeram uso de enalapril, no estudo em questão utilizou-se um protocolo de esteira que consistiu em 5 sessões por semana durante 8 semanas consecutivas em machos do modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono (SHR), previamente descrito por Esteves et al. (2013).

Em 2014, Baek et al. conduziram um estudo com animais SHR e mostraram através de imuno-histoquímica aumento das expressões de tirosina hidroxilase nos grupos que fizeram exercício físico, no estudo em ponto foi utilizado um protocolo de esteira consistindo em 30min por dia durante 28 dias, chamando atenção também para o alívio dos sintomas pós tratamento. Arnold & Salvatore (2016) conduziram um estudo com ratos Brown-Norway/Fischer envelhecidos e mostraram que o exercício físico durante dois períodos pré-determinados foi suficiente para aumentar as expressões de TH (~ 42%) em comparação com os ratos não exercitados.

Esteves et al. (2016) realizaram um estudo para verificar o efeito protetor do exercício físico. Grupos foram submetidos ao exercício físico antes e após a indução da lesão nos núcleos A11, outros grupos foram submetidos ao exercício físico somente após a indução da lesão. Os resultados mostraram que 4 semanas de exercício físico foram suficientes para reduzir substancialmente o número de movimentos periódicos, e ainda mais expressivo para os grupos que realizaram o exercício físico antes e depois da cirurgia. Frank et al. (2016) encontrou aumento nas expressões do receptor D₂ e do transportador de dopamina DAT em animais Wistar e SHR que realizaram sessões de exercício físico durante 8 semanas em um protocolo de esteira e fizeram uso de enalapril. Ko et al. (2013) e Cho et al. (2014) também encontraram aumento nas expressões de receptores D₂ depois de utilizar um protocolo de exercício físico 1 vez ao dia durante 28 dias em animais SHR considerados modelos de TDAH.

Essa totalidade de estudos tem demonstrado que o exercício físico (aeróbio e resistido) podem ser vistos como componentes efetivos na melhora dos sintomas da SPI/MPP tanto em modelos animais quanto em diferentes populações, podendo ser utilizados tanto de maneira individualizada, como combinada como complementos aos tratamentos farmacológicos. Deve-se sempre levar em consideração o modelo de estudo para se estabelecer as variáveis, interpretar e assumir os resultados de maneira correta, para que possamos concretizar cada vez mais o potencial do exercício como ferramenta ímpar no tratamento da síndrome das pernas inquietas.

6 – METODOLOGIA

6.1 – Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar com 60 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética da UNICAMP (protocolo nº 3471-1). Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas aclimatizadas (entre 20°C e 22°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas individuais. Os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- Controle - dieta padrão (CTRL/NP – CTRL/P)
- Dieta com suplementação de ferro (Sfe/P)
- Exercício físico + dieta padrão (EF/P)
- Exercício físico + dieta com suplementação de ferro (Sfe+EF/P)

* NP: não prenhe; P: prenhe

6.2 – Delineamento Experimental

Os experimentos se iniciaram quando os animais atingiram 60 dias de idade. Neste período foi realizado o esfregaço vaginal nas ratas para a identificação das fases do ciclo estral. Antes da indução a prenhez, todas as ratas foram submetidas a testes de adaptação ao ambiente do campo aberto (*Open-Field*), que foi utilizado para avaliar o comportamento locomotor, sendo que cada teste teve a duração de 10 minutos por animal. Uma semana após a adaptação, as ratas foram submetidas novamente ao campo aberto, que constituiu na avaliação Basal. Após a avaliação basal, todas as ratas do grupo prenhe foram submetidas à presença do macho para

a indução da prenhez, e quando prenhes foram avaliadas no campo aberto nos dias 3, 10, 17 e 21 da prenhez juntamente com o grupo não prenhe. As ratas do grupo suplementação de Fe foram submetidas à dieta durante todo o período de prenhez e as ratas do grupo exercício físico realizaram as sessões de exercício físico (natação) 6 vezes por semana até o 20º dia de prenhez. Logo após o nascimento, mães e prole foram eutanasiados e tecidos foram coletados para posterior análise.

6.3 – Procedimentos Experimentais

6.3.1 – *Campo aberto*

A atividade locomotora foi avaliada no campo aberto (*Open-field*), que consiste em uma arena circular de madeira, com 76 cm de diâmetro, fechada por paredes brancas de 19cm de altura, com a parte superior aberta e o chão dividido em 12 quadrantes. Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho e observado por 10 minutos, sendo que apenas os 5 minutos finais foram avaliados. Primeiramente se realizou um teste de adaptação e posteriormente os animais passaram pelo teste basal, e os testes após o início da prenhez (3º, 10º, 17º e 21º dia) Todos os testes foram realizados entre 9h e 11h, pois os ratos são animais de hábitos noturnos, e este horário pode ser correlacionado com o período tarde/noite nos seres humanos, onde ocorre a piora dos sintomas da SPI (Qu et al., 2007). Os testes foram realizados sempre pelo mesmo avaliador.

Contadores manuais foram utilizados para marcar os seguintes parâmetros: ambulação total (quantidade total de quadrantes que o animal pisou com as 4 patas), frequência de *rearing* (número de vezes que o animal ficou apoiado nas duas patas traseiras), frequência de *grooming* (número de vezes que o animal manteve a boca ou as patas no corpo ou na cabeça), e tempo total de imobilização (total de tempo que o animal permaneceu totalmente imóvel, movendo apenas as vibrissas) (Fukushiro et al., 2007). Todas as variáveis do teste nos dizem respeito ao padrão de inquietação, fornecendo maiores detalhes sobre a locomoção dos ratos e a demonstração dos sintomas de acordo com o protocolo. O teste do campo aberto é um dos mais usados para medir atividade locomotora em ratos, e pode ser adequado para medir o desejo de se movimentar causado pela SPI (Manconi, 2007).

6.3.2 – *Esfregaço vaginal e cruzamento*

As ratas apresentam o ciclo estral que se inicia entre 35 e 45 dias de vida, com duração de 4 a 5 dias aproximadamente, apresentando 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro. A fase estro, que se inicia geralmente no período noturno, dura de 25 a 27 horas e é quando ocorre a ovulação espontânea das fêmeas. Estas também se tornam receptivas aos machos, apresentando mudanças comportamentais (Long & Evans, 1922).

Para a identificação das fases do ciclo estral, foi realizado diariamente no mesmo período do dia, o esfregaço vaginal das ratas, que consiste na introdução de soro fisiológico na abertura vaginal da rata com uma ponteira de 200 μ l, aspirando-se após alguns instantes o líquido contendo as células epiteliais da vagina. O líquido é espalhado sobre uma lâmina para a leitura no microscópio de aumento 40x, a fim de se observar o tipo de célula predominante para a identificação da fase do estro, fase na qual as ratas são submetidas à presença do macho para o cruzamento durante um período de aproximadamente 12h (19h dia 1 - 7h dia 2). Após a presença do macho, novamente é introduzido soro fisiológico no poro vaginal da fêmea para aspirar o material ali contido após a cópula para a leitura no microscópio, a fim de avaliar a presença de espermatozoides (Marcondes et al., 2002).

6.3.3 – *Exercício físico*

Os grupos Exercício Físico foram submetidos a uma adaptação ao meio líquido de até 30 dias, sendo esta, contabilizada até o momento em que a rata emprenhasse; a adaptação, teve como caráter sub limiar anaeróbio (2º limiar) e o tempo mínimo de 2 minutos e máximo de 15 minutos; com os primeiros 3 dias em água rasa (3cm), os 5 dias seguintes em água profunda (120 cm), e os demais dias também em água profunda (120cm) com adição de 3 % do peso corporal (De Lima et al., 2015).

Os animais foram submetidos a um programa de exercício físico aeróbio (natação) durante o período de prenhez, 6 dias por semana, até o 20º dia de prenhez. O volume de treino foi ajustado conforme o prolongamento no tempo de prenhez, sendo assim o primeiro terço de prenhez as fêmeas nadaram 30 minutos diários, no segundo terço 25 minutos diários, e, no terceiro terço 20 minutos diários. A variável intensidade do treinamento foi estabelecida através de uma relação massa/densidade, conforme o prolongamento do tempo de prenhez, sendo então estabelecida em 3% da massa corporal corrigida pela densidade ao longo do tempo de prenhez. A temperatura da água foi estabelecida em 30°C durante todo o período de adaptação e de

treinamento e os treinos foram realizados sempre as 19:00h. (dos Reis et al., 2011; Corvino et al., 2017).

6.3.4 – Suplementação de ferro

Para o grupo que recebeu dieta de suplementação em Fe, foi mantido durante o período de prenhez a dieta de 100 mgFe/kg de dieta; para o grupo de dieta padrão foi mantida a dieta de 40 mgFe/kg de dieta (Felt et al., 2006). A dieta foi produzida em parceria com o curso de Nutrição da FCA/Unicamp. A dieta foi produzida a partir de ingredientes purificados e a sua composição seguiu as formulações da AIN93-G, conforme apresentado nas tabelas 1, 2 e 3 (Reeves, 1997). A dieta de AIN93 padrão e suplementada em Fe foi realizada utilizando um mix mineral isento de Fe, adicionando a concentração desejada de Fe na forma de sulfato ferroso na preparação da dieta. Os valores apresentados na AIN93-G correspondem às necessidades da dieta do roedor na fase de crescimento, prenhez e de lactação (Reeves e al., 1993). Todas as dietas foram livremente disponíveis aos animais.

Tabela 1. Formulação da dieta (AIN93-G)

Ingredientes	AIN93-G (g/kg de dieta)
Amido de milho	397.486
Caseína	200.000
Amido de milho dextrinizado	132.000
Sacarose	100.000
Óleo de soja	70.000
Fibra	50.000
Mix Mineral	35.000
Mix Vitamínico	10.000
L-Cisteína	3.000

Bitartarato de colina	2.500
tert-butil-hidroquinona	14.0

Tabela 2. Mix mineral

Ingredientes	AIN93-G MX (g or mg/kg mix)
Carbonato de cálcio anidro (40.04% Ca)	357.00
Fosfato de potássio monobásico (22.76% P, 28.73% K)	196.00
Citrato de potássio, tripotássio monohidrato (36,16% K)	70.78
Cloreto de sódio (39,34% Na, Cl 60,66%)	74.00
Sulfato de potássio (44,87% K, 18,39% S)	46.60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24.00
<i>Citrato férrico (16,5% de Fe)</i>	<i>6.06</i>
Carbonato de Zinco (Zn 52,14%)	1.65
Metassilicato de Sódio 9H ₂ O (9,88% de Si)	1.45
Carbonato de manganês (Mn 47,79%)	0.63
Carbonato cúprico (57,47% de Cu)	0.30
Cromo Sulfato de potássio 12H ₂ O (10.42% Cr)	0.275
Ácido bórico (17,5% de B), mg	81.5
Fluoreto de sódio (45,24% F), mg	63.5
Carbonato de níquel (45% Ni), mg	31.8
Cloreto de lítio (16,38% Li), mg	17.4
Selenato de sódio anidro (41.79% Se), mg	10.25

Iodato de potássio (59,3% I), mg	10.0
Molibdato de amônio 4H ₂ O (54.34% Mo), mg	7.95
Vanadato de amônio (43,55% V), mg	6.6
Sacarose em pó	221.026

Tabela 3. Mix vitamínico

Vitamina	Quantidade (g/kg mix)
Ácido nicotínico	3.000
pantotenato de calico	1.600
Piridoxina-HCl	0.700
Tiamina-HCl	0.600
Riboflavina	0.600
Ácido fólico	0.200
Biotina	0.020
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (0,1% em manitol)	2.500
Vitamina E (alfa-tocoferol) 2 (500 UI / g)	15.000
Vitamina A (todo-trans-palmitato de retinol) 2 (500.000 UI / g)	0.800
Vitamina D-3 (coleciferol) (400.000 UI / g)	0.250
Vitamina K-1 (filoquinona)	0.075
Sacarose em pó	974.655

6.3.5 – Eutanásia

Ao término do experimento os animais foram eutanasiados individualmente, após aprofundamento anestésico seguido de decapitação para a coleta do tecido caudado-putâmen. A eutanásia foi realizada sempre no mesmo horário do dia (11:00h) (Andersen et al., 2004).

6.3.6 – Extração de tecidos

Fragmentos do estriado (caudado-putâmen) foram coletados e homogeneizados em tampão de extração contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000rpm durante 30min para a remoção de material insolúvel. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto. Após determinação da concentração no extrato, 100ug de proteínas das amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o aparato de mini gel Bio-Rad® e detectadas utilizando anticorpo específico pela técnica de imunoblot.

6.3.7 – Imunoblot

A técnica de *imunoblot* foi realizada seguindo o protocolo Kurien & Scofield, (2003) adaptado. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas de interesse foram primeiramente bloqueadas para redução de possíveis ligações inespecíficas com PBST contendo 5% de albumina. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos anti-D2, anti-DAT e anti-TH., em PBST contendo 3% de albumina, usando como controle endógeno GAPDH (Cell Signaling® 1:2000). Após o período de incubação, os anticorpos foram removidos e foi feita a lavagem das membranas em PBST. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição) em PBST contendo 3% de albumina. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL Western Blotting Substrate (Promega®) e colocadas no fotodocumentador GeneGnome XRQ - Syngene®. O sinal foi detectado por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa ImageJ – NHI (domínio público).

6.3.8 – Análise estatística

Para análise de cada parâmetro foi aplicado o teste de *Shapiro Wilk* para verificar a normalidade dos dados. Assim, para os dados paramétricos do teste comportamental foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de Duncan. Para os dados que se referem à quantificação de proteínas foi utilizada uma ANOVA One-Way seguido do post-hoc de Bonferroni, e quando se fez necessário, utilizou-se um Teste-t para mostrar diferenças pontuais. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças estatísticas.

7 – RESULTADOS

Os resultados dos testes comportamentais são estabelecidos em média e erro padrão e foram consideradas todas as variáveis de interesse, os momentos das avaliações e a divisão dos grupos.

A variável Ambulação Total (Figura 2) no 21º dia mostrou-se reduzida em relação ao seu momento basal no grupo EF/P, e para o grupo Sfe+EF/P mostrou-se reduzida a partir do 10º dia de prenhez.

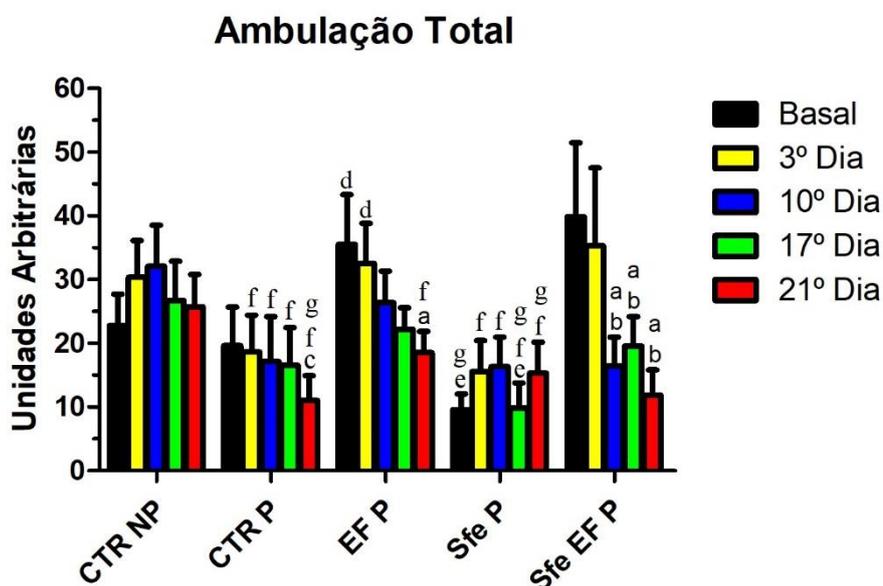


Figura 2. Ambulação total dos animais dos grupos controle não prenhe (CTR NP), controle prenhe (CTR P), suplementação de ferro prenhe (Sfe P), exercício físico prenhe (EF P) e suplementação de ferro + exercício prenhe (Sfe EF P) nos diferentes momentos do experimento; (a) em comparação ao momento basal do próprio grupo; (b) em comparação ao 3º dia do próprio grupo; (c) em comparação ao 10º dia do grupo CTR NP; (d) em comparação ao 21º dia do grupo CTR P; (e) em

comparação ao 10º dia do grupo CTR NP; (f) em comparação ao momento basal do grupo Sfe EF P ANOVA medidas repetidas, $p < 0,05$.

A variável *Rearing* (Figura 3) mostrou-se no 21º dia reduzida em relação ao seu momento basal no grupo EF/P, e para o grupo Sfe+EF/P mostrou-se reduzida a partir do 10º dia.

Para a variável *grooming* (Figura 4), o grupo EF P no 17º e 21º dia apresentou aumento em relação ao 10º dia de prenhez. O grupo Sfe P não mostrou diferença em nenhum momento. O grupo Sfe+EF/P no 21º dia mostrou diferença em relação ao grupo CTR NP nos momentos Basal e 3º dia de prenhez. O grupo Sfe+EF/P no 21º dia também mostrou diferença em relação ao grupo EF P 17º dia de prenhez.

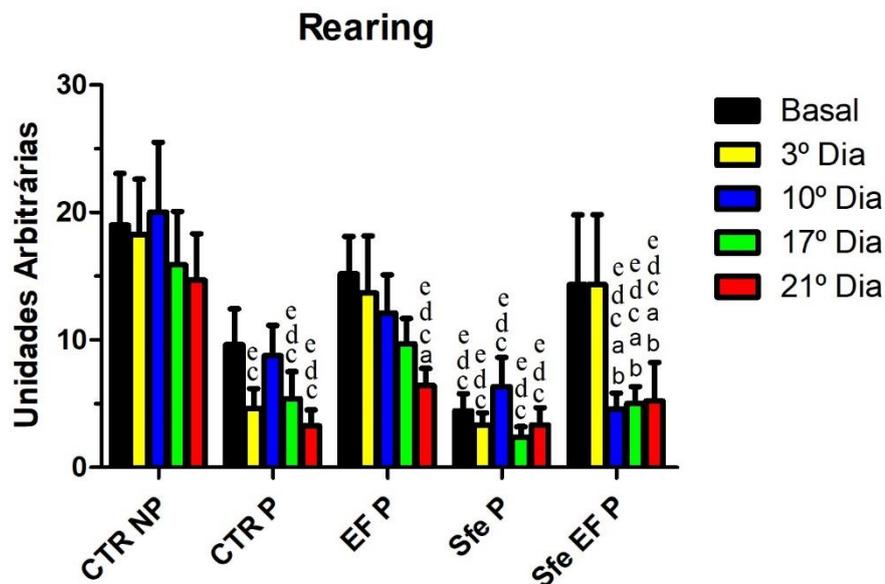


Figura 3. *Rearing* dos animais dos grupos controle não prenhe (CTR NP), controle prenhe (CTR P), suplementação de ferro prenhe (Sfe P), exercício físico prenhe (EF P) e suplementação de ferro + exercício prenhe (Sfe EF P) nos diferentes momentos do experimento; (a) em comparação ao momento basal do próprio grupo; (b) em comparação ao 3º dia do próprio grupo; (c) em comparação ao momento basal do grupo CTR NP; (d) em comparação ao 3º dia do grupo CTR NP; (e) em comparação ao 10º dia do grupo CTR NP. ANOVA medidas repetidas, $p < 0,05$.

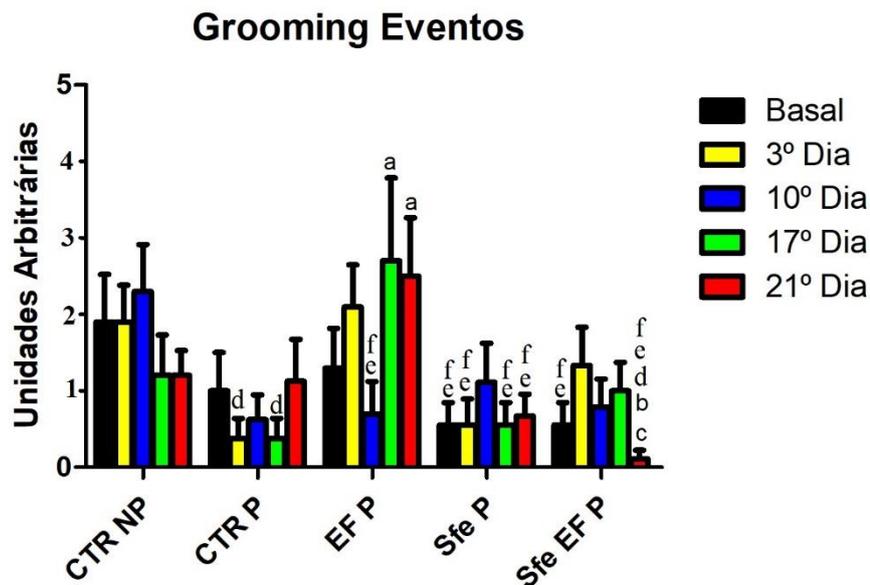


Figura 4. *Grooming* dos animais dos grupos controle não prenhe (CTR NP), controle prenhe (CTR P), suplementação de ferro prenhe (Sfe P), exercício físico prenhe (EF P) e suplementação de ferro + exercício prenhe (Sfe EF P) nos diferentes momentos do experimento; (a) diferente em comparação ao 10º dia do próprio grupo; (b) diferente em comparação ao momento basal, 3º dia e 10º dia do grupo CTR NP; (c) diferente em comparação ao 17º dia do grupo EF P; (d) em relação ao 10º dia do grupo CTR NP; (e) em relação ao 17º dia do grupo EF P; (f) em relação ao 21º dia do grupo EF P. ANOVA medidas repetidas, $p < 0,05$.

Para a variável *Freezing* (Figura 5), o grupo Sfe+EF/P mostrou que o 21º dia de prenhez apresentou aumento em relação ao seu momento Basal.

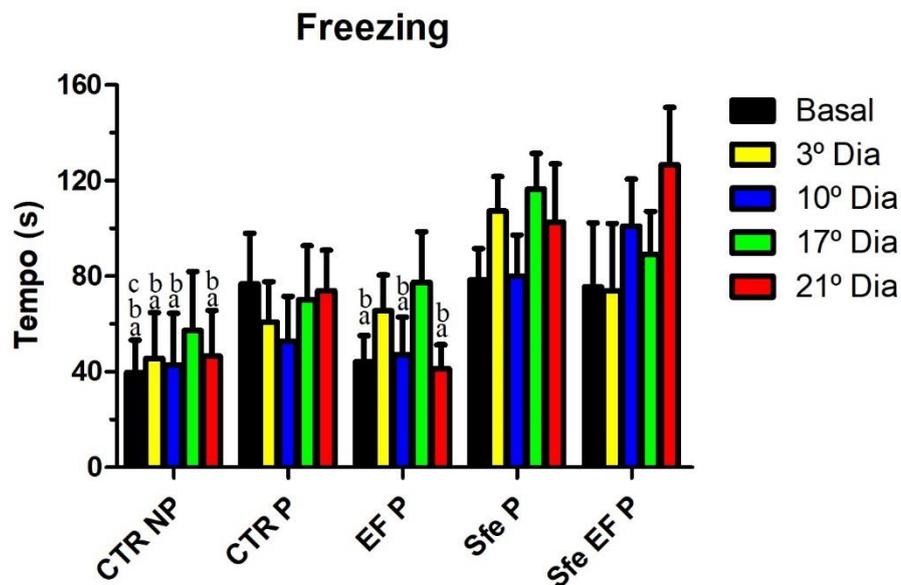


Figura 5. *Freezing* dos animais dos grupos controle não prenhe (CTR NP), controle prenhe (CTR P), suplementação de ferro prenhe (Sfe P), exercício físico prenhe (EF P) e suplementação de ferro + exercício prenhe (Sfe EF P) nos diferentes momentos do experimento; (a) em comparação ao 21º dia do grupo Sfe EF P; (b) em relação ao 21º dia do grupo Sfe P; (c) em relação ao 3º dia do grupo Sfe P. ANOVA medidas repetidas, $p < 0,05$.

Os resultados da quantificação de proteínas são estabelecidos em média e erro padrão, comparando todos os grupos entre si.

Como mostrado na figura 6, o receptor de dopamina D2 (50kDa) em conjunto com o anticorpo endógeno GAPDH (37kDa) quando analisados por ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni mostram diferença estatística apenas no grupo Sfe EFP em comparação com o grupo CTR P.

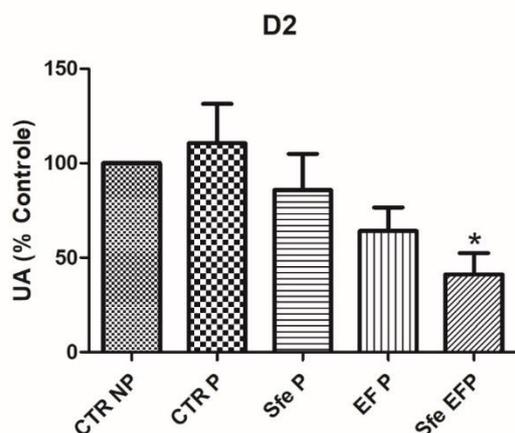


Figura 6. Imagem representativa à partir de um conjunto de 6 membranas; Média e erro padrão receptor de dopamina D2; * em comparação ao grupo CTR P. ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Na figura 7, o transportador de dopamina DAT (68kDa) em conjunto com o anticorpo endógeno GAPDH (37kDa) quando analisados por ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni não mostram diferença estatística para nenhum dos grupos. Foi ainda realizado um Teste-t para os grupos CTR P x Sfe EFP que também não mostrou diferença estatística.

Na figura 8, a tirosina hidroxilase TH (55kDa) em conjunto com o anticorpo endógeno GAPDH (37kDa) quando analisados por ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni não mostram diferença estatística para nenhum dos grupos. Em seguida foi realizado um Teste-t que por sua vez mostrou diferença estatística para os grupos CTR P x Sfe EFP.

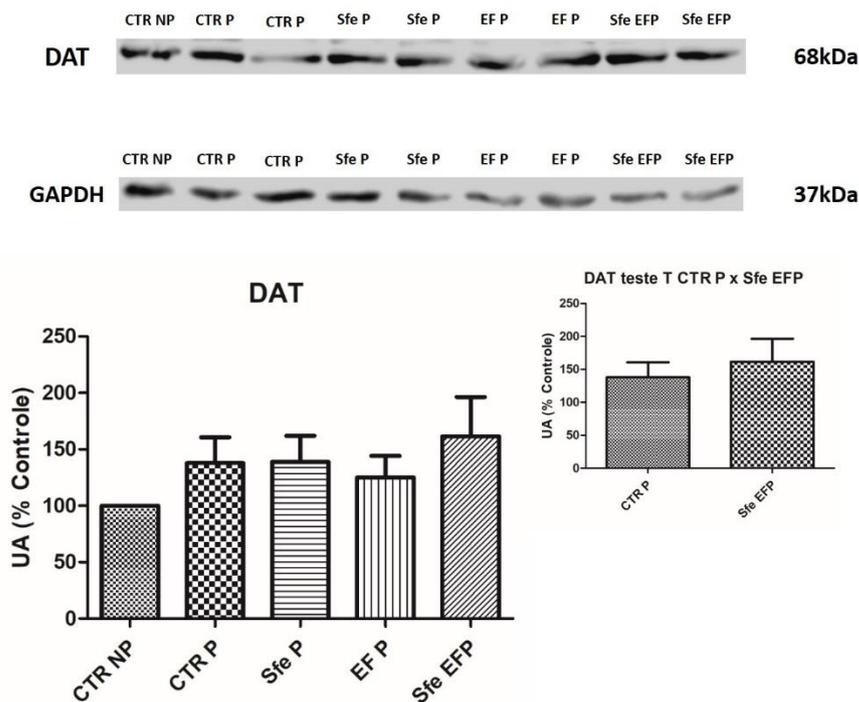


Figura 7. Imagem representativa à partir de um conjunto de 6 membranas; Média e erro padrão transportador de dopamina DAT; ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni, Teste-t somente para os grupos CTR x SfeEFP. $p < 0,05$.

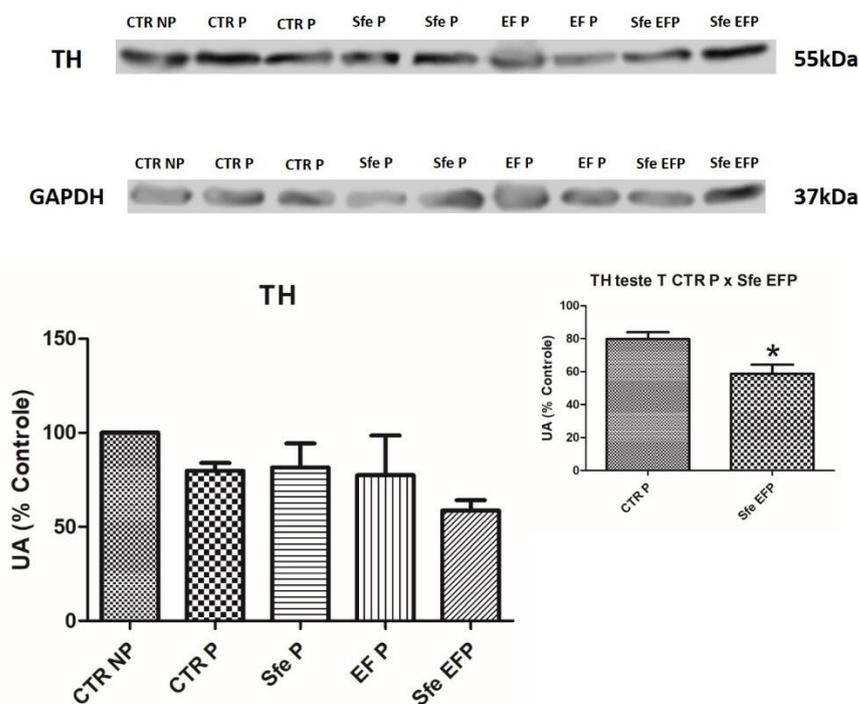


Figura 8. Imagem representativa à partir de um conjunto de 6 membranas; Média e erro padrão tirosina hidroxilase TH; ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni, Teste-t. * em comparação ao grupo CTR P $p < 0,05$.

8 – DISCUSSÃO

Pacientes que apresentam a SPI demonstram uma alteração no padrão de sono e em consequência uma redução na qualidade de vida. Com isso, muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar formas de tratamento que amenizem essa alteração no bem estar dos indivíduos. Pesquisas tem apontado uma grande relação entre o exercício físico, a suplementação de ferro como forma de tratamento para os distúrbios do movimento relacionados ao sono (SPI). Assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar à influência do exercício físico e da suplementação de ferro no comportamento e atividade locomotora de ratas prenhes, utilizando o teste de campo aberto (*Open-Field*) e a relação com a expressão de proteínas relacionadas a essa síndrome (*Imunoblot*). O protocolo *Open-Field*, vem sendo utilizado com frequência para avaliar a atividade locomotora dos ratos, se mostrando fidedigno tanto para tratamentos farmacológicos quanto para não farmacológicos (Almeida et al., 2014; Mariano et al., 2014; Frank et al., 2016). O *imunoblot* por sua vez, nos permite quantificar e obter uma análise objetiva do resultado do protocolo utilizado (Kurien & Scofield, 2003).

Tratando-se do *Open-field*, nossos achados indicaram para a variável ambulação total, uma redução nos valores para os grupos EF P e Sfe EF P ao longo dos 21 dias de prenhez, mostrando que tanto o exercício físico isolado como de forma combinada com a suplementação de ferro, apresentam atenuação dos sintomas da SPI. Para a variável *rearing* os grupos EF P e Sfe EF P obtiveram reduções expressivas, sugerindo redução nos parâmetros de inquietação, sendo esta uma das características acentuadas em quem apresenta esse tipo de distúrbio do sono. O grupo Sfe por sua vez não obteve diferença significativa em nenhum momento dos 21 dias de prenhez. Em estudo realizado por Frank et al. (2016) foram demonstradas diferenças estatísticas nas variáveis ambulação total e *rearing* para os grupos exercício físico (SHR e Wistar) em relação ao grupo SHR controle, demonstrando dessa forma a eficácia do exercício físico na modulação dos sintomas da síndrome. No estudo em questão utilizou-se um protocolo de esteira que consistiu em 5 sessões por semana durante 8 semanas, em machos do modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono (SHR), previamente descrito por Esteves et al. (2013). Neste aspecto podemos verificar a influência do exercício físico na melhora dos sintomas da síndrome, independente do modelo animal utilizado. Nota-se importante pontuar que a predominância da frequência de *rearing* do grupo Sfe P no momento basal foi muito baixa, podendo assim, a suplementação ter simplesmente se mantido, sem deixar que os sintomas da síndrome tivessem se manifestado com maior intensidade ao decorrer dos 21 dias.

Já em relação a variável *grooming*, Mariano et al. (2014) realizaram um estudo com um modelo de ratas prenhes, e encontrou aumento no tempo de duração de *grooming*, indicando piora no grupo prenhe. No entanto, em seu estudo, Mariano et al. (2014) avaliaram somente ratas prenhes e não prenhes. Nosso trabalho utilizou o mesmo modelo animal que Mariano et al. (2014), e corrobora para a variável *grooming*, com aumento nos sintomas do grupo EF P. O grupo Sfe não apresentou diferença, e o grupo Sfe EF P apresentou melhora nos sintomas quando comparado ao grupo controle, indicando uma possível melhora do exercício físico quando os níveis de ferro estão normais.

Em nosso estudo, o grupo Sfe EF P mostrou um aumento no tempo de *freezing* do 21º dia de prenhez em relação ao momento basal, justificando uma possível melhora nos sintomas da SPI quando em tratamento combinado. Mariano et al. (2014) encontraram um tempo de *freezing* reduzido no grupo prenhe, refletindo o avanço dos sintomas conforme o tempo de prenhez.

Quando analisamos o receptor de dopamina D₂ através do método Imunoblot, podemos notar que nossos resultados apontaram para reduções das expressões do grupo Sfe EF P em comparação ao grupo CTR P, ao contrário dos estudos de Ko et al. (2013) e Cho et al. (2014) que utilizaram um modelo animal SHR considerado modelo de TDAH, sendo que ambos os estudos contextualizaram um protocolo de exercício físico 1 vez ao dia durante 28 dias, e encontraram aumento nas expressões de receptores D₂. O estudo de Frank et al. (2016) também encontrou aumento nas expressões do receptor D₂ para os grupos Wistar e SHR que realizaram sessões de exercício físico durante 8 semanas em um protocolo de esteira e fizeram uso de enalapril. O aumento na expressão do receptor de dopamina D₂ dos estudos citados anteriormente talvez possa ser explicado pelo fato de terem sido conduzidos com animais SHR e esses por natureza já apresentam redução de ferro no organismo, tal qual são utilizados como modelo de TDAH e SPI. Por outro lado, uma hipótese para a redução das expressões do receptor D₂ no presente trabalho pode se dar por um possível aumento de dopamina na fenda sináptica com consequente aumento na sensibilidade do receptor pós sináptico. Em humanos, Fisher et al. (2013) demonstraram aumento nas expressões dos receptores D₂ em pacientes com doença de Parkinson após 3 sessões semanais de 1h por 8 semanas consecutivas em um protocolo de esteira ergométrica.

Quando se trata do transportador de dopamina DAT, nossos resultados não apontaram diferença estatística. Se olharmos para a literatura, podemos observar resultados também não lineares e contraditórios. Em 2007, O'dell et al. conduziram um experimento com sessões de

exercício físico, e não encontraram diferença nos níveis de DAT estriatal em ratos Sprague–Dawley com injeções intrastriatais unilaterais de 6-OHDA. Em contrapartida Frank et al. (2016) encontraram em seu estudo aumento nas expressões de DAT. Já por uma terceira linha, em um estudo realizado com humanos, Cavagnoli et al. (2013) demonstraram que indivíduos com distúrbios do movimento relacionados ao sono (SPI/MPP) apresentaram menores valores na densidade do transportador de dopamina (DAT), no entanto uma sessão aguda de treino não foi capaz de alterar a sua densidade.

Nossos achados apontam para a redução das expressões de tirosina hidroxilase no grupo Sfe EF P em relação ao grupo CTR P, um resultado que não segue o mesmo paradigma apontado pela literatura. Ko et al. (2013) e Frank et al. (2016) encontraram aumento de expressões de TH em seus respectivos estudos. Em 2014, Baek et al. conduziram um estudo com animais SHR, considerados modelos de TDAH, e mostraram através de imuno-histoquímica aumento das expressões de tirosina hidroxilase nos animais que seguiram o protocolo de esteira 30 min por dia durante 28 dias, chamando a atenção para o alívio dos sintomas. O aumento na expressão e tirosina hidroxilase dos estudos citados anteriormente podem ser explicados pelo fato de terem sido conduzidos com animais SHR e esses por natureza têm redução de ferro no organismo, tal qual são utilizados como modelo de TDAH e SPI. Arnold & Salvatore (2016) conduziram um estudo com ratos Brown-Norway/Fischer envelhecidos e mostraram que 35 minutos de exercício físico durante dois períodos pré-determinados de 12 dias consecutivos foram suficientes para aumentar as expressões de TH (~ 42%) em comparação com os ratos não exercitados.

Assim, podemos verificar no presente estudo que a suplementação de ferro quando não associada ao exercício, não demonstrou alterações nas variáveis analisadas pelo teste *Open-Field*, e, que houve uma influência positiva do exercício físico na redução dos sintomas quando associado à suplementação. Tanto em modelos animais (Esteves et al., 2013; Frank et al., 2016) quanto em humanos (Esteves et al., 2009, 2011), a literatura já descreve que o exercício aeróbio promove melhoras nos sintomas da SPI e MPP. Além disso, a suplementação de ferro já vem sendo indicada para o tratamento da SPI (Birgegård et al., 2010; Vadasz et al., 2013).

Quando tratamos da análise molecular, a redução da tirosina hidroxilase nos mostra que a quantidade de ferro administrado pode não ter sido suficiente para a respectiva demanda. Outra linha seria a redução das concentrações de tirosina se dando por uma via independente da regulação de ferro, visto que o mecanismo do ferro como co-fator de sua produção está bem descrito na literatura (Roberts et al., 2013). Em relação ao transportador de dopamina, não

obtivemos diferença significativa, e a literatura ainda apresenta resultados divergentes (O'dell et al., 2007; Cavagnoli et al., 2013; Frank et al., 2016). Quanto à redução dos receptores D₂, podemos sugerir uma maior sensibilidade destes, porém essa resposta não se dá por definitivo com este presente trabalho, visto que não foi investigado o segmento da via, assumindo assim uma das nossas limitações. Entre as possíveis limitações do presente estudo, a falta das análises bioquímicas de ferro, ferritina e transferrina, que poderiam nos fornecer parâmetros maiores sobre a quantificação de ferro das ratas prenhes.

9 – CONCLUSÃO

Concluindo, a influência do protocolo de exercício físico na atividade locomotora se mostrou sensível em sua predominância. Com os resultados obtidos podemos chamar a atenção do exercício físico como um tratamento eficiente quando utilizado de forma isolada, visto que em sua predominância se mostrou efetivo no final da gestação na análise das variáveis do teste *Open- Field*.

A influência da dieta de suplementação de ferro na atividade locomotora não se mostrou sensível. Levando em consideração os resultados obtidos, a suplementação de ferro quando administrada de forma isolada não mostrou resultados estatísticos em nenhum momento do tratamento durante todo o período de gestação.

A resposta da quantificação molecular nos mostrou reduções das expressões dos receptores de dopamina e da tirosina hidroxilase no grupo Sfe EFP, e não mostrou diferença no transportador de dopamina. Somente o grupo de tratamento combinado apresentou diferença, mais uma vez e por métodos diferentes pudemos mostrar que a diferença se dá de uma forma mais evidente quando os tratamentos não farmacológicos são utilizados de maneira combinada.

Neste contexto, tomados em conjunto, nossos resultados apontam que os tratamentos não farmacológicos (suplementação de ferro e exercício físico) foram positivos em relação aos sintomas da SPI em um modelo animal de ratas prenhes.

10 – REFERÊNCIAS

1. ALLEN R.P.; PICCHIETTI D.; HENING W.A.; TRENKWALDER C.; WALTERS A.S.; MONTPLAISIR J. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology - A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Medicine*, v.4, p.101-119, 2003.
2. ALLEN R. Dopamine and iron in the pathophysiology of restless leg syndrome (RLS). *Sleep Medicine*, v.5 n.4, p.385-391, 2004.
3. ALMEIDA W.A.O.; ESTEVES A.M.; ALMEIDA-JUNIOR C.L.; LEE K.S.; FRANK M.K.; MARIANO M.O.; FRUSSA-FILHO R.; TUFIK S.; DE MELLO M.T. The effects of long-term dopaminergic treatment locomotor behavior in rats. *Sleep Science*, v.7, p.203-208, 2014.
4. ALVES D.A.G.; CARVALHO L.B.C.; MORAIS J.F.; PRADO G.F. Restless legs syndrome during pregnancy in Brazilian women. *Sleep Medicine*, v.11, p.1049-1054, 2010.
5. AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. International classification of sleep disorders, 2nd ed.: Diagnostic and Coding Manual. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, p.297, 2005.
6. AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. Guideline Update. p.1039-1062, 2012.
7. ANDERSEN M.L.; D'ALMEIDA V.; KO G.M.; KAWAKAMI R.; MARTINS P.J.F.; MAGALHÃES L.E.; TUFIK S. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de experimentação. p.73-74, São Paulo, Editora Unifest, 2004.
8. ARNOLD J.C.; SALVATORE M.F. Exercise-Mediated Increase in Nigral Tyrosine Hydroxylase Is Accompanied by Increased Nigral GFR- α 1 and EAAC1 Expression in Aging Rats. *ACS Chem Neurosci*. v.7, n.2, p.227-239, 2016.
9. AUKERMAN M.; AUKERMAN D.; BAYARD M.; TUDIVER F.; THORP L.; BAILEY B. Exercise and Restless Legs Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *JABFM*, vol.19, n.5, p.487-493, 2006.
10. BAEK D.J.; LEE C.B.; BAEK S.S. Effect of treadmill exercise on social interaction and tyrosine hydroxylase expression in the attention-deficit/hyperactivity disorder rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, v.10, n.5, p.252-257, 2014.
11. BAIER P.C.; ONDO W.G.; WINKELMANN J. Animal Studies in Restless Legs Syndrome. *Movement Disorders*, v.22, p.459-465, 2007.

12. BENEDIKTSDOTTIR B.; JANSON C.; LINDBERG E.; ARNARDÓTTIR E.S.; ISLEIFUR O.; COOK E.; THORARINSDOTTIR E.H.; GISLASON T. Prevalence of restless legs syndrome among adults in Iceland and Sweden: Lung function, comorbidity, ferritin, biomarkers and quality of life. *Sleep Medicine*, v.11, p.1043-1048, 2010.
13. BIRGEGÅRD G.; SCHNEIDER K.; ULFBERG J. High incidence of iron depletion and restless leg syndrome (RLS) in regular blood donors: intravenous iron sucrose substitution more effective than oral iron. *Vox Sanguinis*, v.99, p.354-361, 2010.
14. BRUNNER D.P.; MUNCH M.; BIEDERMANN K.; HUCH R.; HUCH A.; BORBELY A.A. Changes in sleep and sleep electroencephalogram during pregnancy. *Sleep*, v.17, p.576-82, 1994.
15. CAVAGNOLLI D.A.; ESTEVES A.M.; CASTIGLIONE M.L.V.; BATISTA I.R.; BRESSAN R.A.; TUFIK S.; DE MELLO M.T. Dopamine Transporter Shown by SPECT in Patients with Periodic Leg Movement after Acute Physical Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, p.224-229, 2013.
16. CHO H.S.; BAEK D.J.; BAEK S.S. Effect of exercise on hyperactivity, impulsivity and dopamine D2 receptor expression in the substantia nigra and striatum of spontaneous hypertensive rats. *J. Exerc. Nutr. Biochem*, v.18, n.4, p.379-384, 2014.
17. CORVINO S.B.; DAMASCENO D.C.; SINZATO Y.K.; NETTO A.O.; MACEDO N.C.D.; ZAMBRANO E.; VOLPATO G.T. Comparative analysis of two different models of swimming applied to pregnant rats born small for pregnant age. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.89, n.1, p.223-230, 2017.
18. CUI Y.; WANG Y.; LIU Z. Acupuncture for restless legs syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, p.4, 2008.
19. DAUBIAN-NOSÉ P.; FRANK M.K.; ESTEVES A.M. Sleep disorders: A review of the interface between restless legs syndrome and iron metabolism. *Sleep Science*, v.7, p.234-237, 2014.
20. DE LIMA A.; Efeitos de dois protocolos de adaptação ao meio líquido com intensidades diferentes sobre parâmetros fisiológicos, de desempenho e padrão de nado de ratos Wistar. *Dissertação de Mestrado em Ciências da Nutrição do Esporte e do Metabolismo. Faculdade de Ciências Aplicadas – Universidade Estadual de Campinas – Limeira*, 2015.
21. DE MELLO M.T.; LAURO F.A.; SILVA A.C.; TUFIK S. Incidence of periodic leg movements and of the restless legs syndrome during sleep following acute physical activity in spinal cord injury subjects. *Spinal Cord*, v.34, n.5, p.294-6, 1996.

22. DE MELLO M.T.; SILVA A.C.; ESTEVES A.M.; TUFIK S. Reduction of periodic leg movement in individuals with paraplegia following aerobic physical exercise. *Spinal Cord*, v.40, p.646-649, 2002.
23. DE MELLO M.T.; ESTEVES A.M.; TUFIK S. Comparison between dopaminergic agents and physical exercise as treatment for periodic limb movements in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.42, p.218-221, 2004.
24. DOS REIS I.G.M.; ARAUJO G.G.; GOBATTO C.A. Maximal lactate steady state in swimming rats by a body density related method of workload quantification. *Comparative Exercise Physiology*, v.7, n.4, p.179-184, 2011.
25. DRIVER H.S.; SHAPIRO C.M. A longitudinal study of sleep stages in young women during pregnancy and postpartum. *Sleep*, v.15, p.449-53, 1992.
26. DUSEK P.; JANKOVIC J.; LE W. Iron dysregulation in movement disorders. *Neurobiology of Disease*, v.46, p.1-18, 2012.
27. EARLEY C.J.; HECKLER D.; ALLEN R.P. The treatment of restless legs syndrome with intravenous iron dextran. *Sleep Medicine*, p.231-235, 2004.
28. EARLEY C.J.; HORSKA A.; MOHAMED M.A.; BARKER P.B.; BEARD J.L.; ALLEN R.P. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous iron sucrose in restless legs syndrome. *Sleep Medicine*, v.10, p.206-211, 2009.
29. EKBOM K.A. Restless legs. *Acta Med Scand*, p.1-123, 1945.
30. ERIKSON K.M.; JONES B.C.; BEARD J.L. Iron Deficiency Alters Dopamine Transporter Functioning in Rat Striatum. *The Journal of Nutrition*, v.130, p.2831-2837, 2000.
31. ESPINAR S.J.; VELA B.A.; LUQUE O.M. Periodic leg movements in sleep in essential hypertension. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v.51, p.103-107, 1997.
32. ESTEVES A.M.; DE MELLO M.T.; LANCELLOTTI C.L.; NATAL C.L.; TUFIK S. Occurrence of limb movement during sleep in rats with spinal cord injury. *Brain Research*, v.13, p.32-38, 2004.
33. ESTEVES A.M.; DE MELLO M.T.; LANCELLOTTI C.L.; SQUARCINI C.F.R.; COMPARONI A.; TUFIK S. Sleep patterns over 15-day period in rats with spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.37, n.9, p.634-637, 2007.
34. ESTEVES A.M.; DE MELLO M.T.; PRADELLA-HALLINAN M.; TUFIK S. Effect of acute and chronic physical exercise on patients with periodic leg movements. *Med Sci Sports Exerc*, v.41, n.8, p.237-42, 2009.
35. ESTEVES A.M.; DE MELLO M.C.; BENEDITO-SILVA A.A.; TUFIK S. Impact of aerobic physical exercise on Restless Legs Syndrome. *Sleep Sci*, v.4, n.2, p.45-48, 2011.

36. ESTEVES A.M.; LOPES C.; FRUSSA-FILHO R.; FRANK M.K.; CAVAGNOLLI D.; ARIDA R.M.; TUFIK S.; DE MELLO M.T. Spontaneously Hypertensive Rats: Possible Animal Model of Sleep-Related Movement Disorders. *Journal of Motor Behavior*, v.45, n.6, p.487-493, 2013.
37. FELT B.T.; LOZOFF B. Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *Journal of Nutrition*, v.126, p.693-701, 1996.
38. FISHER B.E.; LI Q; NACCA A.; SALEM G.J.; SONG J.; YIP J.; HUI J.S.; JAKOWEK M.W.; PETZINGER G.M. Treadmill exercise elevates striatal dopamine D2 receptor binding potential in patients with early Parkinson's disease. *Degeneration and repair*, v.24, p.509-514, 2013.
39. FRANK M.K.; DE MELLO M.T.; LEE K.S.; DAUBIAN-NOSÉ P.; TUFIK S.; ESTEVES A.M. Sleep-related movement disorder symptoms in SHR are attenuated by physical exercise and an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Physiology and Behavior*, v.154, p.161-168, 2016.
40. FUKUAHIRO D.F.; AVARA M.B.; LOPEZ G.B.; ABÍLIO V.C.; ANDERSEN M.L.; TUFIK S.; FRUSSA-FILHO R. Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. *Physiology & Behavior*, v.92, p.773-779, 2007.
41. GAMALDO C.; EARLEY C. Restless legs syndrome: A Clinical Update, v.130, n.5, p.1596-1604, 2006.
42. GANZ T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Am J Hematol* v.1, p.29-35, 2006.
43. GANZ T.; NEMETH E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.290. p.199-203, 2006.
44. GARCÍA-BORREGUERO D.; WILLIAMS A.M. Dopaminergic augmentation of restless legs syndrome. *Sleep Medicine Reviews*, v.14, p.339-346, 2010.
45. GIANNAKI C.; SAKKAS G.K.; HADJIGEORGIOU G. Non-pharmacological management of periodic limb movements during hemodialysis session in patients with uremic restless legs syndrome. *ASAIO Journal*, v.56, p.538-42, 2010.
46. GOODMAN J.D.S.; BRODIE C.; AYIDA G.A. Restless leg syndrome in Pregnancy. *British Medical Journal*, v.297, p.1101-1102, 1988.

47. GROTE L.; LEISSNER L.; HEDNER J.; ULFBERG J. A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Multi-Center Study of Intravenous Iron Sucrose and Placebo in the Treatment of Restless Legs Syndrome. *Movement Disorders*, vol.24, n.10, p.1445-1452, 2009.
48. HERTZ G.; FAST A.; FEINSILVER S.H.; ALBERTARIO C.L.; SCHULMAN.; FEIN A.M. Sleep in normal late pregnancy. *Sleep*, v.15, p.246-51, 1992.
49. JELLEN L.C.; BEARD J.L.; JONES B.C. Systems genetics analysis of iron regulation in the brain. *Biochimie*, v.91, p.1255-1259, 2009.
50. JOLIVET B.; BONDUELLE M. *Bulletin of the Medical Library Association*, 1953.
51. KURIEN B.; SCOFIELD R.H. Protein blotting: A review. *Journal of Immunological Methods*, v.274, n.1-2, p.1-15, 2003.
52. KO I.G.; KIM S.E.; KIM T.W.; JI E.S.; SHIN M.S.; KIM C.J.; HONG M.H.; BAHN G.H. Swimming exercise alleviates the symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder in spontaneous hypertensive rats. *Molecular Medicine Reports*, v.8, p.393-400, 2013.
53. KRANICK S.M.; MOWRY E.M.; COLCHER A.; HORN S.; GOLBE L.I. Movement Disorders and Pregnancy: A Review of the Literature. *Movement Disorders*, v.6, p.665-671, 2010.
54. KUCHUKHIDZE G.; TOIDZE I.; KHATIASHVILI I.; MAISURADZE L.; FRAUSCHER B.; KASRADZE S.; HÖGL B. Prevalence of Restless Legs Syndrome in a Georgian Primary Healthcare Setting: A Pilot Study. *Eur Neurol*, v.68, p.177-180, 2012.
55. KURIEN B.T.; SCOFIELD R.H.; Protein Blotting: a review. *Journal of Immunological Methods*, v.274, p.1-15, 2003.
56. LARSEN L.; MILMAN N. Normal iron absorption determined by means of whole body counting and red cell incorporation of ⁵⁹Fe. *Acta Medica Scandinavica*, v.198, n.4, p.271-274, 1975.
57. LEE K.A.; ZAFFKE M.E.; BARATTE-BEEBE K. Restless legs syndrome and sleep disturbance during pregnancy: the role of folate and iron. *Journal of Women's Health and Gender-Based Medicine*, v.10, p.335-341, 2001.
58. LETTIERI C.; ELIASSON A. Pneumatic compression devices are an effective therapy for restless legs syndrome: a prospective, randomized, double-blinded, sham-controlled trial. *Chest*, v.135, p.74-80, 2009.
59. LONG J.A.; EVANS H.M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, v.6, p.1-148, 1922.

60. LOPES C.; ESTEVES A.M.; FRUSSA-FILHO R.; TUFIK S.; DE MELLO M.T. Evaluation of periodic limb movements in a putative animal model of restless leg syndrome. *Mov Disord*, vol.27, n.3, p.413-20, 2011.
61. LUCIANO E.; CARNEIRO E.M.; CARVALHO C.R.; CARVALHEIRA J.B.; PERES S.B.; REIS M.A.; SAAD M.J.; BOSCHERO A.C.; VELLOSO L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*, v.1, p.149-57, 2002.
62. MANCONI M.; GOVONI V.; DE VITO A.; ECONOMOU N.T.; CESNIK E.; MOLLICA G.; GRANIERI E. Pregnancy as a risk factor for restless legs syndrome. *Sleep Medicine*, v.5, p.305-308. 2004 (a).
63. MANCONI M.; GOVONI V.; DE VITO A.; ECONOMOU N.T.; CESNIK E.; CASSETTA I.; MOLLICA G.; FERINI-STRAMBI L.; GRANIERI E. Restless legs syndrome and pregnancy. *Neurology*, v.63, p.1065-1069, 2004 (b).
64. MANCONI M.; HUTCHINS W.; FERROAH TR.; ZUCCONI M.; FERINI-STRAMBI L. On the pathway of an animal model for restless legs syndrome. *Journal of the Neurological Science*, v.28. p.53-60, 2007.
65. 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, p.609-614, 2002.
66. MARIANO M.O.; ESTEVES A.M.; FRANK M.K.; CAPERUTO L.C.; MANCONI M.; TUFIK S.; DE MELLO M.T. Changes in motor behavior during pregnancy in rats: the basis for a possible animal model of restless legs syndrome. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.36, n.10, p.436-41, 2014.
67. MASUKO A.H.; PRADO L.B.F.; PRADO G.F. Síndrome das Pernas Inquietas. *Neurociências*, p.18-20, 2004.
68. MEHMOOD T.; AUERBACH M.; EARLEY C.J.; ALLEN R.P. Response to intravenous iron in patients with iron deficiency anemia (IDA) and restless leg syndrome (Willis-Ekbom disease). *Sleep Med*, v.15, n.12, p.1473-1476, 2014.
69. MENEGASSI M.; DE MELLO E.D.; GUIMARÃES L.R.; MATTE B.C.; DRIEMEIER F.; PEDROSO G.L.; ROHDE L.A.; SCHMITZ M. Food intake and serum levels of iron in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, vol.32, n.2, p.132, 2010.

70. MILLARD K.N.; FRAZER D.M.; WILKINS S.J.; ANDERSON G.J. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut*, v.53, n.5, p.655-60, 2004.
71. MINÁR M.; KOŠUTZKÁ Z.; HABÁNOVÁ H.; RUSŇÁK I.; PLANCK K.; VALKOVIČ P. Restless legs syndrome in pregnancy is connected with iron deficiency. *Sleep Med*, v.16, n.5, p.589-592, 2015.
72. MINDELL J.A.; COOK R.A.; NIKOLOVSKI J. Sleep patterns and sleep disturbances across pregnancy. *Sleep Med*, v.16, n.4, p.483-488, 2015.
73. MITCHELL U.; MYRER J.; JOHNSON A.; HILTON S. Restless legs syndrome and near-infrared light: an alternative treatment option. *Physiotherapy Theory and Practice*, v.27, n.5, p.345-351, 2011.
74. MOHRI I.; KATO-NISHIMURA K.; KAGITANI-SHIMONO K.; KIMURA-OHBA S.; OZONO K.; TACHIBANA N.; TANIKE M. Evaluation of oral iron treatment in pediatric restless legs syndrome (RLS). *Sleep Medicine*, v.13, p.429-432, 2012.
75. MONTENEGRO C.A.B.; DOS SANTOS F.C.; REZENDE-FILHO J. Anemia e gravidez. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v.14, n.2, p. 1-6, 2015.
76. MONTPLAISIR J.; DENESLE R.; PETIT D. Pramipexole in the treatment of restless leg syndrome – a follow-up study. *European Journal of Neurology*, v.7, p.27-31, 2000.
77. NEAU J.; MARION P.; MATHIS S.; JULIAN A.; GODENECHÉ G.; LARRIEU D.; MEURICE J.; PAQUEREAU J.; INGRAND P. Restless Legs Syndrome and Pregnancy: Follow-Up of Pregnant Women before and after Delivery. *European Neurology*, v.64, p.361-366, 2010.
78. O'DELL S.J.; GROSS N.B.; FRICKS A.N.; CASIANO B.D.; NGUYEN T.B.; MARSHALL J.F. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience*, v.144, p.1141-1151, 2007.
79. OHAYON M.M.; ROTH T. Prevalence of Restless legs syndrome and periodic limb movement disorder in the general population. *Journal of Psychosomatic Research*, v.53, p.547-54, 2002.
80. OHAYON M.M.; O'HARA R.; VITIELLO M.V. Epidemiology of restless legs syndrome: A synthesis of the literature. *Sleep Medicine Reviews*, v.16, p.283-295, 2012.
81. O'KEEFE S.T.; GAVIN K.; LAVAN J.N. Iron status and Restless Legs Syndrome in the elderly. *Age and Aging*, v.23, n.3, p.200-203, 1994.
82. ONDO W.G.; JANKOVIC J. Restless legs syndrome: Clinico etiologic correlates. *Neurology*, v.47, p.1435-1441, 1996.

83. ONDO W.G.; HE Y.; RAJASEKARAN S.; LE W.D. Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: A possible model for restless legs syndrome. *Movement Disorders*, v.15, p.154-158, 2000.
84. ONDO W.G.; ZHAO H.R.; LE W.D. Animal models of restless legs syndrome. *Sleep Medicine*. v.8, p.344-348, 2007.
85. ONER P.; DIRIK E.B.; TANER Y.; CAYKOYLU A.; ANLAR O. Association Between Low Serum Ferritin and Restless Legs Syndrome in Patients with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Tohoku J. Exp. Med.*, v.213, p.269-276, 2007.
86. PAIVA A.A.; RONDÓ P.H.; GUERRA-SHINOHARA E. Parameters for the assessment of iron status. *Rev Saúde Publica*, v.34, p.421-6, 2000.
87. PAULI J.R.; ROPELLE E.R.; CINTRA D.E.; CARVALHO-FILHO M.A.; MORAES J.C.; DE SOUZA C.T.; VELLOSO L.A.; CARVALHEIRA J.B.; SAAD M.J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol*, v.2, p.659-71, 2008.
88. PEREIRA JR. J.C.; SILVA I.R.R.; PRADELLA-HALLINAN M. Transient Willis-Ekbom's disease (restless legs syndrome) during pregnancy may be caused by stradiol-mediated dopamine over modulation. *Medical Hypotheses*, v.80, p.205-208, 2013.
89. PICCHIETTI M.A.; PICCHIETTI D.L. Advances in pediatric restless legs syndrome: iron, genetics, diagnosis and treatment. *Sleep Medicine*, v.11, p.643-651, 2010.
90. PHILLIPS B.; YOUNG T.; FINN L. Epidemiology of restless legs symptoms in adults. *Arch Intern Med*, v.160, p.2137-41, 2000.
91. QU S.; LE W.; ZHANG X.; XIE W.; ZHANG A.; ONDO W.G. Locomotion is increased in A11-lesioned mice with iron deprivation: a possible animal model for restless legs syndrome. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.66, n.5, p.383-388, 2007.
92. RAJARAM S.; SHANAHAN J.; ASH C.; WALTERS A.; WEISFOGEL G. Enhanced external counter pulsation (EECP) as a novel treatment for restless legs syndrome (RLS): a preliminary test of the vascular neurologic hypothesis for RLS. *Sleep Medicine*, v.6, p.101-106, 2005.
93. REVEES P.G.; NIELSEN F.H.; FAHEY G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, p.1939-1951.
94. REVEES P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet, *The Journal of Nutrition*, p.838-841.

95. RICHARDS K.C.; BOST J.E.; ROGERS V.E.; HUTCHISON L.C.; BECK C.K.; BLIWISE D.L.; KOVACH C.R.; CUELLAR N.; ALLEN R.P. Diagnostic accuracy of behavioral, activity, ferritin, and clinical indicators of restless legs syndrome. *Sleep*, v.38, n.3, p.371-80, 2015.
96. ROBERTS K.M.; FITZPATRICK P.F.; Mechanisms of Tryptophan and Tyrosine Hydroxylase. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. v.65, n. 4, p.350-357, 2013.
97. SIDDAPPA A.J.; RAO R.; LONG J.D.; WIDNESS J.A.; GEORGIEFF M.K. The assessment of newborn iron stores at birth: A review of the literature and standards for ferritin concentrations. *Neonatology*, v.92, p.73-82, 2007.
98. SOTO-INSUGA V.; CALLEJA M.L.; PRADOS M.; CASTANOS C.; LOSADA R.; RUIZ-FALCÓ M.L. Utilidad del hierro en el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad. *An Pediatr (Barc)*, v.79, n.4, p.230-235, 2013.
99. SOUZA A.I.; FILHO M.B.; FERREIRA L.O.C. Alterações hematológicas e gravidez. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.24, n.1, p.29-36, 2002.
100. SPOLADOR T.; ALLIS J.C.S.; PONDÉ M.P. Treatment of restless legs syndrome Tratamento da síndrome das pernas inquietas. *Rev Bras Psiquiatr*, v.28, n.4, p.308-15, 2006.
101. SUN E.R.; CHEN C.A.; HO G.; EARLEY C.J.; ALLEN R.P. Iron and the Restless Legs Syndrome. *Sleep*, v.21, p.371-377, 1998.
102. THORPY M. Classification of Sleep Disorders. *Neurotherapeutics* v.9, p.687-701, 2012.
103. TRENKWALDER C.; PAULUS W.; WALTERS A.S. The restless legs syndrome. *Lancet. Neurology*, v.4, p.465-475, 2005.
104. TRENKWALDER C.; PAULUS W. Restless Legs Syndrome: pathophysiology, clinical presentation and management, *nature reviews neurology*, v.6 p.337, 2010.
105. VADASZ D.; RIES V.; OERTEL W.H. Intravenous iron sucrose for restless legs syndrome in pregnant women with low serum ferritin. *Sleep Medicine*, v.14, p.1214-1216, 2013.
106. WANG J.; O'REILLY B.; VENKATARAMAN R.; MYSLIWIEC V.; MYSLIWIEC A. Efficacy of oral iron in patients with restless legs syndrome and a low-normal ferritin: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Sleep Medicine*, v.10, p.973-975, 2009.
107. WAYNE H.; WALTERS A.S.; ALLEN R.P. Impact, diagnosis and treatment of restless legs syndrome (RLS) in a primary care population: the REST (RLS epidemiology, symptoms and treatment) primary care study. *Sleep Medicine*, v.5, p.237-246, 2004.

108. WESSTRÖM J.; SKALKIDOU A.; MANCONI M.; FULDA S.; SUNDSTRÖM-POROMAA I. Pre-pregnancy restless legs syndrome (Willis-Ekbom Disease) is associated with perinatal depression. *J Clin Sleep Med.*, v.10, n.5, p.527-33, 2014.
109. WINKELMAN J.W. Considering the causes of RLS. *European Journal of Neurology*, v.13, p. 8-14, 2006.
110. WONG A.C.; SHETREAT M.E.; CLARKE J.O.; RAYPORT S. D1- and D2-like dopamine receptors are co-localized on the presynaptic varicosities of striatal and nucleus accumbens neurons in vitro. *Neuroscience*, v.89, n.1, p.221-233, 1999.
111. ZHANG A.S.; ENNS C.A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J Biol Chem*, v.284, p.711-5, 2008.

11 – ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**Avaliação dos efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de Síndrome das Pernas Inquietas**" (protocolo nº **3471-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Andrea Maculano Esteves / Paulo Daubian**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **11 de agosto de 2014**.

Campinas, 11 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva