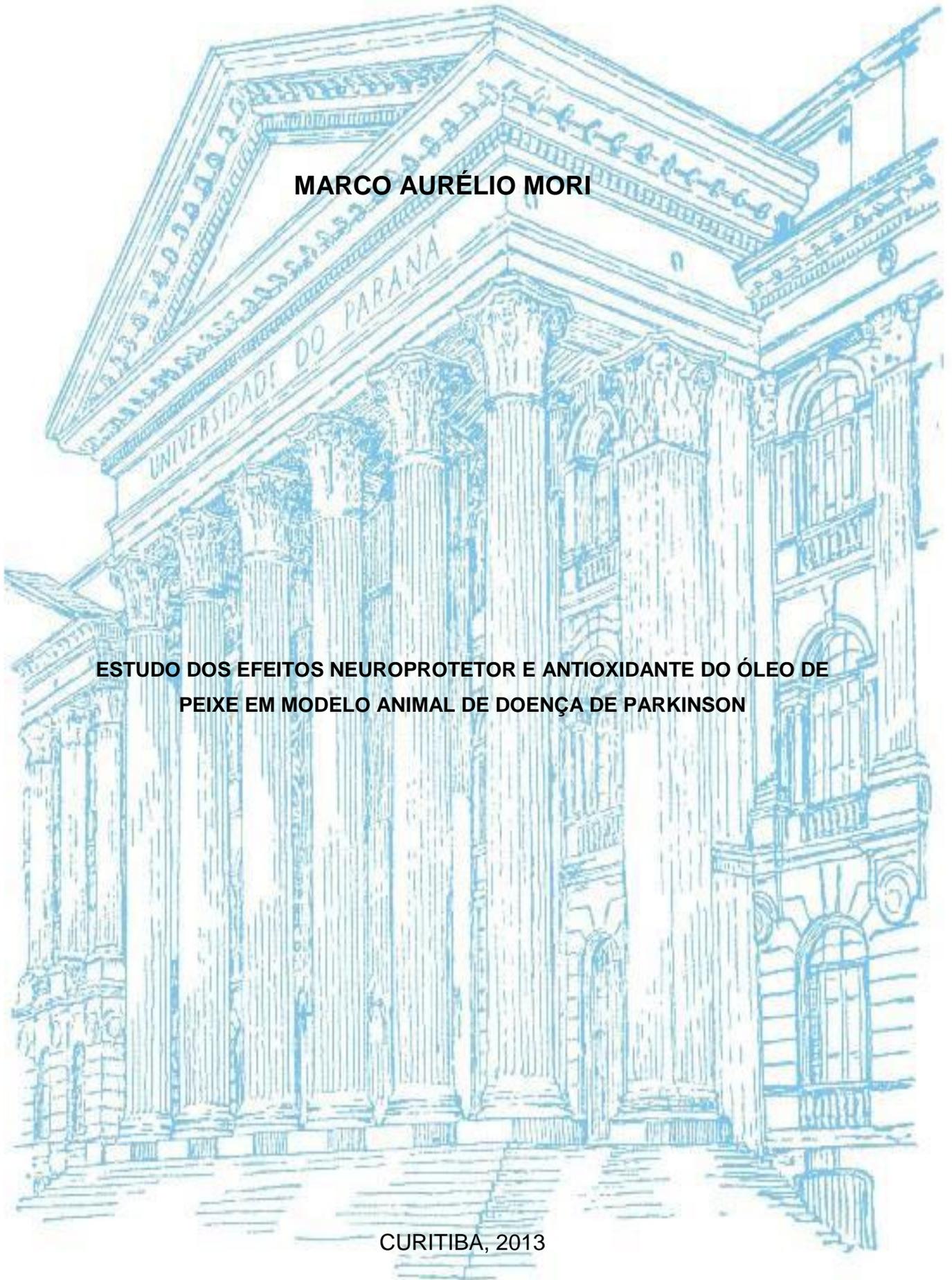


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCO AURÉLIO MORI

**ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE
PEIXE EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

CURITIBA, 2013



MARCO AURÉLIO MORI

**ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE
PEIXE EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de mestre em Fisiologia, curso de Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz

Co-orientação: Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel

CURITIBA, 2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da defesa de dissertação de mestrado de MARCO AURÉLIO MORI

Aos vinte e nove dias do mês de julho do ano de dois mil e treze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando **Marco Aurélio Mori**, intitulada **“ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETOR E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE PEIXE EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON”**. A abertura teve início às 09h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora do candidato, Professora Doutora Anete Curte Ferraz. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Anete Curte Ferraz passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Maria Aparecida B. Frazão Vital do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Anete Curte Ferraz fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela "aprovação", habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Anete Curte Ferraz, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 29 de julho de dois mil e treze.

Professora Doutora Maria Aparecida Frazão Vital
UFPR- Membro Titular

Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Anete Curte Ferraz

UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora
Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Obrigado meu Deus pela sua grandeza, pelo seu amor incondicional. Obrigado pelo carinho, pelo cuidado com minha família e meus amigos, por nunca desistir de mim, por me amparar em meus momentos tristes e por me capacitar para receber tudo que tens para me dar.

Minha vida, minha saúde e minha fé dependem quase que exclusivamente da minha família. Sou guiado pelos meus pais José Carlos e Maria de Fátima desde meu primeiro dia de aula. A jornada até aqui não foi diferente. Segui meus caminhos e minha vontade de fazer mestrado, entretanto, a realização desse sonho é dedicada a eles, meus dois maiores amores. As minhas irmãs, Lara e Carla, que também amo muito, obrigado por estarem sempre sonhando junto comigo e por sempre terem me apoiado com imenso amor. Pais e irmãs, obrigado pelo amor, pelo carinho e pelo apoio. Obrigado por sempre se orgulharem de mim.

Professora Dra. Anete Curte Ferraz, quero agradecê-la por todo período de orientação desse nosso trabalho. Quero agradecê-la pelo exemplo de dedicação ao trabalho e orientação a mim dedicados. Obrigado por tudo, por todo conhecimento que adquiri, pela amizade, pelo carinho, obrigado pelo apoio, e principalmente, obrigado por ter acreditado em mim desde o início, desde o dia que me apresentei ao laboratório como possível candidato ao mestrado.

Agradeço ao Professor Dr. Marcelo de Meira Santos Lima pela amizade, por ter sido sempre disposto a ajudar no desenvolvimento do trabalho..

Meus companheiros do laboratório de Neurofisiologia, vocês são um bando de relaxados e eu me orgulho de, por muitas vezes, ter comandado os momentos de “relaxo”. É impossível o trabalho e a convivência em um local onde não se encontra amizade e parceria para todos os momentos, e essas características não cabem ao laboratório. Com vocês, estudei, fiz experimentos, reclamei, baguncei, ri, cantei e cantei muito mesmo... Ana Márcia, Claudia e Laís nunca conseguirão “desapaixonar” da minha voz

extremamente afinada e da minha personalidade de artista. Mentira (risos). Obrigado a todos por sempre fazerem mais fáceis os dias de trabalho pesado. Obrigado Adriano Targa, Laís Soares, Maíra Maturana, Fabíola Vila, Mariana Bordinhão, Ana Noseda e todos os alunos de iniciação científica. Dentre meus amigos do laboratório, três precisam ser especialmente agradecidos. Agradeço ao Bruno Carabelli pela amizade e pelo companheirismo durante todas as etapas do mestrado, você nunca me abandonou nesse período. Ana Márcia Delattre, não esqueço quando me disse: “escrever sua discussão, é mostrar a todos o que você pensa e conclui dos seus trabalho... você vai convencer a todos que seus resultados são importantes..”, isso pesou quando fui escrever e considero que, por isso, só fui aprender a escrever, de verdade, quando fui estudar para discutir meus resultados. Muito obrigado por ter me apoiado em toda parte experimental, com seus conhecimentos e sua dedicação bem como sua disposição extrema em me ajudar sempre que precisei, tudo isso foi essencial para minha chagada até aqui. Sei que a amizade que criamos é verdadeira. Claudia Pudell, muito obrigado por tudo, pela amizade, pelo companheirismo, pelo apoio nos experimentos e nas nossas cantorias que sempre alegraram nossas cirurgias e perfusões.

Agradeço a todos os Professores do departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, pois vou levar comigo todo conhecimento adquirido com vocês.

Agradeço à Professora Dra. Elaine Aparecida Del Bel pela dedicação como co-orientadora, por ter me disponibilizado tudo que pode para o desenvolvimento das minhas análises, pelo carinho que fui recebido em seu laboratório.

Agradeço ao Professor Dr. Humberto Milani e à Professora Dra. Rúbia Maria Weffort pela amizade e por sempre me deixarem claro que posso contar com vocês. Foram essenciais no meu desenvolvimento científico desde meu primeiro ano de faculdade.

Ao Professor Jesuí Vergílio e sua equipe do Departamento de Química da UEM pela realização da análise do perfil lipídico.

À Fundação Herbarium de Pesquisa e saúde, que gentilmente cedeu as cápsulas de óleo de peixe utilizadas na suplementação dos animais.

Dizem por ai que não há solidão maior do que a do homem sem amizades e ainda, que ter muitos amigos é ter nenhum. Bom, tenho poucos amigos e, esses poucos, são os melhores do mundo. Fazem-me sentir rodeado de amor, carinho e cuidado mesmo quando distante deles. Se cheguei até aqui, também devo muito aos meus poucos e excelentes amigos. Tanto para os de longa data quanto para os meus novos. A amizade e paciência que dedicaram a mim durante esse período foi essencial. Acreditaram em mim em todos os momentos difíceis e, mesmo entendendo absolutamente nada dos meus experimentos, se orgulharam de mim. Não citarei nomes, pois eles sempre saberão quem são pela minha eterna gratidão. Meus amigos, MUITO OBRIGADO.

RESUMO

O a doença de Parkinson é uma enfermidade neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal que acomete mais homens que mulheres e leva ao aparecimento de sinais motores como acinesia, bradicinesia, rigidez muscular e tremores característicos. Os sintomas motores ainda podem ser acompanhados de alterações do humor e comprometimento da memória. Muitas hipóteses tentam explicar a morte de neurônios dopaminérgicos na DP, no entanto, atualmente não há um consenso sobre os mecanismos de morte celular que contribuem para essa perda neuronal. Disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, alterações nas configurações proteicas, e processos inflamatórios, podem conduzir a uma disfunção celular e morte neuronal. Nesse trabalho investigamos o efeito da suplementação prolongada com óleo de peixe (OP) nos aspectos anti-inflamatório, antioxidante, e neuroprotetor em um modelo animal de DP. Para isso, 10µg de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou salina foram microinjetados unilateralmente na parte medial do estriado esquerdo. Os animais foram suplementados diariamente do 70º ao 120º dia de vida com 3g/kg de OP rico em ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3. A lesão causada pela 6-OHDA foi branda, mimetizando os estágios iniciais da DP e não levou a alterações motoras avaliadas pelo teste de campo aberto. A análise do perfil lipídico, no estriado e substância negra, realizada por cromatografia gasosa, mostrou que o ácido graxo docosahexaenóico (DHA) teve seus níveis aumentados em ambas as estruturas. A análise da enzima tirosina hidroxilase (TH) mostrou que a suplementação teve papel neuroprotetor e reduziu a perda neuronal causada pela toxina quando comparado com o grupo controle. O aspecto neuroprotetor é apoiado pelo efeito antioxidante da suplementação avaliado pela imunohistoquímica para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que foi reduzida nos grupos suplementados. Associado a isso, a suplementação teve papel anti-inflamatório ao avaliarmos os dados de OX-42 como marcador microglial e GFAP como marcador astrocitário. Os níveis de ativação dessas células foram amenizados nos grupos suplementados nas regiões analisadas do estriado e da substância negra. Baseado nos resultados mencionados acima, é possível inferir que a suplementação prolongada com OP pode ser uma estratégia eficaz em amenizar os danos celulares característicos da DP por amenizar eventos inflamatórios e oxidativos.

Palavras chave: Ácidos graxos poliinsaturados. Óleo de peixe. Doença de Parkinson.

ABSTRACT

The Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway that affects more men than women, and leads to the appearance of motor signs such as akinesia, bradykinesia, and muscle tremors regidez characteristic. Motor symptoms may still be accompanied by mood changes and memory impairment. Many hypotheses attempt to explain the death of dopaminergic neurons in PD, however, there is currently no consensus on the mechanisms of cell death that contribute to this neuronal loss. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, protein settings changes and inflammatory processes can lead to cellular dysfunction and neuronal death. In this study we investigated the effect of prolonged supplementation with fish oil (FO) on aspects anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective effects in an animal model of PD. To this, 10mg of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or saline was microinjected unilaterally in the medial part of the left striatum. The animals were supplemented daily from the 70th to the 120th day of life with 3g/kg OP rich in polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family. The injury caused by 6-OHDA was bland, mimicking the early stages of PD and did not lead to motor disorders assessed by the open field test. The lipid profile in the striatum and substantia nigra performed by gas chromatography showed that the fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) levels had increased in both structures. The analysis of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) showed that supplementation had neuroprotective role and reduced neuronal loss caused by the toxin as compared to the control group. This aspect is supported by the neuroprotective effect of antioxidant supplementation assessed by immunohistochemistry for the inducible enzyme nitric oxide synthase (iNOS), which was reduced in the supplemented groups. Associated with this, supplementation has anti-inflammatory role in assessing the data as a microglial marker OX-42 and astrocytic marker GFAP. The levels of activation of these cells in the supplemented groups were attenuated in striatal and substantia nigra regions analyzed. Based on the results mentioned above, it is possible to infer that prolonged supplementation with OP may be an effective strategy to minimize cell damage characteristic of PD to ameliorate oxidative and inflammatory events.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids. Fish oil. Parkinson's disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01: Representação esquemática da anatomia funcional dos núcleos da base.....	19
FIGURA 02: Representação da via nigroestriatal e dos corpos de lewy ...	22
FIGURA 03: Etapas bioquímicas dos AGPs	33
FIGURA 04: Representação da formação de mediadores pró e anti-inflamatórios	37
FIGURA 05: Representação temporal do experimento	42
FIGURA 06: Representação da localização da injeção de 6-OHDA	44
FIGURA 07: Representação das áreas analisadas por DOI para TH	50
FIGURA 08: Representação das divisões do estriado em quadrantes	52
FIGURA 09: Resultados da análise de DOI para TH no estriado	56
FIGURA 10: Fotomicrografias de TH no estriado	57
FIGURA 11: Resultados da análise de DOI para TH na SNpc	58
FIGURA 12: Fotomicrografias de TH na SNc	59
FIGURA 13: Resultados da análise de DOI para iNOS no estriado	60
FIGURA 14: Fotomicrografias de iNOS no estriado	61
FIGURA 15: Resultados da análise de DOI para iNOS na SNpc	62
FIGURA 16: Fotomicrografias de iNOS na SNpc	63
FIGURA 17: Resultados da análise de DOI para OX-42 no estriado	64
FIGURA 18: Fotomicrografias de OX-42 no estriado	65
FIGURA 19: Resultados da análise de OX-42 na SNpc	66
FIGURA 20: Fotomicrografias de OX-42 na SNpc	67
FIGURA 21: Resultados da análise de DOI para GFAP no estriado	68
FIGURA 22: Fotomicrografias de GFAP no estriado	69
FIGURA 23: Resultados da análise de DOI para GFAP na SNpc	70
FIGURA 24: Fotomicrografias de GFAO na SNpc	71
FIGURA 25: Representação esquemática dos resultados obtidos	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Concentração dos ácidos graxos nas membranas do estriado.	54
TABELA 02: Concentração dos ácidos graxos nas membranas da substancia negra	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** – Serotonina
- 6-OHDA** – 6-hidroxidopamina
- AA** – Ácido aracdônico
- AGPs** – Ácidos graxos poliinsaturados
- AINES** – Anti-inflamatórios não esteroidais
- AL** – Ácido linoleico
- AMPC** – Monofosfato cíclico de adenosina
- A α L** – Ácido alfa-linolênico
- BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro
- COX** – Ciclo-oxigenase
- COX-2** – Ciclo-oxigenase do tipo 2
- DA** – Dopamina
- DAB** - 3,3 diamino-benzidina
- DAT** – Transportador catecolaminérgico
- DHA** – Ácido docosahexaenóico
- DOI** – Densidade óptica integrada
- DOPAC** - Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- DP** – Doença de Parkinson
- EC** – Estriado caudal
- EDL** – Estriado dorsolateral
- EDM** – Estriado dorsomedial
- EM** – Estriado medial
- EMe** – Estriado Medial esquerdo
- eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial
- EPA** – Ácido eicosapentaenoico
- ER** – Estriado rostral
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- EVL** – Estriado ventrolateral
- EVM** – Estriado Ventromedial
- FPM** – Feixe prosencefálico medial
- GABA** – Ácido gama-amino-butírico
- GDNF** – Fator neurotrófico derivado de células gliais

GFAP – Proteína fribilar ácida
GMPc - 3', 5'- monofosfato cíclico de guanosina
HO-I - Heme-oxigenase-I
HVA - Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético
IL-1 – Interleucina do tipo 1
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
LEU – Leucotrienos
LOX – Lipooxigenase
LPS – Lipopolisacarídeo bacteriano gram-negativo
LX – Lipoxinas
MAO – Monoamina oxidase
MPTP – 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NOS – Óxido nítrico sintase
NPD – Neuroprotectinas
NPD1 – Neuroprotectina do tipo D1
ON – Óxido nítrico
OP – Óleo de peixe
PFA – Paraformaldeído
PTG – Prostaglandinas
RvD1 – Resolvina 2 da série D
RvD2 – Resolvina 2 da série D
RvE1 – Resolvina 1 da série E
RvE2 – Resolvina 2 da série E
SN – Substancia negra
SNC – sistema nervoso central
SNcd – Substância negra compacta dorsal
SNcv – Substância negra compacta ventral
SNpc – Substância negra parte compacta
TH – Tirosina hidroxilase
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Aspectos neuroanatômicos e funcionais dos núcleos da base	16
1.2. Doença de Parkinson.....	21
1.3. Modelo animal de DP induzido por 6-OHDA intraestriatal.....	24
1.4. Óxido nítrico.....	25
1.4.1. O estresse oxidativo no desenvolvimento da doença de Parkinson	27
1.5. Neuroinflamação do desenvolvimento da DP	29
1.6. Ácidos graxos poliinsaturados	33
1.6.1. Ácidos graxos poliinsaturados e seus mediadores pró e anti-inflamatórios	37
1.6.2. Ação dos AGPIs na DP	39
2. OBJETIVO GERAL	41
2.1. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Animais.....	42
3.2. Grupos experimentais.....	42
3.3. Delineamento experimental	43
3.4. Cirurgia	44
3.5. Preparação dos encéfalos – Perfusão intracardíaca	45
3.6. Cromatografia gasosa	45
3.7. Imunohistoquímica	46
3.7.1. Processamento dos tecidos	46
3.7.2. Ensaio imunohistoquímico realizados	48
3.7.3. Análise de imagens por densidade óptica integrada (DOI)	49
3.7.4. Análise da imunohistoquímica para TH	50
3.7.5. Análise das imunohistoquímicas para OX-42, GFAP e iNOS	51
3.8. Teste comportamental	52
3.8.1. Campo aberto	52
3.9. Análises estatísticas	53

4. RESULTADOS	54
4.1. Campo aberto	54
4.2. Determinação do perfil lipídico	54
4.3. Análises histológicas	56
4.4. Imunohistoquímica para TH	56
4.4.1. TH no estriado	57
4.4.2. TH na substância negra	58
4.5. Imunohistoquímica para iNOS	60
4.5.1. iNOS no estriado	60
4.5.2. iNOS na substância negra	61
4.6. Imunohistoquímica para OX-42	64
4.6.1. OX-42 no estriado	64
4.6.2. OX-42 na substância negra	67
4.7. Imunohistoquímica para GFAP	68
4.7.1. GFAP no estriado	68
4.7.2. GFAP na substância negra	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

O Parkinsonismo é uma enfermidade neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na via nigro estriatal. Esta via é composta por neurônios cujos corpos celulares estão localizados na substância negra parte compacta (SNpc) e que projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado, onde a dopamina atua como um neurotransmissor modulador (Bove et al 2005). Esta perda celular afeta severamente a neurotransmissão dos núcleos da base. Para um melhor entendimento das consequências dessas alterações, iremos fazer uma breve revisão sobre o funcionamento dos núcleos da base.

1.1. Aspectos neuroanatômicos e funcionais dos núcleos da base

Os Núcleos da Base são estruturas subcorticais formadas por agrupamentos celulares que derivaram do telencéfalo. Esses núcleos são o caudado, o putâmen e acumbens que juntos formam o estriado, sendo o caudado e o putamen formando o neoestriado e o globo pálido o paleoestriado, de acordo com a filogenética. O globo pálido que é dividido em segmento externo (lateral) e interno (medial); o núcleo subtalâmico, localizado no diencefalo e a substância negra, localizada no mesencéfalo e é dividida em parte compacta e parte reticulada (Mink 1998, Parent & Hazrati 1995).

A substância negra compacta e o núcleo subtalâmico atuam modulando a atividade que ocorre no eixo principal do circuito córtex-núcleos da base-tálamo-córtex que é composto pelo estriado, globo pálido, substância negra reticulada e núcleos ventrais do tálamo. Estes núcleos processam o fluxo de informação de áreas neocorticais e talâmicas e projetam-se principalmente para tronco encefálico e tálamo (Parent & Hazrati 1995), possuem papel no controle de movimentos, (Calabresi et al 2006) e funções não motoras que incluem cognição e humor (cujos circuitos se originam em regiões límbicas e pré-frontais), controle da atenção, execução e comportamento motivado. Dentre as funções motoras podemos citar: ajuste postural, execução de movimentos, execução automática de planos motores, movimentos

simultâneos, planejamento motor e, em particular, a iniciação da resposta motora (Bostan et al 2013, Hauber 1998, Van asselen et al 2009).

O desempenho motor é acompanhado de uma sequência dinâmica de excitabilidade dos neurônios dos núcleos da base e córtex motor. Recentemente um estudo, por análise de imagem obtida por ressonância magnética, em humanos, mostrou que ocorre ativação de estruturas subcorticais, como putâmen e globo pálido, para o desenvolvimento de atividades motoras e que, quando em situação de esforço físico, o circuito motor interage com estruturas do sistema límbico, como amígdala (Bonzano et al 2013). O núcleo subtalâmico, que é glutamatérgico (excitatório), ainda possui uma rede que recebe aferências corticais diretas (chamada via hiperdireta) com funções ainda não compreendidas na programação motora, apesar de estar relacionada a em funções regulatórias nos núcleos da base (Mathai & Smith 2011).

O estriado (caudado/putâmen) corresponde ao principal núcleo de entrada e recebe aferências excitatórias glutamatérgicas (GLU) provenientes do córtex cerebral e tálamo (BOLAM ET AL 2000). O estriado recebe aferências dopaminérgicas da substância negra compacta (Calabresi et al 2006) e serotoninérgicas (5-HT) dos núcleos da rafe (Hauber 1998). Projeções estriatais são restritas a algumas estruturas, como o globo pálido, o núcleo entopeduncular e a substância negra, principalmente a reticulada. Os neurônios que se projetam para o globo pálido contêm, além do GABA, encefalina, os que inervam o globo pálido interno são ricos em substância P e dinorfina (Parent & Hazrati 1995).

Os núcleos da base influenciam outros sistemas neuronais por meio de dois núcleos de saída principais, o globo pálido interno e a substância negra reticulada. Estes núcleos enviam projeções GABAérgicas aos núcleos ventral anterior e ventral lateral do tálamo que, por sua vez, projetam-se de volta ao córtex cerebral (lobo frontal) (Parent & Hazrati 1995). As informações corticais são processadas no estriado e encaminhadas aos núcleos de saída, que se projetam para o tálamo e tronco encefálico. Os estudos sobre o funcionamento destes circuitos levaram à elaboração de modelos de como seria a sua organização. O modelo atualmente mais aceito descreve duas vias paralelas

denominadas via direta e via indireta (BRITTAIN & BROWN 2013, PENNEY & YOUNG 1983).

A via direta, é formada por neurônios estriatais que se projetam diretamente para a substância negra reticulada, utilizando o GABA como neurotransmissor. Quando os neurônios estriatais são ativados por um estímulo cortical (GLU), seu disparo suprime a inibição causada pelos núcleos de saída, permitindo a ativação do tálamo e em última análise do córtex frontal. Sendo assim, a ativação desta via funciona como um mecanismo de retro-alimentação positiva (BRITTAIN & BROWN 2013, DELONG 1990, OBESO ET AL 2002, OBESO ET AL 2000B).

A via indireta é formada por neurônios estriatais que se projetam para o globo pálido externo, utilizando o GABA como neurotransmissor. Os neurônios do globo pálido externo, também GABAérgicos, projetam-se para o núcleo subtalâmico que, por sua vez, emite eferências glutamatérgicas para os núcleos de saída. Dessa forma, quando a via indireta é ativada ocorre que o estímulo proveniente do córtex excita os neurônios estriatais que inibem o globo pálido externo e, portanto, este deixa de exercer sua atividade inibitória sobre o núcleo subtalâmico. A desinibição do núcleo subtalâmico faz com que aumente sua estimulação sobre os neurônios do globo pálido interno e da substância negra reticulada, os quais enviam projeções inibitórias para os neurônios tálamo-corticais. Assim, a ativação da via indireta constitui um mecanismo de retro-alimentação negativa (DeLong 1990).

Dessa forma, a interação das vias direta e indireta modula a atividade das células tálamo-corticais, por meio de um mecanismo de desinibição mediado pelo GABA (CHEVALIER & DENIAU 1990).

A via estriatal ainda é modulada pela dopamina, um neurotransmissor que é sintetizado na substância negra e tem como precursor o aminoácido tirosina. Ao ser liberada, a dopamina age em receptores dopaminérgicos que podem ser divididos nas famílias D1 e D2. A família D1 inclui os subtipos D1 e D5 e a família D2, os subtipos D2, D3 e D4. Os receptores D1 e D2 estão localizados nos terminais pós-sinápticos, enquanto, os receptores D2 são encontrados também no soma, dendritos e terminais dopaminérgicos pré-sinápticos onde atuam como autoreceptores, regulando os níveis de dopamina

(CHARNTIKOV ET AL 2011, FAURE ET AL 2010, SMITH & BOLAM 1990, STRANGE 1993).

As projeções estriatais diretas são mediadas por receptores dopaminérgicos tipo D1, enquanto as projeções indiretas são mediadas por receptores do tipo D2. Quando a dopamina se liga a receptores D1 promove a ativação da enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e Ca^{2+} intracelular, facilitando a transmissão GABAérgica estriatal. Por outro lado, quando a dopamina se liga a receptores do tipo D2 o que ocorre é a inativação da adenilato ciclase e consequente redução da transmissão neuronal (Smith & Bolam 1990). Portanto, a dopamina possui papel excitatório sobre a via direta e inibitório sobre a via indireta, sendo o resultado final de sua ação semelhante nas duas vias, induzindo facilitação dos movimentos (CLARK & WHITE 1987, GERFEN ET AL 1995). Ou seja, embora a atuação sináptica seja diferente, a projeção dopaminérgica leva a um efeito comum que consiste na redução da inibição dos núcleos de saída sobre os neurônios tálamo-corticais e consequente facilitação da iniciação dos movimentos pelo córtex (Figura 01)(Brittain & Brown 2013, DeLong 1990).

As projeções dopaminérgicas que influenciam as vias direta e indireta tem origem, principalmente, na substância negra compacta e tem como principal alvo o estriado dorsal (Via Nigroestriatal). Esta via origina-se principalmente na substância negra compacta, no mesencéfalo, e projeta-se principalmente para o neostriado por meio do feixe prosencefálico medial. (GERFEN ET AL 1995, SCHWARTING & HUSTON 1996). Seu conhecimento é importante visto que é a principal via acometida pelo processo neurodegenerativo na doença de Parkinson (DP).

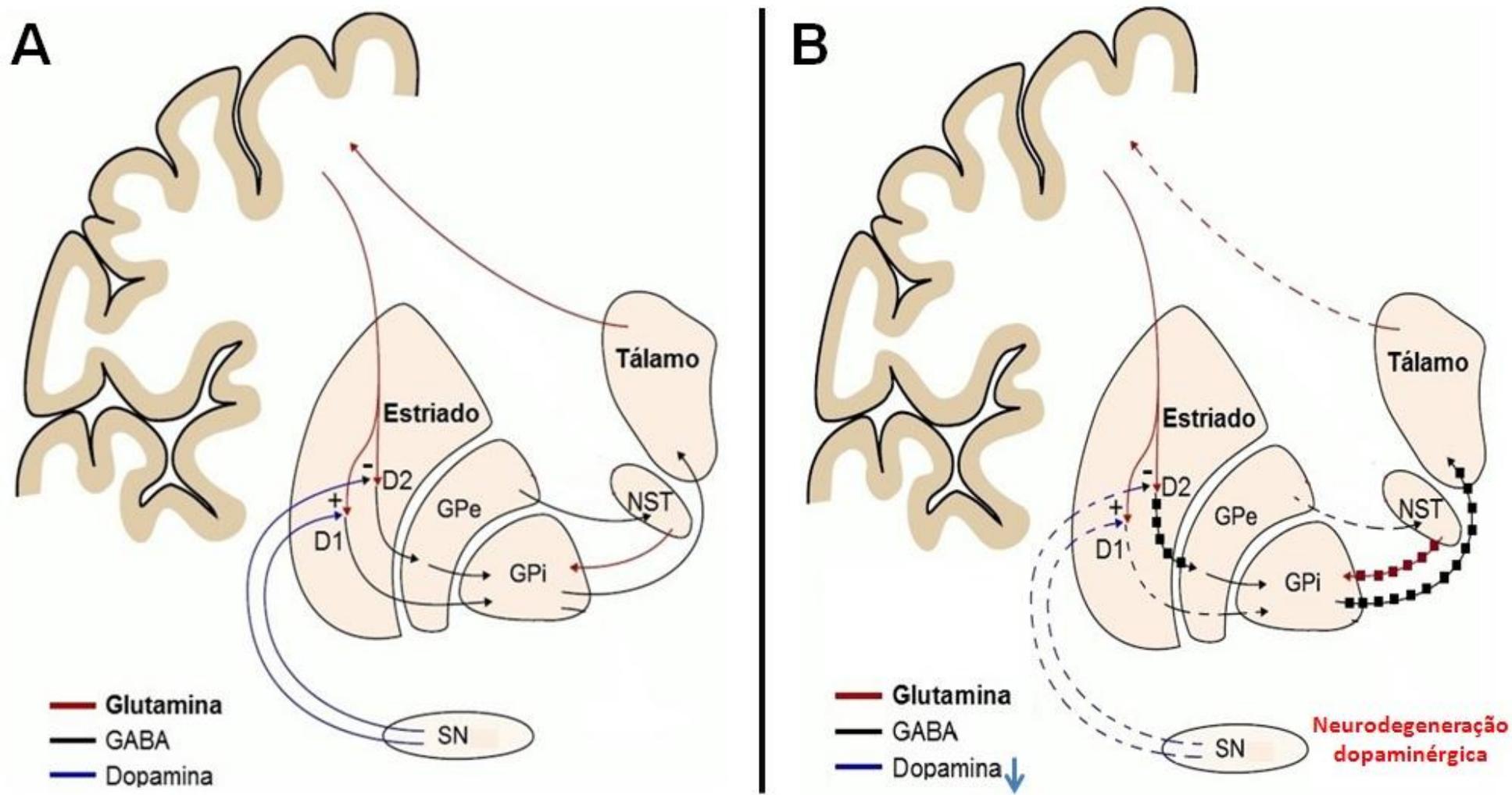


Figura 01: Representação esquemática da anatomia dos núcleos da base e a modulação dopaminérgica da programação motora. Nos circuitos os neurônios excitatórios glutamatérgicos estão em vermelho; os neurônios inibitórios gabaérgicos estão em preto e os neurônios dopaminérgicos que exercem efeito modulatório estão em azul. A figura A representa o circuito em condições normais onde a dopamina ativa os receptores estriais D1, que são excitatórios da via direta, e inibe os receptores D2 inibitórios da via indireta. A figura B representa o circuito em um encéfalo de um parkinsoniano no qual a perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) acarreta um déficit de dopamina no corpo estriado. A diminuição da aferência dopaminérgica da substância negra para o corpo estriado leva a um aumento da atividade da via indireta no globo pálido externo (GPe), desinibindo o núcleo sub-talâmico (NST) e inibindo a alça tálamo-cortical, e uma diminuição da atividade da via direta, inibindo o complexo palidial e facilitando a alça tálamo-cortical. Assim, inibindo o tálamo e diminuindo a saída das áreas motoras do córtex motor (adaptado de Brittain & Brown 2013).

1.2. Doença de Parkinson

Em 1817, um médico inglês chamado James Parkinson descreveu pela primeira vez, em seu trabalho "*Essay on Shaking Palsy*", uma doença de idade adulta que afeta mais homens que mulheres e é de evolução lenta. James elucidou a doença de forma bastante precisa e quase irretocável e por isso, hoje, leva o seu nome "Doença de Parkinson" (Parkinson 2002).

Embora o envelhecimento não seja considerado a causa primária da DP (Levy et al 2000, Strickland & Bertoni 2004), sua prevalência é estimada em 1% da população geral acima dos 55 anos. Em seguida aumenta progressivamente com a idade chegando a 3% das pessoas acima dos 70 anos (Emborg 2004, Levy et al 2000, Przedborski 2005).

A doença de Parkinson é uma enfermidade neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da via nigro estriatal, como visto anteriormente. A redução destes neurônios, que contêm neuromelanina, produz a despigmentação da SNpc (Dauer & Przedborski 2003) e, associado a este fato, um dos achados fisiopatológicos mais freqüentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy, formados principalmente pelas proteínas α -sinucleína e ubiquitina (Figura 02) (Emborg 2004).

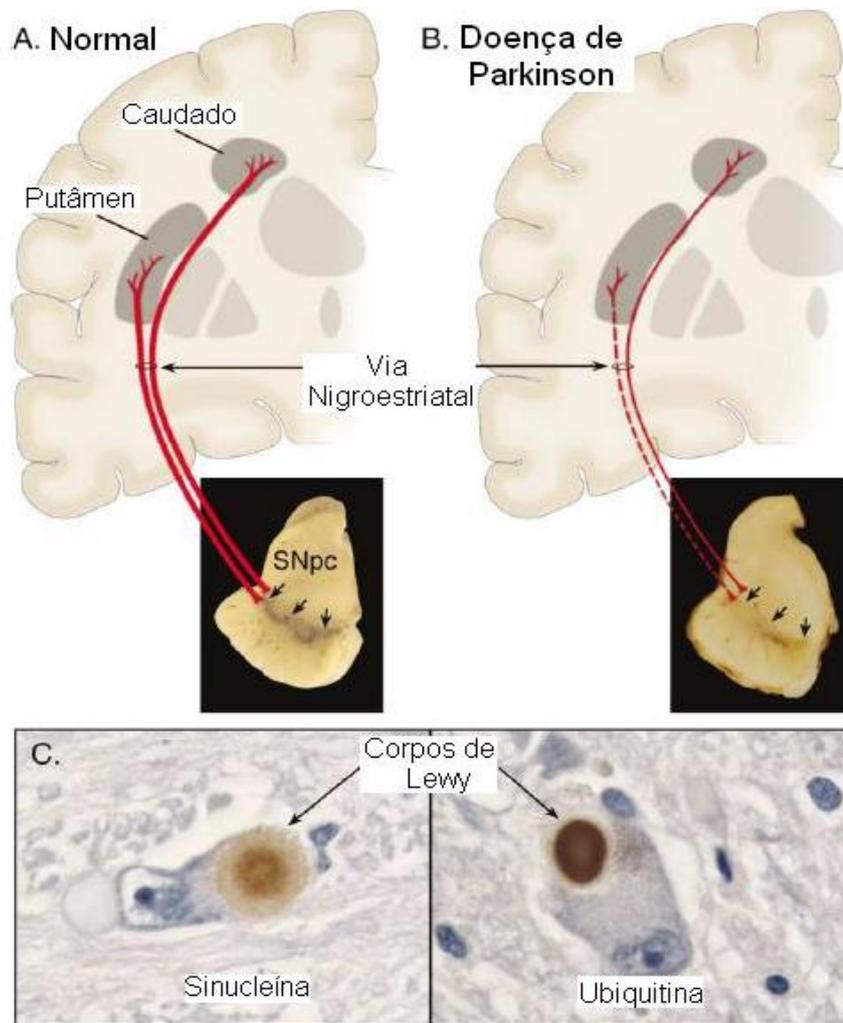


FIGURA 02: Representação esquemática da via nigroestriatal normal (a) e na doença de Parkinson (b). (c) detalhe das inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy). fonte: Dauer e Przedorski (2003).

Essa progressiva degeneração no sistema nigroestriatal dopaminérgico leva ao aparecimento de sinais motores como: acinesia, bradicinesia, rigidez do tônus muscular, redução dos reflexos posturais e tremores característicos (Howells et al 2005). Dessa forma, o objetivo de muitas pesquisas é amplamente focado em diminuir o impacto desta doença na qualidade de vida dos pacientes com DP. Inicialmente, cientistas estudavam no intuito de amenizar a deficiência motora característica da doença crônica. Entretanto, manifestações não motoras também podem ocorrer, tais como: alterações do humor (depressão e ansiedade), comprometimento da memória, alterações do sono e distúrbios do sistema nervoso autônomo. Esses sintomas neuropsicológicos tendem a ir aparecendo no decurso da doença e são

reflexos atribuídos a interrupção do circuito dopaminérgico frontoestriatal (Lima et al 2012; Nojomi et al 2010).

Qualquer que seja a causa da DP sabe-se que ela ocorre quando há perda de pelo menos 50% das células da substância negra o que corresponderia à perda de 80% da dopamina que chega ao estriado com perda do seu efeito modulatório (Debeir et al 2005). É nessa fase que surgem os primeiros sintomas clínicos da doença.

Embora a etiologia da DP ainda permaneça desconhecida, dados originados nas últimas décadas por estudos clínicos, autópsias e experimentos *in vivo* e *in vitro*, têm possibilitado ampliação do entendimento sobre sua patogênese. Sabe-se que a redução das células dopaminérgicas pode estar associada a diferentes mecanismos, incluindo estresse oxidativo, excitotoxicidade, distúrbio homeostático do cálcio, inflamação, apoptose e agregação de proteínas (Dauer & Przedborski 2003, Emborg 2004, Esposito et al 2007, Przedborski 2005). Outra possibilidade para a causa da doença é o fator genético, no qual genes como parkina, ou ainda mutações em α -sinucleína, podem estar envolvidos (Howells et al 2005). Entretanto, para Hald e Lotharius (2005), em apenas 5 a 10% dos casos observam-se correlações entre a ocorrência da doença e mutações, o que constitui a forma familiar da doença, que geralmente acomete os indivíduos ainda na juventude.

A descoberta, no início dos anos 80, do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) como um composto capaz de produzir um quadro clínico semelhante ao da DP (Bove et al 2005) motivou estudos que correlacionavam esta doença com tóxicos ambientais. Além disso, fatores endógenos que pudessem estar ligados à sua etiopatogênese também foram pesquisados (Esposito et al 2007). O papel da mitocôndria na DP adquiriu relevância após a observação de que toxinas que induzem a doença podem resultar na ação inibitória da atividade do complexo I mitocondrial (Dauer & Przedborski 2003, Przedborski 2005). O declínio moderado na atividade deste complexo não pode ser considerado como único responsável na etiologia da patologia, porém esta disfunção pode contribuir para uma cascata de danos que gera extensa morte celular (Dunnett & Bjorklund 1999). Neste sentido, a inibição do complexo I aumenta a produção de radical superóxidos ($-O_2^-$), que formam radicais hidroxil ($-OH$) ou reagem com o óxido nítrico (NO) formando

peroxinitritos (-ONOO⁻). Estes causam danos celulares por reagirem com ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Dauer & Przedborski 2003).

Muitos estudos indicam o papel da micróglia na etiologia da DP (Hald & Lotharius 2005, Kobylecki et al 2010), sua ativação contribui para a patogênese e progressão da doença. A micróglia, quando ativa, produz fatores pró-inflamatórios como o óxido nítrico (NO) e o Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que se acredita levarem a neurodegeneração (Wang et al 2005). Dessa forma, acredita-se que a degeneração neuronal não resulte apenas da ação de um único fator deletério, mas da convergência de diversos fatores patogênicos.

1.3. Modelo animal de DP induzido por 6-OHDA intraestriatal

Estudar doenças que têm impacto significativo na saúde humana, há anos tem sido facilitado por experimentação animal. Exemplos clássicos desse campo da ciência são dos modelos animais da DP nos quais toxinas como a 6-OHDA, o MPTP e a rotenona estabelecem modelos validados e úteis. Além de permitir elucidar os mecanismos patogênicos da neurodegeneração da DP, permitem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e farmacológicas voltadas para o tratamento dos sintomas motores e não motores que ocorrem na doença. Microinjeções de 6-OHDA intracerebral em ratos que resultaram em um dos grandes primeiros passos no avanço do modelo animal de DP (Ungerstedt 1971). Estudos demonstraram que a microinjeção desta toxina no feixe prosencefálico medial causa perda maciça e quase imediata de neurônios dopaminérgicos, levando a um quadro característico dos estágios avançados da doença de Parkinson, enquanto a aplicação de 6-OHDA no estriado pode ser considerada como um modelo lento e progressivo de degeneração destes neurônios (Sauer & Oertel 1994).

A neurotoxina 6-OHDA que compartilha algumas semelhanças estruturais com a dopamina e noradrenalina, dessa forma exibe grande afinidade com transportadores catecolaminérgicos como o da dopamina (DAT). Assim, a 6-OHDA consegue entrar nos neurônios dopaminérgicos e causar lesões específicas na via nigroestriatal. Estudos sugerem que essas lesões são causadas a partir do estresse oxidativo resultante da interação da toxina 6-

OHDA, esse estresse leva a morte celular por apoptose e/ou necrose contribuindo, então, para morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos. Esse estresse oxidativo resulta da disfunção mitocondrial, como citado anteriormente, e também pela ativação de enzimas ligadas aos processos inflamatórios como caspase e COX (Dodel et al 1999, Elkon et al 2004, Kupersmidt et al 2010, Liu et al 2007, Park et al 2004).

O uso de microinjeção de 6-OHDA no estriado foi sustentado pela idéia deste representar um modelo animal que mimetiza as fases iniciais da DP e que fornece, também, um substancial modelo de estudo dos impactos oxidativo e inflamatório no desenvolvimento da doença. Por promover diversos efeitos benéficos, neste projeto, objetivamos avaliar os efeitos da suplementação prolongada com OP, rico em ácidos graxos da família n-3, em animais submetidos ao modelo animal de DP induzida por 6-OHDA infundida no estriado.

1.4. Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é uma molécula gasosa, difusível e altamente reativa, com importantes propriedades funcionais. É formado pela oxidação do grupo guanidina da L-arginina por ação de enzimas denominadas sintases do óxido nítrico (NOS), num processo catalítico, que resulta na formação de L-citrulina (Bredt & Snyder 1994). Até o momento, o maior efetor para o ON é a guanilato ciclase solúvel, que, uma vez ativada, provoca a síntese do segundo mensageiro 3', 5'- monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O ON pode ser considerado um radical livre extremamente reativo dentre uma série de óxidos de nitrogênio. A partir de reações com outros radicais, pode se tornar mais biologicamente ativo que a molécula original (Bruckdorfer 2005).

Depois de formado, o ON atua como mensageiro celular em diferentes processos fisiológicos como: regulação do tônus muscular, transmissão neuronal, modulação de reações imunológicas e inflamatórias, crescimento, sobrevivência, apoptose, proliferação e diferenciação celular (Madhusoodanan & Murad 2007).

Atualmente, três isoformas de óxido nítrico sintase são conhecidas, sendo duas constitutivas, classificadas como neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), e uma induzida, derivada de macrófagos. A isoforma induzida, iNOS, que tem sua expressão regulada por citocinas e produtos bacterianos e pode ser induzida nos macrófagos, hepatócitos, micróglia, eritrócitos, músculo liso vascular, rins, pâncreas e cérebro em resposta a infecção (Clementi 2003, McLaren et al 2009). Isoforma endotelial, eNOS, produzido para regulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo, essa é a isoforma responsável pela atividade do fator de relaxamento endotelial descrito em 1980 por Furchgott e Zawadzki. Isoforma neuronal, nNOS, responsável pela produção de ON que atua no sistema nervoso e cardiovascular (Furchgott & Zawadzki 1980).

No sistema nervoso central (SNC) o ON pode atuar como neuromodulador na modulação do fluxo sanguíneo, da neurogênese e da plasticidade sináptica, sendo assim, relacionado a modulação do aprendizado e da formação da memória (Bishop & Anderson 2005). Como neuromodulador, o ON é produzido pelos neurônios nitrérgicos e glutamatérgicos e atravessa a membrana celular por difusão, sem a necessidade de um transportador (Esplugues 2002, Khandare et al 2013). Entretanto, quando produzido em excesso, o ON pode participar de eventos oxidativos que são nocivos ao neurônios (Fang et al 2007). O estresse nitrosativo pode levar a agregação de nitratos de proteínas modificados. Esses agregados de proteínas são altamente tóxicos e estão associados a diversas patologias degenerativas (Chung & David 2010, Fang et al 2007). Diversos estudos mostram o envolvimento do ON no desenvolvimento da DP. Em animais com DP induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a administração de um inibidor da nNOS conseguiu amenizar a perda dos neuronios dopaminérgicos da Substancia negra parte compacta, comprovando o envolvimento do ON nos processos neurodegenerativos (Gomes et al 2008, Padovan-Neto et al 2011).

1.4.1. O estresse oxidativo no desenvolvimento da doença de Parkinson

Muitas hipóteses tentam explicar a morte de neurônios dopaminérgicos na DP, no entanto, atualmente não há um consenso sobre os mecanismos de morte celular que contribuem para essa perda neuronal. Disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, alterações nas configurações proteicas, e processos inflamatórios, podem conduzir a uma disfunção celular e morte neuronal (Schapira & Jenner 2011).

Os neurônios nigrais podem ser seletivamente vulneráveis aos agentes ambientais os quais podem desencadear disfunções mitocondriais (Cicchetti et al 2009, Gao et al 2003). Estudos em modelos animais de DP, induzida por toxina, mostram a importância da função mitocondrial na manutenção das transmissões sinápticas e na sobrevivência neuronal. Isso demonstra que a disfunção mitocondrial pode estar envolvida na patogênese da DP (Dauer & Przedborski 2003, Orth & Schapira 2002). Outro fator importante envolvido na DP é o ambiente intracelular altamente oxidativo que é gerado nos neurônios dopaminérgicos a partir do metabolismo da dopamina. Quando metabolizada, a dopamina gera grandes quantidades de H_2O_2 e de dopamina-quinona (Dauer & Przedborski 2003). A dopamina-quinona pode gerar alterações em proteínas que perdem sua atividade enzimática como ocorre com a tirosina hidroxilase (TH) levando a danos nos neurônios dopaminérgicos (Kuhn et al 1999).

Essas alterações na configuração de proteínas, incluindo agregação, em associação com a disfunção mitocondrial podem criar prejuízos no processo celular os quais resultam em um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio como superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais livres que, em conjunto com os intermediários de nitrogênio, como o óxido nítrico e peróxido nítrico (OONO), podem causar danos para os neurônios (Mosley et al., 2006). Estudos confirmam que OONO é um potente inibidor da TH - a enzima limitante da velocidade na síntese de catecolaminas, e que é reduzida quali-quantitativamente em pacientes com DP (Kastner et al 1993).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) surgem como resultado normal da respiração celular a partir da mitocôndria (Danielson & Andersen 2008). Na cadeia respiratória, o oxigênio é reduzido a H_2O_2 , porém quando ocorre um

vazamento de elétrons, essa redução do oxigênio é incompleta resultando na formação de oxigênio molecular e superóxido (Chinta & Andersen 2008). Como essas EROs são produzidas naturalmente, a célula produz componentes enzimáticos para metabolizá-los a fim de diminuir seus possíveis efeitos nocivos. A enzima superóxido dismutase, por exemplo, metaboliza o H_2O_2 em H_2O e O_2 visto que, o peróxido de hidrogênio pode causar diversos danos celulares (Lin & Beal 2006). Um das hipóteses é de que a dopamina pode ser oxidada por H_2O_2 , que é um subproduto do próprio catabolismo da dopamina a partir da monoamina oxidase (MAO). Essa oxidação não enzimática da dopamina é um fator que torna os neurônios dopaminérgicos particularmente, mais vulneráveis ao dano oxidativo (Chinta & Andersen 2008, Kavya et al 2006).

Eventos nocivos causados por EROs podem estar associados a disfunções mitocondriais que levam a eventuais processos oxidativos, sendo esses relacionados como um importante mecanismo que leva a doença (Schapira & Gegg 2011). A disfunção mitocondrial é uma importante ferramenta para estudar os mecanismos da DP. Por exemplo, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetraidropiridina (MPTP), após diversos eventos enzimáticos, torna-se um inibidor do complexo I mitocondrial fazendo com que haja uma produção excessiva de radicais livres os quais levam a morte dos neurônios dopaminérgicos (Schapira & Gegg 2011).

Apesar de os reais motivos ainda não serem conhecidos, sabe-se que mutações no DNA mitocondrial podem gerar defeitos na cadeia respiratória o que pode acarretar em diferentes patologias como a DP (Schapira 1998, Tuppen et al 2010). Pesquisas epidemiológicas em humanos, bem como estudos moleculares em modelos animais induzida por toxinas, mostram que a disfunção mitocondrial é um defeito que ocorre no início da patogênese do PD tanto esporádica quanto familiar (Bueler 2009). Em um estudo com modelo animal de DP induzido por rotenona, os parâmetros neuroquímicos de nitrito e caspase-3 suportam a hipótese de que o estresse oxidativo causado pela toxina, levou os neurônios dopaminérgicos a apoptose (Abdin & Sarhan 2011).

A interação desses radicais livres resulta em uma variedade de eletrofílicos altamente reativos que podem causar peroxidação lipídica (Kohen

& Nyska, 2002). O uso de antioxidantes (vitamina E ou ácido ascórbico) em cultura de células PC12 reduziu efeitos oxidativos (Slotkin & Seidler 2010).

Compreender essa interação facilitou o entendimento dos fatores que levam a patologias neurodegenerativas como a DP, dessa forma, não é surpreendente que diferentes fatores resultantes do estresse oxidativo levem ao envelhecimento e a neurodegeneração relacionadas a patologias como a DP.

1.5. Neuroinflamação no desenvolvimento da DP

Nos últimos vinte anos, estudos pós-morte que avaliam encéfalos de pacientes parkinsonianos evidenciam o envolvimento de inflamação na progressão da DP (Ouchi et al 2009). A presença de micróglia ativadas corroboram esses estudos, e a partir desses achados a literatura aponta, através de estudos clínicos e em modelos animais, o envolvimento da micróglia ativada assim como dos níveis aumentados de mediadores inflamatórios tais como citocinas, e EROs na patologia da DP (Collins et al 2012, McGeer et al 1988). É apontado que a ativação glial pode se tornar altamente nociva quando em excesso e que pode estar diretamente relacionada com os mecanismos que levam a processos neurodegenerativo em diferentes patologias do SNC (Araque 2006, Cunningham 2013, Kimelberg 2010, Sidoryk-Wegrzynowicz et al 2011)..

Portanto, a ativação glial desencadeia a resposta inflamatória que contribui para o processo neurodegenerativo através de produção de toxinas, ou seja, quando ocorre um processo inflamatório agudo, mecanismos anti-inflamatórios limitam a lesão e promovem o reparo tecidual (Marchetti & Abbracchio 2005, Wyss-Coray & Mucke 2002), entretanto, quando cronicamente sustentada, a neuroinflamação provavelmente aumenta a suscetibilidade de neurônios vulneráveis a neurotoxicidade (Tansey et al 2007). A micróglia pode ser ativada diretamente por toxinas ou proteínas endógenas ou indiretamente por neurônios que estejam morrendo. Diversos estudos em torno da neuroinflamação demonstraram claramente que a reação micróglial frente a situações patológicas pode ter papel tanto benéfico quanto prejudicial

dependendo da intensidade e cronicidade da ativação destas células (Collins et al 2012)

Dentre os mecanismos patogênicos que contribuem para neurodegeneração dopaminérgica, o estresse oxidativo ganha atenção devido as evidências experimentais que mostram que a formação das EROs a partir dos metabólitos da dopamina, que são tóxicos as células gliais, pode ser uma das vias do desencadeamento de cascatas de eventos que culminam em processos inflamatórios, ou dos processos inflamatórios que levam a formação de EROs (Kupersmidt et al 2010).

Diversas alterações celulares e moleculares podem estar envolvidas na neurodegeneração das células dopaminérgicas como o desenvolvimento de proteínas anormais, a disfunção mitocondrial, processos apoptóticos, estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação (Hirsch et al 2005). A reação glial foi descrita em distúrbios do sistema nervoso central como a doença de Alzheimer e a isquemia cerebral (McGeer et al 1988), assim como em modelos animais da doença de Parkinson (Barcia et al 2011). Sabe-se que micróglia ativada leva a formação de mediadores pró-inflamatórios tanto em pacientes com DP quanto em modelos animais da doença. Essa ativação glial, em condições normais, é uma resposta celular genérica a degeneração de células vizinhas como os neurônios. Isso pode ser observado em animais com DP induzida por MPTP nos quais as análises histológicas mostram um intensa atividade de células gliais, como os astrócitos (Alvarez-Fischer et al 2008, Hirsch & Hunot 2009).

Quando moderadamente ativada, a micróglia exerce papel importante na homeostade do SNC, ajudando na remoção do excesso de toxinas, remoção do glutamato, de células mortas e ainda colabora com a liberação de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e fatores neurotróficos derivados das células gliais (GDNF) (Aloisi 1999, Nakamura 2002). Morfologicamente, em condições normais, a micróglia apresenta uma estrutura ramificada que é rapidamente alterada em condições patológicas e muda sua conformação para uma morfologia amebóide (Kreutzberg 1996) o que demonstra que está em sua forma ativada. Essa ativação pode ser desencadeada experimentalmente por agentes infecciosos como o lipopolissacarídeo bacteriano gram-negativo (LPS), pelo AMPc, interleucinas e 6-OHDA (Hanisch 2002, Nakamura 2002). A

microglia quando ativada, produz e libera moléculas pró-inflamatórias como diversas interleucinas (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-1), TNF- α (Fator de necrose tumoral) e o óxido nítrico (ON) que em excesso torna-se tóxico. O ON, na microglia, pode levar a produção de peroxinitrito (ONOO) que é altamente reativo com ânions e pode quebrar e/ou modificar a cadeia de bases de DNA levando a alterações na integridade estrutural de proteínas e desencadear processos de necrose e/ou apoptose (Beckman & Koppenol 1996, Estevez & Jordan 2002).

Então, como já demonstrado em diversos estudos, a inflamação é um importante mecanismo de defesa contra toxinas ambientais e é um componente chave, assim como o estresse oxidativo, na progressão de doenças neurodegenerativas como a DP (Bartels & Leenders 2007, Monahan et al 2008, Vroon et al 2007).

Portanto, a atenuação da neuroinflamação tornou-se um dos alvos dos pesquisadores para tentar impedir a progressão da DP. Neste sentido, uma linha de pesquisa da DP envolve os inibidores da ciclo-oxigenase (COX), que é uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico (AA) (Kulkarni & Dhir 2009). A microglia quando ativada com LPS aumenta os níveis de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e, assim, de prostaglandinas (Hoozemans et al 2005) e que podem ser tóxicas aos neurônios devido a ativação da caspase 3 (Consilvio et al 2004). Alguns estudos experimentais têm demonstrado efeitos protetores dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (Aguirre et al 2008, Reksidler et al 2007). Essas drogas exercem papel anti-inflamatório a partir da inibição da COX, que reduz a formação de prostaglandinas (Kulkarni & Dhir 2009).

Estudos experimentais mostram que as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 podem desencadear toxicidade e com isso potencializar uma resposta inflamatória levando a um aumento na produção de ON (Clarke & Branton 2002, Hirsch et al 1999, Ponsford et al 2001, Possel et al 2000). Com isso, a ativação microglial, estimula ainda mais a produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e levam a uma maior transcrição de genes necessários para a expressão de COX e iNOS (Liu 2006, Watanabe et al 2004).

Como citado anteriormente, células gliais ativadas podem produzir uma série de moléculas tóxicas, incluindo EROs espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que no contexto inflamatório são produzidos pelas enzimas indutoras iNOS e NADPH-oxidase. No SNC de pacientes saudáveis a iNOS não é expressa e a NADPH-oxidase fica quiescente, porém em pacientes parkinsonianos são claramente expressas e/ou ativadas em células gliais no mesencéfalo (Hunot et al 1996, Liberatore et al 1999). Isso demonstra que essas enzimas podem estar envolvidas em processos fisiopatológicos da DP.

A resposta glial frente a eventos inflamatórios, além de promover a ativação microglial, também leva a ativação astrocitária. Os astrócitos desempenham diferentes atividades relacionada ao controle direto da homeostase do SNC. Eles produzem diferentes fatores neurotróficos e promovem controle na sobrevivência dos neurônios por promoverem transferência de nutrientes diretamente do sangue (Sofroniew & Vinters 2010).

Frente ao crucial papel trófico dos astrócitos, estudos mostram o seu envolvimento em processos degenerativos como a DP. Sabe-se que essas células estão ativamente presentes na substância negra de encéfalos de parkinsonianos (Gu et al 2010, Mirza et al 2000). Essa alta presença de astrócitos ativados está diretamente relacionado no aumento de processos inflamatórios que levam a progressão da doença (Saijo et al 2009). Quando ativados de forma sustentada, os astrócitos entram em um estado denominado astrogliose, irreversível, e nocivo (Latour et al 2013). Estudos pós-mortem revelam a presença de intensa quantidade de astrócitos ativados na SNpc de parkinsonianos e ainda, que essas mesmas células apresentam imunorreatividade para α -sinucleína que compõe os corpúsculos de Lewi. Esses são comumente encontrados na SN de parkinsonianos (Gu et al 2010, Mirza et al 2000). Ao se induzir a supressão da ativação astrocitária, reduz-se a produção de moléculas pró-inflamatórias nos astrócitos, diferentes respostas neuroprotetora no sistema nigroestriatal são observados em modelos animais de DP (Saijo et al 2009, Tran et al 2011)

Assim como a micróglia, os astrócitos produzem diferentes fatores pró e anti-inflamatórios em resposta a insultos celulares, assim, estão associados tanto no papel protetor quanto potencial promotor do desenvolvimento da DP (Forno et al 1992, Mirza et al 2000). A ativação astrocitária pode ser mediada

pela presença de fatores pró-inflamatórios derivados da micróglia, como ON, FNT- α e interleucinas bem como dos fatores resultantes da morte neuronal, e, em resposta, pode promover liberação de mais fatores pró-inflamatórios que exacerbam o processo inflamatório e a neurodegeneração dopaminérgica (Araque 2006, Sofroniew & Vinters 2010). Juntamente às respostas inflamatórias, a ativação astrocitária está envolvida na expressão de proteínas relacionadas com a DP como a α -sinucleína e a parkina (Song et al 2009).

Dessa forma, a ativação sustentada da micróglia e dos astrócitos, como resposta inflamatória, leva a formação excessiva de mediadores pró-inflamatórios que tornam-se ainda mais nocivos que o insulto inicial e agravam processos neurodegenerativos envolvido no desenvolvimento da DP e acaba resultando em um ciclo vicioso devido a inflamação.

1.6. Ácidos graxos poliinsaturados

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que podem apresentar cadeia saturada, a qual não contém dupla ligação entre carbonos, ou cadeia insaturada, com uma ou mais duplas ligações entre carbonos. As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são amplamente determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) da série n-3, mais popularmente conhecidos como ômega-3, ou seja, os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) vêm despertando muito interesse pelas suas ações antiinflamatórias e neuroprotetoras, em contraste aos derivados do ácido aracdônico (AA), da série n-6 (ômega-6), ou eicosanóides, com potente atividade inflamatória. A figura 03 ilustra a síntese do AA (ω -6), EPA e DHA (ω -3) no organismo dos mamíferos a partir dos seus precursores, o ácido linoléico (AL) e ácido alfa-linolênico (A α L), repectivamente. Portanto, ambos os precursores (AL e A α L) são ácidos graxos essenciais, devendo ser introduzidos no organismo somente através da dieta, cujas proporções variam conforme a fonte (óleos vegetais de diferentes plantas, por

exemplo, soja, girassol, milho, canola, linhaça, primola, castanhas, etc). A partir desses precursores, a síntese do AA, EPA, DHA, ocorre em animais, mas não em plantas (Innis 2007).

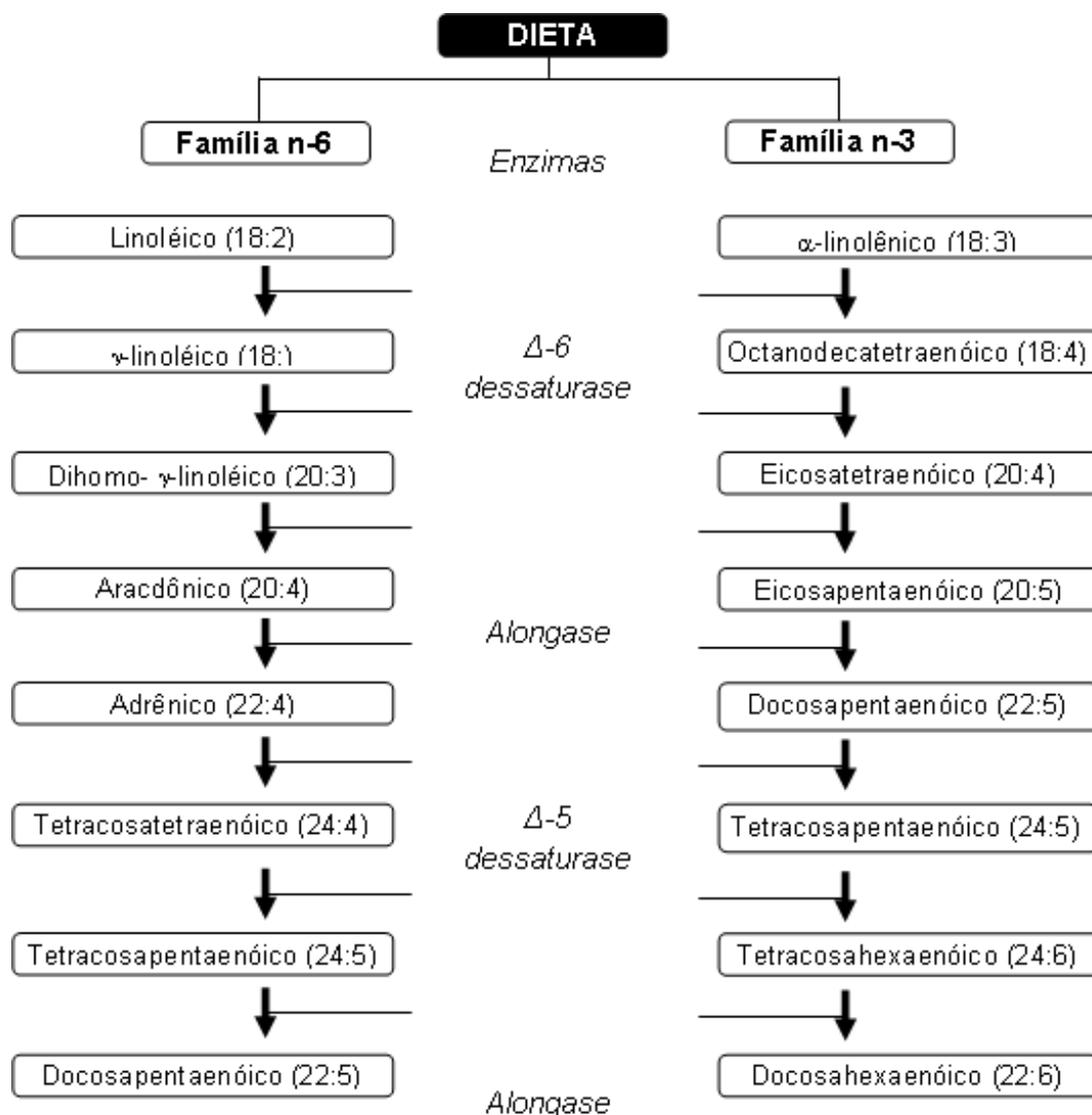


FIGURA 03 - Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos (Lauritzen 2001) (LAURITZEN et al. 2001)

É importante notar que ao longo das várias etapas de síntese (nos mamíferos), os AGPIs n-6 e n-3 são substratos das mesmas enzimas (Δ^5 -, Δ^6 -desaturases e elongases), competindo entre si pela atividade das mesmas. Considerando que o teor de AGPIs n-6 é maior nos vegetais (ou seus óleos) mais comumente consumidos através da dieta humana (ex., soja), principalmente a partir da revolução industrial, não é surpresa que a dieta típica atual do ser humano contenha 20 vezes mais AGPIs n-6 do que n-3 (Simopoulos 2002). Isso tem implicação na saúde humana, pois, os AGPIs n-6

dão origem aos eicosanóides com potentes ações inflamatórias, a exemplo do AA e seus derivados (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas). Apesar da essencialidade do ácido α -linolênico (A α L), o EPA e DHA podem ser obtidos mediante o consumo de certos peixes de água fria (ex., sardinha, salmão, anchova), os quais representam a fonte mais rica desses produtos finais da série n-3. (Bazan et al 2005, DeFilippis & Sperling 2006).

O DHA, em particular, é o ácido graxo poliinsaturado mais abundante no cérebro e retina, ficando incorporado nos fosfolípidos de membrana, a partir de onde é mobilizado sob determinadas condições para desempenhar importantes funções no desenvolvimento e manutenção física e funcional das células nervosas cerebrais e retinianas (Bazan et al 2005). A alta concentração de DHA incorporado nos fosfolípidos de membrana, principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, alcançando até 35% do total de ácidos graxos nas membranas sinápticas nos encéfalos de mamíferos, é uma característica do cérebro nos mamíferos, em contraste à baixa concentração de DHA no plasma e fígado (onde é sintetizado) (Innis 2007).

A incorporação do DHA no SNC ocorre ativamente durante o período de desenvolvimento do organismo. Evidências indicam, contudo, que o DHA pode ser sintetizado localmente no cérebro. Entre as células neurais (neurônios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos), a capacidade para sintetizar o DHA no encéfalo é restrita aos astrócitos. Embora os neurônios sejam o sítio de maior acúmulo de DHA e o endotélio da microvasculatura cerebral seja capaz de alongar e desnaturar ácidos graxos de pequena cadeia carbônica, existe uma carência cerebral das enzimas Δ^5 - e Δ^6 -desaturases (Kim et al 2009) e, portanto as etapas finais de desnaturaçãõ necessárias para formar o EPA e DHA não ocorrem (Innis 2008, Lauritzen 2001).

Em condições basais, ambos AA e DHA encontram-se altamente incorporados nos fosfolípidos de membrana. Em condições patológicas com processos inflamatórios, o AA, o EPA e o DHA são liberados do fosfolípido de membrana mediante a ação da fosfolipase A2. Mediante a ação das ciclooxigenases (COX-1, -2, -3) e lipooxigenases (15-LOX, 5-LOX) o AA dará origem aos eicosanóides clássicos envolvidos na resposta inflamatória (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas) (Bazan et al 2005, Zhang & Bazan 2010). Quando os níveis de EPA são maiores que de AA, por

competição enzimática, o EPA reduz a formação desses mediadores inflamatórios derivados do AA e sequencialmente ocorre um aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios derivados do EPA e do DHA como as Resolvinas e Protectinas (Bazan et al 2005, Serhan et al 2004). Os mediadores anti-inflamatórios derivados de AGPIs n-3 também reduzem a expressão de COX-2 e a infiltração de leucócitos, atenuando a resposta inflamatória (Boudrault et al 2010).

Se o perfil lipídico da dieta não é adequado para manter as necessidades cerebrais, as células irão substituir o DHA por outros AGPIs, causando alterações nas funções cerebrais (Carlson 2001, Fernstrom 1999) (FERNSTROM, 1999; CARLSON, 2001). Logo, o balanço correto entre ômega-3 (ALA,18:3) e ômega-6 (LA, 18:2) dentre os fosfolipídios é, em última análise, essencial para o funcionamento neural normal.

Com a expectativa de vida aumentada surge o desafio da manutenção da ótima função cerebral. Danos cerebrais são associados à idade e pode ser influenciado pela dieta, incluindo a proporção de AGPIs ingeridos. A deficiência de DHA na dieta é diretamente relacionada a distúrbios do SNC sugerindo, então, que uma ingestão adequada de DHA pode prevenir distúrbios cognitivos, emocionais, neurodegenerativos e ainda otimizar os mecanismos endógenos de reparo celular. Quando incorporado à dieta, o DHA ainda promove neurogênese, sendo assim, esses fatos indicam que o DHA pode ser uma ferramenta promissora na prevenção de processos degenerativos do SNC relacionados à idade como a DP (Alessandri et al 2003, Calder 2011, Massiera et al 2006, Mazereeuw et al 2012, Paizanis et al 2007, Simopoulos 2002).

Nas últimas quatro décadas houve um considerável aumento no consumo de AGPIs da família n-6 devido ao maior consumo de óleos vegetais, carne vermelha e produtos lácteos enquanto o consumo de n-3, como DHA, manteve-se inalterado. Dessa forma, a dieta determina alteração da composição de AGPIs nas membranas celulares e, como a conversão enzimática dos AGPIs das famílias n-6 e n-3 compete pelas mesmas enzimas, a conversão de ALA em DHA torna-se reduzida (Alessandri et al 2004, Alessandri et al 2003, Bazinet et al 2003, Calder 2005).

1.6.1. Ácidos graxos poliinsaturados e seus mediadores pró e anti-inflamatório

Os ácidos graxos estão relacionados aos processos inflamatórios por serem precursores de eicosanóides, como o AA que dá origem a prostaglandinas, leucotrienes e tromboxanos da série inflamatória (Calder 2011). Já o EPA e o DHA, apresentam atividade anti-inflamatória representada pela ativação de eicosanóides da série anti-inflamatória. Além disso, ativam sistemas antioxidantes e ativam proteínas antiapoptóticas (Seki et al 2009).

Na síntese destes compostos bioativos, o ácido graxo precursor é clivado por ação de fosfolipases, para ser então metabolizado. Existem duas vias de metabolização: a via ciclooxigenase, para formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a via lipooxigenase, a qual leva à síntese de leucotrienes (LEHNINGER; NELSON; COX, 1998). Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via da ciclooxigenase, a presença do EPA inibe competitivamente esta via. Por exemplo, a ingestão aumentada de AGPIs n-3, resulta na diminuição plasmática de AA. Conseqüentemente, sua disponibilidade e taxa de renovação (*turnover*) pela ciclooxigenase estão diminuídos, resultando na menor formação de derivados do AA, aumentando desta forma as prostaglandinas e tromboxanos derivados do EPA. A grande importância deste fato se dá não só pela alteração das concentrações de tais compostos, mas também pela diferença em suas atividades biológicas, pois os eicosanóides derivados do EPA têm menor potencial inflamatório quando comparados aos que são derivados do AA (Fedorova & Salem 2006). Desse modo, as quantidades relativas das duas famílias de ácidos graxos provenientes da dieta e presentes nos tecidos são de grande importância.

Em contrapartida a produção de pró-inflamatórios promovida pelos AGPIs da família n-6 (figura 04-A), alguns ácidos graxos, como o DHA, produzem mediadores que possuem atividade anti-inflamatória e imunomodulatória, incluindo a redução da migração de neutrófilos e redução das citocinas pró-inflamatórias (figura 04-B). Como esses mediadores anti-inflamatórios são produzidos durante os processos inflamatórios a fim de solucionar o problema, eles são denominados *resolvinas* (Marcheselli et al 2003). De acordo com cada ácido graxo precursor, as resolvinas são

destinadas a series diferentes: as derivadas do EPA são da série E (RvE1 e RvE2); o DHA dá origem as resolvinas da série D (RvD1 e RvD2) e ainda dá origem as protectinas e neuroprotectinas (quando produzidas no encéfalo) (Calder 2009, Calder & Yaqoob 2009, Serhan 2008, Thienprasert et al 2009).

As RvE1 reduzem a atividade de neutrófilos e inibem a geração de superóxidos, em macrófagos promovem fagocitose de neutrófilos apoptóticos, em células dendríticas inibem a produção de TNF- α e a liberação de interleucinas dos tipos 2 e 6. Ainda bloqueiam receptores tromboxanos, evitando a agregação plaquetária. Como as RvE1 são derivadas do EPA, admite-se que o uso desse ácido graxo pode ser benéfico a saúde, bem como o DHA (Dona et al 2008, Seki et al 2009).

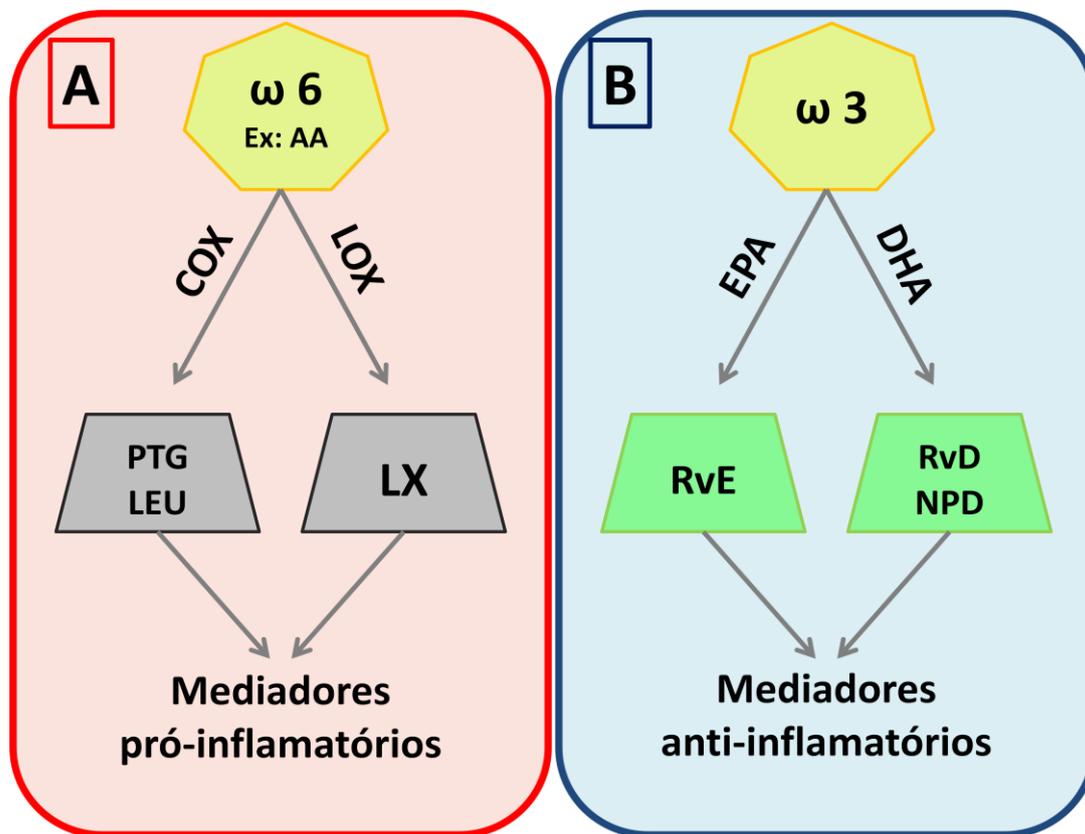


FIGURA 04: A: representação esquemática da formação de mediadores pró inflamatórios a partir de AGPs; Prostaglandinas e leucotrienos (PTG e LEU) e lipoxinas (LX) formados a partir do AA via COX e LOX, respectivamente. B: representação esquemática da formação de mediadores anti-inflamatórios a partir do EPA, com resolvinas da série E (RvE), e do DHA, com resolvinas da série D (RvD) e neuroprotectinas (NPD) (adaptado de (Serhan & Chiang 2008))

1.6.2. Ação dos AGPIs na DP

De acordo com Youdim, (2000) no envelhecimento e em distúrbios neurodegenerativos, tais como a DP e a doença de Alzheimer, há frequentemente declínio nos AGPIs, o que contribui para o decréscimo nas sinapses e na redução na função cerebral. Neste sentido, estudos epidemiológicos demonstraram que uma dieta carente em AGPIs n-3 é um fator de risco para o aparecimento da doença de Alzheimer e que esta diminuição é correlacionada com declínio cognitivo e demência (Calon & Cole 2007).

Ampliando estes conhecimentos, em estudos que tiveram o intuito de fornecer um suporte complementar de AGPIs, os autores demonstraram efeito neuroprotetor destes ácidos graxos em diversas neuropatologias tais como doença de Huntington, esclerose múltipla e isquemia (Correia Bacarin et al 2013, Das & Vaddadi 2004, Weinstock-Guttman et al 2005).

Com relação à DP, um estudo na população idosa da cidade de Rotterdam analisando perfil de consumo alimentar, associou a ingestão elevada de AGPIs na dieta a uma diminuição do risco de desenvolvimento dessa patologia (de Lau et al 2005). Entretanto, estes autores não fizeram associação direta entre AGPIs n-3 e o risco de desenvolvimento da doença.

Um estudo demonstrou, através de modelo animal de DP induzido por MPTP, que a dieta enriquecida com AGPIs n-3 teve efeito neuroprotetor nos aspectos quantitativos de dopamina (DA) e seu metabólito DOPAC, bem como no número de neurônios tirosina hidroxilase (TH) positivos presentes na SNpc (Bousquet et al 2008).

Outro estudo com pacientes com doença de Parkinson que apresentavam sintomas de depressão relacionou a eficiência dos AGPIs n-3 com a sintomatologia apresentada na DP e, demonstrou que a ingestão diária de óleo de peixe, rico em n-3, durante 3 meses foi eficiente na redução dos sintomas depressivos (da Silva et al 2008).

Delattre e colaboradores (2010) evidenciaram uma significativa redução da peroxidação lipídica na substância negra após lesão com 6-OHDA em animais suplementados com OP, indicando um potencial efeito sobre o estresse oxidativo. Porém, no modelo utilizado, no qual a neurotoxina 6-OHDA

foi injetada no feixe presencefálico medial (FPM), a suplementação prolongada com OP (69 dias) não foi eficaz na proteção da morte dos neurônios dopaminérgicos como também não modificou os déficits motores decorrentes da degeneração do sistema nigroestriatal.

Além disso, o protocolo utilizado para indução do parkinsonismo mimetiza lesões equivalentes aos estágios finais da doença o que pode ter dificultado a análise dos reais efeitos neuroprotetores do OP. Quando a toxina é infundida no estriado, a lesão obtida mimetiza os estágios iniciais da doença, pois induz morte das células dopaminérgicas por um mecanismo retrógrado, promovendo uma janela temporal mais prolongada para o aparecimento do efeito neuroprotetor, em comparação com a intensa morte celular promovida por essa toxina quando infundida no FPM.

Muitos estudos mostram que os AGPIs como o DHA e o EPA, encontrados em altas concentrações no óleo extraído de peixes provenientes de águas frias, exibem efeitos protetores em diferentes modelos experimentais. Neste sentido, esses ácidos graxos apresentam atividade antiinflamatória, anti-apoptótica, aumento da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), ação antioxidante e aumento da neurogênese (Cole & Frautschy 2010, Ferraz et al 2011, Vines et al 2012).

Baseado nos conhecimentos sobre os processos oxidativos e inflamatórios que podem levar a morte celular, em particular a neurodegeneração, muitos estudos tentam encontrar estratégias terapêuticas que possam, ao menos, reduzir esses processos nocivos aos diferentes tipos celulares.

Assim, como estes ácidos graxos são necessários para o adequado desenvolvimento do encéfalo e de suas funções, sua correlação com a DP poderá ser a descoberta de uma nova estratégia neuroprotetora, que consiste em reduzir as manifestações clínicas da doença e/ou retardar a sua progressão, para trazer aos portadores desta patologia melhora na qualidade e na expectativa de vida.

Portanto, neste estudo, nosso objetivo foi de avaliar os efeitos da suplementação prolongada com óleo de peixe, rico em ácidos graxos da família ω -3, em animais submetidos ao modelo animal de DP induzida por 6-OHDA administrada intraestriatalmente.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi investigar quais os efeitos da suplementação prolongada com óleo de peixe (OP), rico em ácidos graxos da família n-3, por 50 dias, em animais jovens adultos (70 dias) submetidos ao modelo animal de DP induzida por 6-OHDA inulateral.

2.1. Objetivos específicos:

- Determinar o perfil lipídico da substância negra em animais suplementados e controles;
- Investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a função motora através do teste de campo aberto;
- Investigar o efeito da suplementação prolongada com OP sobre o número de neurônios TH positivos na substância negra parte compacta dorsal e ventral bem como das fibras dopaminérgicas no estriado;
- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o estresse oxidativo causados pela 6-OHDA através da quantificação imunohistoquímica de iNOS na substância negra (compacta dorsal e ventral) e estriado em animais suplementados e controles;
- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a inflamação induzida pela 6-OHDA através da quantificação imunohistoquímica de OX-42 e GFAP na substância negra (compacta dorsal e ventral) e estriado em animais suplementados e controles.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados para o experimento 60 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 280 e 300 gramas, obtidos no Biotério Central do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor acima citado sob número 556 seguindo exigências estabelecidas em “*Guide for care and use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”.

Os animais foram mantidos em condições constantes de umidade e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração (Nuvilab CR₁ – Nuvital Nutrientes S/A) à vontade durante todo experimento. Esforços máximos foram tomados para reduzir eventuais desconfortos causados aos animais durante os experimentos, demonstrando preocupações que se adaptam às modernas práticas bioéticas de experimentação animal.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais: grupo óleo de peixe (OP, n=30), que receberam diariamente, por meio de agulha de gavagem, 3,0 g/kg via oral de uma mistura de óleo de peixe composta de 12% de ácido docosahexaenóico (DHA), 18% de ácido eicosapentaenóico (EPA) e antioxidante tocoferol, gentilmente doado pelo Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Paraná, Brasil. O grupo controle (C, n=30) que não recebeu suplementação com óleo de peixe, alimentado apenas com ração própria para ratos à vontade e água à vontade, durante o mesmo período.

3.3. Delineamento experimental

No projeto, avaliamos os possíveis efeitos neuroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante do OP em animais com lesão unilateral (hemiparkinsonianos) induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os animais foram suplementados com OP por 50 dias sendo que, no 25º passaram pelos processos cirúrgicos para a microinjeção no estriado de 6-OHDA ou salina. O desenho experimental adotado pode ser visto na figura 05 e os grupos ficaram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo OP-6-OHDA – Animais suplementados com óleo de peixe e que receberam microinjeção com 6-OHDA no estriado (n=15);
- Grupo OP-Salina (Sham) – Animais suplementados com óleo de peixe e que receberam microinjeção com salina no estriado (n=15);
- Grupo Ctr-6-OHDA – Animais que não receberam suplementação com óleo de peixe e receberam microinjeção com 6-OHDA no estriado (n=15);
- Grupo Ctr-Salina (Sham) – Animais que não receberam suplementação com óleo de peixe e receberam microinjeção de salina no estriado (n=15).

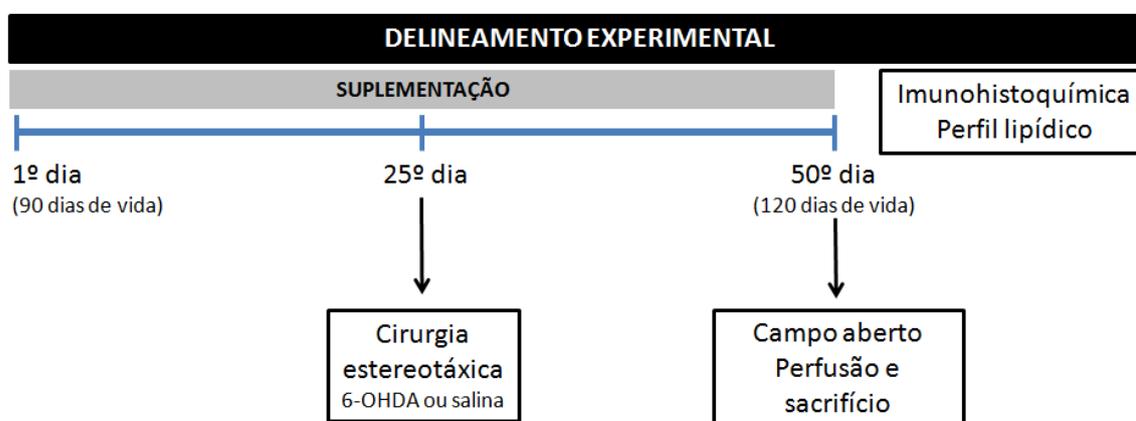


FIGURA 05: Representação temporal do experimento

Aos 120 dias de idade, os animais de, todos os grupos, passaram pelo teste de campo aberto para avaliar se a magnitude da lesão foi capaz ou não de induzir alterações motoras. Em seguida, 20 animais de cada grupo foram anestesiados e perfundidos transcárdiacamente para fixação do tecido encefálico e posterior análise histológica por imunohistoquímica. E cinco animais de cada grupo foram sacrificados (decapitados) para dissecação do estriado e da substância negra que seguiram para avaliação do perfil lipídico por cromatografia gasosa.

3.4. Cirurgia estereotáxica

Para lesão unilateral da via nigroestriatal, os animais foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (60mg/Kg, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*) e Quetamina (4mg/Kg, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*). Anestesiados, foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight), em seguida receberam uma microinjeção única de 10µg/µl, 0,25µl/min, de 6-OHDA no estriado esquerdo, parte medial, nas seguintes coordenadas relativas ao Bregma (Paxinos & Watson 2005): Antero-posterior: +0,4; látero-lateral: +2,8; dorso-ventral: -5,0 (Figura 06). A concentração e as coordenadas foram baseadas em trabalhos anteriores (Gomes et. al. 2008; Debeir et. al. 2005 e Cunha et al, 2008).

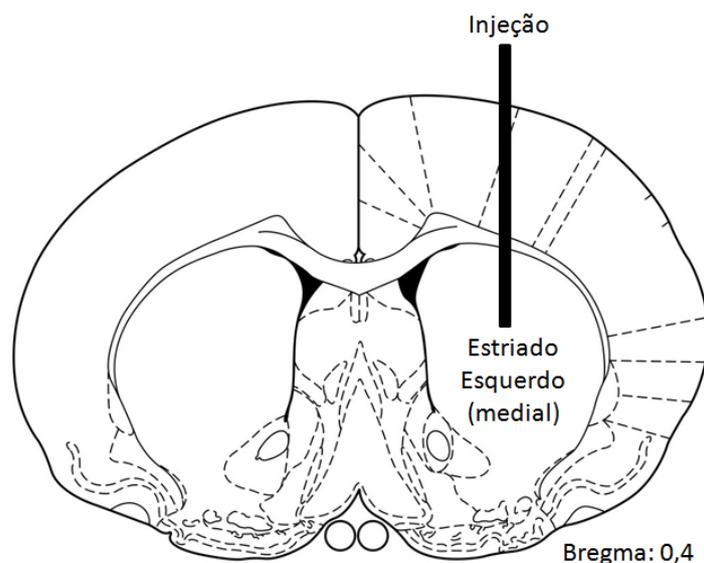


FIGURA 06: Representação esquemática da localização da microinjeção de 6-OHDA ou Salina.

3.5. Preparação dos encéfalos – Perfusão intracardíaca

Uma parte dos grupos experimentais (n=40) foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (60mg/Kg, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*) e Quetamina (4mg/Kg, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*) e foram perfundidos intracardicamente primeiramente com solução salina 0,9%, 250 ml, contendo heparina (25.000UI/L) e em seguida por paraformaldeído (PFA) 4%, 500ml, com pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e mantidos em PFA 4% por duas horas e a 4°C e crioprotégidos em solução de sacarose 30% a 4°C por 72 horas. Em seguida, os encéfalos foram congelados a -40°C em Isopentano e foram mantidos em freezer -70°C até o momento dos ensaios imunohistoquímicos. O restante dos animais, também foi anestesiado, foram decapitados para dissecação do estriado e substância negra. Estas estruturas foram mantidas em freezer -70°C até o processamento cromatográfico.

3.6. Cromatografia gasosa

Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol-água e a trans-esterificação dos lipídios totais foi realizada. Vinte e cinco mg de óleo ($\pm 0,1$ mg) foram pesados e adicionados a 1,5 ml de 0,50 mol de NaOH / L de metanol. A mistura foi aquecida num banho de 100°C durante 5 minutos e em seguida arrefecida até temperatura ambiente. Em seguida, 2ml de uma solução de trifluoreto de boro (BF₃) em 12% de metanol foram adicionados e aquecido novamente em banho a 100°C durante 30 minutos. As amostras foram arrefecidas em água corrente a temperatura ambiente e 1ml de isooctano foi adicionado. As amostras esterificadas foram mantidas em repouso para separação das fases. O sobrenadante foi recolhido e a amostra foi concentrada para um volume final de 1,0ml para subsequente injeção no cromatógrafo a gás. Os ésteres de ácidos graxos poliinsaturados foram separados em fases gasosas pelo cromatógrafo (Ultra Rastreo 3300) equipado com detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (FAME Select 100m de comprimento, a 0,25mm de diâmetro e 0,25mm de cianopropilo) com um fluxo de H₂ (gás transporte) de 1,2ml/min, 30ml/min de N₂ (perfazer). O volume injetado foi de aproximadamente 2,0 uL, utilizando

1:80 divisão da amostra, com as temperaturas do injetor e do detector de 220 a 230°C respectivamente, enquanto que a coluna 165°C que aumentou para 235°C em uma taxa de 4°C/min e mantido por 14,5 min. Os percentuais foram determinados pela integração de áreas de pico pelo Software Chronquest versão 5.0. Os valores foram obtidos utilizando o critério da comparação do tempo de retenção dos ésteres metílicos de padrões da Sigma (EUA), com a amostra e através da co-diluição padrão de composição conhecida.

3.7. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica se refere ao processo de localizar antígenos (proteínas) em uma amostra de tecido e mantendo-se seu contexto anatômico. Essa técnica explora o princípio de ligações específicas entre antígenos e anticorpos específicos. Os protocolos utilizados para os ensaios imunohistoquímicos foram:

3.7.1. Processamento dos tecidos

Cortes coronais de 25 µm foram feitos em criostato (Leica®, modelo CM1850) ao longo da extensão rostro-caudal do estriado e substância negra (Atlas de Paxinos & Watson, 2005). Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento, de modo que as análises histológicas fossem realizadas em secções comparáveis ao longo da extensão rostro-caudal de cada estrutura. As secções foram distribuídas sequencialmente em 8 tubos, de modo que cada um continha de 10 a 15 secções (dependendo da extensão do núcleo) que correspondam as regiões rostral, medial e caudal de cada núcleo. Cada tubo foi direcionado a uma imunohistoquímica, sendo estas realizadas em secções adjacentes (1º tubo = TH; 2º tubo = iNOS; 3º tubo = GFAP; 4º tubo = OX-42; os tubos restantes ficaram como reserva)

- Recuperação antigênica: as secções foram aquecidas durante 30 minutos em solução citrato de sódio com pH 6.0 em banho Maria a 50°C. As secções foram arrefecidas por 30min;

- Foram realizadas 3 lavagens de 5min cada com PBS 0,1M, pH 7,4 contendo 0,15% de Triton X-100 para, por meio de sua atividade detergente, tornar a membrana celular permeável, melhorando o acesso do anticorpo ao antígeno;
- Bloqueio dos sítios inespecíficos: com albumina de soro bovino 2% (BSA - NGS, Jackson Immuno Research, EUA) e soro normal 5% (produzido em cabra, cavalo, sendo utilizado de acordo com o anticorpo secundário) durante 1 hora em temperatura ambiente;
- Incubação com anticorpo primário (diluído em PBTS): durante 18 a 48 horas (de acordo com cada anticorpo) com anticorpos específicos para as imunohistoquímicas de interesse;
- Foram realizadas lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST para eliminar o excesso de anticorpo e aqueles ligados inespecificamente;
- Incubação com anticorpo secundário de interesse: para aumentar a visualização da ligação foi empregada a revelação com marcadores enzimáticos ou método de marcação indireta onde, o anticorpo secundário carrega um marcador, nesse caso, a biotina. A incubação foi realizada durante 90 minutos;
- Lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST;
- Incubação das secções durante 2 horas com o complexo avidina - peroxidase biotinilada (solução A e B, Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories®), onde a avidina se liga às moléculas de biotina do anticorpo secundário. Esta solução foi preparada 30 minutos antes para permitir a formação do complexo;
- Lavagem das secções 1 vez durante 5 minutos, em PBST;
- Lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em Trisma Base (TB 0,25M, pH 7,4);
- Após a lavagem, a atividade da enzima peroxidase foi revelada por adição do cromógeno tetrahydrocloroto de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB, Sigma) contendo 3µl peróxido de hidrogênio 30V (diluídos em 20ml de TB 0,1M, pH7,4), durante aproximadamente 10 minutos. Esta revelação ocorre por uma reação de oxidação, formando um composto

insolúvel fortemente corado em marrom-róseo e eletrodenso, que se precipita marcando assim o sítio do complexo antígeno - anticorpo;

- Lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em TB 0,25M, pH 7,4. Finalmente as secções passaram por uma série de concentrações crescentes de alcoóis para que o tecido seja desidratado (70%, 95%, 100%, 100% + xilol) e logo após foram diafanizadas no xilol, duas vezes durante 3 minutos. Os cortes foram então montados utilizando solução de montagem (Entellan, MERK, Darmstadt, Germany).

As imunohistoquímicas para iNOS e OX-42 foram reveladas utilizando o realçador cromógeno sulfato de níquel. Este, adicionado a DAB+peróxido de hidrogênio formando um composto insolúvel fortemente corado em preto-zulado e elétdenso, que se precipita marcando assim o sítio do complexo antígeno – anticorpo. Há essencialmente nenhuma diferença na sensibilidade das reações enzimáticas com DAB ou níquel-DAB, embora a coloração preta seja por vezes mais óbvia. É importante reconhecer que Níquel-DAB irá precipitar em soluções que contenham cloreto, de modo que o NaCl não deve ser incluído em qualquer tampão expostos a Níquel-DAB. Desta forma, no caso dessas imunohistoquímicas foram realizadas utilizando solução de acetato de sódio 0.175M pH 6.9 ao invés de TB 0,25M. O composto Níquel-DAB foi dissolvido em 50mL de solução acetato de sódio com adição do cromógeno tetrahydroclorato de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB, Sigma) contendo 4,15µl peróxido de hidrogênio 30V, durante aproximadamente 10 minutos (Hoffman et al 2008).

3.7.2. Ensaio Imunohistoquímico realizado

- Imunohistoquímica para TH: O anticorpo primário utilizado é específico para a enzima tirosina hidroxilase, produzido em coelho (1:8000, rabbit anti-TH, Pel Freez, USA; 18hs) e o secundário anti-coelho produzido em cabra (1:400, goat anti-rabbit IgG, Vectastain Kit PK 6101, Vector Laboratories®). O soro utilizado no bloqueio de reações inespecíficas foi o soro de cabra (goat normal serum, Vectastain, Vector Laboratories®).
- Imunohistoquímica para GFAP: O anticorpo primário utilizado foi específico para a GFAP, produzido em coelho (1:1000, rabbit anti-

GFAP, Chemicon, USA; 18hs) e o secundário anti-coelho produzido em cabra (1:400, goat anti-rabbit IgG, Vectastain Kit PK 6101, Vector Laboratories®). O soro utilizado no bloqueio de reações inespecíficas foi o soro de cabra (goat normal serum, Vectastain, Vector Laboratories®).

- Imunohistoquímica para OX-42: O anticorpo primário utilizado foi específico para a OX-42, produzido em camundongo (1:600, mouse anti-OX-42, Abcam, Cambridge, UK; 48hs) e o secundário anti-coelho produzido em cavalo (1:400, horse anti-mouse IgG, Vectastain Kit PK 6101, Vector Laboratories®). O soro utilizado no bloqueio de reações inespecíficas foi o soro de cavalo (horse normal serum, Vectastain, Vector Laboratories®).
- Imunohistoquímica para iNOS: O anticorpo primário utilizado é específico para a iNOS, produzido em coelho (1:400, rabbit anti-iNOS, Sta. Cuz, USA; 48hs) e o secundário anti-coelho produzido em cabra (1:400, goat anti-rabbit IgG, Vectastain Kit PK 6101, Vector Laboratories®). O soro utilizado no bloqueio de reações inespecíficas foi o soro de cabra (goat normal serum, Vectastain, Vector Laboratories®).

3.7.3. Análise de imagens por densidade óptica integrada (DOI)

As imunohistoquímicas realizadas foram analisadas quantitativamente por densidade óptica integrada das marcações positivas dos anticorpos dirigidos para iNOS, OX-42, GFAP e TH. Para isso, todo processo imunohistoquímico seguiu regras de padronização e todas as revelações, de cada anticorpo, foram realizadas no mesmo ensaio, com o mesmo tempo de revelação, a partir da mesma solução reveladora.

A quantificação foi realizada a partir de análise de imagens capturadas a partir do scanner de lâminas Zeiss Axio Imager2. O aparelho permite captura de imagens de qualidade, sem perda de informações importantes para validação dos dados. Para isso, fez-se uma captura global que é criada a partir de um processo de escaneamento e captura de várias imagens individuais, criou-se, então, uma imagem panorâmica de toda lâmina que serviu de base

para a análise das áreas de interesse. Cada imagem capturada permitiu resultados precisos e reprodutíveis, pois todos os padrões de luminosidade, foco e objetiva (10x) utilizada foram previamente estabelecidos e mantidos em todos os escaneamentos. O aparelho possui iluminação completamente homogênea o que permitiu uma melhor análise por densidade óptica integrada (DOI). As imagens foram capturadas pela câmera *AxioCam HRc* acoplada no microscópio Zeiss Axio Imager2. O mosaico para formação da imagem geral foi feito pelo software *AxioVision*.

Obtida a imagem total de cada lâmina, imagens individuais foram extraídas pelo software MetaView v.2.0.112, em seguida cada imagem extraída foi analisada pelo software ImageJ v1.46r que permite a análise por densidade óptica integrada (DOI). Este software transformou cada imagem para escala de cinza e a intensidade da marcação foi expressa em unidades arbitrárias em uma escala de 0 a 255 (255 representa a marcação mais escura). Para análise das estruturas de interesse, estriado rostral, medial e caudal, substância negra dorsal e ventral, foram delimitadas áreas no ImageJ. A partir desses parâmetros, a densidade óptica integrada foi calculada multiplicando-se a área considerada como marcação positiva pela medida dos valores de cinza. O valor obtido foi utilizado para comparar todos os grupos.

3.7.4. Análise da imunohistoquímica para TH

A quantificação da densidade das fibras (estriado) e corpos celulares dopaminérgicos (SNpc) marcados para TH foi realizada analisando-se ambos os hemisférios encefálicos. A marcação para TH é reduzida quando ocorre algum tipo de lesão tecidual pelo fato de ocorrer redução da enzima de reconhecimento. Dessa forma, o valor da DOI, quando existe lesão, é menor que quando comparado com o grupo sem lesão. Para realizar a análise de forma que pudéssemos abranger toda a área da lesão, uma área fixa foi delimitada para cada núcleo analisado (figura 07) e a mesma foi repetida igualmente para todos os animais.

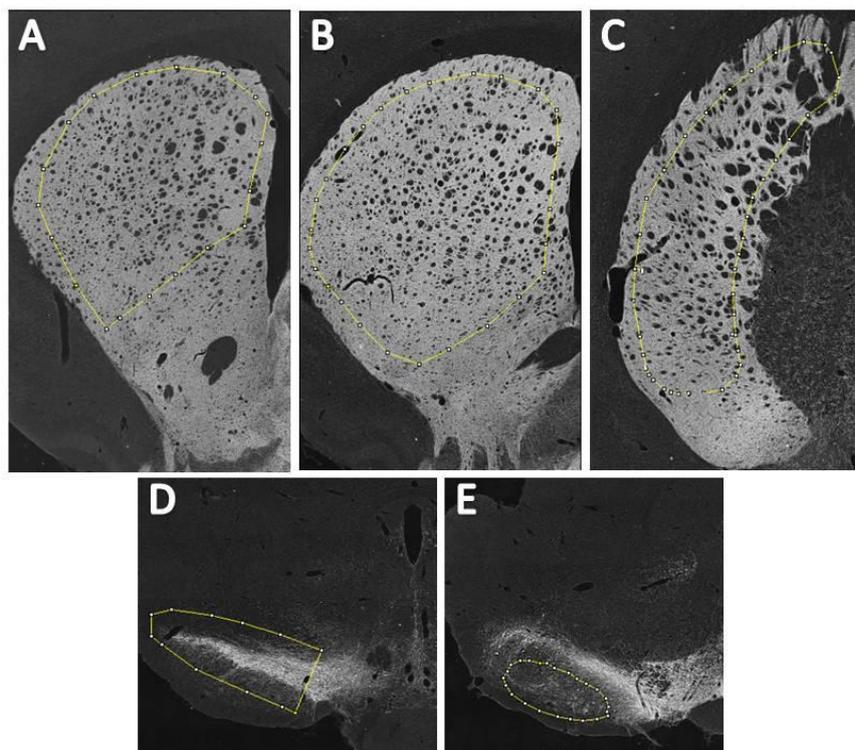


Figura 07: Fotomicrografias representativas de cada posição das estruturas analisadas de acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 2005. Para cada, a área delimitada pelo pontilhado com linha amarela corresponde a área analisada pelo ImageJ para DOI. As imagens correspondem a: A: Estriado parte rostral; B: Estriado parte medial; C: Estriado parte caudal; D: Substância Negra parte compacta dorsal; E: Substância Negra parte compacta ventral.

3.7.5. Análise da imunohistoquímica para OX-42, GFAP e iNOS

Baseados no fato de que a localização do sítio de injeção de 6-OHDA encontrar-se na porção medial do estriado esquerdo, e que o lado contralateral não apresentou diferença significativa na análise da imunohistoquímica para TH evidenciando ausência de atividade neurotóxica da 6-OHDA no lado direito, decidimos avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre OX-42, GFAP e iNOS somente estriado medial esquerdo (EMe).

Para isso, o EM esquerdo foi dividido em 4 quadrantes e uma imagem central (650 x 400 μm) de cada quadrante foi capturada e analisada por DOI. Para melhor entendimento dos resultados, os quadrantes foram nomeados como: estriado dorsomedial (EDM), estriado dorsolateral (EDL), estriado

ventromedial (EVM) e estriado ventrolateral (EVL) como demonstrado na figura 08.

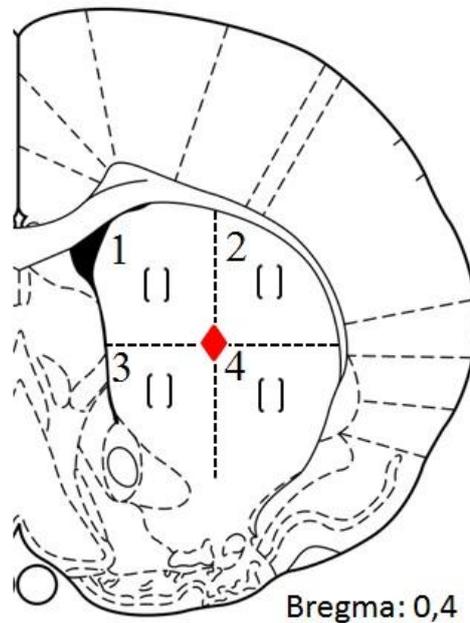


Figura 08: Representação esquemática das divisões do estriado em quadrantes. 1, 2, 3 e 4 representam estriado dorso medial (EDM), estriado dorsolateral (EDL), estriado ventromedial (EVM) e estriado ventrolateral (EVL). Os “[]”, posicionados na parte central de cada quadrante, indicam o local de captura de imagem para análise de DOI. O losango central, representa o sítio da microinjeção de salina ou 6-OHDA.

3.8. Teste comportamental

3.8.1. Campo Aberto

O teste de campo aberto foi realizado em uma arena circular (1m de diâmetro), limitado por uma parede de 40cm de altura e iluminado por quatro lâmpadas de 60W (Broadhurst 1960). O piso da arena era preto, sem divisões aparentes. Os animais foram colocados individualmente na área central, e deixou-se explorar livremente a arena durante 5 minutos. Durante o período de exploração do ambiente, a atividade locomotora foi avaliada pelos parâmetros de distância percorrida e velocidade através do software Smart System Junior® (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) O campo aberto foi limpo com uma

solução de 5% de etanol-água antes de cada teste comportamental para eliminar possível viés devido a odores deixados pelos ratos anteriores.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de Duncan. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Campo aberto

Todos os animais do experimento foram submetidos ao teste de campo aberto (dados não mostrados) e os resultados mostram que, no protocolo experimental utilizado, a neurotoxina não apresentou efeito estatisticamente significativo na distância percorrida [$F_{(1,54)} = 3,22$; $P < 0,1$] e na velocidade [$F_{(1,54)} = 1,18$; $P < 0,5$].

4.2. Determinação do perfil lipídico

Para a determinação do perfil lipídico foram utilizadas as membranas neuronais do estriado e da substancia negra do lado contralateral à lesão. Pelo fato de a lesão por si só causar uma redução neuronal, dessa forma a quantidade de membrana celular, o lado lesado torna-se inviável para análise da possível incorporação lipídica nas membranas neuronais. A análise das membranas estriatais demonstrou aumento significativo do DHA nos animais que receberam a suplementação com óleo de peixe [$F_{(1,15)} = 29,10$; $P < 0,0001$]. Todavia a concentração deste ácido graxo não foi alterada em função da presença da neurotoxina 6-OHDA [$F_{(1,15)} = 0,46$; $P < 0,50$] ou pela interação entre estes fatores [$F_{(1,15)} = 0,075$; $P < 0,78$] (Tabela 01). O pós-teste de Duncan indicou que os grupos OP- Salina e OP-6-OHDA apresentaram incorporação estatisticamente aumentada do ácido graxo DHA em relação aos grupos controles ($P \leq 0,01$).

Parâmetros similares também foram observados quando analisadas as membranas da substancia negra. Os dados não evidenciaram alteração no contingente dos demais ácidos graxos quantificados, exceto na concentração do DHA que se mostrou aumentado em decorrência da suplementação [$F_{(1,15)} = 10,39$; $P < 0,001$], porém não foi influenciado pela aplicação da 6-OHDA [$F_{(1,15)} = 0,88$; $P = 0,36$] ou da interação entre os fatores [$F_{(1,15)} = 0,11$; $P = 0,73$] (Tabela 02). O pós-teste de Duncan indicou que os grupos OP- Salina e OP-6-OHDA apresentaram incorporação estatisticamente aumentada do ácido graxo DHA em relação aos grupos controles ($P \leq 0,01$).

Tabela 01 – Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas do estriado

Ácido Graxo	ESTRIADO			
	Ctr-Salina (n=5)	Ctr-6-OHDA (n=5)	OP-Salina (n=5)	OP-6-OHDA (n=5)
Palmítico (16:0)	18,62 ± 0,28	18,68 ± 0,23	18,79 ± 0,23	18,75 ± 0,05
Esteárico (18:0)	21,93 ± 0,34	21,82 ± 0,10	21,74 ± 0,31	21,83 ± 0,21
Linoleico (18:2 n-6)	0,70 ± 0,03	0,73 ± 0,01	0,77 ± 0,04	0,78 ± 0,02
Aracdônico (20:4 n-6)	12,22 ± 0,20	12,09 ± 0,24	11,67 ± 0,31	11,85 ± 0,15
EPA (20:5 n-3)	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,29 ± 0,05
DHA (22:6 n-3)	13,84 ± 0,29	13,97 ± 0,25	15,56 ± 0,56 ^a	15,89 ± 0,24 ^a

Os valores representam as médias ± EPM. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Duncan. ^ap<0,01 quando comparado aos animais OP-Salina e OP-6-OHDA.

Tabela 02 – Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas da substancia negra

Ácido Graxo	SUBSTÂNCIA NEGRA			
	Ctr-Salina (n=5)	Ctr-6-OHDA (n=5)	OP-Salina (n=5)	OP-6-OHDA (n=5)
Palmítico (16:0)	17,60 ± 0,55	16,77 ± 0,12	16,89 ± 0,14	16,36 ± 0,61
Esteárico (18:0)	18,61 ± 1,88	21,98 ± 0,20	21,55 ± 0,31	21,93 ± 0,21
Linoleico (18:2 n-6)	0,91 ± 0,08	0,73 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,76 ± 0,06
Aracdônico (20:4 n-6)	10,20 ± 0,36	10,29 ± 0,51	9,36 ± 0,54	9,40 ± 0,35
EPA (20:5 n-3)	0,40 ± 0,02	0,39 ± 0,06	0,33 ± 0,06	0,44 ± 0,10
DHA (22:6 n-3)	13,23 ± 0,44	12,72 ± 0,25	14,36 ± 0,45 ^a	14,13 ± 0,39 ^a

Os valores representam as médias ± EPM. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Duncan. ^ap<0,01 quando comparado aos animais OP-Salina e OP-6-OHDA.

4.3. Análises histológicas

Foram realizados ensaios imunohistoquímicos para TH, OX-42, GFAP e iNOs. Para análise da magnitude da lesão causada pela toxina, ambos os lados do encéfalo foram analisados para imunohistoquímica para TH. O lado esquerdo, o qual recebeu a microinjeção de salina ou 6-OHDA, será denominado, nos resultados, como ipsilateral e o lado direito que não recebeu microinjeção será denominado como contralateral. As regiões do estriado analisadas foram: estriado rostral (ER), estriado medial (EM), estriado caudal (EC) e as regiões da substância negra foram: substância negra parte compacta dorsal (SNcd) e substância negra parte compacta ventral (SNcv).

4.4. Imunohistoquímica para TH

A quantificação da densidade das fibras (estriado) e corpos dopaminérgicos (substância negra) marcados para TH foi realizada analisando-se ambos os hemisférios encefálicos. A marcação para TH é reduzida quando ocorre algum tipo de lesão tecidual pelo fato de ocorrer redução da enzima de reconhecimento. Dessa forma, o valor da DOI, quando existe lesão, é menor que quando comparado com uma região sem lesão.

Não foram observados efeitos da neurotoxina 6-OHDA no lado contralateral do ER ($F_{(1,21)} = 1,48$; $P < 0,5$), EM ($F_{(1,21)} = 3,01$; $P < 0,1$) e EC ($F_{(1,21)} = 2,19$; $P < 0,5$), bem como na SNcd ($F_{(1,21)} = 0,00$; $P < 0,94$) e SNcv ($F_{(1,21)} = 0,69$; $P < 0,5$). Da mesma forma, não foram observados efeitos da suplementação no lado contralateral do ER ($F_{(1,21)} = 0,12$; $P < 0,72$), EM ($F_{(1,21)} = 2,52$; $P < 0,5$) e EC ($F_{(1,21)} = 0,34$; $P < 0,56$), SNcd ($F_{(1,21)} = 2,24$; $P < 0,5$) e SNcv ($F_{(1,21)} = 0,569$; $P < 0,5$). Com isso, a média do lado contralateral de cada região analisada, para TH, foi utilizada como parâmetro para expressão em porcentagem do tamanho da lesão causada pela toxina.

4.4.1. TH no estriado

A análise da imunorreatividade para TH no lado ipsilateral, mostrou que a neurotoxina 6-OHDA reduziu a marcação positiva para TH no estriado rostral -ER- [$F_{(1,19)} = 170,98$; $P < 0,0001$], estriado medial -EM- [$F_{(1,19)} = 98,25$; $P < 0,0001$] e estriado caudal -EC- [$F_{(1,19)} = 13,02$; $P < 0,001$]. A suplementação com OP reduziu o efeito neurotóxico da 6-OHDA no estriado rostral -ER- [$F_{(1,19)} = 21,19$; $P < 0,001$], estriado medial -EM- [$F_{(1,19)} = 19,64$; $P < 0,001$] e estriado caudal -EC- [$F_{(1,19)} = 6,25$; $P < 0,05$]. Foram observadas interações entre a neurotoxina e a suplementação no estriado rostral -ER- [$F_{(1,19)} = 29,99$; $P < 0,0001$], estriado medial -EM- [$F_{(1,19)} = 17,71$; $P < 0,001$] e estriado caudal -EC- [$F_{(1,19)} = 9,53$; $P < 0,01$] (figuras 09 e 10).

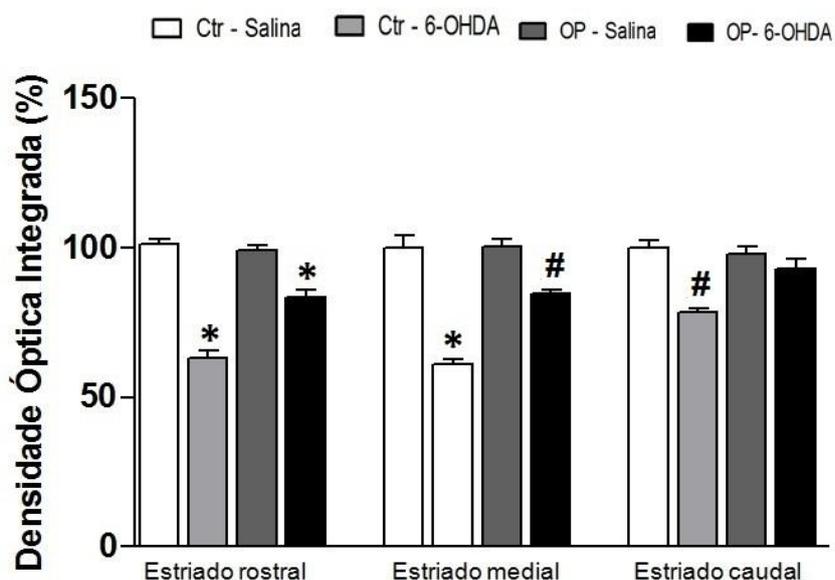


FIGURA 09: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para TH nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. * $P < 0,0005$ comparados com os demais grupos e # $P < 0,005$ comparados com os demais grupos.

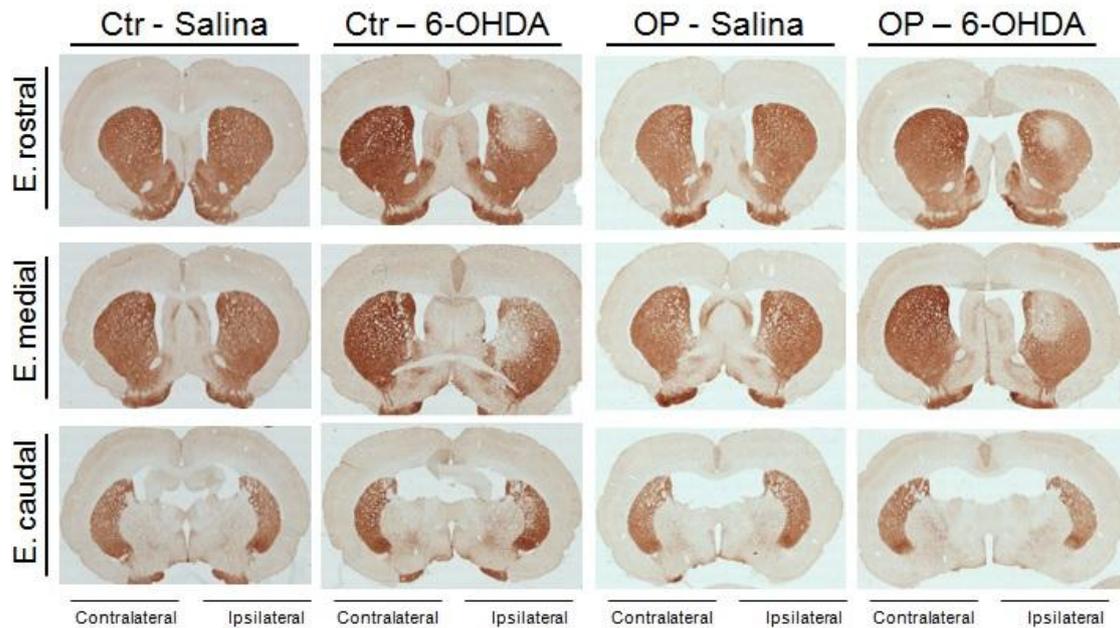


FIGURA 10: Fotomicrografias da imunohistoquímica para TH ao longo da extensão rostro-caudal do estriado após microinjeção com 6-OHDA na parte medial do estriado esquerdo. Fotomicrografias dos ratos hemiparkinsonianos do grupo controle com microinjeção de salina (Ctr – Salina, n=06), grupo controle com microinjeção de 6-OHDA (Ctr – 6-OHDA, n=05), grupo suplementado com óleo de peixe com microinjeção de salina (OP – Salina, n=06), grupo suplementado com óleo de peixe com microinjeção de 6-OHDA (OP – 6-OHDA, n=06). Estriado rostral, medial e caudal de cada grupo respectivamente.

4.4.2. TH na substância negra

A 6-OHDA reduziu a marcação positiva pra TH na SNcd [$F_{(1,19)} = 129,60$; $P < 0,0005$] e SNcv [$F_{(1,19)} = 32,08$; $P < 0,0001$]. Os efeitos da neurotoxina foram amenizados pela suplementação na SNcd [$F_{(1,19)} = 21,79$; $P < 0,005$] e SNcv [$F_{(1,19)} = 6,63$; $P < 0,05$]. Foram observadas interações entre a neurotoxina e a suplementação na SNcd [$F_{(1,19)} = 20,24$; $P < 0,001$] e SNcv [$F_{(1,19)} = 4,69$; $P < 0,05$] (figuras 11 e 12).

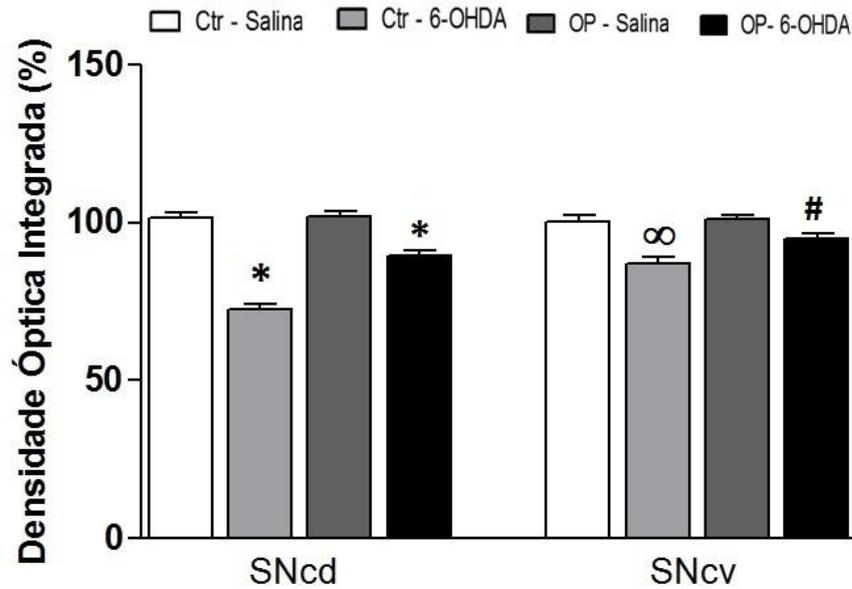


FIGURA 11: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para TH na SNcd e SNcv nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. * $P < 0,0005$ comparados com os demais grupos; $\infty P < 0,005$ comparado com os demais grupos e # $P < 0,05$ comparado com os demais grupos.

A lesão causada pela 6-OHDA foi de aproximadamente -37% no estriado rostral, -40% no estriado medial, -22% no estriado caudal, -28% na substância negra parte compacta dorsal e -13% na substância negra parte compacta ventral, quando comparados com o grupo controle. A suplementação com óleo de peixe teve efeito estatisticamente significativo em amenizar a lesão causada pela toxina tanto no estriado partes rostral, dorsal e caudal (figura 10) quanto na substância negra partes dorsal e ventral (figura 12). Esse efeito neuroprotetor do OP abrandou o efeito neurotóxico da toxina e a lesão foi de aproximadamente -17% no estriado rostral, -15% no estriado medial, -4% no estriado caudal, -10% na substância negra parte compacta dorsal e de -5% na substância negra parte compacta ventral quando comparadas com o grupo controle.

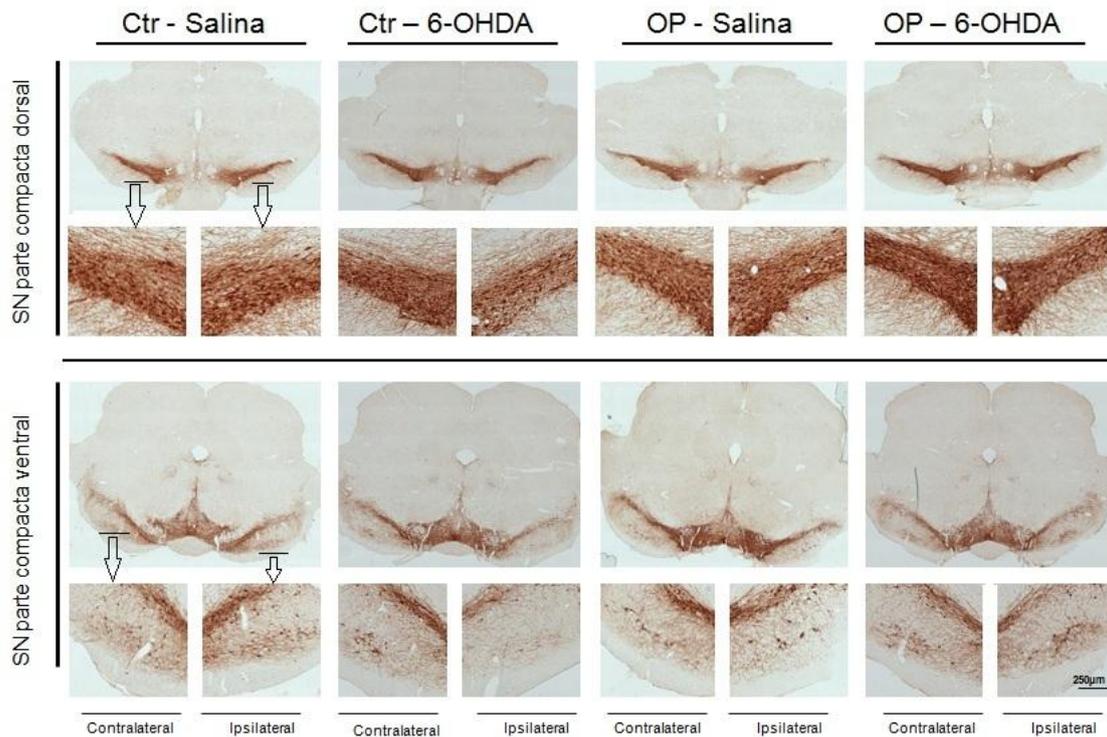


FIGURA 12: Fotomicrografias da imunohistoquímica para TH nas partes compactas dorsal e ventral da substância negra após microinjeção de 6-OHDA no Estriado, parte medial, esquerdo. As imagens ilustram a degeneração dos corpos celulares dopaminérgicos

4.5. Imunohistoquímica para iNOS

4.5.1. iNOS no estriado

Os resultados obtidos a partir da quantificação por DOI e avaliados pela ANOVA de duas vias mostram haver diferença significativa na imunoreatividade para a enzima iNOS (figura 13) nos quatro quadrantes analisados no estriado medial esquerdo. A neurotoxina 6-OHDA aumentou a quantidade da enzima no EDM [$F_{(1,18)} = 6,04$; $P < 0,024$], no EDL [$F_{(1,18)} = 14,20$; $P < 0,005$], no EVM [$F_{(1,18)} = 4,95$; $P < 0,03$] e EVL [$F_{(1,18)} = 5,06$; $P < 0,03$]. A suplementação mostrou efeito em reduzir esse aumento nas regiões analisadas, EDM [$F_{(1,18)} = 18,45$; $P < 0,001$], EDL [$F_{(1,18)} = 26,99$; $P < 0,0001$], EVM [$F_{(1,18)} = 13,63$; $P < 0,001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 12,00$; $P < 0,002$]. Foram observadas interações estatísticas entre os fatores suplementação com OP e neurotoxina no EDL

$[F_{(1,18)} = 9,18; P < 0,007]$ e EVL $[F_{(1,18)} = 4,77; P < 0,04]$ e ausência no EDM $[F_{(1,18)} = 3,82; P < 0,066]$ e EVM $[F_{(1,18)} = 4,32; P < 0,05]$ (figuras 13 e 14).

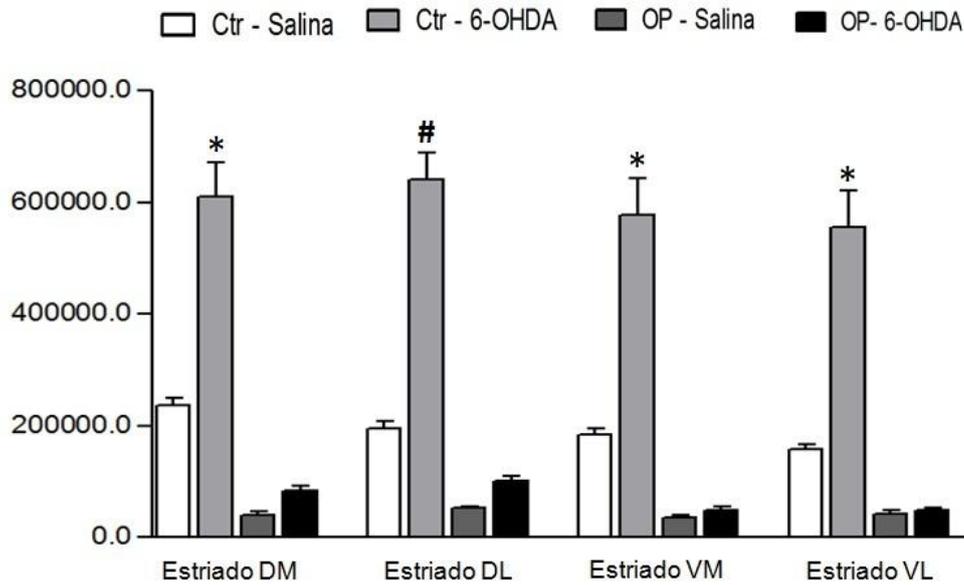


FIGURA 13: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para iNOS nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. * $P < 0,01$ comparados com os demais grupos e # $P < 0,0005$ comparados com os demais grupos.

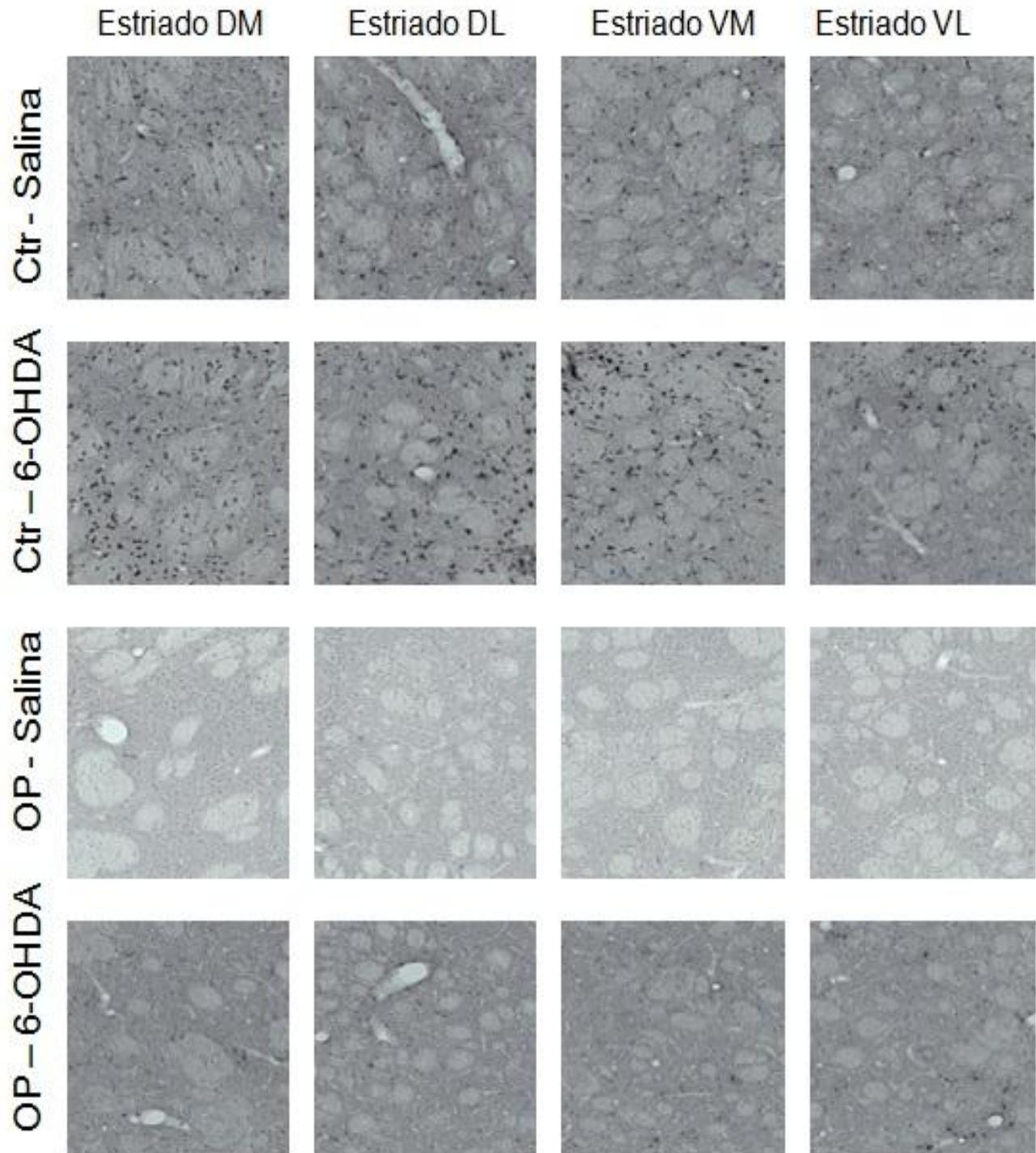


FIGURA 14: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para iNOS nos diferentes grupos experimentais nas quatro subdivisões do estriado medial esquerdo (DM, DL, VM e VL). Foi observada uma maior marcação no grupo Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos.

4.5.2. iNOS na substância negra

A substância negra foi analisada em duas regiões, na parte compacta dorsal esquerda (SNcd) e compacta ventral esquerda (SNvc), e em ambas foram observadas diferenças estatísticas para marcação da enzima iNOS (Figura 15). Os resultados obtidos mostram que na SNcd a 6-OHDA [$F_{(1,18)} = 1,97$; $P < 0,177$] não alterou a quantidade da enzima entretanto a suplementação com OP [$F_{(1,18)} = 20,61$; $P < 0,001$] apresentou efeito em reduzir a marcação. Não houve interação entre a neurotoxina e a suplementação [$F_{(1,18)} = 0,31$; $P < 0,58$]. Na SNcv, a neurotoxina [$F_{(1,18)} = 5,47$; $P < 0,05$] aumentou a marcação para iNOS e a suplementação [$F_{(1,18)} = 12,47$; $P < 0,01$] foi eficaz em amenizar esse efeito. Não foi observada interação entre neurotoxina e a suplementação [$F_{(1,18)} = 3,02$; $P < 0,099$] (figuras 15 e 16).

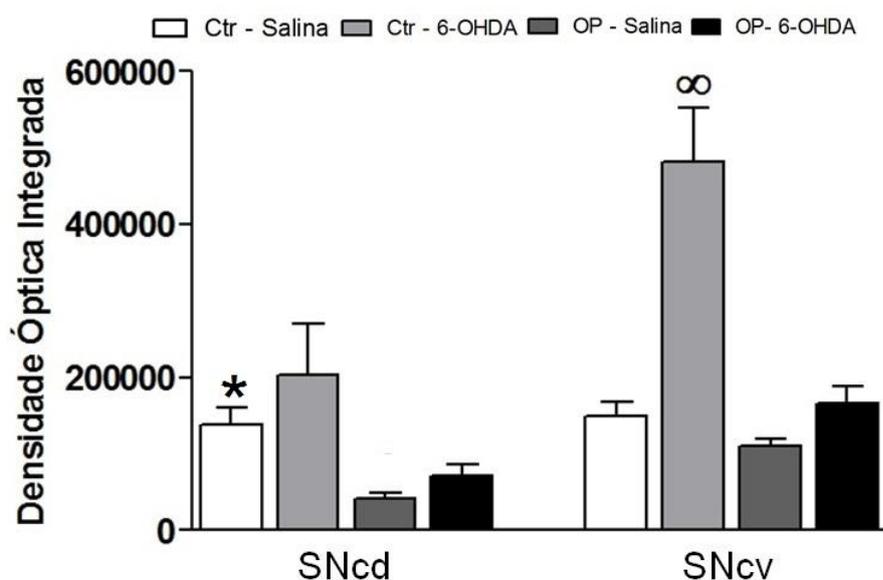


FIGURA 15: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para iNOS nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média ± EPM. * $P < 0,02$ comparados com os grupos suplementados; # $P < 0,0005$ comparados com os demais grupos.

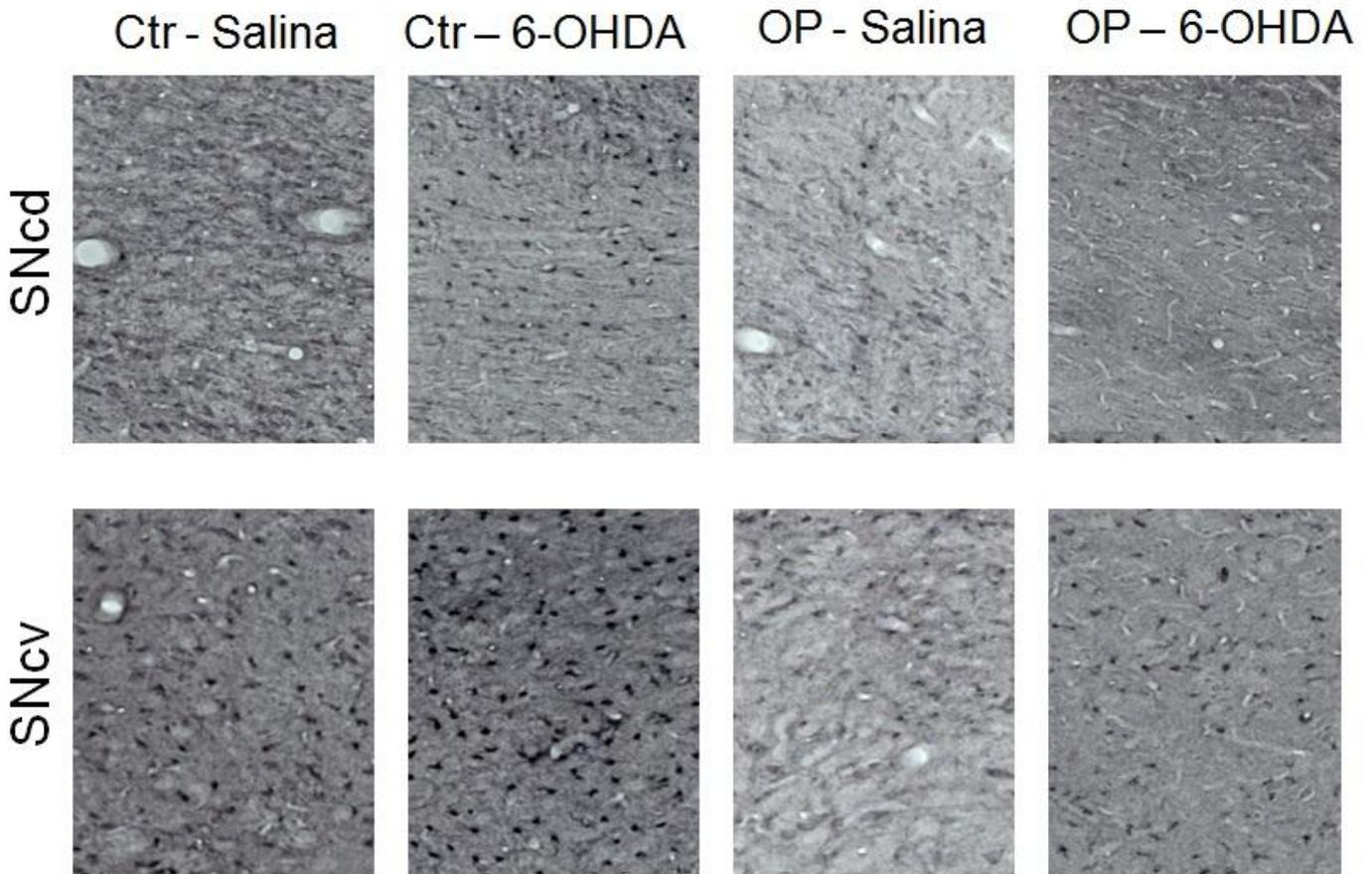


FIGURA 16: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para iNOS nos diferentes grupos experimentais na SNcd e SNcv. Foi observada uma maior marcação no grupo Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos.

4.6. Imunohistoquímica para OX-42

4.6.1. OX-42 no estriado

A marcação positiva para o antígeno OX-42 nos animais que receberam 6-OHDA foi aumentada no EDM [$F_{(1,18)} = 10,69$; $P < 0,005$], no EDL [$F_{(1,18)} = 13,25$; $P < 0,005$], no EVM [$F_{(1,18)} = 31,54$; $P < 0,0001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 41,95$; $P < 0,0001$]. Nessas subregiões a predominância foi de células OX-42-positivas que exibiram características amebóides e alongadas, estando, então, ativadas (figura 17), porém, quando em repouso, essas células apresentam corpo celular pequeno e fino e essas características foram predominantes nos grupos que receberam suplementação com OP nas subregiões EDM [$F_{(1,18)} = 6,85$; $P <$

0,05], no EDL [$F_{(1,18)} = 9,91$; $P < 0,001$], no EVM [$F_{(1,18)} = 16,10$; $P < 0,001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 20,79$; $P < 0,0005$]. Foram observadas interações entre a 6-OHDA e a suplementação no EDL [$F_{(1,18)} = 8,05$; $P < 0,01$], no EVM [$F_{(1,18)} = 7,00$; $P < 0,05$] e EVL [$F_{(1,18)} = 11,53$; $P < 0,005$] (figuras 17 e 18).

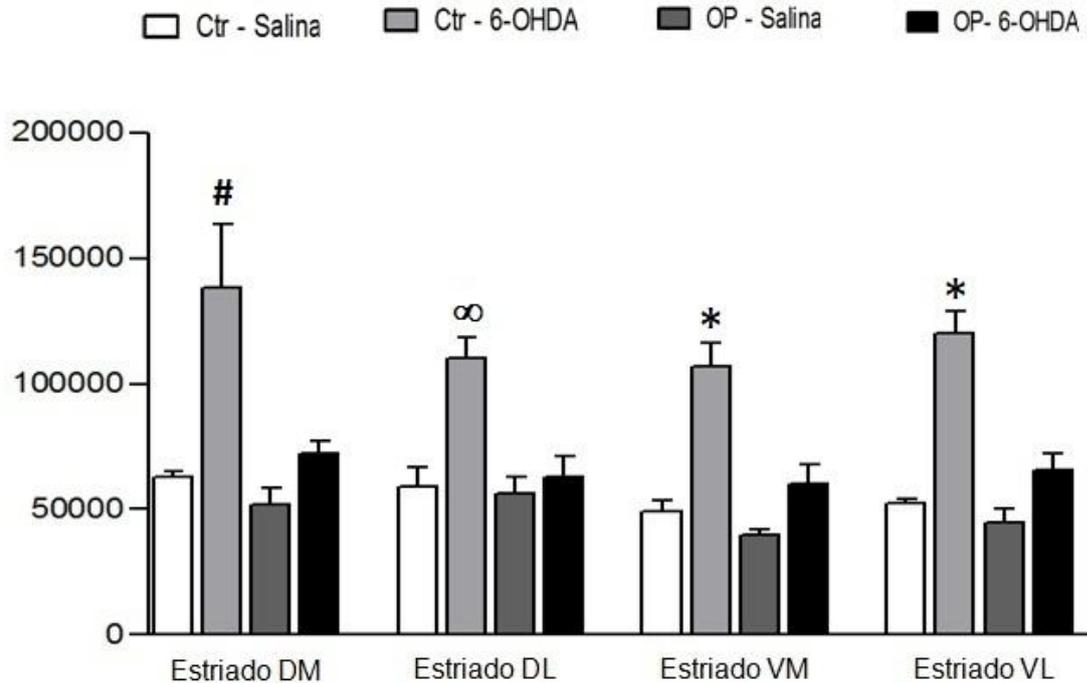


FIGURA 17: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para OX-42 nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. # $P < 0,01$, ∞ $P < 0,001$ e * $P < 0,0005$ comparando o grupo Ctr-6-OHDA com os demais grupos nos respectivos quadrantes EDM, EDL, EVM e EVL individualmente.

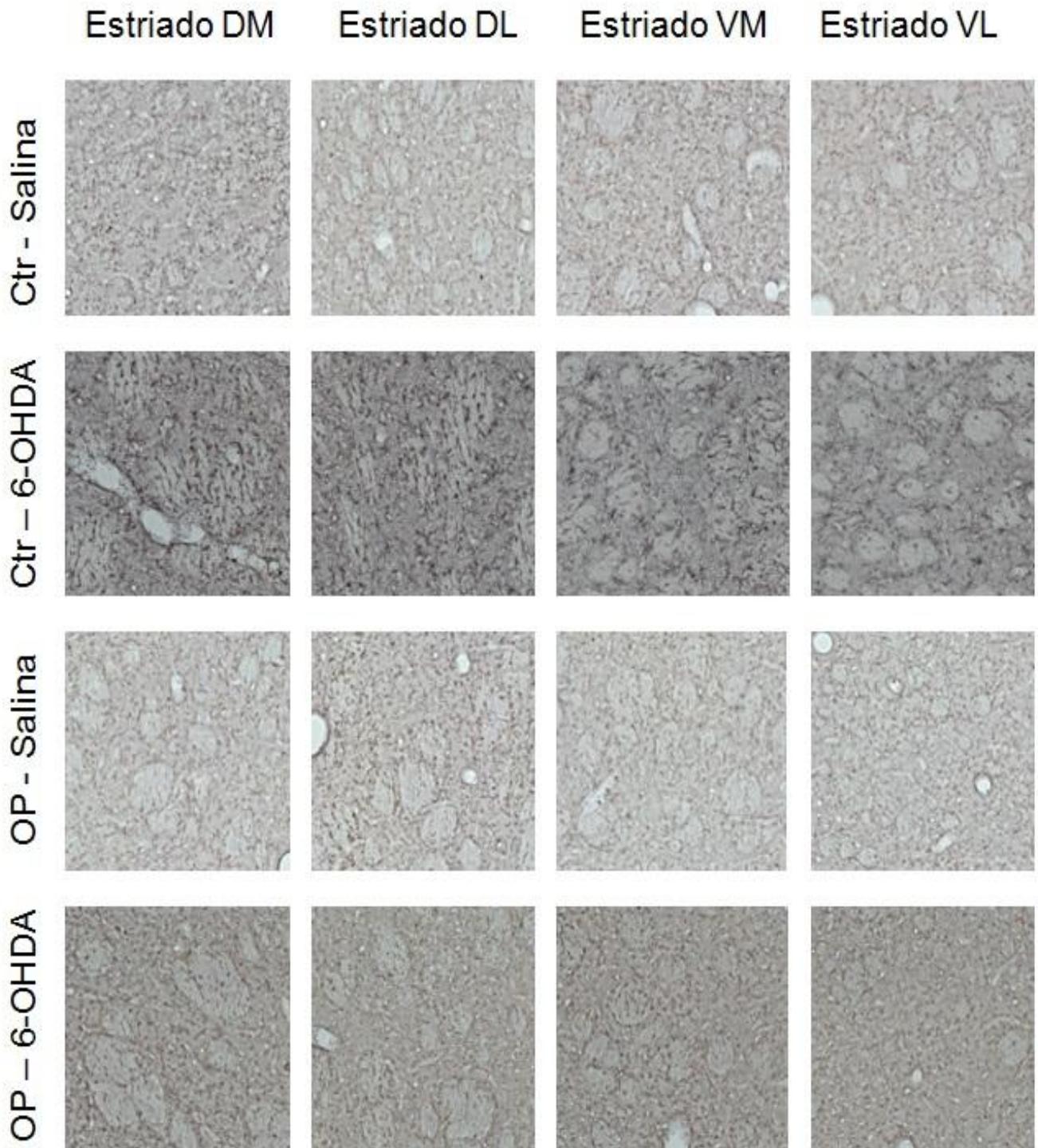


FIGURA 18: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para OX-42 nos diferentes grupos experimentais nas quatro subdivisões do estriado medial esquerdo (DM, DL, VM e VL). Foi observada uma maior predominância de células microgliais ativadas no Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos.

4.6.2. OX-42 na substância negra

Bem como no estriado, na SNcd foi observado predominância de células microgliais ativadas, assim com maior marcação para o antígeno OX-42 (Figura 19) nos animais que receberam 6-OHDA [$F_{(1,18)} = 5,96$; $P < 0,05$]. A suplementação foi eficaz em reduzir a ativação microglial [$F_{(1,18)} = 37,90$; $P < 0,0001$]. Resultados semelhantes foram observados na SNcv onde a 6-OHDA [$F_{(1,18)} = 12,58$; $P < 0,005$] aumentou a marcação pra OX-42 e esse efeito foi amenizado pela suplementação com OP [$F_{(1,18)} = 33,75$; $P < 0,0001$]. Foram observadas interações estatísticas entre 6-OHDA e a suplementação tanto na SNcd [$F_{(1,18)} = 11,78$; $P < 0,005$] quanto na SNcv [$F_{(1,18)} = 9,34$; $P < 0,01$] (figuras 19 e 20).

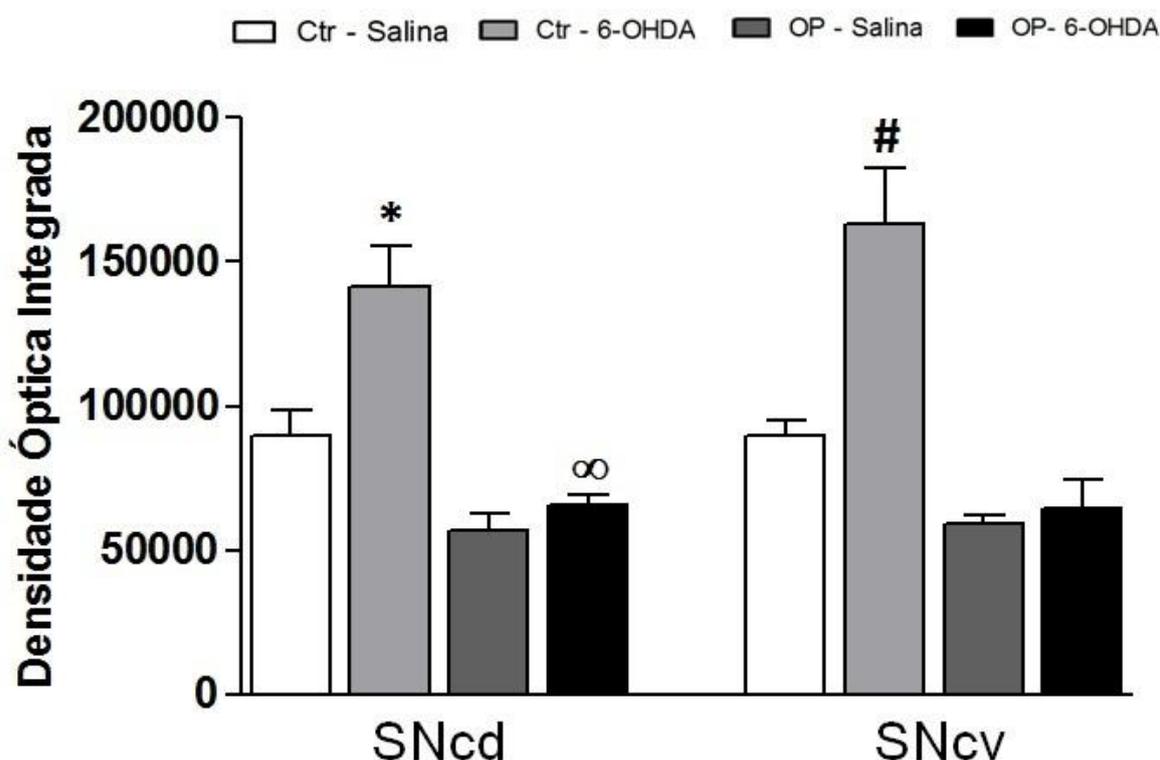


FIGURA 19: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para OX-42 nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. Na SNcd, o grupo OP-6-OHDA não diferiu do OP-Salina porém diferiu dos demais onde $\infty P < 0,01$, e o Ctr-6-OHDA diferiu dos demais grupos onde $*P < 0,0001$. Na SNcv o grupo Ctr-6OHDA diferiu dos demais # $P < 0,0005$.

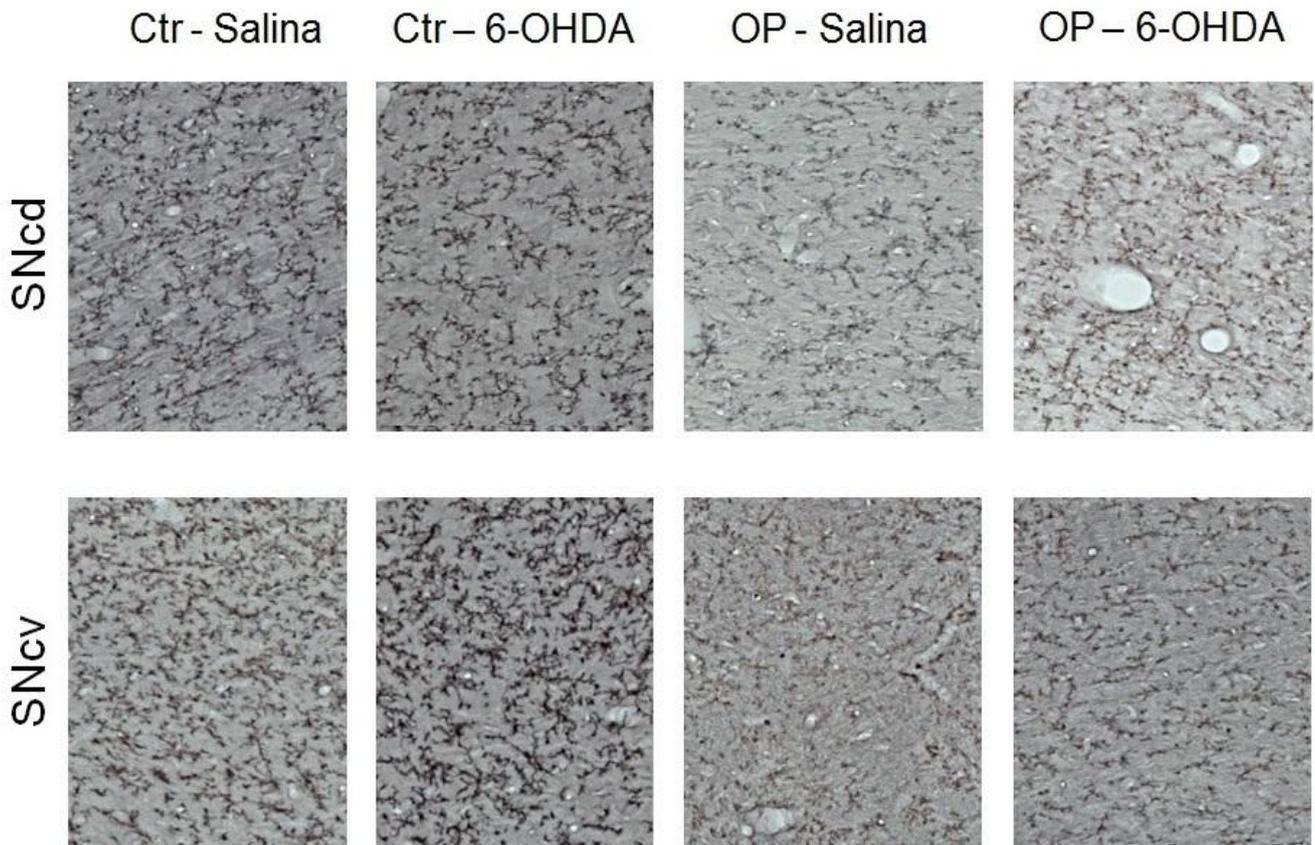


FIGURA 20: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para OX-42 nos diferentes grupos experimentais na SNcd e SNcv. Foi observada uma maior predominância de células microgliais ativadas no Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos.

4.7. Imunohistoquímica para GFAP

4.7.1. GFAP no estriado

Os resultados obtidos a partir da quantificação por DOI e avaliados pela ANOVA de duas vias mostram haver diferença significativa na imunorreatividade para proteína ácida fibrilar glial, GFAP, (Figura 21) nos quatro quadrantes analisados no estriado medial esquerdo. A neurotoxina 6-OHDA aumentou a quantidade da proteína no EDM [$F_{(1,18)} = 27,4$; $P < 0,0001$], no EDL [$F_{(1,18)} = 29,38$; $P < 0,0001$], no EVM [$F_{(1,18)} = 78,94$; $P < 0,0001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 43,48$; $P < 0,0001$]. A suplementação mostrou efeito em reduzir esse aumento nas regiões analisadas, EDM [$F_{(1,18)} = 18,87$; $P < 0,0005$], EDL [$F_{(1,18)} = 18,18$; $P < 0,0005$], EVM [$F_{(1,18)} = 37,74$; $P < 0,0001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 18,42$; $P < 0,0005$].

Houve interação estatística entre os fatores suplementação com OP e neurotoxina no EDM [$F_{(1,18)} = 11,60$; $P < 0,005$], EDL [$F_{(1,18)} = 12,39$; $P < 0,005$], EVM [$F_{(1,18)} = 34,48$; $P < 0,0001$] e EVL [$F_{(1,18)} = 14,73$; $P < 0,005$] (Figuras 21 e 22).

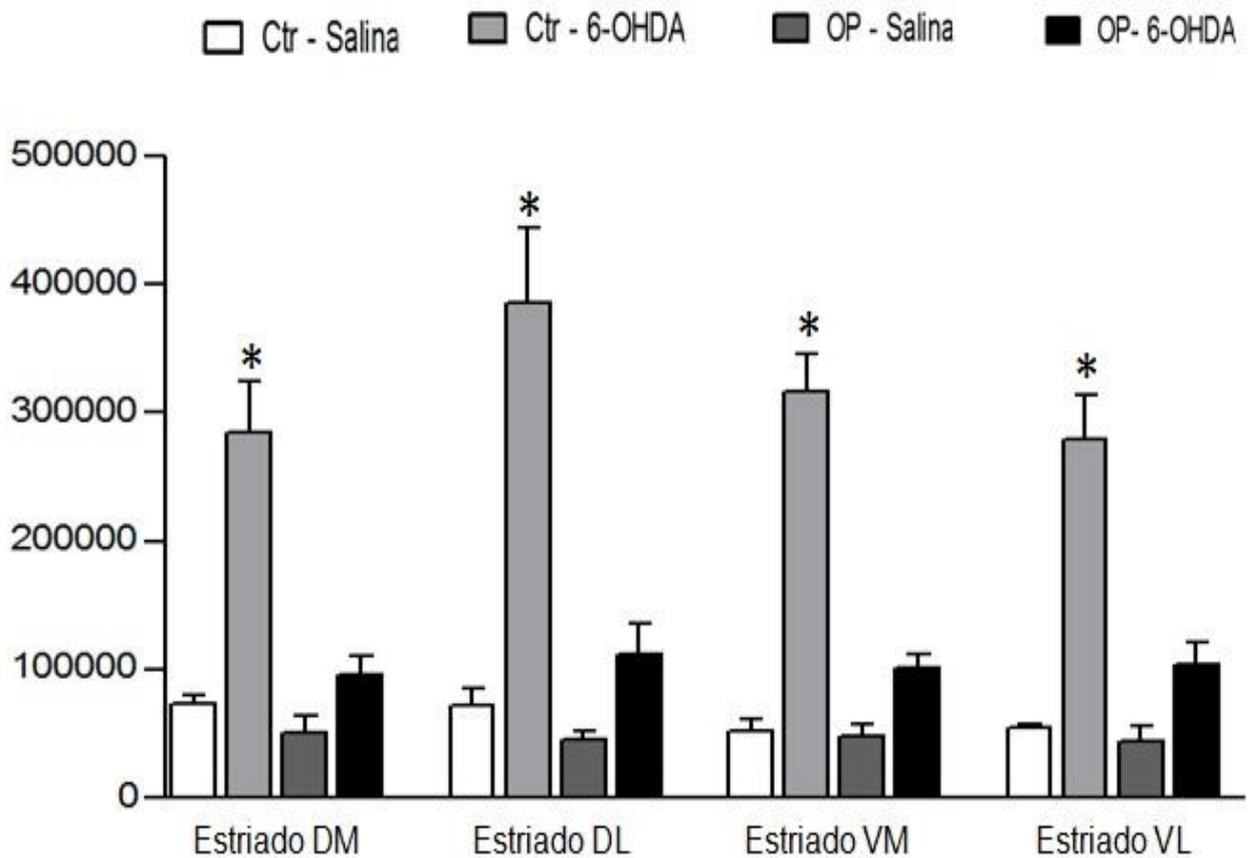


FIGURA 21: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para GFAP nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. e * $P < 0,0002$ comparando o grupo Ctr-6-OHDA com os demais grupos nos respectivos quadrantes EDM, EDL, EVM e EVL individualmente.

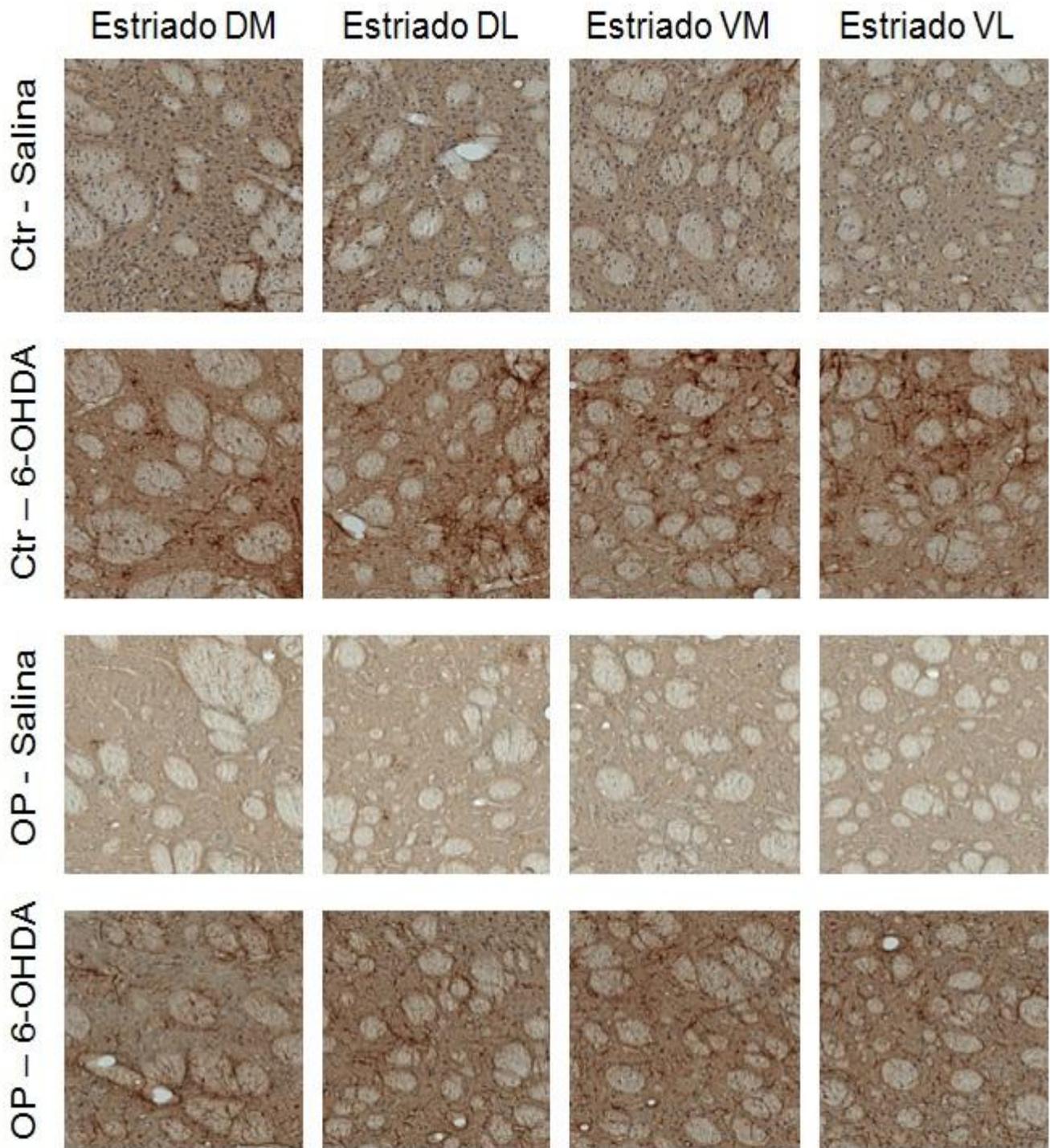


FIGURA 22: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para GFAP nos diferentes grupos experimentais nas quatro subdivisões do estriado medial esquerdo (DM, DL, VM e VL). Foi observada uma maior predominância de marcação no Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos.

4.7.2. GFAP na substância negra

A substância negra foi analisada em duas regiões, na parte compacta dorsal esquerda (SNcd) e compacta ventral esquerda (SNcv), e em ambas foram observadas diferenças estatísticas para marcação de GFAP (Figura 23). Os resultados obtidos mostram que na SNcd a 6-OHDA [$F_{(1,18)} = 1,97$; $P < 0,177$] não levou a alterações estatisticamente significativas, entretanto a suplementação com OP [$F_{(1,18)} = 20,61$; $P < 0,001$] apresentou efeito em reduzir a marcação. Não houve interação entre a neurotoxina e a suplementação [$F_{(1,18)} = 0,31$; $P < 0,58$]. Na SNcv, a 6-OHDA [$F_{(1,18)} = 5,47$; $P < 0,05$] aumentou a marcação para GFAP e a suplementação [$F_{(1,18)} = 12,47$; $P < 0,005$] foi eficaz em amenizar esse efeito. Não foi observada interação entre neurotoxina e a suplementação [$F_{(1,18)} = 3,02$; $P < 0,0$] (Figuras 23 e 24).

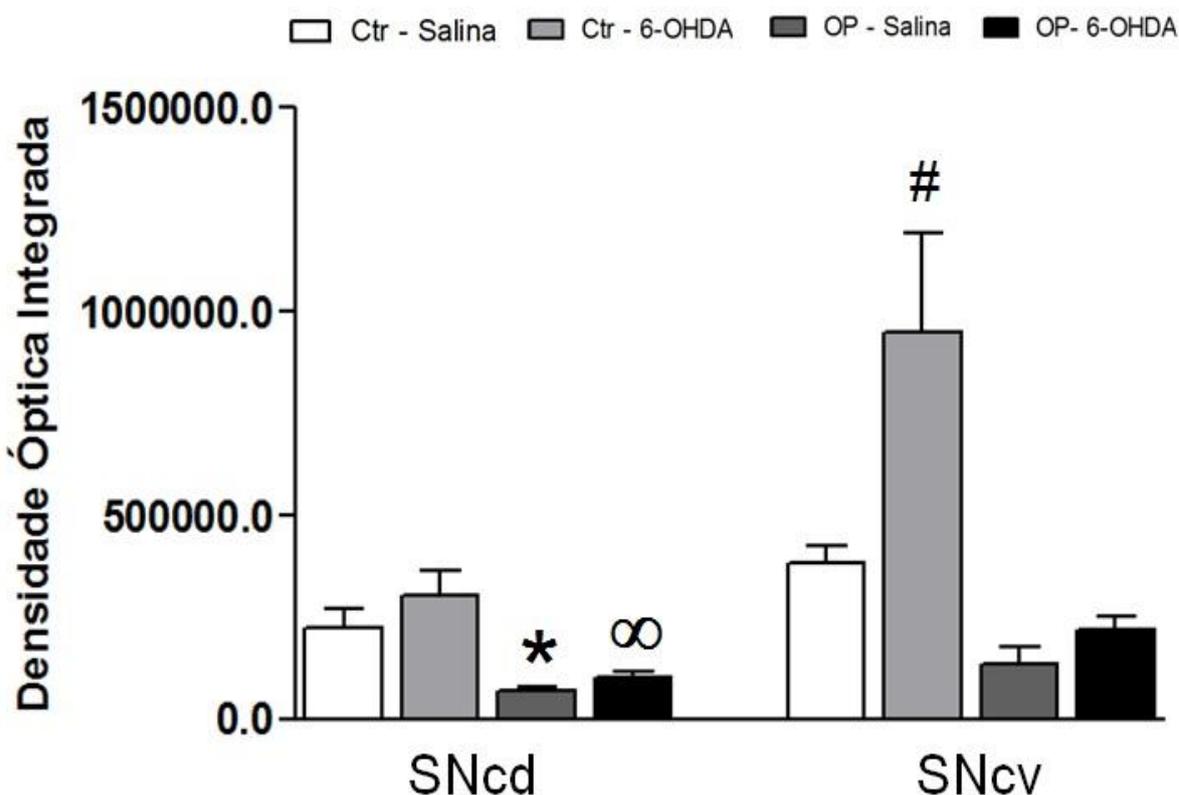


FIGURA 23: Gráfico representando os valores de densidade óptica integrada da imunohistoquímica para GFAP nos grupos Ctr-Salina (n=5), Ctr-6-OHDA (n=6), OP-Salina (n=5) e OP-6-OHDA (n=6). Foi utilizada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Duncan. Os resultados expressam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado com Ctr-Salina e Ctr-6-OHDA, ∞ $P < 0,05$ comparado com Ctr-Salina e Ctr-6-OHDA e # $P < 0,05$ comparado aos demais grupos.

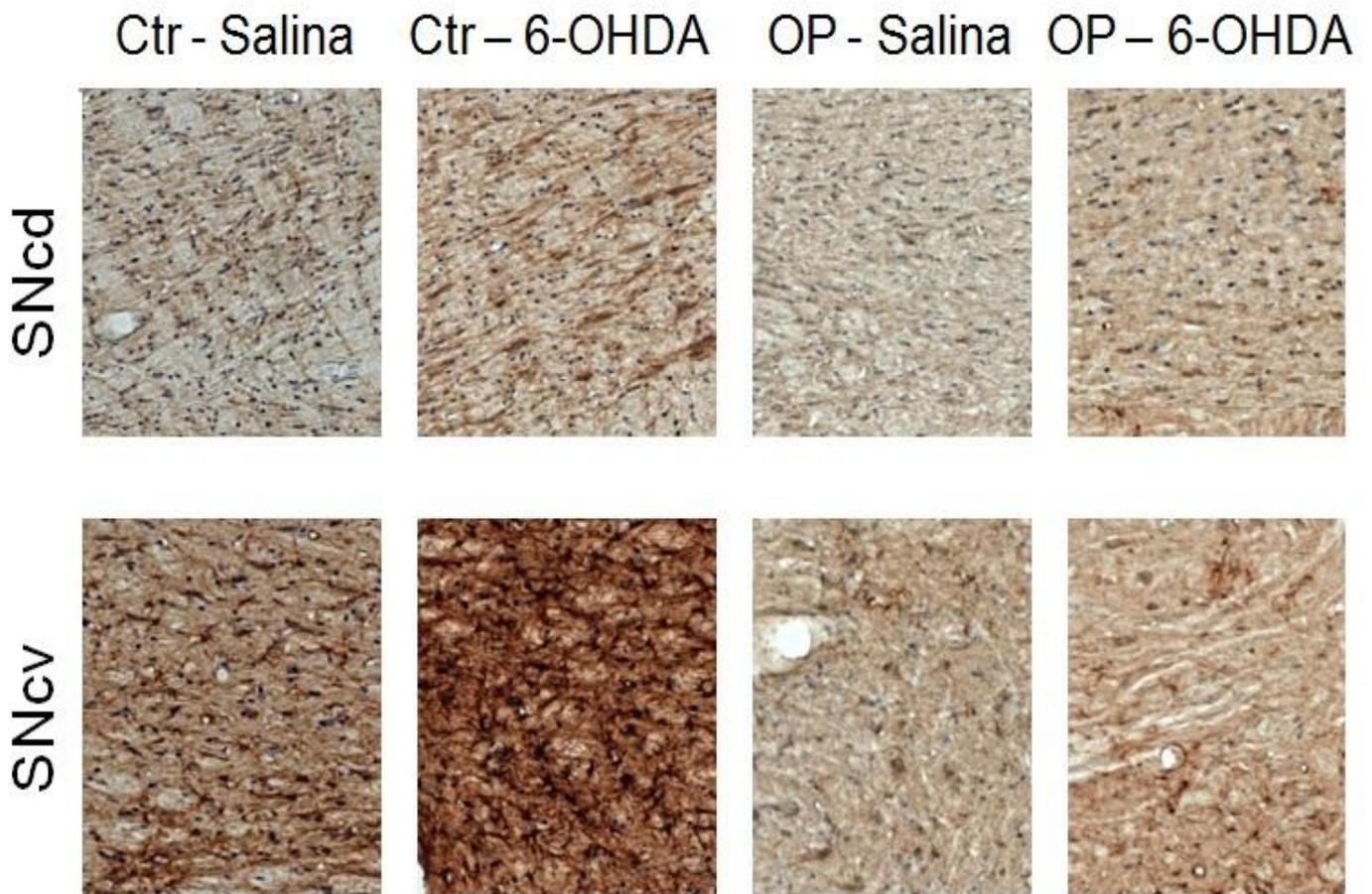


FIGURA 24: Fotomicrografias ilustrando marcação positiva para GFAP nos diferentes grupos experimentais na SNcd e SNcv. Foi observada uma maior marcação no grupo Ctr-6OHDA quando comparado com os demais grupos

5. Discussão

A DP é uma neuropatologia caracterizada pela perda progressiva de neuronios dopaminérgicos acompanhado pelo decréscimo do conteúdo de dopamina no corpo estriado. Associados a neurodegeneração, sinais motores são reconhecidos, como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, disfunção na marcha e instabilidade postural (Obeso et al 2000a).

Diferentes modelos animais da doença de parkinson tentam mimetizar os eventos que ocorrem com a progressão da doença, como a perda neuronal de células dopaminérgicas, os distúrbios de humor de sono bem como os déficits motores associados. Para isso, diferentes técnicas são utilizadas no intuito de induzir depleção dopaminérgica no estriado, como intervenções farmacológicas, toxinas e manipulações genéticas (Bezard & Przedborski 2011).

Sabe-se que, os sintomas motores da DP começar a se tornar mais evidentes quando a neurodegeneração dopaminérgica excede 50% o que acarreta em uma redução de aproximadamente 70% da dopamina liberada no estriado (Debeir et al 2005). Antes disso, os sinais motores não são tão claros e dessa forma, o início da DP ocorre progressivamente de forma silenciosa. Alguns experimentos tentam estabelecer técnicas que possam monitorar o início bem como o avanço da neurodegeneração a partir de imagens obtidas por ressonância magnética (Barsottini et al 2007, Kondoh et al 2005, Kostic & Filippi 2011). Diferentes fatores estão relacionados ao processo de morte celular progressiva da DP como genética, toxinas ambientais, processos inflamatórios, estresse oxidativo e alterações nos conteúdos de AGPIs nas membranas neuronais (Schapira & Jenner 2011, Shapiro 2003). Sabe-se que hábitos alimentares com bom consumo de AGPIs da família n-3 estão intimamente relacionados a um baixo risco de desenvolvimento da DP (de Lau et al 2005).

Em nosso trabalho, os animais foram suplementados com 3.0g/Kg de óleo de peixe contendo 12% de Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e 18% de Ácido Docosahexaenóico (DHA) durante 50 dias. O protocolo de suplementação utilizado foi eficaz em aumentar a incorporação de DHA nas

membranas tanto do estriado quanto da substância negra, esse resultado não foi observado nos animais que receberam somente ração (tabelas 1 e 2). Esses resultados corroboram outro trabalho de nosso laboratório (Delattre et al 2010), e de forma semelhante, não observamos alterações na concentração de EPA nas duas estruturas analisadas.

O DHA, por desempenhar diversas funções no tecido neuronal, tem seu conteúdo constantemente renovado através da sua ingestão e da conversão a partir de seus precursores. No SNC, os astrócitos são capazes de sintetizar DHA a partir de seus precursores, o ácido α -linolênico, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenóico e o ácido tetracosahexaenóico. Dessa forma, o alto índice de DHA incorporado e a ausência de EPA em nossas análises de incorporação lipídica nos possibilita levantar a hipótese de que o EPA pode ter sido utilizado como precursor para a formação de DHA requerida (Horrocks & Farooqui 2004). Com isso, sugerimos que nossos resultados obtidos não são diretamente exclusivos do DHA, que teve seus níveis de incorporação aumentados, mas também por ação indireta do EPA, precursor do DHA, fornecido na suplementação com OP rica nestes dois AGPIs da família do ômega-3.

Um dos nossos objetivos foi reproduzir uma lesão branda na via nigro estriatal, de forma a não atingir 50% de perda das células dopaminérgicas no estriado e com isso, mimetizar os estágios iniciais da DP nos quais alterações motoras não são observadas. Assim, nosso estudo consistiu em analisar as alterações celulares no estriado e substância negra de ratos hemiparkinsonianos induzidos por 6-OHDA e submetidos a uma suplementação prolongada de 50 dias com óleo de peixe.

Para isso, o protocolo utilizado foi baseado e adaptado a partir de comparação de diferentes trabalhos levando-se em consideração a magnitude da lesão obtida, neurotoxina utilizada bem como a dose e as coordenadas utilizadas (Debeir et al 2005, Gomes et al 2008, Lindgren et al 2007, Lindholm et al 2007, Palner et al 2011, Tadaiesky et al 2008, Voutilainen et al 2011).

A microinjeção de 6-OHDA no estriado medial induziu perda regular de fibras dopaminérgicas ao longo da extensão rostro-caudal do estriado e perda branda de células dopaminérgicas na substância negra compacta. Essa perda foi mensurada por meio da imunohistoquímica para TH. Não foram observadas

lesões no lado contralateral à lesão em ambos os núcleos analisados bem como nos animais que receberam microinjeção de salina.

Como observado, no grupo Ctr-6-OHDA, a neurotoxina infundida foi capaz de provocar uma lesão ao longo da extensão rostro-caudal de aproximadamente 37% no estriado rostral, 40% no estriado medial, 22% no estriado caudal, 28% na substância negra parte compacta dorsal e 13% na substância negra parte compacta ventral, quando comparados com o grupo veículo. Essa lesão obtida não foi grande o suficiente para promover alterações motoras no teste do campo aberto.

A suplementação com óleo de peixe teve efeito estatisticamente significativo em amenizar a lesão causada pela toxina tanto no estriado partes rostral, dorsal e caudal quanto na substância negra partes dorsal e ventral. Esse efeito neuroprotetor do OP abrandou o efeito neurotóxico da toxina e a lesão foi de aproximadamente 17% no estriado rostral, 15% no estriado medial, -4% no estriado caudal, 10% na substância negra parte compacta dorsal e de -5% na substância negra parte compacta ventral quando comparadas com o grupo controle. O efeito neuroprotetor de AGPs é descrito em trabalhos que apontam diferentes mecanismos fisiológicos como estratégias de defesa que são melhoradas com o aumento do conteúdo de DHA nas membranas neuronais (Bazan 2005, Bousquet et al 2011a, Bousquet et al 2009, Calon & Cole 2007).

Há uma vasta literatura que aponta diversos efeitos benéficos de AGPs da família n-3, como o DHA e EPA, e sua importância nos processos fisiológicos e necessidade da sua incorporação a partir dieta (Alessandri et al 2004, Calder 2011, Fedorova & Salem 2006, Mazereeuw et al 2012). Na DP, a associação da doença com o conteúdo lipídico de membrana dos neurônios dopaminérgicos já é discutida há um longo período e a redução dos níveis de AGPs na SN foi observado em estudo pós-morte em encéfalos de parkinsonianos (Dexter et al 1989). O efeito neuroprotetor observado em nossos resultados pode ser associado aos níveis aumentados de DHA nas membranas celulares do estriado e da substância negra. Como visto anteriormente, o DHA é um dos principais AGPs constituinte da membrana fosfolipídica e está associado às funções neuronais (Akbar et al 2005).

Diversos estudos demonstram esse efeito neuroprotetor dos AGPIs da família n-3. Bousquet et al. (2008) reverteu significativamente o declínio da enzima TH em animais suplementados. Em um modelo animal de DP induzido por MPTP, Shchepinov *et al.* (2011), com uma suplementação de 12 dias com AGPs se demonstrou eficiente em aumentar os níveis de incorporação lipídica nas membranas celulares, em reduzir o efeito neurodegenerativo do MPTP e ainda aumentou os níveis de DA no estriado (Shchepinov et al 2011). Luchtman et al. (2012) observaram que uma dieta enriquecida com AGPI atenua hipocinesia bem como o déficit de memória em animais parkinsonianos, e esses resultados são atribuídos à redução de citocinas pró-inflamatórias (Luchtman et al 2012).

Trabalhos de nosso laboratório mostraram que, uma suplementação prolongada com OP, levou a um aumento dos níveis de DHA nas membranas, normalizou a peroxidação lipídica causada pela 6-OHDA o que resultou em um possível efeito protetor sobre discinesias (Delattre et al 2010). Entretanto, não foram observados efeitos em amenizar a perda de DA no estriado bem como não foi hábil em reverter a redução da concentração dos metabólitos da DA, o DOPAC e o HVA (Delattre et al 2010). Outros trabalhos demonstram, em diferentes modelos de DP, que a suplementação dos AGPs é eficiente em ao menos manter níveis normais de DA e seus metabólitos (Bousquet et al 2011b, Shchepinov et al 2011).

Diferentes mecanismos são discutidos a cerca dos efeitos benéficos do DHA e do EPA nos sintomas da DP e um dos primeiros propostos para elucidar o efeito neuroprotetor dos AGPIs é seu efeito antioxidante. A redução de peroxidação lipídica, aumento de glutadiona redutase, redução do acúmulo de proteínas oxidadas, redução de peróxidos de lipídeos e redução dos níveis de EROs são alguns dos efeitos dos AGPIs no organismo (Bazan et al 2005, Calon et al 2004, Hashimoto et al 2002, Hashimoto et al 2005).

Além da associação dos níveis de AGPIs no desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos, existe ainda uma relação íntima entre os processos inflamatórios e ativação microglial no desenvolvimento dessas patologias (Zhang et al 2005). A ativação glial bem como a astrogliose e aumento de mediadores pró-inflamatórios são comumente observados em

modelos experimentais de DP e também em pacientes portadores da doença (Damier et al 1993, Denis et al 2013).

Acompanhado da perda de neurônios dopaminérgicos, em nossos resultados, para OX-42, observamos que a microinjeção de 6-OHDA, mas não de salina, induziu um aumento significativo na densidade células microgлияis ativadas nas quatro subregiões analisadas do estriado bem como nas subregiões da SN. A micrógлия corresponde a principal célula de defesa imunitária inata do encéfalo e estão envolvidas em respostas neuroinflamatórias e na manutenção homeostática através da produção de fatores neurotróficos (Glial Derived Neurotrophic Factor - GDNF), compostos anti-inflamatórios, e, desta forma, influenciam a manutenção dos neurônios adjacentes (Tansey et al 2007). Essa produção ocorre em condições normais no qual as células microgлияis estão em um estado que é denominado “micrógлия inativa”, com corpo celular pequeno e pouco ramificado. Na presença de toxinas, como a 6-OHDA, essas células alteram sua morfologia e assim tornam-se ainda mais ramificadas e com corpo celular aumentado em formato ameboide. Nesse estado, as micrógлияs se tornam mais competentes imunologicamente, conseguem exercer migrações para alcançar agentes patógenos e locais de lesões (Cho et al 2006, Fetler & Amigorena 2005, Nimmerjahn et al 2005).

O protocolo de suplementação utilizado em nosso trabalho promoveu um aumento significativo na concentração de DHA nas membranas celulares. Como as estruturas foram analisadas como um todo, todos os tipos celulares que nelas continham, é possível inferir que além de incorporado nas membranas neuronais, o DHA também esteja aumentado nas membranas das células gлияis, nos grupos suplementados com OP. Nestes grupos suplementados, não foi observado aumento da densidade de micrógлияs ativadas tanto no grupo OP-6-OHDA quanto no OP-Salina, quando comparados com Ctr-6OHDA. Esse resultado estão de acordo com outros trabalhos que mostram a ativação microgлияl em modelos animais de DP (Gao et al 2003, Kohutnicka et al 1998, Scheller et al 2005). É importante ressaltar que, os encéfalos foram removidos 25 dias após o insulto com a neurotoxina. A alta densidade de células imunorreativas para OX-42 no grupo Ctr-6-OHDA permite elucidar que houve um robusto processo inflamatório que foi mantido

por até 25 dias após a lesão e que a suplementação com OP foi eficaz em abolir esse efeito neurotóxico (Figura 17) ao se analisar a ausência de micróglias ativadas no grupo OP-6-OHDA.

A literatura aponta diferentes mecanismos do DHA em modular a resposta inflamatória microglial. Quando adicionado exogenamente na alimentação e incorporado na membrana microglial, o DHA pode exercer papel modulatório na expressão de citocinas reduzindo a síntese de interleucina-1b e de TNF- α (De Smedt-Peyrusse et al 2008). A membrana microglial é dotada de complexos de histocompatibilidade e de receptores de quimiocinas, que estão relacionados a iniciação de respostas imunes (Neumann 2001). Esses complexos podem estar inseridos nos chamados *rafts* de membrana e ao se alterar a composição lipídica desses *lipid rafts* com adição de DHA, a resposta a agente tóxicos reconhecidos pelo complexo de receptores modulada e a transcrição de fatores pró-inflamatórios é atenuada (Fan et al 2003). Essa atenuação ainda é acompanhada de uma marcada redução de expressão gênica para iNOS, COX-2, TNF- α e diversas interleucinas (Lu et al 2010).

Outro mecanismo anti-inflamatórios associado aos AGPIs é a redução da produção de fatores pró-inflamatórios e o aumento de anti-inflamatórios. Por exemplo, os derivados do DHA, por ação enzimética, com ação anti-inflamatória e que podem ser produzidos como as resolvinas (RvD1 e RvD2) e as neuroprotectinas D1 (NPD1) encontradas no SNC (Bannenberg & Serhan 2010). Ambas, resolvinas ou protectinas, tem papel endógeno no SNC em regular os processos inflamatórios. Esse papel anti-inflamatório das resolvinas foi demonstrado por Serhan em 2002 onde, em seu trabalho, mostrou que a RvD1 inibiu a expressão dos genes para TNF- α em cultura de células microgliais humana (Al-Rajab & Schiavon 2010). Semelhantemente, as RvD2 reduzem a expressão de TNF- α e também de citocinas (Dinkova-Kostova et al 2010). A administração de NPD1 apresentou efeito neuroprotetor a partir do seu mecanismo que inibe a expressão de COX-2 e iNOS (Schiavoni et al 2010).

Tanto as resolvinas quanto a NPD1 vão tendo seus níveis reduzidos gradualmente com a idade. Em contrapartida, diferentes genes pró-inflamatórios tem seus níveis gradualmente aumentados. Esses dados são naturalmente inatos com a progressão da idade e exacerbados em pacientes

com patologias neurodegenerativas. A deficiência desses processos imunológicos do SNC são associados à redução dos níveis de DHA. Um estudo post-mortem mostrou que, em pacientes com a doença de Alzheimer, a concentração de DHA e de seus mediadores anti-inflamatórios era duas vezes menor quando comparado com pessoas neurologicamente normais (Schiavon et al 2010, Schiavon & Tonini 2010).

Existem diferentes mecanismos com os quais as células microgliais modulam os processos inflamatórios. A concentração adequada de DHA nas membranas da micróglia facilita e até mesmo potencializa a resposta imunitária do SNC frente a agentes patógenos. No grupo OP-6-OHDA, as células microgliais encontraram-se em seu estado de repouso quando comparado com o grupo Ctr-6-OHDA que, mesmo 25 dias após a microinjeção de 6-OHDA, ainda apresentava uma intensa densidade de micróglia ativadas as quais podem indicar a presença de processos inflamatórios.

Em nosso trabalho, procuramos investigar o papel do OP no estresse oxidativo. Além de produzir os diferentes mediadores pró-inflamatórios já discutidos, a micróglia quando ativada em processos inflamatórios produz superóxidos e ON que, juntamente com espécies reativas de oxigênio (EROs), podem apresentar papel nocivo nas células do SNC (Re et al 2010). O ON é uma molécula altamente reativa que pode atuar no SNC como neuromodulador mas que, quando ocorre produção excessiva, torna um importante mediador de neurotoxicidade em diferentes neuropatologias (Bredt & Snyder 1994, Dawson et al 1996).

A neurotoxina 6-OHDA que utilizamos para promover lesão nigroestriatal em nosso trabalho, por si só já promove danos celulares. Como a 6-OHDA é captada pelos neuronios dopaminérgicos, dentro dele ela exerce efeito citotóxico por interagir e danificar biomoléculas como proteínas e lipídeos de membrana. Dessa forma, ocorre degeneração de terminais nervosos e dos corpos celulares (Blum et al 2001). A morte dos neurônios dopaminérgicos, ativa as células microgliais que como descrito anteriormente, aumenta a produção de ON. A óxido nítrico sintase induzível é altamente expressa nessas células quando ocorre algum tipo de lesão tecidual como a causada pela 6-OHDA (Vincent & Kimura 1992).

Os resultados atuais, mostram que os animais que receberam 6-OHDA no estriado e não foram suplementados com OP apresentaram uma alta densidade de células microgliais com expressão de iNOS nas quatro subregiões do estriado e na SNcv. Bem como para OX-42, essa alta marcação foi robustamente atenuada nos animais suplementados com OP. Essa marcante redução da expressão de iNOS pela suplementação pode ser associada ao aumento do DHA incorporado nas membranas celulares do estriado e da SN. Esses resultados estão de acordo com diferentes trabalhos que também mostram o efeito antioxidante e anti-inflamatório do DHA (De Smedt-Peyrusse et al 2008, Ebert et al 2009, Komatsu et al 2003, Saw et al 2010).

A alta marcação para iNOs que observamos em nossos resultados, deve ser analisado em associação à OX-42 que revelou a intensa densidade de micrógliaS ativadas. É nesse estado ativado, característico de processos inflamatórios, que ocorre uma maior expressão para iNOs e conseqüentemente de ON. A expressão para iNOs não é encontrada em encéfalos saudáveis, semelhantemente para OX-42 (Conti et al 2007). O processo neurodegenerativo característico da DP está associado ao aumento da expressão de iNOS nas células da SN. Ademais, alterações no gene para iNOS pode aumentar o risco de desenvolvimento da doença (Hunot et al 1996, Levecque et al 2003).

Como já discutido, a ativação microglial resulta em uma série de respostas celular com produção de compostos pró-inflamatórios, dentre eles a produção de ON pela iNOS. O excesso de ON leva a formação de diversas espécies reativas de oxigênio, que, oxidativamente, danificam o DNA, proteínas e iniciam ou agravam a peroxidação lipídica de AGPIs de membrana associados a morte neuronal (Niki 2013). O impacto dessa resposta foi avaliado por Dehmer et al., 2000, em um modelo animal de DP induzida por MPTP. Semelhante à 6-OHDA, o MPTP também resulta em neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos por promover estresse oxidativo e inflamação. Em seu trabalho, Dehmer induziu DP em uma linhagem de comundongos nocautes para o gene da iNOS. Apesar de ter sido relatada uma intensa ativação microglial, a ausência do gene para iNOS levou a uma proteção de 90% dos neurônios dopaminérgicos quando comparado com o grupo de

animais normais. Evidenciou-se assim, a contribuição da iNOS no desenvolvimento da DP (Dehmer et al 2000).

A descoberta de um inibidor seletivo para iNOS, o GW274150, contribuiu significativamente para identificação e caracterização do papel dessa enzima no desenvolvimento de neuropatologias como a DP (Young et al 2000). O primeiro estudo que utilizou esse inibidor da iNOS em um modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA ratificou o papel da iNOS em processos neurodegenerativos. O inibidor atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos e também reduziu a ativação microglial (Broom et al 2011). É importante evidenciar que a isoforma nNOS também é associada na progressão da DP. A inibição seletiva dessa isoforma pelo L-nitro-arginina (L-NOARG) reduziu neurodegeneração dopaminérgica no estriado e na substância negra e também reduziu a densidade de células imunopositivas para nNOS em animais hemiparkinsonianos induzidos por microinjeção de 6-OHDA no estriado medial (Gomes et al 2008).

Apesar de não apresentar especificidade como o inibidor de iNOS, a participação do DHA na redução de processos oxidativos é relatada em diferentes trabalhos. Nossos resultados mostram uma robusta redução da imunorreatividade para iNOS levantando a hipótese de que seu efeito antioxidante, e antiinflamatório do DHA, que teve seus níveis aumentados, foi crucial em atenuar a lesão causada pela 6-OHDA no estriado e na SN. Uma vez incorporado na membrana glial, o DHA regula a ação de receptores e influencia na fluidez de membrana e com isso modula diferentes mecanismos de ação entioxidantes inatos da micróglia.

Um dos mecanismos antioxidantes da micróglia é a produção da enzima heme-oxigenase-I (HO-I). Essa enzima é altamente ativada em resposta a estímulos nocivos como a inflamação e possui papel importante na regulação para baixo de citocinas inflamatórias estimuladas pela produção de ON (Abraham & Kappas 2008). Lu e colaboradores (2010), mostrou que o DHA pode regular para cima a produção de HO-I e dessa forma reduzir a produção excessiva de ON e, então, amenizar a exacerbação de processos inflamatórios. Esse papel foi confirmado ao se adicionar um inibidor da HO-I. Neste mesmo trabalho, uma análise por Western Blot mostrou que a adição de DHA reduziu a expressão de RNAm para iNOs e COX-2. Com isso, sabe-se que o DHA pode

reduzir processos oxidativos regulando a expressão de iNOs e a produção de ON (Lu et al 2010).

Um experimento *in vitro* mostrou que células em meio de cultura enriquecido DHA por 1,5 dia apresentaram inibição na indução de iNOs e consequentemente nos níveis de ON (Araki et al 2011). Semelhantemente em cultura de células, ao se adicionar Curcumina, um agente quimiopreventivo que induz a expressão gênica para HO-I, observou-se um efeito antioxidante que com a adição de DHA, foi altamente potencializado. Essa observação resultou da redução da expressão de iNOs e consequentemente de ON. Então, em combinação com outras moléculas, o DHA pode apresentar um efeito sinérgico na redução da oxidação (Saw et al 2010).

Quando uma atividade inflamatória ocorre no SNC, prontamente o sistema imune entra em ação, dentre eles a ativação microglial. Quando os mecanismos inflamatórios ultrapassam a linha de defesa, o mesmo pode se tornar prejudicial e torna-se potencialmente mais nocivo que o insulto inicial. Dentro desse mesmo contexto, outra linhagem de células gliais também participam dos processos de detoxicação imunitária inatos do SNC, essa linhagem é compreendida pelos astrócitos. Semelhante a ativação microglial, a ativação astrocitária está relacionada a ações imunológicas (Korn et al 2007).

O principal papel dos astrócitos no SNC é manter a homeostase. Essas células são associadas a capilares sanguíneos com porções em contato direto com a superfície neuronal. Essa morfologia permite que os astrócitos regulem o metabolismo neuronal controlando o fluxo de nutrientes da corrente sanguínea para os neurônios e ainda contribuem com a manutenção de fluxo iônico durante a atividade neuronal (Kimelberg 2010). Nesse contexto, é importante ressaltar que os astrócitos são cruciais em suprir os neurônios na demanda de DHA exigida, e que fazem a transferência do sangue para os neurônios (Moore 1994), além de serem dotados de enzimas que sintetizam DHA a partir de seus precursores como o EPA (Williard et al 2001). Esse papel de produzir AGPIs fundamentais para o SNC, é restrita aos astrócitos. (Moore et al 1991).

Em condições normais, os astrócitos produzem e liberam diferentes fatores neurotróficos incluindo o fator de crescimento de nervos (NGF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e também o fator de crescimento de

células epidermicas (EGF) relacionado ao processo de cicatrização mediado pelos astrócitos (Nedergaard et al 2003). Dessa forma, são responsáveis pela manutenção dos neurônios. Entretanto, quando ocorre algum tipo de lesão, os astrócitos são ativados. Considerando que os astrócitos fornecem fatores neurotróficos para os neurônios, o fornecimento de DHA também pode ser considerado trófico. Quando ativados, aumentam intensamente a produção de mediadores pró-inflamatórios, como diversas interleucinas, citocinas e TNF- α , que podem interferir na sobrevivência dos neurônios adjacentes. É importante ser ratificado que a ativação dos astrócitos é fortemente mediada por compostos pró-inflamatórios que são produzidos e liberados pela micróglia ativada e por compostos resultantes da morte celular (Araque 2006, Kimelberg 2010).

Nossas análises da ativação astrocitária pela ação da 6-OHDA infundida no estriado foi feita pela quantificação de GFAP. O processo de ativação astrocitária envolve a intensa produção dessa proteína ácida glial fibrilar que compõe o citoesqueleto (glial fibrillary acidic protein – GFAP). O aumento de GFAP coopera com a proliferação dos astrócitos quando ocorre algum tipo de lesão (Liberto et al 2004). Nossos resultados para GFAP mostram que houve intensa produção dessa proteína nas quatro subregiões analisadas do estriado e na SNcv para os animais do grupo Ctr-6-OHDA mas não para Ctr-Salina. Para essas mesmas regiões, observamos uma marcante redução de astrócitos ativados no grupo OP-6-OHDA quando comparado com os demais grupos. Na SNcd, de forma semelhante para iNOS, não observamos aumento significativo de GFAP no grupo Ctr-6-OHDA quando comparado com o grupo Ctr-Salina e, ainda, os grupos suplementados com OP, tiveram os valores de densidade óptica integrada para GFAP menores em comparação com os grupos não suplementados.

A redução da ativação astrocitária é estudada como mecanismo neuroprotetor para diferentes doenças do SNC. Em nossos resultados, o efeito neuroprotetor da suplementação com OP, pela análise da TH no estriado e SN, é apoiado pelos resultados que mostram uma robusta redução de astrócitos ativados na via nigroestriatal. A literatura aponta que o DHA modula funções de diferentes tipos celulares, o mesmo ocorre nos astrócitos. Nesse ponto de vista, a redução de astrócitos ativados no nosso modelo experimental de DP

pode ter sido efetivo pela maior disponibilidade de DHA nas estruturas que analisamos o perfil lipídico.

A possível redução de GFAP modulada pela disponibilidade de DHA pode ser explicada por resultados de diferentes trabalhos. Sabe-se que o DHA incorporado nas membranas astrocíticas participa de diferentes funções dessas células e que, um acréscimo desse AGP pode melhorar a eficácia dessas funções. *In vitro*, num meio enriquecido com DHA, observou-se que os astrócitos são eficientes em incorporar esse AGP em suas membranas e melhoram suas principais funções. O DHA leva a um aumento de conexinas, que permite que os astrócitos estabeleça conexões com neurônios (Champeil-Potokar et al 2004). Durante processos inflamatórios, os astrócitos alteram sua morfologia para emitirem ramificações que permitem maior plasticidade dos mecanismos de defesa, e essa ramificação é facilitada quando há mais DHA incorporado nas membranas. A ativação astrocítica, quando exacerbada, pode resultar na formação de prostaglandinas e COX-1 que podem agravar ainda mais a inflamação inicial. Entretanto, em experimentos com aumento da concentração de DHA, observou-se que a produção desses mediadores inflamatórios foi regulada para baixo e a lesão induzida por LPS foi atenuada (Strokin et al 2007).

Dentre os diversos papéis homeostáticos inerentes dos astrócitos, esta a capacidade de reversão do seu estado ativado para seu estado de repouso. Quando ativado por um longo período, os astrócitos podem entrar no estado chamado de astrogliose. Nesse estado as reações astrocíticas se tornam deletérias e perdem a capacidade de manter a homeostase do SNC bem como redução do fornecimento de fatores tróficos. Essa perda da capacidade de retornar ao estado de repouso está associada a neuropatologias (Morale et al 2006, Sofroniew & Vinters 2010). Nossos dados das análises de GFAP mostram que a suplementação com OP reduziu significativamente a ativação astrocítica ao se comparar o grupo Ctr-6-OHDA com o OP-6-OHDA (Figuras 21 e 23). Esse retorno ao estado de repouso promovido pela suplementação pode ser associado à maior disponibilidade de DHA. As funções dos astrócitos são diretamente influenciadas pela disponibilidade de DHA, e o estado de astrogliose pode ser agravado quando o suprimento desse AGPI é deficiente (Bourre et al 1984, Latour et al 2013).

O papel neuroprotetor dos astrócitos é estudado em diferentes modelos animais de DP. O MPTP e o LPS, além de serem tóxicos para os neurônios dopaminérgicos, estabelecem mecanismos tóxicos diretamente nos astrócitos. Essa interação permite estabelecer hipóteses do envolvimento dos astrócitos em processos inflamatórios e oxidativos no desenvolvimento da DP (Iravani et al 2012, Sandhu et al 2009). Entretanto, os astrócitos, além de liberarem fatores neurotróficos, são “equipados” com um eficiente sistema de detoxificação que os capacitam para enfrentar níveis elevados de estresse oxidativo (Sandhu et al 2002). Com esse mecanismo, os astrócitos tornam-se insensíveis a ação direta da 6-OHDA e a sua ativação ocorre de forma secundária em resposta a morte de neuronios dopaminérgicos. Assim, a ativação astrocitária no modelo de DP induzida pela 6-OHDA, é promovida pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas, TNF- α e pelo ON (Depino et al 2003, Sandhu et al 2009).

Tornando-nos, então, apoiados por nossos resultados e dados da literatura, podemos estabelecer uma linha hipotética das ações antioxidantes e antiinflamatórias do DHA em reduzir os processos neurodegenerativos causados pela 6-OHDA. Nas próprias membranas dos neurônios dopaminérgicos, os AGPIs podem ter apresentado efeito protetor por ser eficiente em reduzir os efeitos neurotóxicos da toxina como o aumento da peroxidação lipídica e por ser precursor celular de fatores anti-inflamatórios (Delattre et al 2010, Shchepinov et al 2011). O efeito nocivo da 6-OHDA é prontamente identificado pelas células de defesa do SNC, como as micróglia que avaliamos pela imunorreação para OX-42. A intensa marcação foi observada mesmo 25 dias depois da microinjeção da toxina no grupo Ctr-6-OHDA, o que indica que ainda havia algum processo inflamatório estabelecido pela toxina. Já no grupo OP-6-OHDA a maior parte das micróglia se encontraram em seu estado de repouso. Esse resultado pode ser pelo fato de os AGPIs incorporados às membranas celulares auxiliarem na resposta inflamatória pertinentes à micróglia bem como promover redução de expressão gênica que fatores pró-inflamatórios que exacerbam a inflamação (Lu et al 2010).

A presença do possível estado inflamatório apontado pela OX-42 no grupo Ctr-6-OHDA, nos permite inferir que mediadores inflamatórios ainda

estavam sendo produzidos e agravando o quadro neurodegenerativo. Essa idéia pode ser confirmada pela análise das células gliais que robustamente expressaram a enzima iNOS. Essa enzima é induzida a ser expressa na presença de algum fator estressor como a 6-OHDA e lesão tecidual. Sua alta expressão leva a uma intensa produção de ON que em excesso oxida biomoléculas causando danos neuronais (Niki 2013). Nossos dados mostraram que o a suplementação com OP teve um importante efeito antioxidante. O grupo OP-6-OHDA apresentou significativa redução da expressão de iNOS, e sabe-se que o DHA é eficaz em regular para baixo a expressão de iNOS e dessa forma a produção de ON que pode provocar estresse oxidativo (Araki et al 2011).

Esse potencial efeito antioxidante do DHA por promover modulação de iNOS pode ser confirmado pelas nossas análises de GFAP. Os astrócitos são ativados pela presença de mediadores pró-inflamatórios resultantes tanto da morte neuronal quanto da ativação microglial como o ON (Sofroniew & Vinters 2010). É possível estabelecer a hipótese de que, para o grupo OP-6-OHDA, os AGPIs modularam a redução da ativação microglial (dados de OX-42) e, concomitantemente, reduziu a produção de ON (dados de iNOS). Com uma menor produção de ON, houve menor sinalização da ativação astrocitária (dados de GFAP). Nossos dados mostram que a suplementação com OP foi eficaz em retornar os astrócitos ao seu estado de repouso. Esses dados corroboram aos resultados de Latour et al., 2013, que mostraram que o DHA é promove o retorno dos astrócitos ao seu estado de repouso e reduz a probabilidade de astrogliose. O grupo que recebeu 6-OHDA e não foi suplementado apresentou alta densidade de astrócitos em seu estado ativado. Em conjunto, a ação anti-inflamatória e antioxidante do OP resultaram em um papel neuroprotetor da via nigroestriatal, estriado e SN, analisados por TH. Esses resultados estão apresentados resumidamente na figura 25.

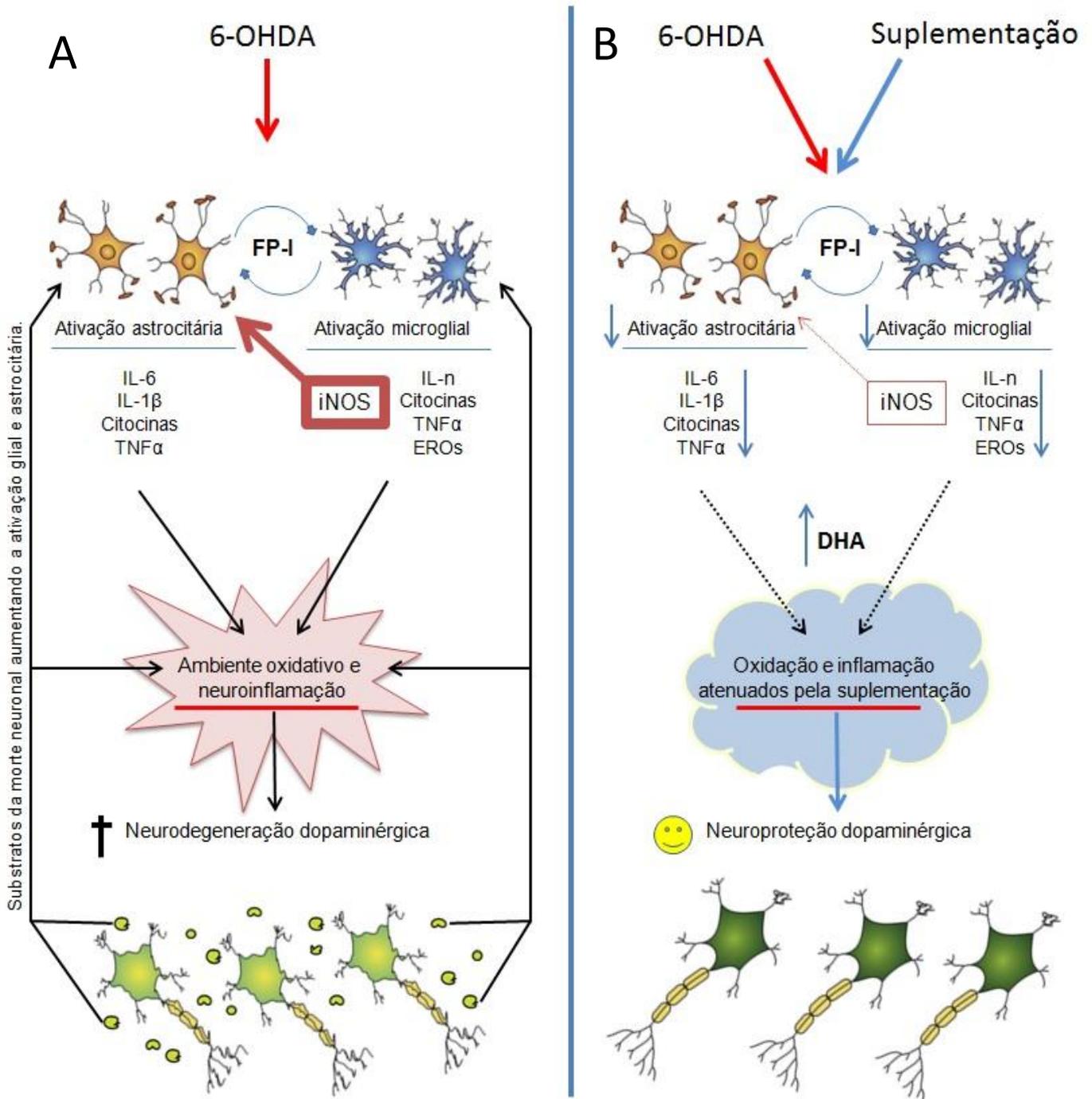


FIGURA 25: Resposta oxidativa e inflamatória à microinjeção de 6-OHDA e efeitos da suplementação com OP. Em A, a 6-OHDA desencadeou resposta inflamatória com ativação da micróglia e dos astrócitos que levou a um aumento da liberação de fatores pró-inflamatórios (FP-I) decorrente do metabolismo oxidativo. Esses FP-I aumentam a resposta inflamatória nas próprias células de defesa do SNC. Por exemplo, o aumento da expressão de iNOS nas micróglia que promovem maior ativação astrocitária. O aumento do ambiente oxidativo e inflamatório leva à morte dos neurônios dopaminérgicos, que resultam na formação de diversos substratos de morte celular que aumentam ainda mais a ativação microglial e astrocitária. Tem-se então, um ciclo vicioso do estresse oxidativo e inflamação que aumentam a neurodegeneração. Em B, a suplementação que resultou num aumento dos níveis de DHA, reduziu a síntese de fatores pró-inflamatórios, como a síntese de iNOS observado em nossos resultados, atenuando os processos oxidativos e inflamatórios que promoveu efeito neuroprotetor (adaptado de Taylor et al 2013).

Esse potente efeito anti-inflamatório e antioxidante do DHA pode ainda confirmado ao se avaliar os dados de GFAP e iNOS na SNcd. Para iNOS, o Ctr-Salina, mesmo sem 6-OHDA, apresentou diferenças estatísticas quando comparados com grupos suplementados. Fatores pró-inflamatórios sistêmicos, que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, podem ter induzido a expressão de iNOS nas células microgliais desses animais (Collins et al 2012, London et al 2013), assim, nossos resultados sugerem que esse efeito pode ter sido controlado nos animais suplementados. De forma semelhante, observamos que, para GFAP, o grupo Ctr-Salina apresentou astrócitos em seu estado ativado quando comparado aos grupos suplementados. Essa ativação pode ser resultado da produção de ON em resposta a mediadores inflamatórios sistêmicos. Somando-se a esses dados, mesmo não apresentando diferenças estatísticas, o grupo OP-Salina apresentou um número ainda menor de células imunorreativas para iNOS quando comparado ao grupo Ctr-Salina nos quatro quadrantes analisados do estriado. Indicando que o DHA *per se* é um antioxidante essencial, porém, são necessários futuros estudos para confirmar essa tendência.

Alguns trabalhos mostram que uma redução dos níveis de AGPIs essenciais torna a SNpc mais suscetível a processos oxidativos quando comparada com outras áreas do encéfalo como o estriado. Essa maior susceptibilidade torna a SNpc propensa a maiores danos neurodegenerativos (Passos et al., 2012, Cardoso et al., 2012). Nossos resultados apontam que, na SNpc, a parte compacta ventral foi mais suscetível aos processos degenerativos quando comparada com a parte compacta dorsal. Pelas análises de OX-42, é possível observar que, no grupo Ctr-6-OHDA, a parte compacta ventral possui uma densidade de micróglia maior que a compacta dorsal. Assim, com essa maior densidade de células microgliais, levou a uma grande densidade de expressão de iNOS que pode ter levado a maior ativação de astrócitos (imunorreatividade para iNOS e GFAP respectivamente) resultando no maior dano na região compacta ventral. Nessa mesma linha de raciocínio, a menor densidade de micróglia na parte compacta dorsal pode ter influenciado no menor dano neurodegenerativo observado pelas análises para TH.

Em conjunto, nossos resultados confirmam a importância clínica do fornecimento adequado de DHA para o SNC. Sua incorporação nas

membranas neuronais e nas diferentes células da glia apresentou efeito antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor no modelo animal de Doença de Parkinson que utilizamos. Os benefícios da suplementação confirmam a necessidade de incorporação de ácidos graxos poliinsaturados da família do ômega-3 especialmente nas populações que possuem hábitos alimentares com redução desses ácidos graxos.

6. CONCLUSÃO

A hipótese geral do nosso trabalho é confirmar que a suplementação com óleo de peixe, rico em DHA e EPA, tem efeito antioxidante e antiinflamatório no encéfalo de ratos hemiparkinsonianos mediados por 6-OHDA. O aumento dos níveis de DHA nas estruturas analisadas apoiam nossos resultados e esses efeitos associados são eficazes em atenuar os processos neurodegenerativos da toxina, amenizando a lesão e resultando em um papel neuroprotetor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdin AA, Sarhan NI. 2011. Intervention of mitochondrial dysfunction-oxidative stress-dependent apoptosis as a possible neuroprotective mechanism of alpha-lipoic acid against rotenone-induced parkinsonism and L-dopa toxicity. *Neuroscience research* 71: 387-95
- Abraham NG, Kappas A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews* 60: 79-127
- Aguirre JA, Leo G, Cueto R, Andbjør B, Naylor A, et al. 2008. The novel cyclooxygenase-2 inhibitor GW637185X protects against l-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neuroreport* 19: 657-60
- Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY. 2005. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 10858-63
- Al-Rajab AJ, Schiavon M. 2010. Degradation of 14C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. *Journal of environmental sciences* 22: 1374-80
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, et al. 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction, nutrition, development* 44: 509-38
- Alessandri JM, Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Perruchot MH, Raguenez G, et al. 2003. Incorporation of docosahexaenoic acid into nerve membrane phospholipids: bridging the gap between animals and cultured cells. *The American journal of clinical nutrition* 78: 702-10
- Aloisi F. 1999. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Advances in experimental medicine and biology* 468: 123-33
- Alvarez-Fischer D, Guerreiro S, Hunot S, Saurini F, Marien M, et al. 2008. Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *Journal of neurochemistry* 107: 701-11
- Araki Y, Matsumiya M, Matsuura T, Oishi M, Kaibori M, et al. 2011. Peroxidation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibits the Induction of iNOS Gene Expression in Proinflammatory Cytokine-Stimulated Hepatocytes. *Journal of nutrition and metabolism* 2011: 374542
- Araque A. 2006. Astrocyte-neuron signaling in the brain--implications for disease. *Current opinion in investigational drugs* 7: 619-24
- Bannenberg G, Serhan CN. 2010. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et biophysica acta* 1801: 1260-73
- Barcia C, Hunot S, Guillemin GJ, Pitossi F. 2011. Inflammation and Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011: 729054

- Barsottini OG, Ferraz HB, Maia AC, Jr., Silva CJ, Rocha AJ. 2007. Differentiation of Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy with magnetic resonance imaging: the first Brazilian experience. *Parkinsonism & related disorders* 13: 389-93
- Bartels AL, Leenders KL. 2007. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK11195 PET. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22: 1852-6
- Bazan NG. 2005. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain pathology* 15: 159-66
- Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. 2005. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1053: 137-47
- Bazinet RP, Douglas H, Cunnane SC. 2003. Whole-body utilization of n-3 PUFA in n-6 PUFA-deficient rats. *Lipids* 38: 187-9
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* 271: C1424-37
- Bezard E, Przedborski S. 2011. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26: 993-1002
- Bishop A, Anderson JE. 2005. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* 208: 193-205
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, et al. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 65: 135-72
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy* 196 (Pt 4): 527-42
- Bonzano L, Tacchino A, Saitta L, Roccatagliata L, Avanzino L, et al. 2013. Basal ganglia are active during motor performance recovery after a demanding motor task. *NeuroImage* 65: 257-66
- Bostan AC, Dum RP, Strick PL. 2013. Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends in cognitive sciences* 17: 241-54
- Boudrault C, Bazinet RP, Kang JX, Ma DW. 2010. Cyclooxygenase-2 and n-6 PUFA are lower and DHA is higher in the cortex of fat-1 mice. *Neurochemistry international* 56: 585-9
- Bourre JM, Pascal G, Durand G, Masson M, Dumont O, Piciotti M. 1984. Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *Journal of neurochemistry* 43: 342-8
- Bousquet M, Calon F, Cicchetti F. 2011a. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing research reviews* 10: 453-63
- Bousquet M, Gibrat C, Saint-Pierre M, Julien C, Calon F, Cicchetti F. 2009. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of

- omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33: 1401-8
- Bousquet M, Gue K, Emond V, Julien P, Kang JX, et al. 2011b. Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of lipid research* 52: 263-71
- Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N, Jr., Cicchetti F, Calon F. 2008. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 1213-25
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 484-94
- Bredt DS, Snyder SH. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry* 63: 175-95
- Brittain JS, Brown P. 2013. Oscillations and the basal ganglia: Motor control and beyond. *NeuroImage*
- Broadhurst PL. 1960. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. *Fortschritte der psychosomatischen Medizin. Advances in psychosomatic medicine* 1: 63-9
- Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. 2011. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free radical biology & medicine* 50: 633-40
- Bruckdorfer R. 2005. The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine* 26: 3-31
- Bueler H. 2009. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 218: 235-46
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M. 2006. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet neurology* 5: 974-83
- Calder PC. 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochemical Society transactions* 33: 423-7
- Calder PC. 2009. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *International reviews of immunology* 28: 506-34
- Calder PC. 2011. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology* 668 Suppl 1: S50-8
- Calder PC, Yaqoob P. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *BioFactors* 35: 266-72
- Calon F, Cole G. 2007. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 77: 287-93

- Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, et al. 2004. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43: 633-45
- Carlson SE. 2001. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Seminars in neonatology* : SN 6: 437-49
- Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavielle M. 2004. Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids. *Journal of neuroscience research* 75: 96-106
- Charntikov S, Der-Ghazarian T, Herbert MS, Horn LR, Widarma CB, et al. 2011. Importance of D1 and D2 receptors in the dorsal caudate-putamen for the locomotor activity and stereotyped behaviors of preweanling rats. *Neuroscience* 183: 121-33
- Chevalier G, Deniau JM. 1990. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in neurosciences* 13: 277-80
- Chinta SJ, Andersen JK. 2008. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1780: 1362-7
- Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, et al. 2006. Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53: 92-102
- Chung KK, David KK. 2010. Emerging roles of nitric oxide in neurodegeneration. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 22: 290-5
- Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in pharmacological sciences* 30: 475-83
- Clark D, White FJ. 1987. D1 dopamine receptor--the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* 1: 347-88
- Clarke DJ, Branton RL. 2002. A role for tumor necrosis factor alpha in death of dopaminergic neurons following neural transplantation. *Experimental neurology* 176: 154-62
- Clementi E. 2003. The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide. *IUBMB life* 55: 563-5
- Cole GM, Frautschy SA. 2010. DHA may prevent age-related dementia. *The Journal of nutrition* 140: 869-74
- Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 62: 2154-68
- Consilvio C, Vincent AM, Feldman EL. 2004. Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? *Experimental neurology* 187: 1-10
- Conti A, Miscusi M, Cardali S, Germano A, Suzuki H, et al. 2007. Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. *Brain research reviews* 54: 205-18

- Correia Bacarin C, Mori MA, Dias Fiuza Ferreira E, Valerio Romanini C, Weffort de Oliveira RM, Milani H. 2013. Fish oil provides robust and sustained memory recovery after cerebral ischemia: Influence of treatment regimen. *Physiology & behavior* 119C: 61-71
- Cunningham C. 2013. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* 61: 71-90
- da Silva TM, Munhoz RP, Alvarez C, Naliwaiko K, Kiss A, et al. 2008. Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. *Journal of affective disorders* 111: 351-9
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52: 1-6
- Danielson SR, Andersen JK. 2008. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine* 44: 1787-94
- Das UN, Vaddadi KS. 2004. Essential fatty acids in Huntington's disease. *Nutrition* 20: 942-7
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909
- Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM. 1996. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 2479-87
- de Lau LM, Bornebroek M, Wittteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2005. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology* 64: 2040-5
- De Smedt-Peyrusse V, Sargueil F, Moranis A, Harizi H, Mongrand S, Laye S. 2008. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *Journal of neurochemistry* 105: 296-307
- Debeir T, Ginestet L, Francois C, Laurens S, Martel JC, et al. 2005. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental neurology* 193: 444-54
- DeFilippis AP, Sperling LS. 2006. Understanding omega-3's. *American heart journal* 151: 564-70
- Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB. 2000. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *Journal of neurochemistry* 74: 2213-6
- Delattre AM, Kiss A, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Bagatini PB, et al. 2010. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neuroscience research* 66: 256-64
- DeLong MR. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13: 281-5
- Denis I, Potier B, Vancassel S, Heberden C, Laviolle M. 2013. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. *Ageing research reviews* 12: 579-94

- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, et al. 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience* 18: 2731-42
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, et al. 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 52: 381-9
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P, Sharkey J, Zhang Y, Holtzclaw WD, et al. 2010. An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and reactivity with Keap1. *The Journal of biological chemistry* 285: 33747-55
- Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. 1999. Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain research. Molecular brain research* 64: 141-8
- Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, et al. 2008. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood* 112: 848-55
- Dunnett SB, Bjorklund A. 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399: A32-9
- Ebert S, Weigelt K, Walczak Y, Drobnik W, Mauerer R, et al. 2009. Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *Journal of neurochemistry* 110: 1863-75
- Elkon H, Melamed E, Offen D. 2004. Oxidative stress, induced by 6-hydroxydopamine, reduces proteasome activities in PC12 cells: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 24: 387-400
- Emborg ME. 2004. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of neuroscience methods* 139: 121-43
- Esplugues JV. 2002. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology* 135: 1079-95
- Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. 2007. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Experimental neurology* 205: 295-312
- Estevez AG, Jordan J. 2002. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Annals of the New York Academy of Sciences* 962: 207-11
- Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. 2003. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *The Journal of nutrition* 133: 1913-20
- Fang J, Nakamura T, Cho DH, Gu Z, Lipton SA. 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18742-7

- Faure A, Leblanc-Veyrac P, El Massioui N. 2010. Dopamine agonists increase perseverative instrumental responses but do not restore habit formation in a rat model of Parkinsonism. *Neuroscience* 168: 477-86
- Fedorova I, Salem N, Jr. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 75: 271-89
- Fernstrom JD. 1999. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. *Lipids* 34: 161-9
- Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, et al. 2011. Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behavioural brain research* 219: 116-22
- Fetler L, Amigorena S. 2005. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 309: 392-3
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Di Monte D, Langston JW. 1992. Astrocytes and Parkinson's disease. *Progress in brain research* 94: 429-36
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. 2003. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences* 24: 395-401
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB. 1995. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 8167-76
- Gomes MZ, Raisman-Vozari R, Del Bel EA. 2008. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain research* 1203: 160-9
- Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H. 2010. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular brain* 3: 12
- Hald A, Lotharius J. 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental neurology* 193: 279-90
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-55
- Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, et al. 2002. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *Journal of neurochemistry* 81: 1084-91
- Hashimoto M, Tanabe Y, Fujii Y, Kikuta T, Shibata H, Shido O. 2005. Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats. *The Journal of nutrition* 135: 549-55
- Hauber W. 1998. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in neurobiology* 56: 507-40

- Hirsch EC, Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology* 8: 382-97
- Hirsch EC, Hunot S, Faucheux B, Agid Y, Mizuno Y, et al. 1999. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 14: 383-5
- Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. 2005. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 11 Suppl 1: S9-S15
- Hoffman GE, Le WW, Sita LV. 2008. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]* Chapter 2: Unit 2 12
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Veerhuis R, Arendt T, Scheper W, et al. 2005. Maximal COX-2 and ppRb expression in neurons occurs during early Braak stages prior to the maximal activation of astrocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation* 2: 27
- Horrocks LA, Farooqui AA. 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 70: 361-72
- Howells FM, Russell VA, Mabandla MV, Kellaway LA. 2005. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 165: 210-20
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, et al. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72: 355-63
- Innis SM. 2007. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of nutrition* 137: 855-9
- Innis SM. 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain research* 1237: 35-43
- Iravani MM, Sadeghian M, Leung CC, Jenner P, Rose S. 2012. Lipopolysaccharide-induced nigral inflammation leads to increased IL-1beta tissue content and expression of astrocytic glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters* 510: 138-42
- Kastner A, Hirsch EC, Agid Y, Javoy-Agid F. 1993. Tyrosine hydroxylase protein and messenger RNA in the dopaminergic nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Brain research* 606: 341-5
- Kavya R, Saluja R, Singh S, Dikshit M. 2006. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 15: 280-94
- Khandare AL, Ankulu M, Aparna N. 2013. Role of glutamate and nitric oxide in onset of motor neuron degeneration in neurotoxicity. *Neurotoxicology* 34: 269-74
- Kim J, Lim SY, Shin A, Sung MK, Ro J, et al. 2009. Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BMC cancer* 9: 216

- Kimelberg HK. 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 16: 79-106
- Kobylecki C, Cenci MA, Crossman AR, Ravenscroft P. 2010. Calcium-permeable AMPA receptors are involved in the induction and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 114: 499-511
- Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A. 1998. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39: 167-80
- Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H, Shinohara K. 2003. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 34: 1006-16
- Kondoh T, Bannai M, Nishino H, Torii K. 2005. 6-Hydroxydopamine-induced lesions in a rat model of hemi-Parkinson's disease monitored by magnetic resonance imaging. *Experimental neurology* 192: 194-202
- Korn T, Rao M, Magnus T. 2007. Autoimmune modulation of astrocyte-mediated homeostasis. *Neuromolecular medicine* 9: 1-16
- Kostic VS, Filippi M. 2011. Neuroanatomical correlates of depression and apathy in Parkinson's disease: magnetic resonance imaging studies. *Journal of the neurological sciences* 310: 61-3
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19: 312-8
- Kuhn DM, Aretha CW, Geddes TJ. 1999. Peroxynitrite inactivation of tyrosine hydroxylase: mediation by sulfhydryl oxidation, not tyrosine nitration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 10289-94
- Kulkarni SK, Dhir A. 2009. Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. *Drugs of today* 45: 135-54
- Kupersmidt L, Okun Z, Amit T, Mandel S, Saltsman I, et al. 2010. Metalloporphyrins as cytoprotective agents against oxidative and nitrosative stress in cellular models of neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 113: 363-73
- Latour A, Grimal B, Champeil-Potokar G, Hennebelle M, Lavielle M, et al. 2013. Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging cell* 12: 76-84
- Lauritzen KM. 2001. [Fish liver oil]. *Ugeskrift for laeger* 163: 3821
- Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, et al. 2003. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Human molecular genetics* 12: 79-86
- Levy R, Hutchison WD, Lozano AM, Dostrovsky JO. 2000. High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of parkinsonian patients with limb tremor.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20: 7766-75

- Liberatore GT, Finkelstein DI, Wong JY, Horne MK, Porritt MJ, et al. 1999. Sprouting of dopaminergic axons after striatal injury: confirmation by markers not dependent on dopamine metabolism. *Experimental neurology* 159: 565-73
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of neurochemistry* 89: 1092-100
- Lima MSM, Martins FE, Delattre AM, Proença MB, Mori MA, Carabelli B, Ferraz AC. 2012 Motor and non-motor features of Parkinson's disease - A review of clinical and experimental studies. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*.
- Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-95
- Lindgren HS, Rylander D, Ohlin KE, Lundblad M, Cenci MA. 2007. The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behavioural brain research* 177: 150-9
- Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppanen VM, et al. 2007. Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448: 73-7
- Liu B. 2006. Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *The AAPS journal* 8: E606-21
- Liu WG, Lu GQ, Li B, Chen SD. 2007. Dopaminergic neuroprotection by neurturin-expressing c17.2 neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 13: 77-88
- London A, Cohen M, Schwartz M. 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in cellular neuroscience* 7: 34
- Lu DY, Tsao YY, Leung YM, Su KP. 2010. Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35: 2238-48
- Luchtman DW, Meng Q, Song C. 2012. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research* 226: 386-96
- Madhusoodanan KS, Murad F. 2007. NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochemical research* 32: 681-94
- Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, et al. 2003. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *The Journal of biological chemistry* 278: 43807-17
- Marchetti B, Abbracchio MP. 2005. To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends in pharmacological sciences* 26: 517-25

- Massiera F, Guesnet P, Ailhaud G. 2006. The crucial role of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development: relationship to childhood obesity. *Nestle Nutrition workshop series. Paediatric programme* 57: 235-42; discussion 43-5
- Mathai A, Smith Y. 2011. The corticostriatal and corticosubthalamic pathways: two entries, one target. So what? *Frontiers in systems neuroscience* 5: 64
- Mazereeuw G, Lanctot KL, Chau SA, Swardfager W, Herrmann N. 2012. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive performance: a meta-analysis. *Neurobiology of aging* 33: 1482 e17-29
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285-91
- McLaren AT, Mazer CD, Zhang H, Liu E, Mok L, Hare GM. 2009. A potential role for inducible nitric oxide synthase in the cerebral response to acute hemodilution. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* 56: 502-9
- Mink JW. 1998. The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 13: 981-2
- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. 2000. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95: 425-32
- Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. 2008. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell transplantation* 17: 363-72
- Moore SA. 1994. Local synthesis and targeting of essential fatty acids at the cellular interface between blood and brain: a role for cerebral endothelium and astrocytes in the accretion of CNS docosahexaenoic acid. *World review of nutrition and dietetics* 75: 128-33
- Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *Journal of neurochemistry* 56: 518-24
- Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, et al. 2006. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138: 869-78
- Nakamura Y. 2002. Regulating factors for microglial activation. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25: 945-53
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences* 26: 523-30
- Neumann H. 2001. Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36: 191-9
- Niki E. 2013. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et biophysica acta*
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-8

- Nojomi M, Mostafavian Z, Shahidi GA, Jenkinson C. 2010. Quality of life in patients with Parkinson's disease: Translation and psychometric evaluation of the Iranian version of PDQ-39. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 15: 63-9
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW. 2000a. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* 55: S13-20; discussion S21-3
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM. 2002. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17: 51-5
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, et al. 2000b. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 23: S8-19
- Orth M, Schapira AH. 2002. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochemistry international* 40: 533-41
- Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. 2009. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 15 Suppl 3: S200-4
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Chiavegatto S, Del-Bel E. 2011. Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. *Frontiers in systems neuroscience* 5: 40
- Paizanis E, Kelai S, Renoir T, Hamon M, Lanfumey L. 2007. Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations. *Neurochemical research* 32: 1762-71
- Palner M, Kjaerby C, Knudsen GM, Cumming P. 2011. Effects of unilateral 6-OHDA lesions on [3H]-N-propylnorapomorphine binding in striatum ex vivo and vulnerability to amphetamine-evoked dopamine release in rat. *Neurochemistry international* 58: 243-7
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research. Brain research reviews* 20: 91-127
- Park SH, Choi WS, Yoon SY, Ahn YS, Oh YJ. 2004. Activation of NF-kappaB is involved in 6-hydroxydopamine-but not MPP+ -induced dopaminergic neuronal cell death: its potential role as a survival determinant. *Biochemical and biophysical research communications* 322: 727-33
- Parkinson J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 14: 223-36; discussion 22
- Penney JB, Jr., Young AB. 1983. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Annual review of neuroscience* 6: 73-94
- Ponsford J, Willmott C, Rothwell A, Cameron P, Ayton G, et al. 2001. Impact of early intervention on outcome after mild traumatic brain injury in children. *Pediatrics* 108: 1297-303

- Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H. 2000. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32: 51-9
- Przedborski S. 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 11 Suppl 1: S3-7
- Re MC, Vitone F, Biagetti C, Schiavone P, Alessandrini F, et al. 2010. HIV-1 DNA proviral load in treated and untreated HIV-1 seropositive patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16: 640-6
- Reksidler AB, Lima MM, Zanata SM, Machado HB, da Cunha C, et al. 2007. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *European journal of pharmacology* 560: 163-75
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, et al. 2009. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137: 47-59
- Sandhu JK, Gardaneh M, Iwasio R, Lanthier P, Gangaraju S, et al. 2009. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiology of disease* 33: 405-14
- Sandhu JK, Sikorska M, Walker PR. 2002. Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells. *Journal of neuroscience research* 68: 604-14
- Sauer H, Oertel WH. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59: 401-15
- Saw CL, Huang Y, Kong AN. 2010. Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. *Biochemical pharmacology* 79: 421-30
- Schapira AH. 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochimica et biophysica acta* 1366: 225-33
- Schapira AH, Gegg M. 2011. Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinson's disease* 2011: 159160
- Schapira AH, Jenner P. 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26: 1049-55
- Scheller C, Sopper S, Jenuwein M, Neuen-Jacob E, Tatschner T, et al. 2005. Early impairment in dopaminergic neurotransmission in brains of SIV-infected rhesus monkeys due to microglia activation. *Journal of neurochemistry* 95: 377-87
- Schiavon E, Stevens M, Zaharenko AJ, Konno K, Tytgat J, Wanke E. 2010. Voltage-gated sodium channel isoform-specific effects of pempidotoxins. *The FEBS journal* 277: 918-30
- Schiavon G, Tonini G. 2010. Hormone-biological therapy in breast cancer: preclinical evidences, clinical studies and future directions. *Current cancer drug targets* 10: 3-18

- Schiavoni G, Bennati AM, Castelli M, Fazia MA, Beccari T, et al. 2010. Activation of TM7SF2 promoter by SREBP-2 depends on a new sterol regulatory element, a GC-box, and an inverted CCAAT-box. *Biochimica et biophysica acta* 1801: 587-92
- Schwartzing RK, Huston JP. 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in neurobiology* 50: 275-331
- Seki H, Tani Y, Arita M. 2009. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins & other lipid mediators* 89: 126-30
- Serhan CN. 2008. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79: 157-63
- Serhan CN, Chiang N. 2008. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1: S200-15
- Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins & other lipid mediators* 73: 155-72
- Shapiro H. 2003. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 68: 219-24
- Shchepinov MS, Chou VP, Pollock E, Langston JW, Cantor CR, et al. 2011. Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology letters* 207: 97-103
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicologic pathology* 39: 115-23
- Simopoulos AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 56: 365-79
- Slotkin TA, Seidler FJ. 2010. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. *Neurotoxicology and teratology* 32: 124-31
- Smith AD, Bolam JP. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends in neurosciences* 13: 259-65
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119: 7-35
- Song YJ, Halliday GM, Holton JL, Lashley T, O'Sullivan SS, et al. 2009. Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68: 1073-83
- Strange PG. 1993. Dopamine receptors in the basal ganglia: relevance to Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 8: 263-70
- Strickland D, Bertoni JM. 2004. Parkinson's prevalence estimated by a state registry. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19: 318-23

- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. 2007. Prostaglandin synthesis in rat brain astrocytes is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A2. *Journal of neurochemistry* 102: 1771-82
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156: 830-40
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology* 208: 1-25
- Thienprasert A, Samuhaseneetoo S, Popplestone K, West AL, Miles EA, Calder PC. 2009. Fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids selectively affect plasma cytokines and decrease illness in Thai schoolchildren: a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. *The Journal of pediatrics* 154: 391-5
- Tran TA, Nguyen AD, Chang J, Goldberg MS, Lee JK, Tansey MG. 2011. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor regulate Parkin expression via nuclear factor-kappa B. *PLoS one* 6: e23660
- Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1797: 113-28
- Ungerstedt U. 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 367: 95-122
- van Asselen M, Almeida I, Andre R, Januario C, Goncalves AF, Castelo-Branco M. 2009. The role of the basal ganglia in implicit contextual learning: a study of Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 47: 1269-73
- Vincent SR, Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-84
- Voutilainen MH, Back S, Peranen J, Lindholm P, Raasmaja A, et al. 2011. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 228: 99-108
- Vroon A, Drukarch B, Bol JG, Cras P, Breve JJ, et al. 2007. Neuroinflammation in Parkinson's patients and MPTP-treated mice is not restricted to the nigrostriatal system: microgliosis and differential expression of interleukin-1 receptors in the olfactory bulb. *Experimental gerontology* 42: 762-71
- Wang X, Chen S, Ma G, Ye M, Lu G. 2005. Involvement of proinflammatory factors, apoptosis, caspase-3 activation and Ca²⁺ disturbance in microglia activation-mediated dopaminergic cell degeneration. *Mechanisms of ageing and development* 126: 1241-54
- Watanabe H, Muramatsu Y, Kurosaki R, Michimata M, Matsubara M, et al. 2004. Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14: 93-104

- Weinstock-Guttman B, Baier M, Park Y, Feichter J, Lee-Kwen P, et al. 2005. Low fat dietary intervention with omega-3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73: 397-404
- Williard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, et al. 2001. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *Journal of lipid research* 42: 1368-76
- Wyss-Coray T, Mucke L. 2002. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35: 419-32
- Young RJ, Beams RM, Carter K, Clark HA, Coe DM, et al. 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by acetamidine derivatives of hetero-substituted lysine and homolysine. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 10: 597-600
- Zhang C, Bazan NG. 2010. Lipid-mediated cell signaling protects against injury and neurodegeneration. *The Journal of nutrition* 140: 858-63
- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, et al. 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 533-42