

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA MARCIA DELATTRE

DIETA COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 EM MODELO DE
PARKINSONISMO EM RATOS EXPOSTOS À ENDOTOXINA BACTERIANA PRÉ-
E PÓS-NATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA

CURITIBA

2014

ANA MARCIA DELATTRE

DIETA COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 EM MODELO DE
PARKINSONISMO EM RATOS EXPOSTOS À ENDOTOXINA BACTERIANA PRÉ-
E PÓS-NATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutora ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Área de Concentração Fisiologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de M. S. Lima

CURITIBA


2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Anete Curte Ferraz
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE


Prof. Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive
Hospital de Clínicas - UFPR


Profa. Dra. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Fabíola Lagher
Universidade Federal do Paraná - UFPR.

E tendo como suplentes,

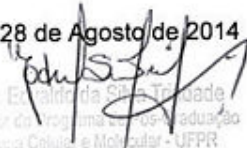
Profa. Dra. Janaina Menezes Zanoveli
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Ana Márcia Delattre**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Dieta com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em modelo de parkinsonismo em ratos expostos à endotoxina bacteriana pré- e pós-natal: avaliação comportamental e neuroquímica" são de parecer favorável à ~~aprovação~~ ^{aprovação} da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Agosto de 2014


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Teodoro
Membro do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185785

Para
Fabricio Mafra Zocolotti

“Meu riso é tão feliz contigo
O meu melhor amigo é o meu amor
Seus olhos meu clarão
Me guiam dentro da escuridão
Seus pés me abrem o caminho
Eu sigo e nunca me sinto só”

(Velha infância - Arnaldo Antunes, Marisa Monte)

Aos Meus pais,
Aroldo e Maria Alice

Todas as lições de vida que me ensinaram
dariam muito mais que uma tese.
Amo vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Não me lembro de ter visto anteriormente em teses um agradecimento especial à orientadora. Mas não poderia deixar de fazê-lo pois, há muito tempo, você deixou de ser *apenas* uma pessoa que me orienta. Afinal, são 10 anos caminhando juntas. Nem sempre tivemos somente flores no caminho (ah, esta vida de pesquisador em intuição pública não é fácil), mas você sempre achava uma saída (como o próprio Ivan Izquierdo falou: — “Essa Anete tem facas nas botas!”). E com isso, além de fazermos a pesquisa científica, você ia me ensinando o caminho das pedras. Cresci, e cresci muito com o que você me ensinou. Cresci como pesquisadora, como profissional, e principalmente como pessoa. Fui aprendendo com a sua nobreza com os colegas de trabalho, sua generosidade com os funcionários, sua paciência com os alunos, e sua motivação ao enfrentar os empecilhos da vida acadêmica. Acho que isso explica o merecido agradecimento especial à amizade sincera, às risadas e conversas agradáveis na hora do café, e aos bons conselhos no momento certo. Agradeço por lapidar a pesquisadora que existia dentro de mim, e principalmente por me passar princípios que me servirão para a vida toda. Meu sincero reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos.

À minha família, pelo amor e pela união que temos.

Ao Prof. Marcelo pela ajuda nos experimentos e pela co-orientação.

Aos amigos Marco Aurélio, Bruno e Claudia que sempre estiveram presentes, *na alegria e na tristeza* durante os experimentos. Além disso, o Marco com seu entusiasmo, Bruno com seu companheirismo, e Claudia com sua tranquilidade, fizeram com que horas intermináveis de cirurgias e testes comportamentais passassem mais rápido. Muito obrigada pela ajuda, paciência, e por termos esta bela amizade.

Aos amigos Adriano, Ana Nosedá, Fabíola, Laís, Patrícia e Simone por fazerem deste laboratório o ambiente mais descontraído (e óbvio, o mais produtivo!) do departamento.

Às minhas ICs Paula, Isabela, Danielle, Karin e Ana Carolina, que no decorrer destes quatro anos trocaram muitas caixas de ratos, e fizeram suplementação mesmo em feriados, finais de semana e férias. À Paula, pela especial ajuda na imunohistoquímica. Muito obrigada.

Ao Luiz Eduardo Rizzo, pelos valiosos ensinamentos e ajuda nas análises de Western Blot. Agradeço por me acompanhar durante os 10 meses de experimentos diários, mesmo após muitos anticorpos não funcionarem. Tenho extrema admiração pela sua competência.

Aos amigos Clarissa, Carol, Celso, Evandro, Fernanda, Flávia, Gabriel, Ingrid, Ivana, Larissa, Max, Valentin, Zaine, e a todos do laboratório de neurobiologia por me receberem tão gentilmente, e fazerem com que eu me sentisse no meu próprio laboratório.

Às professoras Lia Nakao e Adriana Mercadante, e em especial ao professor Silvio Zanata, pela liberdade e confiança que depositaram em mim, e pela parceria nos experimentos de Western Blot.

À professora Beatriz Longo do Laboratório de Neurofisiologia da Unifesp, e ao professor Edvaldo da Silva Trindade do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pelo auxílio com os anticorpos.

Aos professores Déborah Suchecki e Ricardo Borges Machado do Departamento de Psicobiologia da Unifesp, pela parceria nas análises de HPLC.

À comissão organizadora do Evento dos Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da qual eu fiz parte durante dois anos, professores Edvaldo Trindade, Marco Randi e Célia Regina Franco, pelo excelente

trabalho em equipe. Em especial, quero agradecer à Stellee Biscaia por ser a amiga de todas as horas. Foi um prazer ser representante discente ao seu lado.

À Marlene, secretária da pós-graduação, pelo auxílio sempre presente.

Às amigadas que fiz durante esta estadia na UFPR, em especial Gláucia, Dabna, Thaísa e Katlyn.

À Silvia, farmacêutica e técnica do laboratório central do Departamento de Farmacologia, pela ajuda nos cálculos das concentrações das drogas, e é claro, pelo abraço carinhoso que sempre me dava.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Microscopia, Alessandra e Israel, pelo suporte nas análises das lâminas de imunohistoquímica.

Aos professores Ana Lúcia Tararhuch, Anderson Andrade e Fernando Louzada pelas avaliações e acompanhamento no Evento dos Doutorandos.

Ao Rogério, secretário da Fisiologia, e aos técnicos Ely e Fábio pela colaboração.

Aos funcionários do biotério central, pelo cuidado com os animais.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À Fundação Herbarium pela disponibilização das cápsulas de óleo de peixe utilizadas no experimento.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Tião da portaria, por me dar todos os dias “Bom Dia” com a mais doce sinceridade.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa complexa que inclui sintomas cognitivos, motores e não-motores, com fatores etiológicos ainda estudados, e, atualmente, com tratamentos baseados em cuidados e medicamentos paliativos. Embasados na hipótese de que a morte neuronal dopaminérgica na DP é multifatorial, e pode ser iniciada por insultos ocorridos durante a vida intra-uterina do indivíduo, realizamos, neste trabalho, a exposição pré e pós-natal à endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS) em ratos Wistar. Em adição, investigamos a capacidade da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPIs ω -3) durante a formação do sistema nervoso central, gerar modificações no microambiente glial e neuronal da prole, e sua eficácia em atenuar ou reverter a neurotoxicidade causada pela inflamação e consequente dano neuronal dopaminérgico. Ratas prenhas no 11^o dia de gestação foram submetidas à aplicação de 1mg/kg de LPS. Evidenciou-se, ao avaliar a prole aos 21 dias de vida, significativa redução no número de neurônios tirosina hidroxilase (TH) imunorreativos na substância negra parte compacta (SNpc) e da concentração de dopamina (DA) estriatal, além de expressivo déficit de memória espacial e não espacial. Nesta fase, apesar da suplementação com AGPIs ω -3 não alterar o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc, gerou profundo efeito neuroprotetor na preservação da função cognitiva dos animais. Para avaliarmos se o dano neuronal decorrente da exposição pré-natal estaria presente e/ou potencializaria insulto inflamatório posterior, alguns animais expostos na vida intra-uterina ao LPS, foram mantidos até a idade adulta (90 dias), e então re-expostos ao LPS intranigral através de cirurgia estereotáxica. Nesta fase, o déficit cognitivo decorrente da aplicação de LPS pré-natal, ainda presente nos animais não suplementados, foi prevenido pela suplementação com AGPIs ω -3, possivelmente pela manutenção dos níveis de DA estriatal. Por outro lado, estes ácidos graxos não se mostraram hábeis em alterar a significativa ativação microglial e astrocitária, e a acentuada morte neuronal dopaminérgica observadas em decorrência da injeção de LPS intranigral. Além disso, os dados mostraram ausência de alteração nas expressões de proteínas pró e anti-inflamatórias após o insulto inflamatório, além de a continuada ativação microglial e astrocitária não aumentarem o translocamento da proteína indutora de apoptose (AIF) para o núcleo dos neurônios dopaminérgicos no processo de morte neuronal via apoptose caspase independente. Neste contexto, pudemos inferir que o efeito neuroprotetor dos AGPIs ω -3 está diretamente ligado à função neuronal, e que podem em situações adversas, mesmo em logo prazo, manter os níveis fisiológicos de DA estriatal para que funções cognitivas, comportamentais e até possivelmente motoras permaneçam inalteradas.

Palavras-Chave: doença de Parkinson, ômega-3, neuroproteção, LPS, gestação, inflamação.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder including cognitive, motor e non-motor symptoms. Based on the hypothesis that the dopaminergic neuronal death in PD is multifactorial, and may be initiated by insults during intra-uterine life, we performed pre- and postnatal exposure to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide - LPS) in Wistar rats. In addition, we investigated the ability of supplementation with polyunsaturated fatty acids omega-3 (ω -3 PUFAs) during central nervous system formation, to generate neuronal and glial changes in microenvironment of the offspring, and its efficacy in attenuate or reverse the neurotoxicity caused by inflammation, and subsequent dopaminergic neuronal damage. The injection of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide - LPS) into pregnant rats at embryonic day 11, resulted in a birth of offspring with fewer than normal tyroxine hydroxylase immunoreactive neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), decreased concentration of striatal DA, e significant deficit in spatial e non-spatial memories, when assessed at postnatal days 21. At this stage, despite supplementation with ω -3 PUFAs did not alter the number of dopaminergic neurons in SNpc, generated profound neuroprotective effect in preserving cognitive function. In addition, to assess if neuronal damage induced by prenatal exposure would be present and/or potentiate subsequent inflammatory insult, some animals exposed in utero life to LPS, were maintained into adulthood (90 days), and exposed again to the intranigral LPS by stereotactic surgery. The cognitive deficits resulting from the prenatal LPS exposure still present in the non-supplemented animals, and interestingly were prevented by supplementation with ω -3 PUFAs, possibly by maintaining the levels of striatal DA. On the other hand, these fatty acids were not able to alter the microglial and astrocyte activation, and the significant dopaminergic neuronal death observed due to the intranigral injection of LPS. Also, the data showed no change in expression of pro- and anti-inflammatory proteins after the inflammatory insult, and that the important modification of glial microenvironment did not increase the apoptosis-inducing protein (AIF) to the nucleus of the dopaminergic neurons in the caspase-independent apoptosis pathway. In this context, we can infer that the neuroprotective effect of these fatty acids are directly linked to neuronal function, which may under adverse conditions, even in long term, maintain physiological levels of striatal DA to cognitive, behavioral, e even possibly motor functions, remain unchanged.

Keywords: Parkinson's disease, omega-3, neuroprotection, LPS, pregnancy, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – INTERAÇÃO SINÉRGICA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA DOENÇA DE PARKINSON.	22
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E LESÃO DO NEURÔNIO.	29
FIGURA 3 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS VIAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE CELULAR.	34
FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO BALANÇO PRÓ E ANTI-APOPTÓTICO NA DOENÇA DE PARKINSON E O OBJETIVO DE NOVOS TRATAMENTOS ALTERNATIVOS.	36
FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DE APOPTOSE CELULAR ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA INDUTORA DE APOPTOSE (AIF).	38
FIGURA 6 – VISÃO GERAL DAS REAÇÕES DE ELONGAÇÃO E DESSATURAÇÃO DAS FAMÍLIAS ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6.	41
FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO CONSUMO DE GORDURA NA POPULAÇÃO DA UNIÃO EUROPÉIA NOS ÚLTIMOS ANOS.	42
FIGURA 8 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DE CONVERSÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS EM EICOSANÓIDES.	44
FIGURA 9 – POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA DOENÇA DE PARKINSON.	47
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DOS PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO ENCEFÁLICO ENTRE AS ESPÉCIES.	48
FIGURA 11 – LINHA TEMPORAL REPRESENTATIVA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.	53
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.	56
FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA.	59
FIGURA 14 – ALTERAÇÕES NA PORCENTAGEM DE MASSA CORPORAL DAS RATAS PROGENITORAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.	67
FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA NO TESTE DE CAMPO ABERTO.	70
FIGURA 16 - DESEMPENHO NA AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO.	71
FIGURA 17 - DESEMPENHO NA AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DO NOVO OBJETO.	72
FIGURA 18 - CÉLULAS TIROSINA-HIDROXILASE (TH) IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA NOS ANIMAIS DE 21 DIAS DE VIDA.	73
FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA (DA), SEUS METABÓLITOS DOPAC E HVA, E RESPECTIVAS TAXAS DE RENOVAÇÃO.	75
FIGURA 20 – FIGURA REPRESENTATIVA E DENSIDADE ÓPTICA INTEGRADA DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP).	77

FIGURA 21 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E RAZÃO ENTRE AMBAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 21 DIAS.	78
FIGURA 22 – DESEMPENHO MOTOR AVALIADO NO TESTE DE CAMPO ABERTO 7 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO INTRANIGRAL AO LPS.	80
FIGURA 23 – AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO-ESPACIAL REALIZADO NO TESTE DE RECONHECIMENTO DO NOVO OBJETO 7 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO INTRANIGRAL AO LPS.	81
FIGURA 24 – FIGURA REPRESENTATIVA DOS NEURÔNIOS TIROSINA-HIDROXILASE (TH) IMUNORREATIVOS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA, AVALIADOS AOS 100 DIAS DE VIDA.	83
FIGURA 25 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA (DA), SEUS METABÓLITOS DOPAC E HVA, E RESPECTIVAS TAXAS DE RENOVAÇÃO.	85
FIGURA 26 – FIGURA ILUSTRATIVA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS GFAP IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA AVALIADA AOS 100 DIAS DE VIDA.	87
FIGURA 27 – FIGURA ILUSTRATIVA DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS OX-42 IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA AVALIADA AOS 100 DIAS DE VIDA.	88
FIGURA 28 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E RAZÃO ENTRE AMBAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 100 DIAS.	90
FIGURA 29 – EXPRESSÃO INTRANUCLEAR DA PROTEÍNA AIF NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 100 DIAS.	91
FIGURA 30 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DO FRACIONAMENTO CELULAR.	139

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESUMO DO ENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS OMEGA-3.....	43
TABELA 2 – REGISTRO DOS PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DA PROLE AO NASCIMENTO.....	68
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS MEMBRANAS DA SUBSTÂNCIA NEGRA	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** – serotonina
- 6-OHDA** – 6-hidroxidopamina
- AA** – ácido araquidônico
- AIF** – fator de indução de apoptose
- ALA** – ácido α -linolênico
- AGPIs** – ácidos graxos poli-insaturados
- BDNF** – fator neurotrófico derivado do encéfalo
- bNGF** – fator de crescimento do fibroblasto básico
- BH** – domínio Bcl-2 homólogo
- BHE** – barreira hemato-encefálica
- COX** – enzima ciclooxigenase
- DA** – dopamina
- DAT** – transportador de dopamina
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- DOI** – densidade óptica integrada
- DOPAC** – ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- DP** – doença de Parkinson
- DHA** – ácido docosahexaenoico
- e.g.* – por exemplo (do latim *exempli gratia*)
- EPA** – ácido eicosapentaenoico
- GDNF** – fator neurotrófico derivado da glia
- GFAP** – proteína fibrilar ácida
- HPLC** – cromatografia líquida de alta precisão
- HVA** – ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético
- i.e.* – isto é (do latim *id est*)
- i.p.* – intraperitônio
- IL** – interleucina
- LA** – ácido linoleico
- LOX** – enzima lipooxigenase
- LPS** – lipopolissacarídeo
- LTP** – potencial de longa duração

MAO-B – monoamina oxidase B
MPP⁺ – 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NGF – fator de crescimento do nervo
NORT – teste de reconhecimento do novo objeto
OLT – teste de localização do objeto
OP – óleo de peixe
PAR – polímero de poli-ADP-ribose
PARP-1 – poli-ADP-ribose polimerase
PB – tampão fosfato
PLA₂ – fosfolipase A₂
PPE – parkinsonismo pós-encefalite
SNC – sistema nervoso central
SNpc – substância negra parte compacta
TLR – receptor *toll like*
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
TH-ir – tiroxina-hidroxilase imunorreativo
VTA – área tegmentar ventral

LISTA DE SÍMBOLOS

ω – ômega

Δ – delta

β – beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	19
1.1.1 Etiologia.....	21
1.1.2 Evidências do envolvimento neuroinflamatório na etiologia da doença de Parkinson.....	23
1.1.3 O papel da glia na Doença de Parkinson	24
1.1.4 Doença de Parkinson e inflamação sistêmica	27
1.1.5 A exposição ao lipopolissacarídeo como modelo animal de doença de Doença de Parkinson.....	28
1.1.6 Uma visão dos insultos multifatoriais na Doença de Parkinson.....	31
1.1.7 Mecanismos apoptóticos na Doença de Parkinson	33
1.1.7.1 Apoptose via caspase independente.....	37
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS	39
1.2.1 Ácidos Graxos Poli-insaturados e seus mediadores inflamatórios	42
1.2.2 Ação dos ácidos graxos poli-insaturados na doença de Parkinson	45
1.2.3 A influência dos ácidos graxos poli-insaturados no desenvolvimento encefálico.....	47
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
4.1.1 Animais e suplementação	52
4.1.2 Re-exposição ao LPS na vida adulta	54
4.2 AVALIAÇÕES	56
4.2.1 Perfil lipídico	56
4.2.2 Testes Comportamentais	57
4.2.2.1 Teste do campo aberto	57
4.1.3.2 Avaliação da memória espacial e não espacial	58
4.2.3 Avaliação neuroquímica.....	60
4.2.4 Imunohistoquímica.....	60
4.2.5 Análise através da técnica de Western Blot	62
4.2.5.1 Avaliação das proteínas Bcl-2 e Bax.....	62
4.2.5.1 Fracionamento da amostra com centrifugação diferenciada – quantificação do AIF	63
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	67

6.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS NOS ANIMAIS DE 21 DIAS.....	68
6.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS NOS ANIMAIS DE 100 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO AO LPS INTRANIGRAL	79
7 DISCUSSÃO	92
7.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA GERAÇÃO F ₁ AOS 21 DIAS, E DA APLICAÇÃO DE LPS NA FASE EMBRIONÁRIA.....	94
7.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA GERAÇÃO F ₁ , E DA RE-EXPOSIÇÃO AO LPS INTRANIGRAL DURANTE A VIDA ADULTA (100 DIAS DE VIDA).....	103
8 CONCLUSÕES	113
9 REFERÊNCIAS	114
ANEXO 1.....	138
ANEXO 2.....	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta mais de 6 milhões de pessoas no mundo. A incidência desta patologia, nas pessoas com 65 anos ou mais é aproximadamente 160 por 100.000 habitantes (WIRDEFELDT *et al.*, 2011), o que a torna a segunda patologia neurodegenerativa mais prevalente, perdendo apenas para a doença de Alzheimer. Nos Estados Unidos a cada ano 60.000 novos casos são diagnosticados (WIRDEFELDT *et al.*, 2011) e mais de 20.000 mortes são atribuídas à DP (KOCHANNEK *et al.*, 2011).

A DP é clinicamente considerada como uma doença motora, caracterizada pela presença de três sintomas principais: tremor de repouso, rigidez e bradicinesia. A instabilidade postural, geralmente considerada como um dos sinais cardinais da DP é menos específica e pode ser considerada como uma manifestação dos estágios mais tardios da doença (PARKINSON, 2002). Em 70% dos pacientes o tremor de repouso, caracterizado por frequência entre 3-6 Hz, é o primeiro sintoma visível e predominante na parte distal das extremidades principalmente nas mãos, mas também pode ser visível no queixo, lábios e mandíbula (DOORN *et al.*, 2012). Outro sinal cardinal é a rigidez muscular, ou seja, resistência aumentada durante a movimentação articular passiva caracterizada na forma de roda denteada; geralmente mais pronunciada no membro de maior tremor. Esta rigidez é aumentada com a atividade motora contralateral ou quando se desenvolve, com o paciente, tarefas mentais de rendimento (SAMII *et al.*, 2004). O terceiro sintoma motor típico é a bradicinesia, que se remete à lentidão dos movimentos, e à dificuldade de desempenhar tarefas que necessitem de acuidade motora. Na realidade, a bradicinesia engloba uma variedade de outros sintomas presentes no portador de DP como a redução da expressão facial, dificuldade de deglutição e redução dos movimentos pendulares de braço durante a marcha (JANKOVIC, 2008).

Nas últimas duas décadas os sintomas não motores da DP também têm ganhado considerável atenção. A disfunção autonômica geralmente se manifesta na forma de constipação intestinal, frequência e urgência urinária, e hipotensão

ortostática – que acomete aproximadamente 50% dos casos (DOORN *et al.*, 2012). A depressão desenvolve-se em cerca de 40% dos indivíduos com DP, embora nas fases mais tardias da doença este índice alcance 80%. Além disso, a combinação de demência e os medicamentos utilizados para tratar os sintomas da doença podem gerar alucinações e comportamento psicótico em alguns indivíduos (SAMII *et al.*, 2004). Embora os distúrbios do sono tenham sido durante anos atribuídos à farmacologia fornecida aos pacientes, recentemente mostrou-se que esta característica é inerente à doença (GJERSTAD *et al.*, 2006). A insônia, particularmente a fragmentação do sono, também é frequente (50% de prevalência), mas a ocorrência é altamente variável entre pacientes (JANKOVIC, 2008).

Todos os sintomas motores da DP (*i.e.* tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural) foram descritos, de maneira quase irretocável, por James Parkinson em 1817. O médico inglês identificou seis casos, três foram pacientes examinados em seu consultório. Outros três foram descritos através de observação das pessoas portadoras da doença que transitavam nas ruas de Londres (PARKINSON, 2002). Entretanto, somente após 100 anos (1919) da descrição original de James Parkinson, a morte neuronal da substância negra parte compacta (SNpc) foi apontada como fator patológico central, e apenas 140 anos após sua descrição (1957) houve a correlação destes sintomas com a severa depleção de dopamina (DA) estriatal nos pacientes (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; BJORKLUND e DUNNETT, 2007).

Correlações entre análises clínicas e neuroquímicas mostram que os sintomas cardinais da DP somente aparecem quando a redução neuronal na SNpc excede aproximadamente 50%, e quando os níveis estriatais de DA são depletados em aproximadamente 80% ou mais (DEBEIR *et al.*, 2005). Embora a perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc seja nomeado como fator patológico primário da DP, também é observada morte neuronal difusa que pode ocorrer no *locus coeruleus*, no núcleo motor do nervo vago, nervo glossofaríngeo, núcleo basal de Meynert, e em fases avançadas, morte neuronal no neocortex (LONG-SMITH *et al.*, 2009). Braak *et al.*, (2003) examinaram 110 encéfalos de pacientes com DP e notaram que a progressão da doença segue uma “sequência pré-determinada” de eventos, e as categorizaram dentro de uma escala de evolução. O estágio 1 e 2 envolve a patologia na estrutura olfatória, medula oblonga e parte do tegmento pontino. Os estágios 3 e 4 envolvem a patologia na SNpc e afetam algumas áreas

prosencefálicas. Nos estágios 5 e 6 são encontradas degenerações nas áreas sensoriais do córtex e áreas pré-motoras (BRAAK *et al.*, 2003).

Atualmente os tratamentos para a DP são predominantemente paliativos; reduzem os sintomas e melhoram a qualidade de vida do indivíduo no período de 5-8 anos. No final deste período, a maioria desenvolve complicações neuropsiquiátricas e motoras (discinesias) (KULISEVSKY *et al.*, 2013). Esta observação reforça a necessidade de terapias neuroprotetoras que induzam benefícios duráveis e que influenciem no aparecimento da doença e/ou os déficits subsequentes à perda dos neurônios dopaminérgicos.

1.1.1 Etiologia

A maior parte dos surgimentos da DP é idade-relacionada; em países desenvolvidos ela afeta aproximadamente 1% da população com até de 60 anos. Na população acima de 60 anos atinge nível de presença de até 4% (LONG-SMITH *et al.*, 2009).

Em 90-95% dos casos a DP ocorre de maneira idiopática, enquanto nos remanescentes 5-10% está presente uma mutação genética. Atualmente 10 *loci* genéticos associados com a DP de origem genética autossômica dominante ou recessiva foram identificados (WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Em 1997, a α -sinucleína (PARK1) foi a primeira mutação identificada em linhagens originárias da Itália/América em três famílias gregas não relacionadas (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997). Esta descoberta inaugurou a Era da investigação genética da DP, e a procura de herança autossômica dominante ou recessiva que condicionam à patologia. Além das causas genéticas determinantes da DP, foram descobertos genes que não condicionam a ocorrência da doença, mas aumentam o seu risco (genes predisponentes). Todavia, estas pesquisas sugerem que a suscetibilidade genética desempenha um papel significativo na doença de início precoce, e menos importante na doença de aparecimento tardio (SAMII *et al.*, 2004).

Por outro lado, apesar dos recentes progressos na compreensão da etiologia da DP idiopática, os mecanismos pelos quais o processo neurodegenerativo se inicia e progride ainda não são totalmente claros. Diferentes fatores como envelhecimento, vulnerabilidade genética e toxinas podem propiciar alterações

celulares e moleculares envolvidas na morte neuronal dopaminérgica, incluindo excitotoxicidade e disfunção mitocondrial (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; GAUTIER et al., 2014) (FIGURA 1).

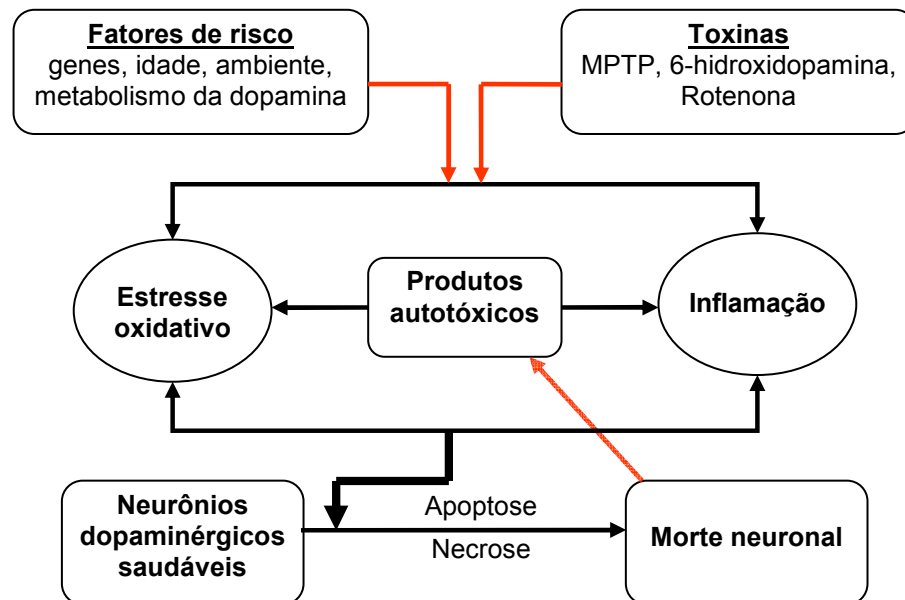


FIGURA 1 – INTERAÇÃO SINÉRGICA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MORTE DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NA DOENÇA DE PARKINSON.
FONTE: adaptado de Espósito et al., (2007).

Análises *post-mortem* de tecido encefálico de indivíduos parkinsonianos, modelos animais, e cultura de células suportam o envolvimento do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na patogênese da DP (revisado por HAUSER e HASTINGS, 2013). O estresse oxidativo, decorrente da excessiva produção de espécies reativas de oxigênio pode, potencialmente, danificar os lipídeos celulares, proteínas e o DNA. Além disso, significativas alterações do sistema de defesa antioxidante, particularmente reduzidos níveis de glutathiona, foram encontrados na SNpc de pacientes com DP (SIAN *et al.*, 1994). A auto-oxidação da dopamina, uma reação conhecida por gerar superóxido e peróxido de hidrogênio, bem como quinonas de dopamina, também pode contribuir para o dano dos neurônios dopaminérgicos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Recentemente, estudos também apontam o processo inflamatório como um fator contribuinte na cascata de eventos que leva à

morte celular na DP. Esses mecanismos compreendem a ativação microglial, a astrogliose e a infiltração de linfócitos no sistema nervoso central (SNC). Desta forma, os consequentes insultos neuronais cumulativos imputáveis a todos estes fatores de estresse podem promover prematura degeneração dopaminérgica através de programas apoptóticos e desencadear e/ou contribuir no desenvolvimento da DP (BARLOW *et al.*, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2007; HIRSCH e HUNOT, 2009).

1.1.2 Evidências do envolvimento neuroinflamatório na etiologia da doença de Parkinson

A pandemia de gripe, no final da primeira guerra mundial (1914 - 1918), foi associada a um aumento considerável no número de casos (+50%) de parkinsonismo pós-encefalite (PPE) diagnosticados nas décadas de 1920 e 1930 (JOSEPHS *et al.*, 2002). Todavia, a mais convincente e completa evidência do envolvimento inflamatório na DP surgiu em estudo *post-mortem* no qual McGEER *et al.*, (1988) encontraram ativação da microglia e presença de linfócitos T na SNpc de pacientes parkinsonianos. A presença do processo inflamatório também teve confirmação em bases moleculares: a concentração de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), além dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) se mostraram elevados no encéfalo e líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP (MOGI *et al.*, 1994a; MOGI *et al.*, 1994b). Ampliando este conceito, estudo posterior confirmou que os neurônios dopaminérgicos expressam receptores para estas citocinas inflamatórias e que, esta expressão está aumentada nos indivíduos portadores da DP (MOGI *et al.*, 2000).

A partir dessas constatações tornou-se essencial o entendimento do processo inflamatório na DP para elucidar possíveis mecanismos etiológicos e, eventualmente, desenvolver estratégias terapêuticas efetivas. Neste propósito, alterações celulares e moleculares visualizadas nos encéfalos humanos, principalmente a reação glial envolvendo astrócitos e células da microglia, foram reproduzidas em modelos animais submetidos à injeção intracerebral de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (AKIYAMA e MCGEER, 1989; RODRIGUES *et al.*, 2001) e injeção periférica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (YASUDA *et al.*, 2008). Todavia, nas últimas duas décadas a inflamação induzida pela injeção de

lipopolissacarídeo (LPS) tem replicado com ampla fidedignidade características da DP (LIU e BING, 2011).

1.1.3 O papel da glia na Doença de Parkinson

A inflamação é uma reação de defesa do organismo contra um estímulo agressor. No SNC o principal sistema imune defensivo inato é desempenhado por células imunocompetentes denominadas microglia. Na formação embrionária, a microglia tem origem mesodérmica, e provavelmente pertence à linhagem mielóide que infiltra o SNC durante a fase pré-natal e início da fase pós-natal (LADEBY *et al.*, 2005). Estas células entram no SNC através da corrente sanguínea, terceiro ventrículo e meninges (CUADROS e NAVASCUES, 1998). Embora presente em todas as áreas do encéfalo a microglia não é uniformemente distribuída, com variação entre 5% no córtex cerebral, 12% na substancia negra, a 16,6% na medula oblonga, da proporção total das células (MITTELBRONN *et al.*, 2001). Tradicionalmente a microglia era considerada principalmente por seu papel de remover debris celulares (BARRON, 1995). No entanto, de acordo com Long-Smith *et al.*, (2009), a microglia tem um papel chave no SNC tanto no desenvolvimento como na fase adulta do indivíduo. No encéfalo saudável é postulado que a microglia possui um estado de “repouso” com morfologia ramificada característica (CUADROS e NAVASCUES, 1998). No entanto microglia em repouso, contrariamente ao que sugere seu nome, não está estática. Estudo com imagens *in vivo* utilizando fotomicroscopia demonstrou que a microglia em repouso, em um estado normal, não move seu corpo celular, mas demonstra alta habilidade em movimentar rapidamente suas ramificações através de protusões e retrações, formando bulbos terminais. Para os autores, através desta mobilidade ela constantemente monitora a área na qual reside contra patógenos e mudanças no microambiente, além de realizar a limpeza de produtos metabólicos e componentes de tecido deteriorado (NIMMERJAHN *et al.*, 2005).

Como a microglia é particularmente sensível às mudanças em seu microambiente, pode ser facilmente ativada por mudanças imunológicas (bacteriana ou viral), lesão neuronal (trauma cerebral) e outros fatores, incluindo síndromes inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, esclerose múltipla) e toxinas ambientais

(pesticidas) (TANSEY e GOLDBERG, 2010). Uma vez ativada, a microglia pode destruir micro-organismos invasores, remover debris potencialmente deletérios, promover reparação tecidual através da secreção de fatores de crescimento, e ainda facilitar a manutenção da homeostase no encéfalo (ORR *et al.*, 2002; LONG-SMITH *et al.*, 2009). Neste contexto, estudos utilizando marcação radioativa em células da medula óssea confirmaram que células progenitoras podem migrar, em pequena quantidade, do tecido periférico em direção ao parênquima neuronal e diferenciar-se em microglia após insulto cerebral mesmo em fase adulta (LADEBY *et al.*, 2005). Além disso, a microglia residente no SNC pode sofrer renovação através do processo de mitose para aumentar o número de células na área afetada durante um insulto neuronal (AJAMI *et al.*, 2007).

Na situação de ativação a microglia sofre mudanças conformacionais para uma forma amebóide facilitando sua proliferação, migração e o processo de fagocitose (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Assim, após um insulto, a microglia - utilizando-se de ATP liberado a partir dos astrócitos - consegue se direcionar aos locais da lesão e cercar a área de insulto para proteger as células adjacentes (DAVALOS *et al.*, 2005), através da secreção de moléculas imunorreguladoras como citocinas, quimiocinas, neurotrofinas, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HIRSCH e HUNOT, 2009).

A existência de processo inflamatório e ativação da microglia em paciente portadores de DP foi descrita primariamente em estudo *post-mortem* realizado por (McGEER *et al.*, 1988). Este achado foi posteriormente corroborado por Gerhard *et al.*, (2006) que mostraram imagens *in vivo* da ativação microglial em pacientes parkinsonianos através da tomografia de emissão de pósitrons. Especificamente os pacientes com DP idiopática tiveram significativa ativação microglial independente da fase da doença em que se encontravam. Estes dados sugerem que a ativação microglial mostra-se presente já nas fases iniciais da doença, e permanece neste estado durante toda sua progressão, tornando constante o estado inflamatório e a vulnerabilidade da população neuronal (GERHARD *et al.*, 2006).

Como nas últimas décadas os astrócitos se tornaram reconhecidamente importantes na função encefálica normal, o papel destas células na doença neurológica também ganhou relevância. Os astrócitos são as mais numerosas células constituintes da glia (RAPOLD e TIEU, 2010) e podem estar funcionalmente envolvidos na: (1) liberação e suprimento dos neurônios com fatores

tróficos (COLANGELO *et al.*, 2014); (2) regulação basal da transmissão sináptica, uma vez que os astrócitos detectam a liberação de neurotransmissores durante a sustentada e intensa atividade das redes neuronais (PANATIER *et al.*, 2011); (3) eficiência sináptica, pois além de os astrócitos estarem perfeitamente posicionados controlando as membranas pré e pós-sinápticas, estão envolvidos na modulação de Ca^{2+} no local (PANATIER *et al.*, 2011); (4) modulação da plasticidade neuronal e na formação de memória (HENNEBERGER *et al.*, 2010); e (5) no envolvimento em diversas funções durante o desenvolvimento, incluindo a sinaptogênese (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; CHUNG e BARRES, 2011).

Todavia, o envolvimento neuroprotetor e neurodegenerativo dos astrócitos depende amplamente das moléculas que são por ele liberadas no espaço extracelular, uma vez que astrócitos, neurônios e microglia estão em íntimo contato. Os astrócitos podem liberar e suprir os neurônios com fatores neurotróficos, como o fator de crescimento da glia (NGF), neurotrofina-3, e fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF), assim como o antioxidante glutatona, para a sobrevivência e o bom funcionamento dos neurônios (RAPPOLD e TIEU, 2010). Por outro lado, quando estas células estão em um processo de ativação, denominado astrogliose, liberam citocinas e quimiocinas que são deletérios aos neurônios (SOFRONIEW e VINTERS, 2010).

A reação astrocitária é uma característica neuropatológica presente na DP. Utilizando a marcação para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Damier *et al.*, (1993) demonstraram em estudo *post-mortem* que os astrócitos são heterogeneamente distribuídos no encéfalo de indivíduos normais e, comparativamente, os parkinsonianos apresentavam, em análise quantitativa, aumento de 30% destas células na SNpc (DAMIER *et al.*, 1993). Recentemente astrócitos imunorreativos para inclusões de α -sinucleína foram relatados em indivíduos portadores de DP idiopática (BRAAK *et al.*, 2007), contudo os efeitos adversos da acumulação desta proteína nos neurônios têm sido amplamente estudados; no entanto, a sua presença nos astrócitos ainda é pouco explorada.

Uma revisão de literatura nos revela rapidamente que a maioria dos resultados de pesquisa sobre neuroinflamação aponta o envolvimento da microglia. No entanto, diversas evidências sugerem que os astrócitos também estão envolvidos neste cenário numa condição patológica (RAPPOLD e TIEU, 2010; McGANN *et al.*, 2012). Nesta situação, citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α

são liberados pela microglia e podem resultar em ativação parácrina dos astrócitos. Esta ativação, em última instância, gera uma produção de mediadores tóxicos pelos astrócitos, que inclui óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Esses fatores podem atuar aditivamente ou sinergicamente com os fatores neurotóxicos produzidos pela microglia, fechando um círculo vicioso que leva, inevitavelmente, a um ambiente hostil para a sobrevivência neuronal (SAIJO *et al.*, 2009).

Assim, uma importante hipótese para a etiologia da DP é que um fator de iniciação transitória (e.g. exposição a toxinas, vírus, infecções, pesticidas, etc.) pode gerar um ciclo de auto-perpetuação na ativação microglial/astrocitária através da secreção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 β que podem diretamente desencadear o mecanismo de morte celular ou ainda atuar na amplificação da resposta inflamatória.

1.1.4 Doença de Parkinson e inflamação sistêmica

O SNC é considerado imunologicamente privilegiado pela barreira hematoencefálica (BHE) que previne a entrada de patógenos e células imunes no parênquima encefálico. Contudo, nos últimos anos esta concepção tornou-se mais maleável, uma vez que na maioria das neuropatologias, incluindo a DP, existe importante fator inflamatório na etiologia/progressão da doença (MOSLEY *et al.*, 2006). Na realidade, a inflamação e a perturbação na BHE podem desempenhar papel importante na neurodegeneração através do comprometimento da unidade vascular e a indução da migração exagerada de leucócitos para dentro do parênquima (STOLP e DZIEGIELEWSKA, 2009).

Existem diversas evidências que sugerem a ligação entre inflamação periférica e a DP (FERRARI e TARELLI, 2011). A pandemia de gripe durante a segunda guerra mundial foi associada a aumento considerável no número de casos de parkinsonismo (JOSEPHS *et al.*, 2002). Em adição, estudo realizado por Jang *et al.*, (2009) demonstrou que ao infectar camundongos com vírus H5N1 houve dano no SNC, uma vez que observaram ativação intensa da microglia, fosforilação e agregação da α -sinucleína, e intensa morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc após 60 dias da infecção. Com estes dados os autores sugerem que uma reação viral pode iniciar uma patologia no SNC, principalmente a DP (JANG *et al.*, 2009).

Estudo realizado por Qin *et al.*, (2007) demonstrou que camundongos expostos a uma única injeção periférica de LPS, mimetizando uma ocorrência de sepse e inflamação periférica, pode resultar em propagação da neuroinflamação pois: (1) houve extensa reação microglial e neuroinflamação que persistiu 10 meses após o processo inflamatório ter cessado; e (2) demonstraram morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc de maneira progressiva similar ao visualizado nos pacientes portadores desta patologia (QIN *et al.*, 2007).

A partir destas constatações, terapias utilizando drogas anti-inflamatórias foram utilizadas em pacientes com DP. Usuários crônicos de droga anti-inflamatória não esteroide, como ibuprofeno – um inibidor da enzima ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1; COX-2) - exibiram reduzida incidência de DP (CHEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2003). A minociclina, um derivado que atravessa a BHE e reduz a ativação microglial, a proliferação e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, reduziu a reação inflamatória induzida por LPS, e mostrou efeito benéfico sobre a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos em modelo animal de DP (TOMAS-CAMARDIEL *et al.*, 2004).

Assim, a interação entre inflamação encefálica e sistêmica não pode ser descartada (FIGURA 2), e deve ser considerada como fator de risco na etiologia da DP e na sua progressão. O conhecimento claro dos mecanismos implicados nesta interface pode ajudar a melhorar a terapêutica e criar ferramentas que levem a uma melhor qualidade de vida do paciente, reduzindo a exacerbação dos sintomas da DP, e retardando a progressão da doença.

1.1.5 A exposição ao lipopolissacarídeo como modelo animal de doença de Doença de Parkinson

A história do entendimento sobre LPS iniciou-se no final do século XIX, quando Richard Pfeiffer utilizou lisado inativado da bactéria *Vibrio cholerae* para induzir reações fisiopatológicas em cobaias (SCHLETTTER *et al.*, 1995). Este princípio tóxico foi à época nomeado de endotoxina. Quimicamente, endotoxina é constituído de lipopolissacarídeos que estão presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. LPS de diferentes espécies contém uma arquitetura básica composta por três segmentos ligados covalentemente: (1) uma cadeia

polissacarídica (mais de 50 unidades oligossacarídicas) denominada O-específica; (2) uma região polissacarídica de localização intermediária; e (3) um componente lipídico denominado lipídio-A. A estrutura do lipídio-A é o princípio endotóxico que varia dentre as diferentes espécies de bactérias, e a ele são atribuídos diversas atividades biológicas patogênicas (SCHLETTER *et al.*, 1995).

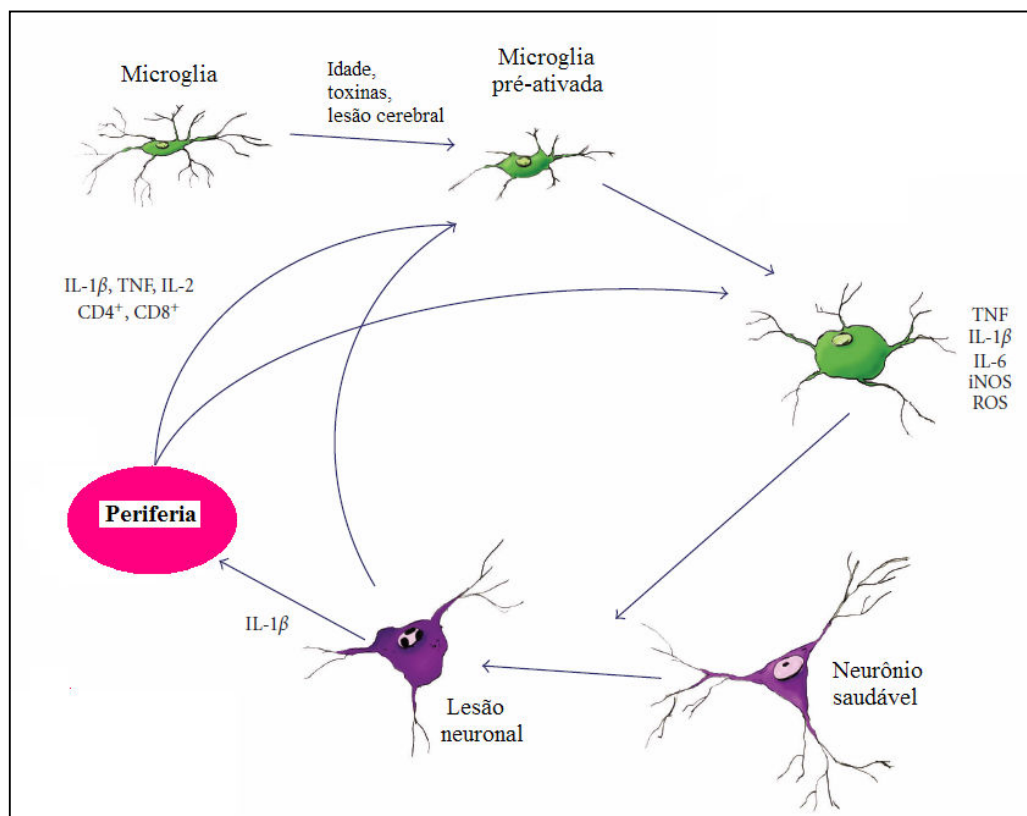


FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E LESÃO DO NEURÔNIO.

FONTE: adaptado de Ferrari e Tarelli (2011)

Lipopolissacarídeo de várias espécies como *Salmonella*, *Pseudomas*, *Vibrio*, *Escherichia*, podem iniciar uma resposta inflamatória aguda e induzir amplos efeitos, desde febre à septicemia. Estudo publicado relata que a auto-injeção intravenosa de 1mg de LPS de *Salmonella minnesota* foi suficiente para gerar quadro de choque séptico e disfunção múltipla de órgãos em paciente apenas duas horas após a exposição à endotoxina (TAVEIRA DA SILVA *et al.*, 1993). Posteriormente, um caso relatado por Niehaus e Lange (2003) confirmou um risco potencial entre a infecção com LPS e o desenvolvimento de DP. Um técnico de laboratório, após

exposição acidental a 10µg de *Salmonella minnesota* através de uma ferida aberta, desenvolveu síndrome parkinsoniana com bradicinesia, rigidez com o fenômeno da roda denteada e tremor, três semana após o incidente. O LPS causou uma inflamação crônica no SNC que também desencadeou dor nevrálgica, polineuropatia e déficits de memória, aprendizado e orientação espacial (NIEHAUS e LANGE, 2003).

Bronstein *et al.*, (1995) desenvolveram trabalho pioneiro comparando o comportamento de cultura de células mesencefálicas de ratos frente à aplicação de 6-OHDA e LPS. Estes autores relatam que na cultura enriquecida de neurônios a 6-OHDA gerou a morte de 89% dos neurônios tirosina-hidroxilase imunorreativos (TH-ir), mas que a aplicação de 50µg de LPS não foi neurotóxico. Por outro lado, na cultura que continha neurônio e glia, a 6-OHDA gerou morte de somente 27% dos neurônios TH-ir em comparação aos 70% de morte gerada pela aplicação de LPS. Este experimento sugere que a morte neuronal dopaminérgica induzido por LPS está associada à presença de microglia (BRONSTEIN *et al.*, 1995). Estudo com cultura neuronal primária comprovou que a neurotoxicidade ao LPS ocorre através da ligação com receptores específicos – *toll-like receptors* (TLR), principalmente TLR4 e que a microglia é a célula com maior número de expressão deste receptor no SNC (LEHNARDT *et al.*, 2003).

Castanho *et al.*, (1998) foram um dos pioneiros a estudar a resposta inflamatória do sistema nigroestriatal frente à injeção intranigral de LPS. Este mesmo grupo de pesquisadores constatou, em estudo posterior, que o dano neuronal induzido pelo LPS se mostrou permanente quando avaliado um ano após a injeção. Além disso, não foram detectadas alterações significativas tanto nos neurônios GABAérgicos e serotoninérgicos no estriado e na substância negra dos ratos quando aos 15 dias, 3, 6 e 12 meses após a injeção de LPS, indicando a aplicação de LPS era restrita aos neurônios dopaminérgicos, e que poderia ser utilizados como modelo de estudo para DP (HERRERA *et al.*, 2000). A partir destas constatações, nas últimas duas décadas estudos em animais têm demonstrado que a inflamação induzida pela aplicação de LPS pode amplamente replicar alterações celulares e moleculares características da DP, e provê uma ferramenta útil para investigação do processo inflamatório e do estudo de drogas potencialmente protetoras.

1.1.6 Uma visão dos insultos multifatoriais na Doença de Parkinson

Baseados na hipótese de que a causa da DP é resultante da interação sinérgica de múltiplos fatores, vários trabalhos experimentais examinaram o potencial da exposição pós-natal a algumas toxinas ambientais na indução desta patologia. Dentre elas o Paraquat, um pesticida estruturalmente similar ao 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) e o Maneb, um fungicida amplamente utilizado na agricultura. Em trabalho realizado por Cory-Slechta *et al.*, (2005), camundongos expostos a um primeiro insulto, com Paraquat associado ao Maneb, no período perinatal, e novamente re-expostos às duas toxinas na fase adulta, mostraram consequências adversas na atividade locomotora e na contagem neuroquímica das células dopaminérgicas, sugerindo efeito deletério progressivo e permanente nos neurônios TH-ir. Em outro estudo, no qual um grupo de ratos foi alimentado com uma dieta enriquecida com ferro, viu-se que esta dieta aumentou a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos aos efeitos nocivos do MPTP na proporção em que a idade do animal avançava. Para estes autores o resultado sugere que houve uma toxicidade silenciosa, com um tempo de latência e progressão, que são características muito importantes no estabelecimento da DP (KAUR *et al.*, 2007).

Alguns pesquisadores sugerem que as exposições aos fatores desencadeantes da DP se dêem no período de vida adulta (CICCHETTI *et al.*, 2005), porém, nos últimos anos, alguns começaram a especular que fatores específicos, que ocorreram ainda com o indivíduo intra-útero, ou ainda, fatores perinatais, podem predispor o sistema nigroestriatal a um dano posterior (LING *et al.*, 2002; LING *et al.*, 2004a; LING *et al.*, 2004b; LING *et al.*, 2006). Para estes autores insultos distintos como explicação etiogênica da DP são de bastante relevância porque suscita a possibilidade de interações sinérgicas, nas quais cada insulto acelera individualmente o declínio da função do sistema dopaminérgico. Além disso, para Cory-Slechta *et al.*, (2005) o potencial para efeitos adversos, especificamente durante o período pré-natal, se deve a uma série complexa de eventos associados ao desenvolvimento do encéfalo, uma vez que, durante este período, as células estabelecem conexões funcionais, que, em última análise, são a base do comportamento humano.

Baseados nos achados que citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no encéfalo de pacientes com DP, e que o LPS é uma toxina indutora dessas citocinas,

alguns autores hipotetizaram a administração dessa droga, em ratas grávidas, como um modelo de degeneração do sistema dopaminérgico. Nesse estudo, a administração i.p. de 1mg/kg de LPS, em ratas no dia 10,5 da gestação, foi suficiente para aumentar o nível de TNF- α , reduzir a concentração de DA estriatal e o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc e na área tegmentar ventral dos filhotes, quando avaliados 10 e 21 dias após o nascimento (LING *et al.*, 2002).

Em estudo posterior Ling *et al.*, (2004b) questionaram se o dano gerado ao sistema dopaminérgico, conseqüente à exposição pré-natal ao LPS, poderia deixá-lo mais vulnerável aos efeitos tóxicos da neurotoxina 6-OHDA, em uma futura exposição. Nos resultados estes autores verificaram que aos 120 dias de vida, o animal exposto pré-natalmente ao LPS ainda apresentava uma redução significativa das células TH-ir e aumentado índice de TNF- α . O que contribuiu significativamente para uma perda adicional de neurônios dopaminérgicos após a injeção da 6-OHDA, sugerindo que indivíduos expostos ao LPS, durante a vida fetal, teriam aumentado risco de aparecimento da DP.

Um paradigma similar, de exposição pré-natal ao LPS, foi usado em outro experimento (LING *et al.*, 2004a); porém nesse estudo os animais foram avaliados 16 meses após o nascimento e alguns foram re-expostos, na vida adulta, ao pesticida rotenona. Segundo os autores, os efeitos da exposição ao LPS, durante a vida intra-útero, ainda se mostravam presentes quando o animal já estava com idade mais avançada (510 dias). O efeito sinérgico do LPS e da exposição à rotenona durante a fase adulta, propiciou significativa redução das células TH-ir, corroborando trabalhos anteriores que sugerem que um estado inflamatório pré-existente, associado a insultos posteriores pode ser a causa do desenvolvimento da DP. Assim, esses resultados não só confirmam a hipótese do envolvimento de múltiplos fatores envolvidos na etiologia da DP, mas também indicam que a perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos, que caracteriza a DP, pode ser uma conseqüência de alterações sinérgicas das respostas inflamatórias produzidas por uma exposição à toxina na vida intra-útero e insultos posteriores durante a vida adulta.

1.1.7 Mecanismos apoptóticos na Doença de Parkinson

A morte celular por apoptose é um fenômeno fisiológico fundamental pois envolve o controle entre proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento, e otimiza a função da célula/tecido na vida adulta (KRANTIC *et al.*, 2007). O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas associadas à apoptose inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, redução do volume celular, diminuição do contato entre células vizinhas, condensação cromatínica, fragmentação da membrana nuclear e celular, e formação de corpos apoptóticos (CHAABANE *et al.*, 2013). Porém, quando a morte celular apresenta todas essas características, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo, não constitui um processo programado, mas uma resposta celular às mudanças ambientais (GHAVAMI *et al.*, 2014).

O processo de apoptose (apoptose clássica ou caspase dependente) pode ser regulado por inúmeros moduladores, incluindo íons (*e.g.* cálcio) (MATTSON e CHAN, 2003), genes (*e.g.* família Bcl-2) (VAN der HEIDE e SMIDT, 2013), proteínas (*e.p.* p53, caspases) e organelas (mitocondria e retículo endoplasmático) (ULUKAYA *et al.*, 2011). De acordo com a literatura estes moduladores podem ser ativados por duas vias distintas: as que são induzidas por sinais de estresse extracelular (extrínseca), e o estresse intracelular (intrínseca) (KRANTIC *et al.*, 2007; CHAABANE *et al.*, 2013). A apoptose extrínseca é mediada principalmente por receptores de morte celular (receptores TNF, ligante Fas, TRAIL, TWEAK), que desencadeiam ativação intracelular das caspases iniciadoras (caspase-8 e -10) e, por conseguinte, as caspases executoras (caspase -3, -6, -7). Já a apoptose induzida pela via intrínseca ocorre em resposta a condições de estresse intracelular (danos no DNA, estresse oxidativo), e é controlada principalmente pelos membros da família Bcl-2 e pela mitocondria (VAN der HEIDE e SMIDT, 2013). Esta organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c e o fator de indução de apoptose (AIF) que podem dar sequência no processo de apoptose por vias caspase dependente e independente respectivamente (KRANTIC *et al.*, 2007) (FIGURA 3).

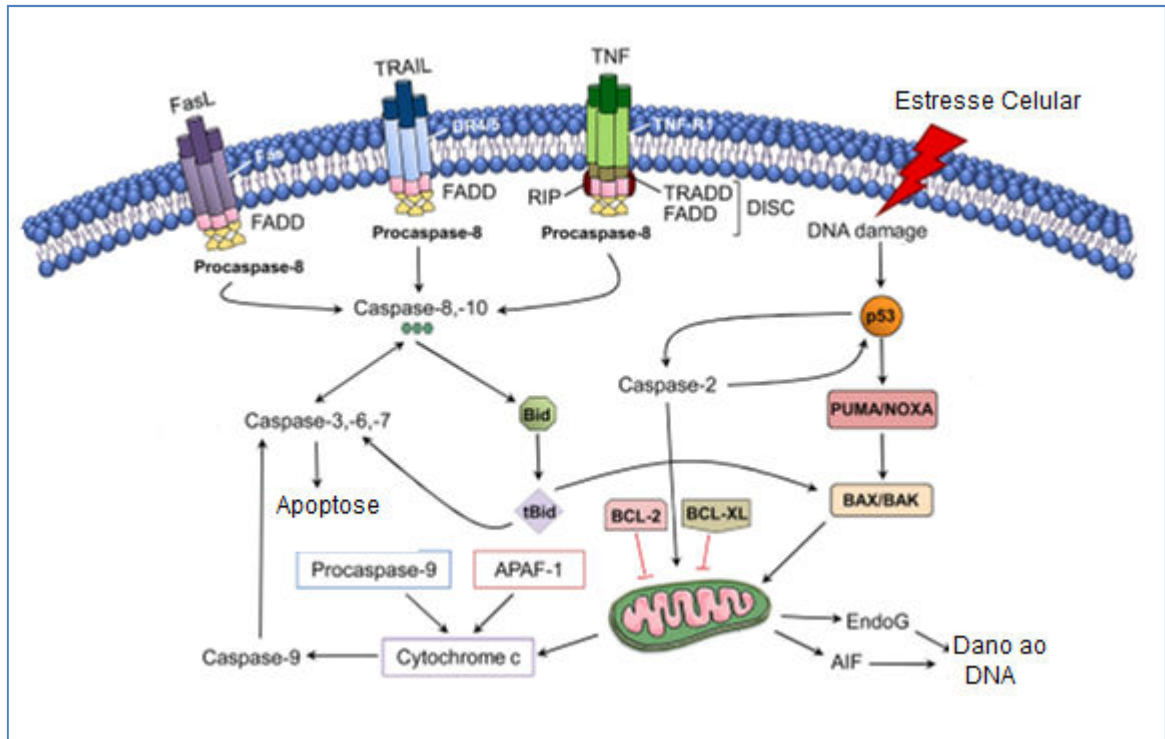


FIGURA 3 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS VIAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE CELULAR
 FONTE: Ghavami *et al.*, (2014)

A família das proteínas Bcl-2 é denominada como reguladora central da apoptose, porque integra diversos sinais de morte que são gerados dentro e fora da célula. Esta família consiste em pelo menos 30 proteínas relacionadas, caracterizadas pela presença de até 4 sequências de cadeias de aminoácidos curtos (menos que 20 carbonos) denominados domínios Bcl-2 homólogos (BH), e uma cadeia terminal hidrofóbica. A partir do arranjo destes domínios, a família pode ser dividida em três subclasses com base nas suas características estruturais e funcionais, a saber (TZIFI *et al.*, 2012):

a) Anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W

Esta subfamília denominada anti-apoptótica possui todos os quatro domínios BH conservadas, o que a torna estruturalmente estabilizada; fator chave para sua função anti-apoptótica, uma vez que as proteínas pró-apoptóticas não possuem o domínio BH4. A proteína Bcl-2 é uma das proteínas que inibe a apoptose através da preservação da integridade da membrana mitocondrial. Além disso, ela impede a formação de dímeros formados por Bax e Bak, inibindo a liberação de moléculas apoptóticas da mitocôndria. A Bcl-2 tem a capacidade de ligar-se a proteínas pró-

apoptóticas (e.g Bax) e inativá-las. Além disso, compete por sítios que seriam ocupados por estas proteínas na membrana mitocondrial, inibindo assim a apoptose (TZIFI *et al.*, 2012).

b) Pró-apoptóticas: Bax, Bak e Bok

Estes membros pró-apoptóticos normalmente compartilham um sequência similar nos domínios BH1, BH2 e BH3. Bax é uma proteína monomérica presente no citosol que, durante a apoptose oligomeriza-se e integra a membrana mitocondrial resultando na liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c e AIF. Entretanto, a formação de poro mitocondrial pode ser impedida pelo aumento de expressão da proteína Bcl-2, uma vez que esta proteína pode formar dímeros com Bax e minimizar sua função pró-apoptótica (TZIFI *et al.*, 2012; VAN der HEIDE e SMIDT, 2013).

c) Proteínas BH3

Incluem um número de proteínas pró-apoptóticas, tais como Bid, Bim, Bik, Bad. Estas atuam como sensores de estresse e são organizados com base em sua capacidade de ativar ou inibir outros membros da família Bcl-2 (TZIFI *et al.*, 2012).

O processo de apoptose deve ser executado no organismo de forma extremamente precisa, pois a exacerbação ou a privação deste processo é um importante fator para o desenvolvimento de doenças. Firmados nesta importância, a partir da década de 1990, o processo apoptótico foi vinculado às doenças neurodegenerativas (MATTSON, 2000). Neste mesmo período, análises no encéfalo de pacientes parkinsonianos confirmaram dano no DNA relacionado à apoptose (ANGLADE *et al.*, 1997).

Trabalhos realizados em modelos animais com a aplicação de MPTP e 6-OHDA apontaram a contribuição da apoptose na indução da morte neuronal dopaminérgica (BLUM *et al.*, 2001; VAN der HEIDE e SMIDT, 2013; REKHA e SELVAKUMAR, 2014). Todavia, os caminhos que levam a este processo podem variar. Basicamente duas vias bioquímicas podem ser distinguidas: uma envolve a ligação de receptores de morte com seus ligantes (e.g. interleucinas, TNF α); e outra, várias formas de estresse celular (e.g. falta do suporte dos fatores de crescimento, dano no DNA, drogas tóxicas, espécies reativas de oxigênio) podem desencadear a formação do poro transitório mitocondrial e, conseqüentemente a liberação de

proteínas que potencializam a morte celular (TATTON *et al.*, 2003; ULUKAYA *et al.*, 2011).

A formação do poro mitocondrial é regulada pela ação de fatores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL) que servem como estabilizadores mitocondriais. Desta forma, pesquisas recentes suscitam o alvo das vias moleculares durante a apoptose como nova estratégia de tratamento (YAMADA *et al.*, 2010; VAN der HEIDE e SMIDT, 2013) (FIGURA 4). A rasagilina (Azilect®) é um inibidor da monoamina oxidase B (MAO-B). A MAO-B catalisa a quebra de dopamina, liberando o hidrogênio peróxido, que é em parte responsável pelo dano oxidativo na DP. Em estudo realizado por Maruyama *et al.*, (2002) a rasagilina além de inibir a apoptose induzida por neurotoxinas *in vitro* e *in vivo*, impediu a permeabilidade mitocondrial devido a superexpressão de proteínas Bcl-2 (MARUYAMA *et al.*, 2002). Em outro estudo, o antibiótico minociclina inibiu a atividade microglial e se mostrou efetivo em inibir a apoptose, prevenindo o estresse oxidativo, a liberação de citocromo c da mitocôndria, além de aumentar a expressão da proteína anti-apoptótica de Bcl-2 e interromper a ativação da caspase-3 em vários modelos de doenças neurodegenerativas, tais como Doença de Huntington, Alzheimer e DP (KIM e SUH, 2009).

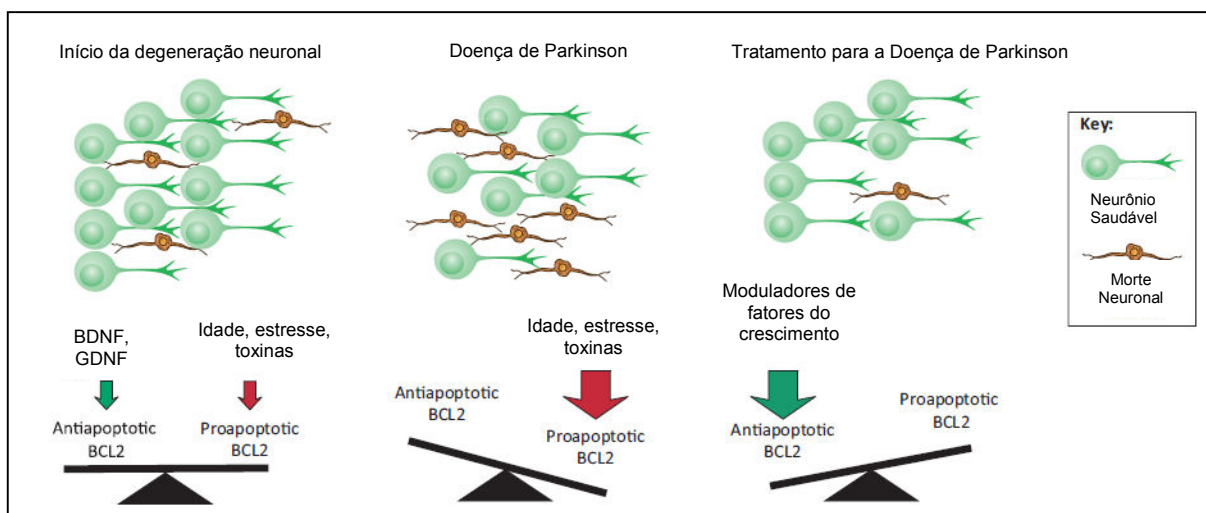


FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO BALANÇO PRÓ E ANTI-APOPTÓTICO NA DOENÇA DE PARKINSON E O OBJETIVO DE NOVOS TRATAMENTOS ALTERNATIVOS
 FONTE: adaptado de Van der Heide e Smidt (2013)

1.1.7.1 Apoptose via caspase independente

O fator de indução de apoptose (AIF – do inglês *Apoptosis-Inducing Factor*) foi identificado no final da década de 1990 como um fator liberado pelas mitocôndrias e que, de forma isolada, causou mudanças apoptóticas, como condensação da cromatina e fragmentação internucleossomal (SUSIN *et al.*, 1996). Até hoje, muitos aspectos das funções desempenhadas pelo AIF continuam desconhecidos. Sabe-se que o AIF é uma proteína mitocondrial que possui uma natureza dual no controle da vida ou morte celular. Na apoptose, ela é translocada ao núcleo, e desempenha uma função pró-apoptogênica via caspase independente. Por outro lado, durante atividade normal está envolvido na função anti-apoptótica através da atividade de oxirredução que desempenha (OTERA *et al.*, 2005; KRANTIC *et al.*, 2007; POLSTER, 2013). O AIF é sintetizado a partir de um precursor de 67 kDa e, subsequentemente, importado às mitocôndrias através de duas sequências de localização mitocondrial encontradas em sua região N-terminal. Nesta organela, há uma quebra na sequência de sua cadeia aminoácida e origina-se, assim, a forma madura do AIF com 57 kDa que é confinado à membrana interna mitocondrial (KRANTIC *et al.*, 2007). Após uma permeabilização patológica da membrana mitocondrial esta proteína é clivada pela ativação da calpaina, liberada no citosol e translocada ao núcleo através do seu domínio de localização nuclear, o que desencadeia a fragmentação do DNA. No SNC a translocação do AIF mitocondrial ao núcleo pode ocorrer após uma variedade de insultos tóxicos, incluindo excitotoxicidade mediada por trauma, hipoxia e isquemia, e estresse oxidativo (YU *et al.*, 2006). Como o AIF não possui em sua estrutura propriedade intrínseca de endonuclease, a degradação de DNA por ele causado depende do recrutamento de nucleases cujos mecanismos ainda não estão totalmente compreendidos (OTERA *et al.*, 2005; LORENZO e SUSIN, 2007; WANG *et al.*, 2009).

Trabalho realizado por Yu *et al.*, (2006), utilizou modelo de excitotoxicidade em cultivo celular, e revelou um possível mecanismo que provocou liberação de AIF mitocondrial via ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP-1). Nesse sistema, um polímero de poli-ADP-ribose (PAR), um produto principal da ativação PARP-1, é o sinal de morte que provoca liberação AIF de mitocôndrias para citosol (YU *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual o PAR induz liberação de AIF não está totalmente

elucidado; todavia os autores propõem duas possibilidades: (1) que ocorra a indução de despolarização mitocondrial, devido à excessiva ativação de PARP-1; ou (2) que ocorra a ligação de polímeros PAR com uma proteína mitocondrial que, por sua vez, induza a liberação de AIF (YU *et al.*, 2006) (FIGURA 5).

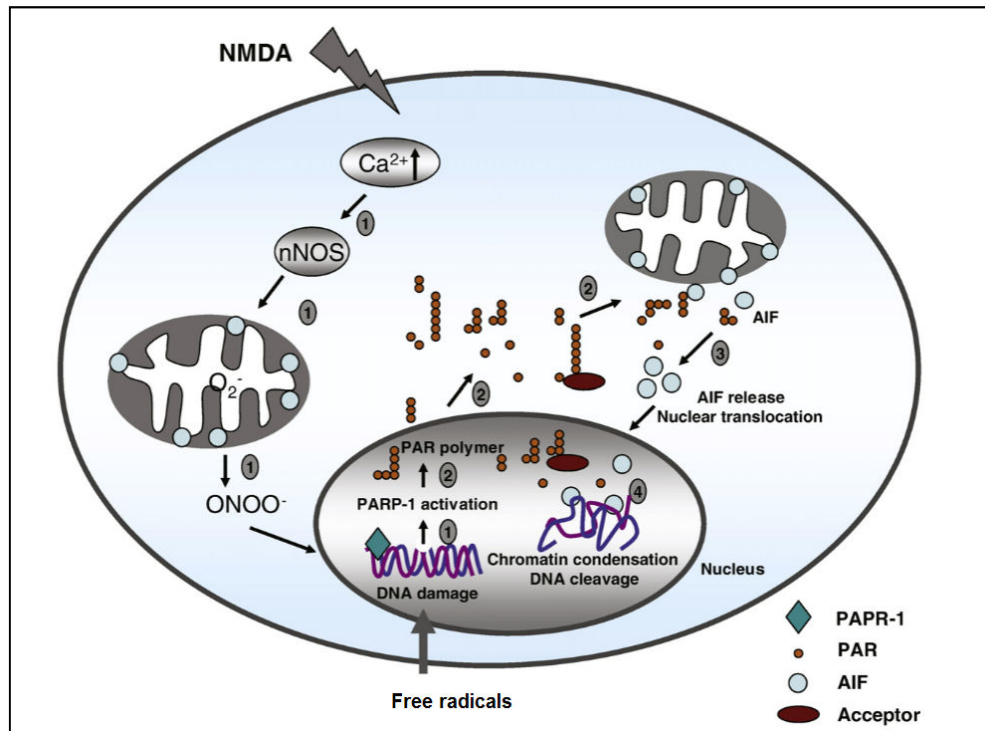


FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA VIA DE APOPTOSE CELULAR ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA INDUTORA DE APOPTOSE (AIF). DANOS NO DNA LEVAM, VIA PARP-1 À LIBERAÇÃO DE AIF DAS MEMBRANAS MITOCONDRIAS PARA O CITOSOL.

FONTE: adaptado de Wang *et al.*, 2009

Nos últimos anos, o envolvimento do AIF em doenças neurodegenerativas foi confirmado em estudo com células neuronais corticais preparadas retiradas de camundongos *Harlequin* (*i.e.* geneticamente modificados, *knockout* para AIF) que se mostraram resistentes à excitotoxicidade do glutamato (CHEUNG *et al.*, 2005). Já em modelo animal de DP, foi demonstrado que a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc consequente à aplicação de MPTP foi desencadeada por PARP-1 mediada por translocação nuclear do AIF (WANG *et al.*, 2003). Neste trabalho, o AIF intranuclear foi encontrado 2 horas após à última injeção de MPTP. Resultado que não foi visualizado nos animais *knockout* para PARP-1. Ainda, nestes

animais com ausência de PARP-1, a aplicação de MPTP falhou em reduzir a DA e seus metabólitos estriatais, além de manter níveis preservados de neurônios TH-ir na SNpc (WANG *et al.*, 2003). Com estes estudos ampliaram-se as opções para possíveis alvos terapêuticos para doenças neurológicas associadas à morte celular causada por fatores intrínsecos e extrínsecos, que em última instância acarretam disfunção mitocondrial e consequente morte celular.

1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Conhecimentos recentes embasam a hipótese de que, além de satisfazer as necessidades de nutrição corporal, a dieta pode modular diversas funções no organismo. Conceitos na ingestão de nutrientes funcionais ou suplementos estão se expandindo a partir de estudos que enfatizam o uso de alimentos para promover um estado de bem-estar, saúde, e redução do risco de doenças (ALABDULKARIM *et al.*, 2012). Atualmente um dos alvos mais promissores na ciência dos alimentos funcionais é a dieta com ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), especialmente a dieta enriquecida com ácidos graxos ômega-3, uma vez que sua ingestão aponta efeitos preventivos e terapêuticos em patologias como traumas, doença cardiovascular, doenças auto-imunes, psiquiátrica e cognitiva, e neurodegenerativas.

Os AGPIs podem ser divididos em duas grandes famílias: ômega-3 (ω -3), e ômega-6 (ω -6), as quais são estruturalmente classificadas (1) pelo número de carbonos presentes na cadeia de hidrocarbonetos (≥ 18 carbonos); (2) número de duplas ligações; e (3) e pela proximidade da primeira dupla ligação com o grupamento metil (ômega) terminal (LAURITZEN *et al.*, 2001).

O ácido α -linolênico (ALA) e o ácido linoléico (LA) constituem os precursores dos ácidos ω -3 e ω -6 respectivamente. Estes são considerados ácidos graxos essenciais, pois os vertebrados não os conseguem sintetizar devido à ausência natural das enzimas dessaturases Δ -15 e -12 e devem, obrigatoriamente, ser adquiridos através de dieta. O ALA está presente em diversos óleos e vegetais como: linhaça (*Linum usitatissimum*) (22,8%), óleo de linhaça (53%), semente de chia (*Salvia hispânica*) (17,6%), e óleo de canola (*Brassica campestris*) (9,1%). O LA faz parte da composição de óleos de semente de girassol (*Helianthus annuus*), de milho (*Zea mays*), e de soja (*Glycine max*) (BARCELO-COBLIJN e MURPHY, 2009).

Após a ingestão desses precursores aproximadamente 60-85% sofre β -oxidação direta devido à significativa utilização de energia pelos tecidos (e.g. coração e músculos) (CUNNANE e EERSON, 1997). O restante envolve-se em uma cascata de reações de alongação e dessaturação que originará representantes dos AGPIs ω -3 e ω -6, como o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido araquidônico (AA) respectivamente (LAURITZEN *et al.*, 2001). Todas estas reações são catalisadas por um sistema enzimático que consiste em Δ -6 e Δ -5 dessaturases e respectivas elongases (BARCELO-COBLIJN e MURPHY, 2009). Evidências de estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que essas duas famílias não apenas compartilham, mas competem pelas mesmas enzimas (FIGURA 6).

Os principais integrantes da família de AGPIs ω -3 (DHA e ácido eicosapentaenóico - EPA) são primordialmente encontrados em organismos que vivem em águas geladas, uma vez que estes organismos são especialmente dependentes das propriedades fisiológicas dos ácidos graxos. Isto acontece devido ao grande número de duplas ligações na molécula que, mesmo em baixas temperaturas, mantêm as estruturas biológicas com a fluidez necessária para manutenção dos processos biológicos (SCHUCHARDT e HAHN, 2013). Quantidades significativas de DHA e EPA são encontradas em peixes como: salmão, cavala, arenque e atum. Microalgas (e.g. *Schizochytrium*) e Antartida krill (*Euphausia superba*) também os possuem, mas em menor expressão. Nos humanos, após a ingestão, os ácidos graxos podem ser transportados no plasma tanto na forma de triacilgliceróis ou ligados à albumina. Os AGPIs, especialmente AA e DHA, são inseridos nos fosfolípidos de membrana, e correspondem à aproximadamente 21-36% dos ácidos graxos das membranas celulares. O AA é distribuído em tecidos como: células vermelhas do sangue, placenta, fígado, testículos e encéfalo. Por outro lado, a distribuição do DHA é mais restrita. O encéfalo e a retina, e alguns poucos tecidos fora do SNC, como testículos são amplamente enriquecidos com DHA (LAURITZEN *et al.*, 2001). O SNC é o órgão com a segunda maior concentração de lipídios no corpo; somente excedido pela concentração no tecido adiposo. O cérebro adulto contém aproximadamente 50-60% do seu peso seco constituído por lipídios, sendo que cerca de 35% destes são considerados AGPIs.

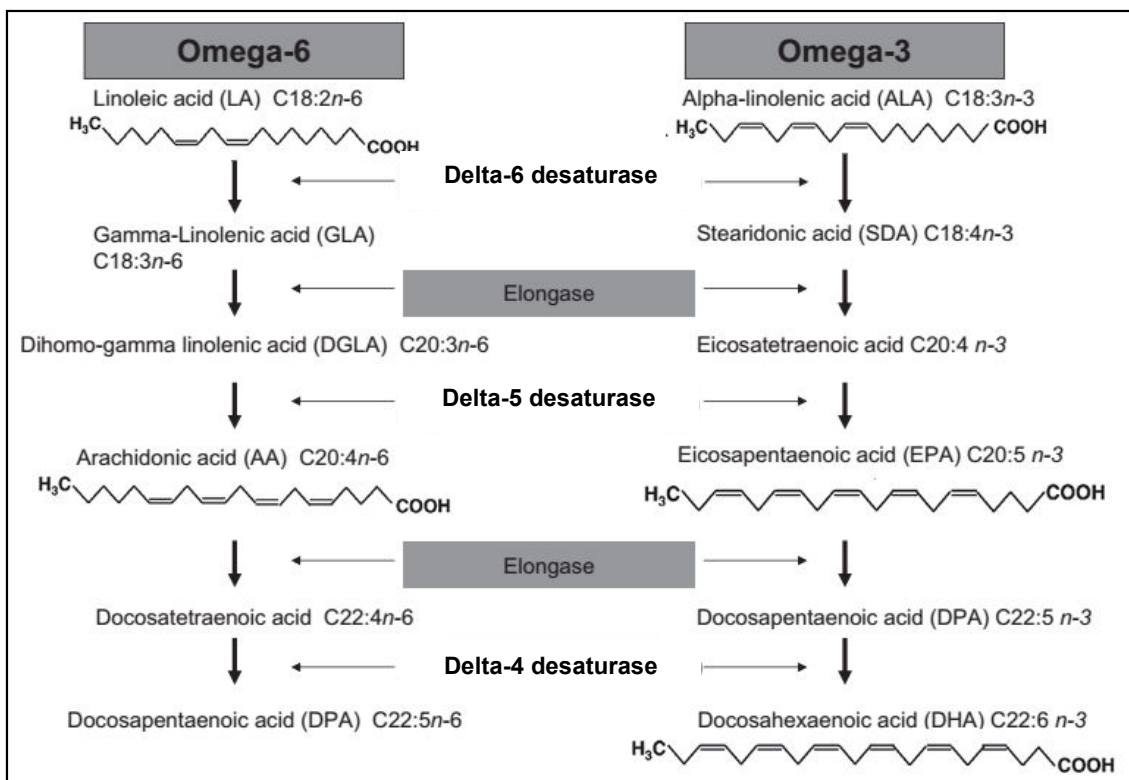


FIGURA 6 – VISÃO GERAL DAS REAÇÕES DE ELONGAÇÃO E DESSATURAÇÃO DAS FAMÍLIAS ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6
 FONTE: Luchtman e Song (2013)

Ao longo das últimas décadas, mudanças qualitativas extremas na nutrição ocorreram. Hoje, a dieta de uma sociedade industrializada, é caracterizada por um aumento do consumo de gordura saturada, monoinsaturada e AGPI ω -6 (MOLENDI-COSTE *et al.*, 2011) (FIGURA 7). Estas mudanças devem-se principalmente ao consumo insuficiente de peixes, nozes, sementes e cereais integrais na alimentação, em preferência ao consumo exagerado de óleo de milho, que possui uma relação ω -6: ω -3 de 60:1, e óleo de cártamo com relação 77:1 (SIMOPOULOS, 2001). Como resultado, observa-se um crescente aumento na incidência de doenças com base inflamatória, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, fruto do consumo exacerbado de AGPI ω -6 na dieta ocidental com índices ω -6: ω -3 que chegam a 10:1 – 20:1, muito diferente da razão recomendada que varia entre 1:1 e 4:1 (SIMOPOULOS, 2001; PATTERSON *et al.*, 2012).

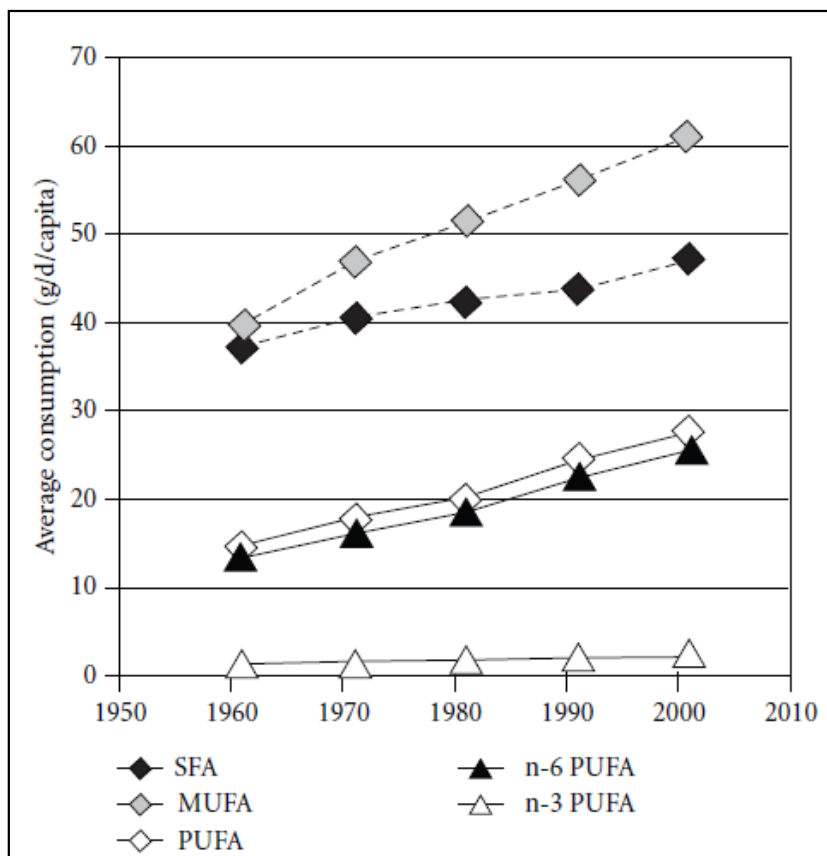


FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO CONSUMO DE GORDURA NA POPULAÇÃO DA UNIÃO EUROPEIA NOS ÚLTIMOS ANOS. SFA: ÁCIDO GRAXO SATURADO; MUFA: ÁCIDO GRAXO MONOINSATURADO; PUFA: ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO

FONTE: adaptado de Molendi-Coste *et al.*, (2011)

1.2.1 Ácidos Graxos Poli-insaturados e seus mediadores inflamatórios

A introdução de AGPIs na dieta é conhecida como uma importante fonte de energia. Entretanto, por volta de 1920, observaram-se efeitos provenientes da redução destes ácidos graxos na dieta alimentar como: dermatites, mudanças na acuidade visual, retardo no crescimento e falhas na reprodução. Mas foi a partir da década de 1940 que se iniciaram pesquisas mais aprofundadas e, com isso, um aumento na fundamentação fisiológica, o que atribuiu funções biológicas mais específicas aos ácidos graxos (CALDER *et al.*, 2010). Pesquisas demonstram que o DHA pode alterar propriedades básicas da membrana celular, incluindo a fluidez de membrana, a compressibilidade elástica, a permeabilidade iônica, fusão, movimento *flip-flop*, e funções protéicas (revisado por STILLWELL e WASSALL, 2003), além de influenciar a organização dos domínios de *lipid rafts* (WONG *et al.*, 2009). Também é

descrita sua participação na modulação da expressão gênica, envolvimento na transdução de sinais, regulação de receptores, e importante envolvimento na formação neural (revisado por HORROCKS e FAROOQUI, 2004; MAZZA *et al.*, 2007). Como resultado, os AGPIs ω -3 desempenham importante papel na manutenção da saúde e na proteção contra diversas patologias (CALDER, 2012a) (TABELA 1).

TABELA 1 – RESUMO DO ENVOLVIMENTO FISIOLÓGICO E BENEFÍCIOS POTENCIAIS DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS OMEGA-3

<i>Envolvimento fisiológico</i>	<i>Potencial efeito sobre a saúde</i>	<i>Doença Alvo</i>
Regulação da pressão sanguínea	Redução da pressão sanguínea	hipertensão, doença cardiovascular
Regulação da função plaquetária	Redução da probabilidade de trombose	trombose, doença cardiovascular
Regulação de triglicerídeos	Redução dos triglicerídeos plasmáticos	hipertrigliceridemia, doença cardiovascular
Regulação da função vascular	Aumento da reatividade cardiovascular	doença cardiovascular
Regulação da inflamação	Redução da inflamação	Artrite, psoríase, lupus, fibrose cística, dermatites, doenças neurodegenerativas
Regulação da sensibilidade à insulina	Aumento da sensibilidade à insulina	Diabetes tipo-2
Regulação do crescimento da célula tumoral	Redução do tumor	Cancer
Regulação da sinalização visual	Otimização da sinalização visual	Problemas visuais no desenvolvimento (especialmente pré-termos)
Componente estrutural do encéfalo e sistema nervoso central	Otimização do desenvolvimento encefálico melhora cognitiva e processo de aprendizado	Problemas na infância e na vida adulta no processo cognitivo e de aprendizado

FONTE: adaptado de Calder (2012a).

A chave que liga os AGPIs e a inflamação são os eicosanóides, que são mediadores e reguladores da inflamação. Na síntese destes compostos bioativos, o ácido graxo precursor é clivado por ação de fosfolipase A₂ (PLA₂), para ser então metabolizado. Existem duas vias de metabolização: a via COX, para formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a via lipooxigenase (LOX), a qual leva à síntese de leucotrienos. Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via da COX, a presença do EPA inibe competitivamente esta via. Por exemplo, a ingestão aumentada de AGPIs ω -3, resulta na diminuição plasmática de AA. Em consequência da sua disponibilidade diminuída haverá menor formação de derivados do AA, aumentando, desta forma, as prostaglandinas (série-3) e leucotrienos (série-5) derivados do EPA (FIGURA 8). A grande importância deste fato se dá não apenas pela alteração das concentrações de tais compostos, mas também pela diferença em suas atividades biológicas, uma vez que os eicosanóides derivados do EPA têm potencial inflamatório 10 a 100 vezes menor quando comparados aos que são derivados do AA (CALDER, 2006). Em adição, nos últimos

1.2.2 Ação dos ácidos graxos poli-insaturados na doença de Parkinson

Estudo baseado em aplicação de questionário com hábitos alimentares em 131.368 participantes revelou que os indivíduos que mantinham frequente consumo de vegetais, frutas e peixe na dieta tinham reduzida incidência de DP (GAO *et al.*, 2007). Contudo, este estudo não mostrava especificamente relação direta da incidência da DP com o consumo de AGPIs ω -3. Esta relação foi apontada em trabalho realizado por De Lau *et al.*, (2005), no qual 5.289 indivíduos foram avaliados e, após 6 anos de acompanhamento, foi observado que o alto consumo de AGPIs ω -3 estava inversamente relacionado ao desenvolvimento da DP.

Para avaliar a relação entre ácidos graxos e DP, Julien *et al.*, (2006) em estudo *post-mortem*, compararam o perfil lipídico encefálico de indivíduos com DP e controles. Altos níveis de AA (+13,6%) foram observados em pacientes parkinsonianos que faziam uso de levodopa. Neste mesmo trabalho, primatas tratados com MPTP e levodopa, além de demonstrarem concentração reduzida de AA nas membranas encefálicas, possuíam baixos índices de DHA (-15%) (JULIEN *et al.*, 2006).

A partir destas constatações, estudos em humanos, primatas não humanos e roedores foram desenvolvidos no intuito de desvendar o papel dos AGPIs sobre os aspectos motores e não motores da DP. Estudo desenvolvido por Samadi *et al.*, (2006) demonstrou potencial efeito neuroprotetor do fornecimento de altas doses de DHA em macacos tratados com MPTP e com discinesia induzida por levodopa. A suplementação com DHA e EPA em ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA também foi objeto de estudo de Delattre *et al.*, (2010). Neste estudo, apesar de os autores não observarem efeito dos AGPIs ω -3 sobre os déficits motores, demonstraram reduzida peroxidação lipídica nos animais que o receberam, indicando que estes ácidos graxos podem contribuir na redução e/ou desaceleração da morte celular programada dos neurônios dopaminérgicos (DELATTRE *et al.*, 2010). Além disso, dieta enriquecida com AGPIs ω -3 durante 10 meses protegeu contra a redução de neurônios TH-ir, *Nurr1* e transportador de dopamina (DAT) consequentes à aplicação de MPTP em camundongos (BOUSQUET *et al.*, 2008). Dentre a sintomatologia não motora da DP a suplementação com óleo de peixe (OP), rico em DHA e EPA foi especificamente avaliada em um estudo duplo-cego placebo controlado. Pacientes que tomaram cápsulas de OP com ou sem o uso de

antidepressivos concomitante mostraram melhora dos sintomas depressivos quando quantificados através de questionários específicos (da SILVA *et al.*, 2008).

Os efeitos dos AGPIs ω -3 não são restritos somente à suplementação. Estudo recente de Cardoso *et al.*, (2014) confirmou que dieta restrita de ácidos graxos essenciais em duas gerações provocou aumento nos níveis de óxido nítrico estriatal, aumento da lipoperoxidação e redução da atividade da enzima catalase na substância negra e no estriado. Estes autores discutem que os animais com esta carência nutricional específica têm reduzida habilidade do sistema nigroestriatal manter sua homeostase uma vez que tiveram significativa redução no número de neurônios TH-ir (-40%), e nas células imunomarcadas para o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF; -20%) na substância negra (CARDOSO *et al.*, 2014).

Devido ao amplo espectro de atividades desempenhadas pelos AGPIs ω -3, vários mecanismos foram apontados como passíveis no envolvimento neuroprotetor na DP (revisado por BOUSQUET *et al.*, 2011) (FIGURA 9). Como importante redução dos níveis de BDNF e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) foram encontrados na substância negra de pacientes portadores de DP (MOGI *et al.*, 1999), estudo realizado por Bousquet *et al.*, (2009) sugere que a modulação da expressão de BDNF contribui para a neuroproteção dos AGPIs ω -3 em modelo animal de DP induzido por MPTP. Ainda, estudos apontam que as propriedades antioxidativas dos AGPIs ω -3, como modulação da glutatona redutase, redução da geração de espécies reativas de oxigênio e dano no DNA, além do efeito de super-expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-XL (proteínas que estão amplamente ligadas à apoptose na DP), também são apontados como possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção AGPIs ω -3 (revisado por CALON e COLE, 2007).

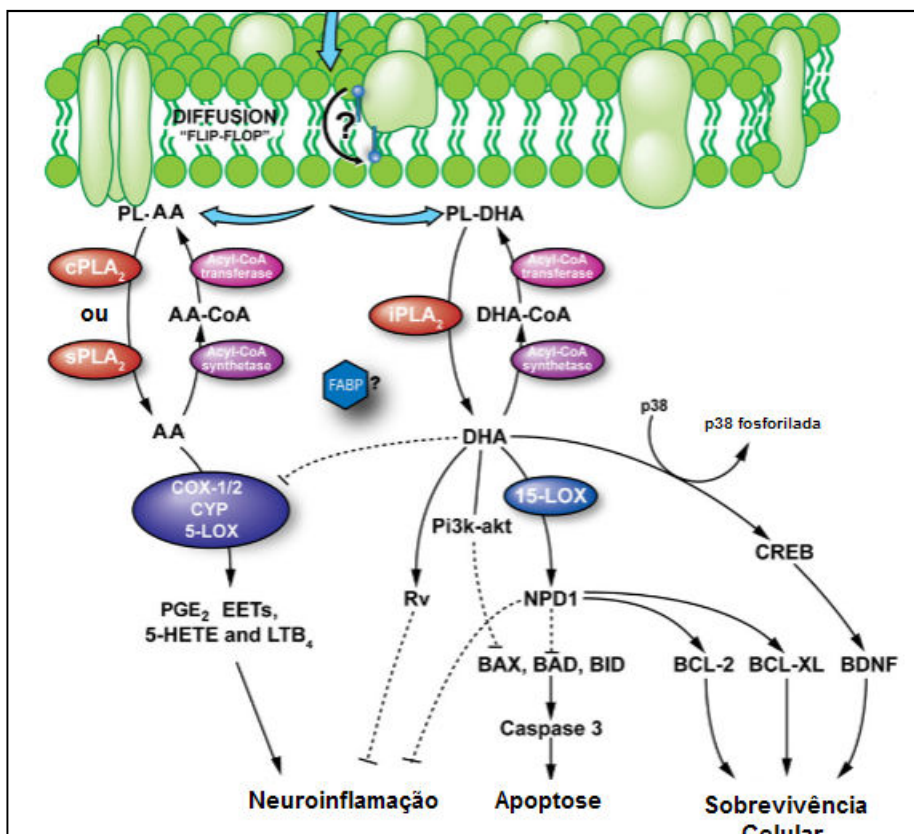


FIGURA 9 – POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA DOENÇA DE PARKINSON. AA: ÁCIDO ARAQUIDÔNICO; DHA: ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO; PLA₂: FOSFOLIPASE A₂; COX: CICLO-OXIGENASE; LOX: LIPO-OXIGENASE; PG: PROSTAGLEINA; PL: FOSFOLIPÍDEO; NPD1: NEUROPROTECTINA D1; RV: RESOLVINA.

FONTE: adaptado de Bousquet *et al.*, (2011)

1.2.3 A influência dos ácidos graxos poli-insaturados no desenvolvimento encefálico

A partir da década de 1970, o interesse por interferências ocorridas durante o desenvolvimento fetal começou a se expandir. Esta hipótese - denominada "hipótese de Barker" (BARKER e OSMOND, 1986) - afirma que as influências adversas no início de desenvolvimento e, particularmente, durante a vida intra-uterina, pode resultar em mudanças permanentes na fisiologia e no metabolismo, o que pode resultar em aumentado risco de doença na idade adulta (de BOO e HARDING, 2006). Neste sentido, o efeito de alterações ou déficits nutricionais neste período tem sido objeto de diferentes pesquisas (INNIS, 2008; HADDERS-ALGRA, 2011; JANSSEN e KILIAAN, 2014).

Estudos em animais são fundamentais para entendimento da formação do SNC e a importante função dos AGPIs neste processo; assim, é essencial o

conhecimento temporal dos acontecimentos nas diferentes espécies (PALANISAMY, 2012) (FIGURA 10).

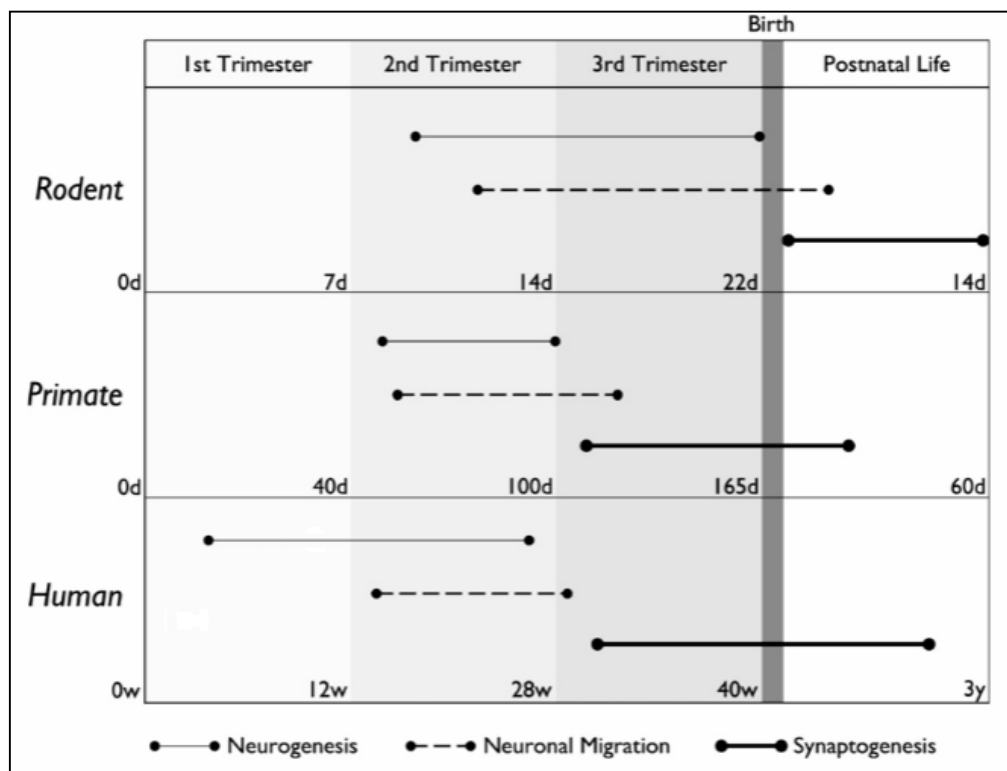


FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DOS PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO ENCEFÁLICO ENTRE AS ESPÉCIES. D: DIAS; W: WEEK, Y: ANOS. FONTE: Palanisamy (2012)

O adequado consumo de AGPIs durante gestação e lactação é de vital importância, pois estes ácidos graxos são componentes estruturais das membranas, e essenciais para a formação de novos tecidos como ocorre durante a formação fetal e seu desenvolvimento. Para suprir estas exigências, as concentrações de AGPIs nos fosfolípidos de membrana materna aumentam aproximadamente 40%. Já para o AA e o DHA estes valores chegam a aumentar 23% e 52% respectivamente (HAGGARTY, 2002). Estes ácidos graxos atravessam a placenta por difusão simples, ou ligados a proteínas específicas (HAGGARTY, 2002), e direcionam-se principalmente ao tecido neural. Nestes tecidos, o DHA acumula-se preferencialmente nos cones de crescimento, nos astrócitos, sinaptossomos, mielina e nas membranas mitocondriais (BOURRE *et al.*, 1992; LAURITZEN *et al.*, 2001).

Este aumento de DHA no tecido neuronal coincide com um período ativo de neurogênese, diferenciação celular, sinaptogênese e mielinização axonal (revisado

por McNAMARA e CARLSON, 2006). Assim, coletivamente esses achados confirmam as propriedades neurotróficas do DHA na promoção da arborização neuronal e sinaptogênese durante o período de formação encefálica (AUESTAD e INNIS, 2000; McNAMARA e CARLSON, 2006).

Estudo realizado por Diau *et al.*, (2005) indicou alta concentração de DHA e AA, em neonatos cujas mães babuínas foram suplementadas com AGPIs, principalmente nos núcleos da base, hipocampo, tálamo, cerebelo, e nos córtex pré e pós-central, pré-frontal e occipital, sugerindo que a presença destes AGPIs no encéfalo estão particularmente envolvidos com áreas de integração motora, função de atenção e execução, e de memória (DIAU *et al.*, 2005).

Nos últimos anos diversos estudos investigaram o impacto da suplementação pré-natal com AGPIs sobre o desenvolvimento neuronal e cognição (HELLAND *et al.*, 2003). Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que a suplementação de ratas com OP durante a fase de gestação e lactação foi essencial para prevenção de patologias como a depressão na fase adulta do animal. Nestes trabalhos ratos com comportamento tipo-depressivo mantiveram elevados níveis de BDNF e de serotonina (5-HT) hipocampais aos 90 dias de vida (VINES *et al.*, 2012). Em adição, quando este protocolo foi aplicado em modelo animal de depressão causado pela bulbectomia olfatória observou-se que a suplementação com OP, durante período crítico para o desenvolvimento neural, atenuou comportamento depressivo e ansiogênico, além dos déficits cognitivos em animais de 100 dias de vida. Estes trabalhos nos mostram que a alteração funcional encontrada pode ser correlacionada com o aumento de BDNF e 5-HT hipocampal, uma vez que estão envolvidos na sobrevivência neuronal e plasticidade de estruturas encefálicas em longo prazo (PUDELL *et al.*, 2014).

Por outro lado, mesmo com estudos que comprovam os efeitos pleiotrópicos do AGPIs ω -3, existem poucos estudos na literatura que avaliam o efeito da suplementação pré-natal com DHA em condições neurodegenerativas. Assim, o estudo do envolvimento dos AGPIs sobre insultos inflamatórios pré e pós-natal envolvidos na etiopatologia da DP pode trazer conhecimentos ainda não explorados e ampliar os conhecimentos tanto na etiologia como no tratamento preventivo da DP.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que os AGPIs ω -3 são essenciais para o desenvolvimento estrutural e funcional do encéfalo, pois proporcionam fluidez e permeabilidade, alteram funções de proteínas de membrana, receptores e canais iônicos, transcrição gênica e na neurogênese (FAROOQUI *et al.*, 2000; STILLWELL e WASSALL, 2003; HORROCKS e FAROOQUI, 2004; YAVIN, 2006; MAZZA *et al.*, 2007).

Estudos arguem a ligação entre a patologia e a disfunção do metabolismo encefálico dos ácidos graxos (JULIEN *et al.*, 2006), e embasam a hipótese de que a dieta rica em ω -3 é benéfica em pacientes parkinsonianos (de LAU *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2008). Os efeitos observados quando a sintomatologia da doença foi extrapolada aos modelos animais, em primatas não-humanos e roedores, também refletiram potencial neuroproteção desses ácidos graxos (SAMADI *et al.*, 2006; BOUSQUET *et al.*, 2008; BOUSQUET *et al.*, 2009; DELATTRE *et al.*, 2010). A partir das evidências desse conjunto de estudos pré-clínicos, comprovou-se que o consumo de AGPIs ω -3 durante o insulto neurotóxico com 6-OHDA, MPTP ou LPS, exerce ação neuroprotetora em diferentes aspectos de avaliação no sistema dopaminérgico (revisado por BOUSQUET *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2012). Todavia existem poucos estudos na literatura que avaliam o efeito da suplementação pré-natal com DHA em condições neurodegenerativas.

Embasados na hipótese de que a etiologia da DP pode ser consequência de alterações sinérgicas das respostas inflamatórias produzidas ainda na vida intra-uterina, e insulto posterior durante a vida adulta (LING *et al.*, 2004a; LING *et al.*, 2004b; LING *et al.*, 2006), hipotetizamos que o fornecimento de AGPIs ω -3 durante uma janela temporal importante para o desenvolvimento do SNC (durante a gestação e lactação), pudesse desenvolver papel crucial na modificação de fatores importantes envolvidos na etiologia desta patologia, e prevenir a morte neuronal dopaminérgica. Além disso, o estudo do envolvimento dos AGPIs sobre insultos inflamatórios pré e pós-natal poderiam trazer conhecimentos ainda não explorados, e ampliar as ferramentas utilizadas no tratamento preventivo da DP.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação materna com ácidos graxos da família ω -3, durante a gestação e lactação, sobre a geração F₁, utilizando modelo animal de doença de Parkinson exposto nas fases pré e pós-natal ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito da suplementação com óleo de peixe durante a gestação e lactação, associada à exposição ao LPS na fase embrionária na geração F₁ (administração intraperitoneal na rata matriz) e na vida adulta (re-exposição intranigral). Os seguintes parâmetros foram analisados aos 21 e aos 100 dias de vida:

- a) Incorporação lipídica nas membranas neuronais da substância negra, através da técnica de cromatografia gasosa;
- b) Atividade motora dos animais, utilizando o teste de campo aberto.
- c) Avaliação da memória espacial e não-espacial com a aplicação dos testes de memória de localização do objeto e memória de reconhecimento do novo objeto, respectivamente.
- d) Expressão das proteínas Bcl-2 e Bax na substância negra, através da técnica de Western Blot.
- e) Expressão da proteína indutora de apoptose (AIF) intranuclear nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, através da técnica de Western Blot.
- f) Avaliar as concentrações do neurotransmissor dopamina e seus metabólitos estriatais, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta precisão.
- g) Quantificar os neurônios tirosina-hidroxilase (TH) imunorreativos, a densidade dos astrócitos marcados (GFAP), e a ativação microglial (OX-42) na substância negra dos animais, através da técnica de imunohistoquímica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Animais e suplementação

Neste estudo todos os cuidados foram tomados no intuito de minimizar o número de animais utilizados ao longo do experimento sem, no entanto, comprometer a análise estatística dos resultados. Os experimentos contidos nesta pesquisa foram aprovados e seguiram as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEEA 503) (Anexo 1).

Foram utilizadas ratas Wistar adultas (n= 250), linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, obtidas no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, que serviram como matrizes dos animais experimentais. Durante todo o experimento os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes às 7:00 horas), em ambiente climatizado com temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), e receberam água e alimentação com ração comercial padrão (ração Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes S/A) à vontade.

O delineamento experimental foi realizado através de dois experimentos independentes. Nestes as fêmeas matrizes foram divididas, aleatoriamente, em dois grandes grupos: (a) óleo de peixe (OP) – cujas ratas receberam diariamente, através de gavagem, 3,0 g/kg/dia de composto enriquecido com AGPIs ω -3 contendo 12% de DHA e 18% EPA (Laboratório Herbarium S/A); e (b) Controle (C) – cujas ratas receberam diariamente a administração de água filtrada através de gavagem, para mimetizar o processo de manipulação dos animais do grupo OP. O protocolo de suplementação iniciou-se 15 dias antes do acasalamento (período de adaptação à manipulação), e perdurou durante o tempo de acasalamento, gestação e lactação (FIGURA 11).

Para o cruzamento, em cada caixa contendo duas fêmeas foi colocado um rato macho (durante as últimas 3 horas do ciclo escuro). A cópula foi confirmada pela presença de espermatozóide no lavado vaginal, e o dia posterior a essa

confirmação designado como o primeiro dia gestacional. As fêmeas que não apresentassem espermatozoides na citologia vaginal voltavam às suas caixas coletivas, para que o processo de acasalamento fosse repetido no dia seguinte.

No 11° dia de gestação, os grupos C e OP foram divididos em dois subgrupos, baseados na aplicação de 1 mg/kg de LPS (L8274; 026:B6; Sigma) (LING *et al.*, 2002; LING *et al.*, 2004a; LING *et al.*, 2004b) ou igual dose de solução salina 0,9% i.p. nas ratas prenhas, formando os seguinte grupos: controle/salina (C/S); controle/LPS (C/LPS); óleo de peixe/salina (OP/S) e óleo de peixe/LPS (OP/LPS).

Para assegurarmos uma amamentação igualitária, mantivemos, ao nascimento, 5 filhotes em cada ninhada. Estes foram mantidos com a mãe, em caixas individuais, até o final da lactação, ou seja, até 21 dias de vida. Nesta idade, de 1 a 2 ratos machos de cada ninhada foram designados para passarem por testes comportamentais seguido de análises bioquímicas. Os demais animais da ninhada foram agrupados em caixas coletivas, levando-se em consideração cada um dos quatro grupos experimentais. Permaneceram nesse estado, recebendo ração e água à vontade, até completarem 100 dias de idade.

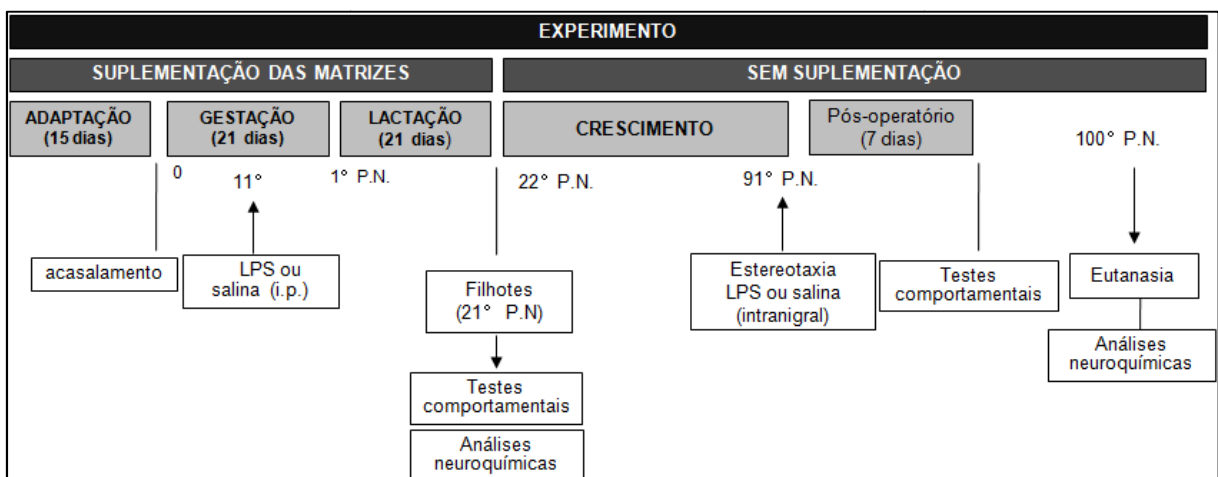


FIGURA 11 – LINHA TEMPORAL REPRESENTATIVA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. P.N.: PÓS-NATAL; LPS: LIPOPOLISSACARÍDEO DE *Escherichia coli*; i.p. INTRAPERITONIAL

4.1.2 Re-exposição ao LPS na vida adulta

Os animais da geração F₁ que permaneceram no estudo, aos 90 dias de vida pós-natal, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de solução LPS ou solução salina intranigral. Para a cirurgia os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (60 mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda) e quetamina (4 mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda), e posicionados no aparelho estereotáxico (Insight). A desinfecção do local da cirurgia foi feita com álcool iodado, e com auxílio de bisturi realizada a incisão de aproximadamente 2 cm para exposição da parte superior da calota craniana.

As coordenadas estereotáxicas foram determinadas a partir do bregma utilizando as seguintes medidas: antero-posterior: - 5.0 mm do bregma; latero-lateral: \pm 2.1 mm da linha mediana, e dorso-ventral: - 7.8 mm do crânio (PAXINOS e WATSON, 2005), e em seguida feita perfuração do crânio com broca de baixa rotação. Cada animal recebeu aplicação bilateral de 1 μ L de solução LPS (2 μ g/ μ L) ou o mesmo volume de solução salina 0,9% (grupo salina) intranigral. Estas soluções foram infundidas por intermédio de uma agulha de 30 gauge, conectada a um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro), o qual estava adaptado a uma microseringa de 10 μ L (Hamilton, EUA). Com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight BI 2000) o fluxo foi programado em 0,33 μ L/min, durante 3 minutos. Após o término da infusão, foram aguardados mais 2 minutos antes de a agulha ser retirada lentamente, de forma a se evitar refluxo da droga.

Assim, cada um dos quatro grupos pré-existentes (C/S; C/LPS; OP/S; OP/LPS) foi novamente subdividido em dois, de acordo com a presença ou não de uma nova re-exposição ao LPS intranigral originando oito grupos experimentais, a saber (FIGURA 12):

- C/S/S: subgrupo no qual as ratas matrizes não foram suplementadas, e no 11º dia de gestação, receberam injeção de solução salina intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, solução salina intranigral bilateralmente.
- C/S/LPS: subgrupo no qual as ratas matrizes não foram suplementadas, e no 11º dia de gestação receberam injeção de solução salina intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, aplicação bilateral de LPS intranigral.

- C/LPS/S: subgrupo no qual as ratas matrizes não foram suplementadas, e no 11º dia de gestação receberam injeção com LPS intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, solução salina intranigral bilateralmente.
- C/LPS/LPS: subgrupo no qual as ratas matrizes não foram suplementadas, e no 11º dia de gestação receberam injeção com LPS intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, aplicação bilateral de LPS intranigral.
- OP/S/S: subgrupo no qual as ratas matrizes foram suplementadas com óleo de peixe e receberam, no 11º dia de gestação, injeção de solução salina intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, solução salina intranigral bilateralmente.
- OP/S/LPS: subgrupo no qual as ratas matrizes foram suplementadas com óleo de peixe e receberam, no 11º dia de gestação, injeção de solução salina intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, aplicação bilateral de LPS intranigral.
- OP/LPS/S: subgrupo no qual as ratas matrizes foram suplementadas com óleo de peixe e receberam, no 11º dia de gestação, injeção com LPS intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, solução salina intranigral bilateralmente.
- OP/LPS/LPS: subgrupo no qual as ratas matrizes foram suplementadas com óleo de peixe e receberam, no 11º dia de gestação, injeção com LPS intraperitoneal. Os filhotes aos 90 dias de vida receberam, através de cirurgia estereotáxica, aplicação bilateral de LPS intranigral.

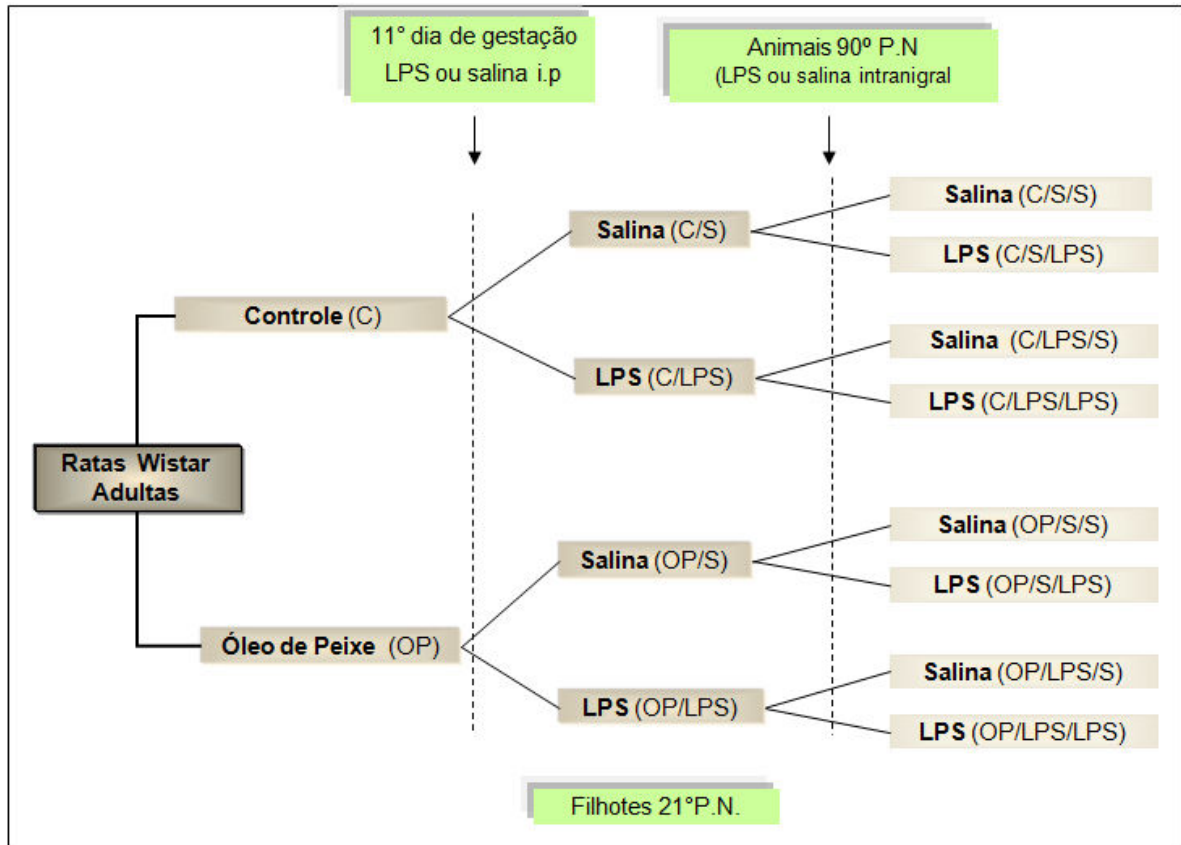


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS. P.N – PÓS NATAL

4.2 AVALIAÇÕES

4.2.1 Perfil lipídico

Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol-água (2:2:1,8 v/v), segundo Bligh e Dyer (1959). Foram pesados cerca de 25,00 g ($\pm 0,1$) adicionados 45,0 mL de solução clorofórmio-metanol (1:2 v/v) e agitados vigorosamente por 5 min. Depois, foram adicionados à mistura 15,0 mL de clorofórmio e agitados por 2 min, 18,0 mL de água destilada, agitados por 5 min. A mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro quantitativo. A solução resultante foi transferida para um funil de separação de 250 mL. Após a separação das fases, a inferior contendo o clorofórmio e os lipídios, foi drenada para balão de 250 mL com banho a 30 °C. Aos lipídios extraídos foram adicionados 500 μ L de solução padrão de concentração 1,000 mg/mL de tricosanoato de metila

(23:0), como padrão interno, em iso-octano. Após homogeneização, a mistura foi transferida para um tubo de esterificação e o solvente foi completamente removido com fluxo de N₂ gasoso. Ao tubo adicionou-se 4,00 mL de solução metanólica de NaOH 0,5 mol/L. O tubo fechado, contendo a mistura, foi aquecido em banho maria a 100 °C por 5 min e resfriado à temperatura ambiente. 5,0 mL de uma solução de reagente esterificante foi adicionado ao tubo que retornou ao aquecimento em banho maria a 100 °C, por mais 5 min e resfriado, logo após, em água corrente. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl agitando vigorosamente por 30 s, em seguida foram adicionados 2,0 mL de iso-octano, e, novamente esta foi agitada por 30 s. A amostra esterificada foi mantida em repouso na geladeira até a separação das fases. O sobrenadante foi recolhido e transferido para frasco para posterior análise cromatográfica. Os ésteres de ácidos graxos poli-insaturados foram separados em fases gasosas pelo cromatógrafo (Ultra Rastreio 3300) equipado com detector de ionização e uma coluna capilar de sílica fundida CP7420 (FAME Select) com um fluxo de H₂ de 1,2 mL/min e 30 mL/min de N₂. O volume injetado foi de aproximadamente 2,0 µL, com as temperaturas do injetor e do detector de 220 a 230°C respectivamente. 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 (JOSEPH e Ackman, 1992).

4.2.2 Testes Comportamentais

4.2.2.1 Teste do campo aberto

A atividade motora foi avaliada em um ambiente rico em estímulo luminoso (iluminado por 4 lâmpadas de 60W cada), o qual consiste em uma arena circular (1 m de diâmetro) circundada por uma parede lateral de 40 cm e com piso preto, sem divisões aparentes. Para a avaliação cada rato foi gentilmente colocado no centro da arena e deixado explorar o ambiente livremente durante 5 minutos. Neste período, uma câmera acoplada a um programa para analisar as imagens (Smart Junior

System Panlab, Harvard Apparatus, Spain) foi usado para quantificar o comportamento locomotor do animal através das análises da distância percorrida, velocidade média e tempo de exploração em cada região da arena (central ou periférica). Após cada animal ser testado a arena foi limpa com solução de etanol 10% para evitar interferências causadas pelo animal previamente testado.

4.1.3.2 Avaliação da memória espacial e não espacial

Como as ratas progenitoras receberam a injeção de LPS i.p. os filhotes, aos 21 dias de idade, foram avaliados quanto ao seu desempenho em dois diferentes tipos de memória: (a) de localização do objeto (OLT), e (b) reconhecimento do novo objeto (NORT) (ENNACEUR *et al.*, 2005). Ambas as avaliações foram realizadas utilizando uma caixa retangular (30 x 50 x 20 cm), com objetos em cópias idênticas, fabricados em material biologicamente neutro (acrílico ou vidro) e pesados o suficiente para que o animal não conseguisse removê-los do lugar. Para a realização do teste os animais foram submetidos a um treino 24 horas antes da avaliação propriamente dita. Nesse treino cada animal foi colocado no centro da caixa, a qual continha dois objetos idênticos colocados paralelamente em um dos lados da caixa. Durante 3 minutos o animal podia explorá-los livremente. Após, era retirado e colocado em sua gaiola de manutenção. Passado um intervalo de 15 minutos, o animal era recolocado na caixa de avaliação com os mesmos dois objetos por mais 3 minutos. Esse processo se repetiu por 5 vezes consecutivas. Entre cada exposição a caixa e cada objeto foram limpos com solução de etanol 10%.

Vinte e quatro horas após a habituação descrita acima, cada animal passou por mais uma sessão de amostra, ou seja, foi colocado novamente no centro da caixa de avaliação e, durante 3 minutos, sob condições idênticas às do dia anterior, explorou os objetos. Para a realização do teste (fase de escolha) que avaliou a memória espacial (de localização), 15 minutos após o treino o animal foi colocado nesta caixa, entretanto, um dos objetos foi colocado em posição oposta à situação anterior (FIGURA 13A). Durante 3 minutos foi quantificado o tempo de exploração em cada um dos objetos. Para a realização do teste de memória não espacial, que avaliou a memória de reconhecimento do novo objeto, outro grupo de animais

passou pela mesma situação de habituação e amostra descritas anteriormente, porém no momento do teste um dos objetos foi trocado por um objeto desconhecido pelo animal (FIGURA 13B).

A geração F₁, na fase adulta após a re-exposição ao LPS intranigral (100 dias), também foi avaliada quanto ao seu desempenho no teste reconhecimento do novo objeto (FIGURA 13B). Os animais, nesta fase, passaram pelo mesmo protocolo acima descrito, no entanto, as atividades foram realizadas uma caixa retangular de madeira (80 x 80 x 50 cm).

Em todos os testes o índice de discriminação entre os objetos foi determinado pela fórmula $[(\text{tempo no objeto conhecido} - \text{tempo no objeto novo}) / \text{tempo total de exploração}] \times 100$.

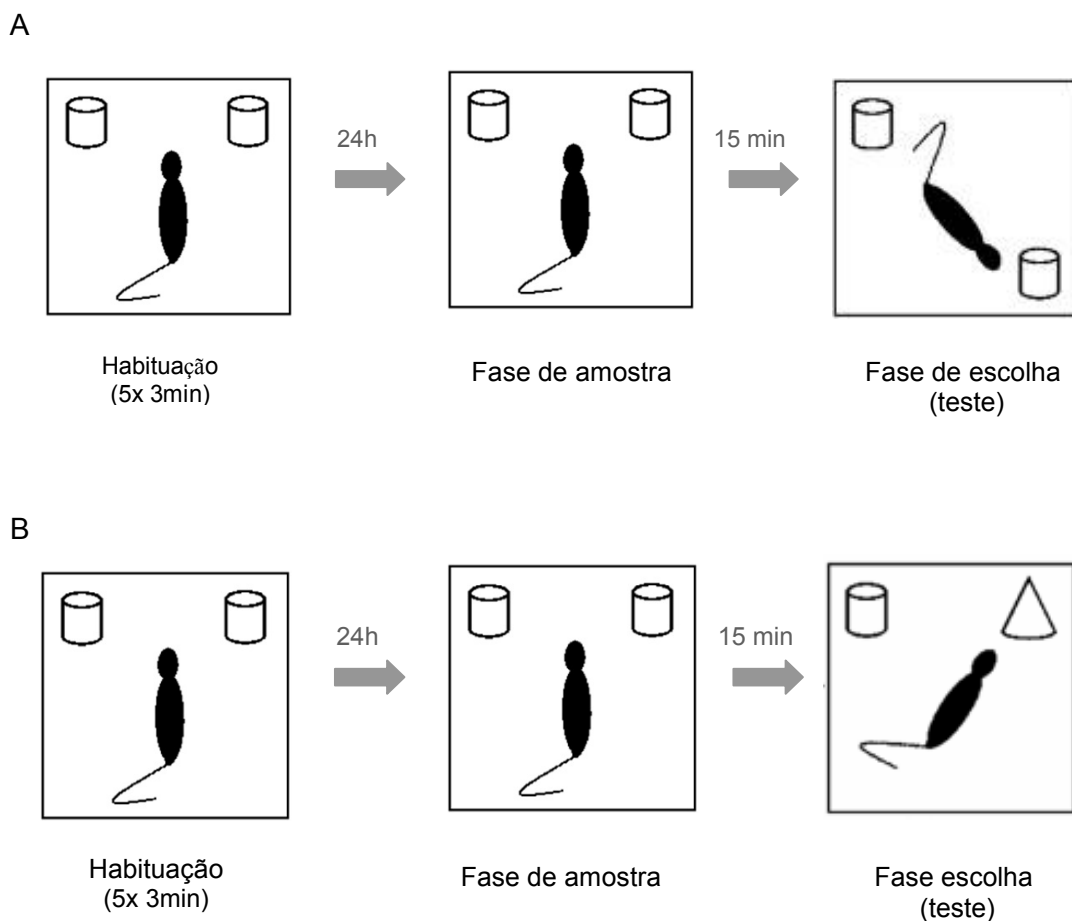


FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA. (A) MEMÓRIA ESPACIAL (DE LOCALIZAÇÃO) E (B) MEMÓRIA NÃO ESPACIAL (DE RECONHECIMENTO DO NOVO OBJETO).

FONTE: adaptado de Ennaceur *et al.*, (2005)

4.2.3 Avaliação neuroquímica

Os animais foram ortotansados por decapitação, e seus estriados dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados e congelados em freezer -80°C , até o momento de terem os níveis de DA, DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) e HVA (ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético) avaliados através do método de cromatografia líquida de alta precisão com detecção eletroquímica (HPLC-ED). Para esta análise, os tecidos foram homogeneizados através de sonicação em 500 mL de solução de extração (0,1 M ácido perclórico, 0,4 mM de metabissulfito de sódio e 0,2 mM de EDTA). O homogenato foi centrifugado a $20.000\times g$ durante 10 minutos, e filtrado com membrana 0,22 μm . Os precipitados foram dissolvidos em NaOH 0,1N e avaliados quanto à concentração proteica utilizando-se o kit de ensaio do ácido bicinconínico (BCA, Pierce Chemical, Rockford, IL). Os sobrenadantes foram submetidos à rápida separação isocrática através de sistema de coluna de fase reversa C18 (Spheri - 5, C18, ODS 5 μm , 25cm, coluna 4,6 μm ; ligada a uma pré-coluna RP-18,7 μm ; Perkin Elmer Brownlee Colu mns, Shelton, CT), e eletroquimicamente detectados usando um detector amperométrico (L-ECD-6A, Shimadzu, Japão), pela oxidação de eletrodo de carbono em +850 mV em relação ao eletrodo referência Ag-AgCl (MACHADO *et al.*, 2008). A fase móvel consistiu em 0,163 M de ácido cítrico, 0,06 M de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,69 mM de octil sódio sulfato, 12 mM de EDTA, 4% de acetonitrila, 1,7% tetra-hidrofurano e ácido fosfórico suficiente para levar o pH a 2,85, diluído em água bidestilada. Cada amostra foi analisada em duplicata para as concentrações de DA, DOPAC e HVA. A recuperação dos analitos foi determinada pela adição de uma concentração fixa de padrão interno de dihidroxibenzilamina (DHBA) antes da homogeneização de tecidos. Todos os padrões e os sais utilizados foram da marca Sigma (St. Louis) e os solventes Carlo Erba (Italy).

4.2.4 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (60mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda) e quetamina (4 mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda), perfundidos intracardiacamente com 200 mL de solução de NaCl 0,9%, seguido de

200 mL de formaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) 0,1M, a uma taxa de infusão de aproximadamente 20 mL/minuto. Foram pós-fixados em solução de formaldeído 4% durante 24 horas e crioprotetidos em solução de sacarose 30% durante 48 horas para posterior congelamento em freezer -80°C.

Cortes coronais de 25 µm foram feitos em criostato (Leica®, modelo CM1850) ao longo da extensão rostro-caudal da substância negra (PAXINOS e 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 da estrutura. Os cortes foram distribuídos sequencialmente em 4 tubos, sendo cada um direcionado a uma análise imunohistoquímica (1º tubo: TH; 2º tubo: GFAP; 3º tubo: OX-42; 4º tubo: reserva).

No momento da análise as secções foram lavadas em solução PB 0,1 M, e a ação da peroxidase endógena foi bloqueada após lavagem com H₂O₂ 1% (30 volumes) em PB. Em seguida as secções foram incubadas com anticorpo primário diluído em PB com 0,1% de Triton X-100 por 24 horas. Os anticorpos utilizados foram anti-TH (tirosina-hidroxilase - 1:1.000, Sigma), anti-GFAP (*Glial fibrillary acidic protein* - 1:2.000, Dako), anti-OX-42 (CD11b microglia ativada 1:1.000, Axyl). Ao fim deste período, as secções foram lavadas e incubadas em seus respectivos anticorpos secundários biotilado (Vector Vectastain Laboratories®, diluição 1:200, em PB e TritonX-100) por 2 horas. Após nova lavagem em PB, seguiu-se a incubação com o complexo avidina e biotina (kit ABC, Vector Vectastain, Laboratories®) por 1 hora, sendo 45 µL do reagente A e 45 µL do B para cada 10 mL de PB com Triton X-100. As secções de tecido foram novamente lavadas e incubadas com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). Após várias lavagens em tampão acetato 0,1 M para inativar a reação, as secções foram montadas em lâminas gelatinadas, desidratadas com banho em solução crescente de álcoois e montadas em Entellan (MERK, Darmstadt, Germany).

As imunohistoquímicas realizadas para GFAP e OX-42 foram analisadas quantitativamente por densidade óptica integrada das marcações positivas dos anticorpos. Para isso, o processo imunohistoquímico seguiu regras de padronização e todas as revelações foram realizadas com o mesmo tempo a partir da mesma solução corante. A quantificação foi realizada a partir de análise de imagens capturadas no scanner de microscopia Zeiss Axio Imager2. Cada imagem capturada permite resultados precisos e reprodutíveis, pois todos os padrões de luminosidade,

foco e objetiva utilizados foram previamente estabelecidos e mantidos em todos os escaneamentos. O aparelho possui iluminação homogênea, o que permite 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 e analisadas pelo software Image J versão 1.32j de domínio público. Para quantificação dos neurônios TH-ir todo o processo de captura de imagens e escaneamento seguiram o protocolo acima descrito com posterior análise realizada com o auxílio do software Image-Pro Express versão 6.0.

4.2.5 Análise através da técnica de Western Blot

4.2.5.1 Avaliação das proteínas Bcl-2 e Bax

Para esta análise os animais foram ortotansados, os encéfalos foram rapidamente removidos, as substâncias negras dissecadas e congeladas em freezer -80°C . Para realizar a extração protéica as estruturas foram sonicadas em 500 μL de tampão de lise (0,2% deoxicolato de sódio, 1% triton X-100, 50 mM tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 2.5 mM Fenantrolina). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15 min, a 10.000 rpm, sob uma temperatura de 4°C . Na porção sobrenadante resultante da centrifugação foi feito todo o processo de análise.

Foi realizada a determinação das concentrações de proteínas a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976), após, foram separadas por SDS-PAGE e submetidas à reação de Western Blot. As amostras aplicadas no gel (equivalente a 80 μg de extrato total de proteína para análise de Bcl-2 e 50ug para análise de Bax) foram preparadas em tampão de amostra redutor (700 mM Tris-HCl, 30% glicerol, 290 mM SDS, 0,012% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol) e desnaturadas a 95°C por 5 min. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS (15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond™-C Extra, Amersham Bioscience, Buckinghamshire-Inglaterra) em aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad)

durante 40 minutos sob corrente constante 15V em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol). As membranas foram coradas com solução Ponceau 0,1% para verificação da transferência. Transferidas as proteínas, as membranas foram então bloqueadas em tampão TBST 0,05% e leite em pó (5%, Molico, Nestlé, Brasil Ltda), por 1h sob agitação em temperatura ambiente. A incubação com anticorpos primários (anti-Bcl-2 1:200 - Santa Cruz Biotecnologia, e anti-Bax 1:200 - Santa Cruz Biotecnologia) foi feita em tampão TBST, BSA 1% ou leite desnatado 5%, por 12-18 horas 4°C sob agitação. As membranas, após lavagens com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase diluído em solução tampão de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Para verificação da presença da banda de interesse, foram feitas novas sequências de lavagens com TBST para então revelar as membranas com substrato adequado para reação de quimioluminescência expondo-as a filme radiográfico em sala escura até obtenção de sinal adequado. A análise das bandas foi realizada por densitometria utilizando o programa ImageJ. Para controle das dosagens protéicas todos os experimentos foram avaliados com a marcação de β -actina.

4.2.5.1 Fracionamento da amostra com centrifugação diferenciada – quantificação do AIF

Para avaliarmos a presença ou não da proteína AIF no núcleo, cada substância negra foi processada a partir de fracionamento celular por centrifugação diferenciada seguindo protocolo de Borsics *et al.*, (2010). Neste, cada amostra (aproximadamente 0,3 g de tecido) foi sonicada em 1 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂). Foi realizada uma centrifugação inicial a 800x g durante 10 minutos, a 4°C. O *pellet* gerado foi ressuscitado em 1 mL de tampão I (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 255 mM sacarose, 10 mM MgCl₂). Neste mesmo tubo foi adicionado gentilmente 1 mL de tampão II (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 350 mM de sacarose, 0,5 mM MgCl₂) para formar um gradiente de concentração diferenciado. Posteriormente foi realizada a centrifugação da amostra durante 10 minutos a 1.430x g, seguida de ressuspensão do infranadante em 200 μ L de tampão de lise (0,2% deoxicolato de sódio, 1% triton X-100, 50 mM tris-HCl pH 7,5, 1 mM

EDTA, 1 mM PMSF, 2.5 mM Fenantrolina). Este produto final continha todos os componentes nucleares das células. Nesta porção foi realizada a determinação das concentrações de proteínas a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a separação das proteínas e realização de Western Blot foi feita a purificação de proteínas da amostra. Para isto, foram adicionados 0,4 mL de metanol a 0,1 mL da amostra. Agitado vigorosamente e centrifugados a 9.000x *g* durante 10 segundos. No mesmo tubo, 0,1 mL de clorofórmio foram adicionados e, novamente agitado vigorosamente e centrifugado a 9.000x *g* durante 10 segundos. Após a adição de 0,3 mL de água bidestilada e autoclavada, repetiu-se o processo de agitação e centrifugação a 9.000x *g* durante 1 minuto a 4°C. Descartou-se a fase superior, e à fase inferior e à interface foram acrescentados 0,3 mL de metanol, para que pela última vez a amostra fosse agitada e centrifugada a 9.000x *g* durante 2 minutos a 4°C. Após descartar a fase superior, as proteínas purificadas contidas no *pellet* sofreram processo de secagem a vácuo.

Após este processamento as proteínas (equivalente a 50 µg de extrato total de proteína) foram ressuspendidas em tampão de amostra redutor (700 mM Tris-HCl, 30% glicerol, 290 mM SDS, 0,012% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) e desnaturadas a 95 °C por 5 min, separadas por SDS-PAGE e submetidas à reação de Western Blot. As proteínas foram separadas em géis de poli(acrilamida)-SDS (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond™-C Extra, Amersham Bioscience, Buckinghamshire-Inglaterra) em aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad) durante 40 minutos sob corrente constante 15V em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol). As membranas foram coradas com Ponceau 0,1% para verificação da transferência. Transferidas as proteínas, as membranas foram então bloqueadas em tampão TBST 0,05% e leite em pó (5%, Molico, Nestlé, Brasil Ltda), por 1h sob agitação em temperatura ambiente. A incubação com anticorpo primário (anti-AIF 1:200 - Santa Cruz Biotecnologia) foi feita em tampão TBST e leite desnatado 5%, por 12-18 horas 4°C sob agitação. As membranas, após lavagens com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase diluído em tampão de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Para verificação da presença da banda de interesse, foram feitas novas sequências de lavagens com TBST para então revelar as membranas com substrato adequado para reação de quimioluminescência expondo-as a filme radiográfico em sala escura até obtenção

de sinal adequado. A análise das bandas foi realizada por densitometria através do programa ImageJ. Para controle e normalização das dosagens protéicas todos os experimentos foram avaliados com a marcação de lamina-A (Sigma 1:200).

Como o AIF é uma proteína que também pode ser encontrada nas membranas mitocondriais, a presença destas em nosso protocolo de centrifugação fracionada poderia influenciar o resultado final. Para tanto, durante a padronização do protocolo acima descrito, tomamos o cuidado de realizarmos a marcação para citocromo c – que mostrou-se negativa – confirmando que o processo de fracionamento estava ausente de contaminação mitocondrial (Anexo 2).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas usando o programa *Statistic 7.0*. Todos os dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os que estavam consistentes com a normalidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias (suplementação e LPS pré-natal como variáveis independentes nos animais de 21 dias) ou três vias (suplementação, LPS pré-natal e LPS pós-natal como variáveis independentes nos animais de 100 dias). ANOVA de medidas repetidas foi utilizada para a avaliação de ganho de massa corporal. Foi realizado, quando indicado, o teste de Duncan como procedimento para comparações *post hoc* para determinar a diferença entre os grupos. Os resultados não paramétricos foram submetidos à Kruskal-Wallis ANOVA. Diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

O tempo médio de duração da gestação das ratas matrizes foi de 22 ± 1 dias. Neste período, seu ganho de massa corporal foi monitorado como um dos parâmetros passíveis de interferência durante a gestação. O dia de confirmação da presença de espermatozóide no lavado vaginal foi considerado o dia 0, e a massa neste dia considerada 100%. A figura 14 expressa a curva de ganho de massa corporal evidenciando que a suplementação com óleo de peixe [ANOVA $F(1,36) = 2,93$; $p = 0,09$] e o processo de exposição ao LPS [ANOVA $F(1,36) = 3,45$; $p = 0,07$] durante o período gestacional não alteraram esta performance.

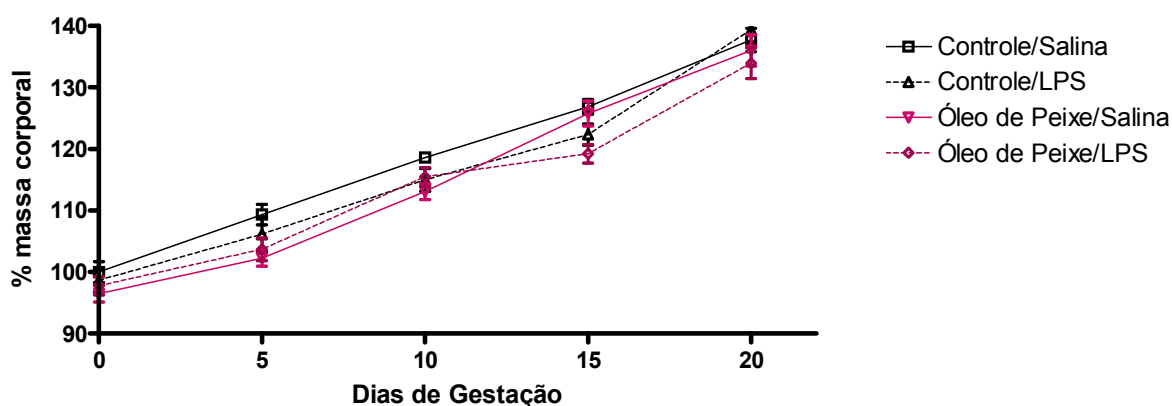


FIGURA 14 – ALTERAÇÕES NA PORCENTAGEM DE MASSA CORPORAL DAS RATAS PROGENITORAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL EM RESPOSTA À SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E A INJEÇÃO INTRAPERITONIAL DE LPS NO PERÍODO EMBRIONÁRIO. ANOVA DE DUAS VIAS COM MEDIDAS REPETIDAS. $n=10$ /GRUPO.

Logo ao nascimento, foram registrados parâmetros macroscópicos relacionados à prole (TABELA 2). Observou-se que as ratas expostas ao LPS tiveram menor número de filhotes [ANOVA $F(1,36) = 11,49$; $p < 0,01$], em relação às que receberam injeção de salina. Dano que não foi revertido pela presença do óleo de peixe durante o período de gestação [ANOVA $F(1,36) = 0,60$; $p = 0,44$].

TABELA 2 – REGISTRO DOS PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DA PROLE AO NASCIMENTO.

Parâmetro	Tratamentos			
	C/S (n=10)	C/LPS (n=10)	OP/S (n=10)	OP/LPS (n=10)
<i>Número de filhotes</i>	11,49 ± 0,81	8,40 ± 1,06 ^a	11,30 ± 0,71	8,80 ± 1,18 ^a
<i>Filhotes machos</i>	7,10 ± 0,88	4,70 ± 0,51 ^b	6,0 ± 0,66	5,40 ± 0,79
<i>Filhotes fêmeas</i>	5,30 ± 0,40	3,70 ± 0,70	5,31 ± 0,72	3,40 ± 0,85
<i>Peso médio do filhote(g)</i>	8,49 ± 0,62	6,88 ± 0,33	7,43 ± 0,40	7,63 ± 0,59

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Duncan. ^ap<0,05 comparado ao C/S e ao OP/S; ^bp<0,05 comparado ao C/S. C: ratas progenitoras que não foram suplementadas; OP: ratas progenitoras que receberam óleo de peixe; S: matrizes que receberam injeção de salina i.p. No 11º gestacional; LPS: matrizes que receberam 1 mg/kg de LPS i.p.

6.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS NOS ANIMAIS DE 21 DIAS

Para investigar possíveis modificações na composição lipídica nas membranas celulares da substância negra analisamos, através de cromatografia gasosa, o perfil lipídico desta estrutura. De acordo com a Tabela 3, é possível perceber que o DHA fornecido às ratas progenitoras foi amplamente incorporado às membranas neuronais da prole (p<0,01), sem que houvesse interferência do tratamento com LPS neste processo [ANOVA F(1,18) = 0,03; p = 0,85]. A razão ω-6 (linoleico + AA) / ω-3 (EPA + DHA) foi significativamente influenciada pela suplementação [ANOVA F(1,18) = 75,38; p = 0,0001], reduzindo-se à metade nos animais que a receberam.

Quando os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, observamos maior permanência na região periférica do aparato nos quatro grupos experimentais, sem implicação de prejuízos causados pela aplicação do LPS [ANOVA F(1,26) = 0,116; p = 0,73] (FIGURA 15A e B). Por outro lado, os animais que foram expostos ao LPS mostraram-se mais ativos desempenhando maior distância percorrida na periferia [ANOVA F(1,26) = 4,61; p<0,05] (FIGURA 15D), e maior velocidade média (+72% no grupo controle; +30% no grupo óleo de peixe) quando comparados aos seus respectivos controles que receberam injeção de salina [ANOVA F(1,26) = 5,44; p<0,05] (Figura 15E).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS MEMBRANAS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

Ácido Graxo	Controle		Óleo de Peixe	
	Salina (n=5)	LPS (n=5)	Salina (n=6)	LPS (n=6)
Mirístico (14:0)	0,47 ± 0,08	0,29 ± 0,04	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,05
Palmítico (16:0)	26,21 ± 2,70	25,75 ± 3,13	24,45 ± 0,55	22,86 ± 0,91
Estearico (18:0)	24,38 ± 3,91	24,64 ± 3,98	21,48 ± 0,73	22,14 ± 0,22
Oleico (18:1 ω-9)	11,52 ± 1,70	12,07 ± 1,38	15,38 ± 1,44	15,03 ± 0,88
Linoleico (18:2 ω-6)	1,78 ± 0,61	1,01 ± 0,29	1,04 ± 0,14	0,89 ± 0,20
AA (20:4 ω-6)	12,92 ± 1,95	12,72 ± 2,68	11,64 ± 0,71	12,13 ± 0,95
EPA (20:5 ω-3)	0,85 ± 0,19	0,71 ± 0,16	1,44 ± 0,37	1,36 ± 0,19
DHA (22:6 ω-3)	11,79 ± 1,92	12,82 ± 2,38	21,82 ± 2,19 ^a	21,61 ± 2,02 ^a
Razão ω-6/ω-3	1,15 ± 0,06	1,01 ± 0,01	0,57 ± 0,06 ^b	0,58 ± 0,06 ^b

Os valores representam a média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Duncan. ^ap<0,01, ^bp<0,0001 comparado aos animais do grupo controle.

Os resultados apresentados na Figura 16A mostram que uma única dose de LPS foi determinante para causar significativo déficit de memória de localização do objeto [ANOVA F(1,56) = 4,90; p<0,05]. A preferência e, conseqüentemente maior tempo de exploração no objeto com nova posição foi demonstrada nos animais salina (controle +49%, e óleo de peixe +53%), confirmando a associação entre este comportamento e a formação de memória dependente de hipocampo. Além disso, quando comparamos somente os animais C/S e OP/S nos deparamos com resultados que demonstram que a suplementação com óleo de peixe *per se* foi capaz de tornar a distinção entre os dois objetos mais evidente [ANOVA F(1,56) = 11,82; p<0,001]. A análise do índice de discriminação entre os dois objetos confirmou o déficit de memória causado pela exposição ao LPS [ANOVA F(1,26) = 13,45; p<0,05], e a prevenção deste dano exercida pela suplementação com óleo de peixe através da significativa interação entre estes dois fatores [ANOVA F(1,26) = 18,89; p<0,001] (FIGURA 16B).

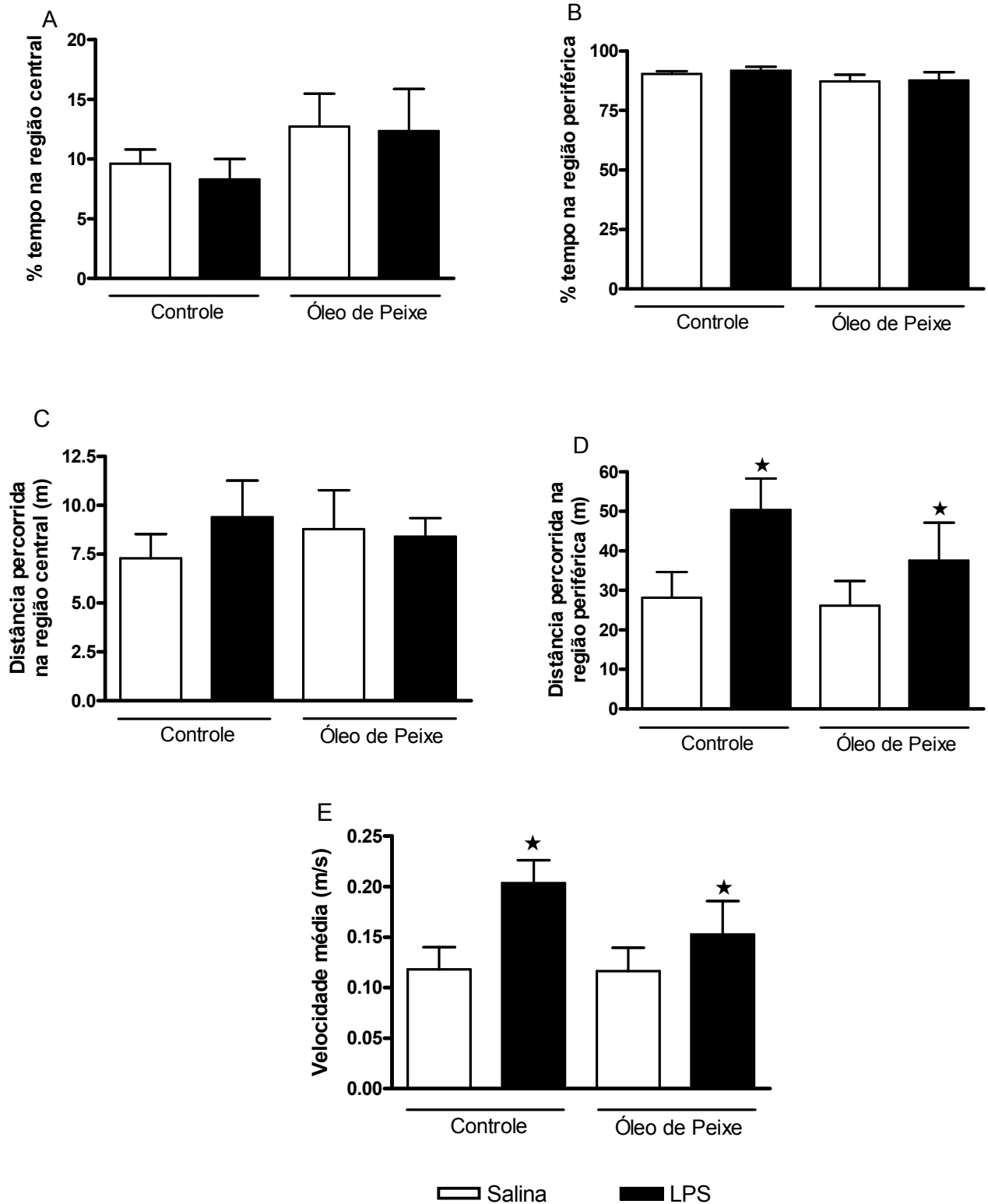


FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA NO TESTE DE CAMPO ABERTO. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$ COMPARADO AOS ANIMAIS SALINA. $n = 7-8$ /GRUPO.

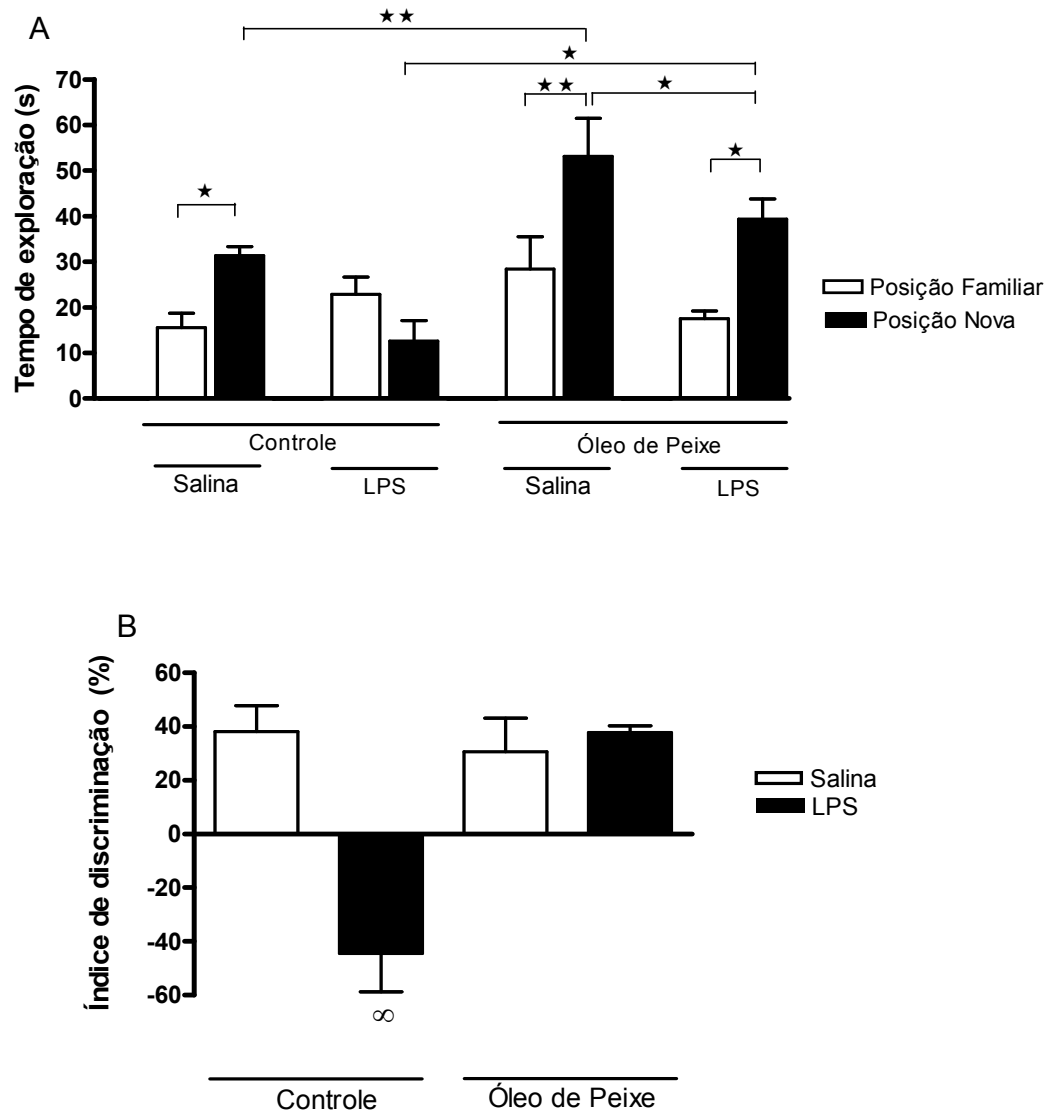


FIGURA 16 - DESEMPENHO NA AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO (A). ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO CALCULADO PELA FÓRMULA $[(\text{TEMPO NA POSIÇÃO NOVA} - \text{TEMPO NA POSIÇÃO FAMILIAR}) / (\text{TEMPO DE EXPLORAÇÃO TOTAL}) \times 100]$ (B). OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDO PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $\infty p < 0,001$ $n = 7-8/\text{GRUPO}$

Paralelamente, o comportamento dos animais no teste de memória não espacial também foi avaliado. Os dados mostrados na Figura 17B indicam o prejuízo causado pela aplicação de LPS [ANOVA $F(1,26) = 7,83$; $p < 0,01$]. Semelhantemente à memória de localização, quando analisamos o índice de discriminação entre os dois objetos (objeto familiar e o novo objeto), observamos que a suplementação com

óleo de peixe preveniu o déficit de memória pois encontramos interação dos fatores óleo de peixe e LPS [ANOVA $F(1,26) = 0,92$; $p < 0,05$] (FIGURA 17B).

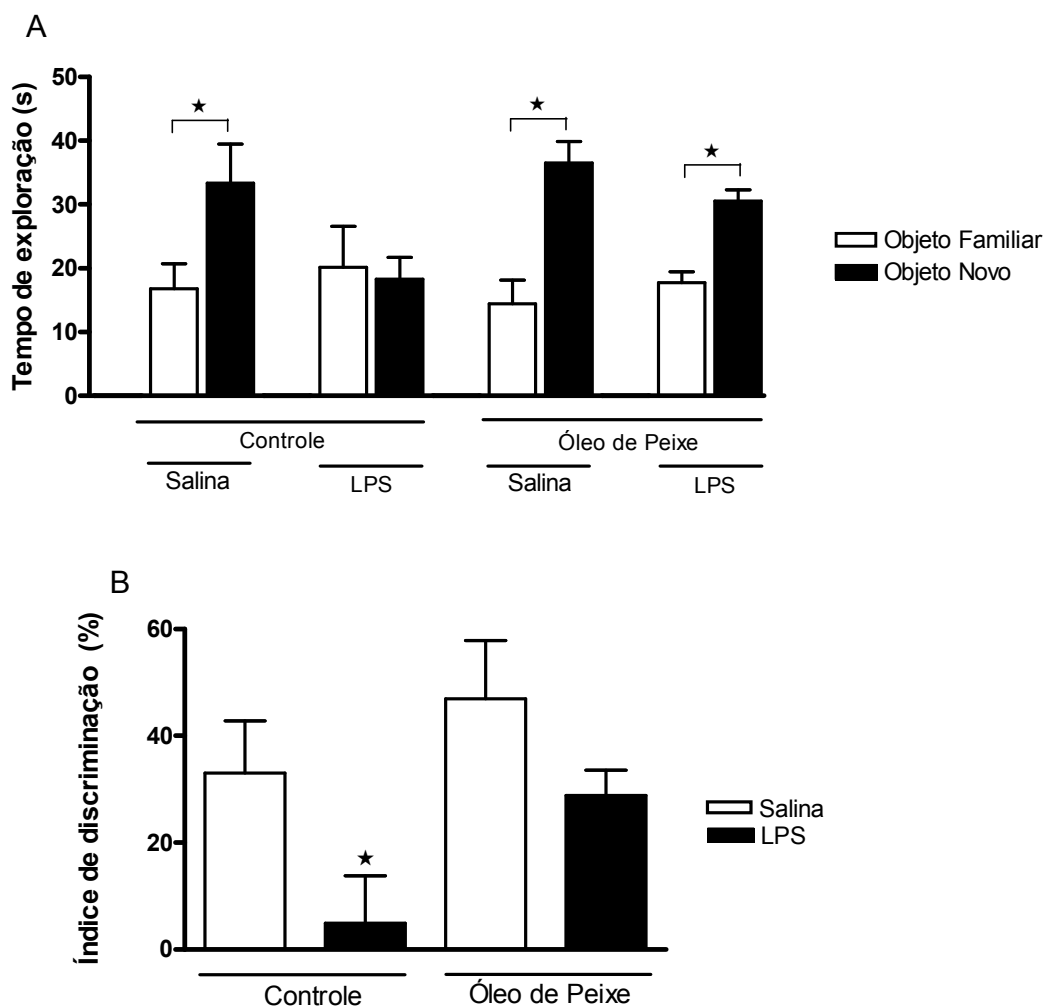


FIGURA 17 - DESEMPENHO NA AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DO NOVO OBJETO (A). ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO CALCULADO PELA FÓRMULA $[(\text{TEMPO NA POSIÇÃO NOVA} - \text{TEMPO NA POSIÇÃO FAMILIAR}) / (\text{TEMPO DE EXPLORAÇÃO TOTAL}) \times 100]$ (B). OS DADOS SÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$. $n = 7-8/\text{GRUPO}$

Somado às alterações comportamentais, a avaliação imunohistoquímica mostrou significativo efeito da exposição ao LPS pré-natal [ANOVA $F(1,16) = 26,66$; $p < 0,0001$] no número de neurônios dopaminérgicos da SNpc (FIGURA 18). Os animais expostos à neurotoxina mostraram redução das células TH-ir tanto no grupo controle (-33%) como no óleo de peixe (-32%). Na Figura 18 também mostramos a

ausência de efeito da suplementação [ANOVA $F(1,16) = 0,19$; $p = 0,66$] ou interação entre estes LPS e óleo de peixe [ANOVA $F(1,16) = 0,01$; $p = 0,90$] neste parâmetro.

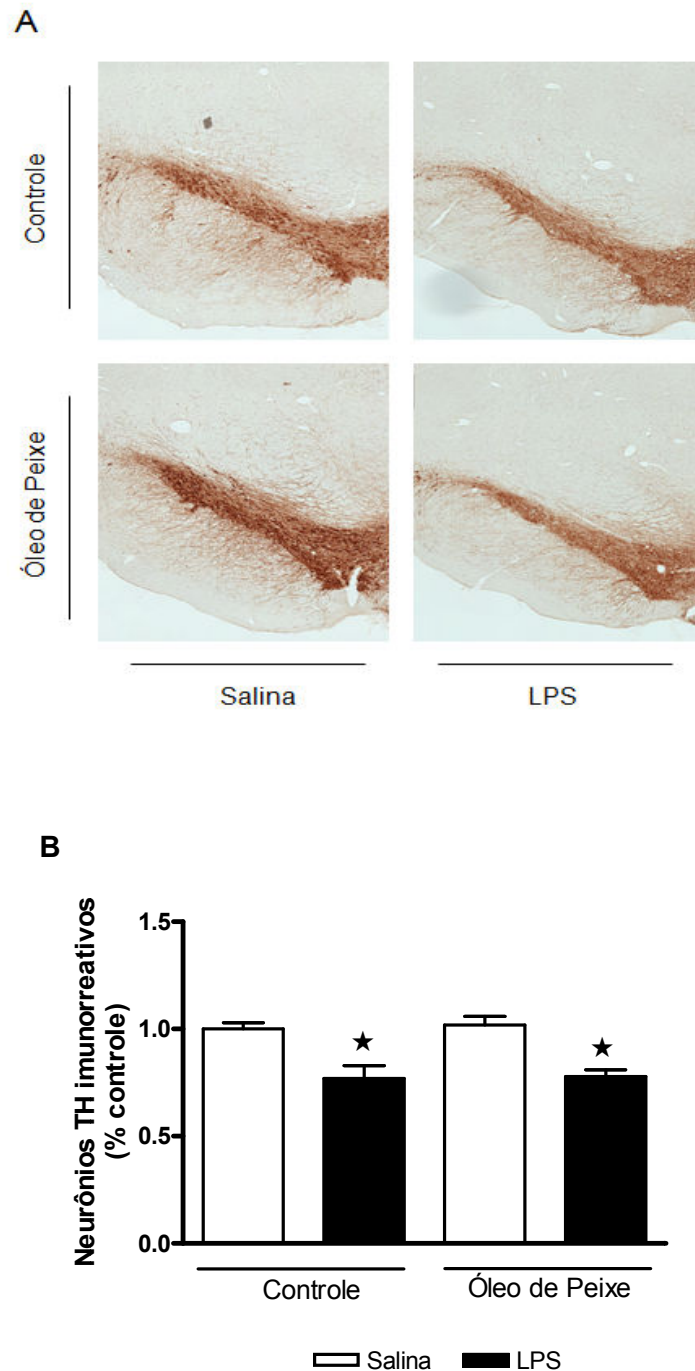


FIGURA 18 - CÉLULAS TIROSINA-HIDROXILASE (TH) IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA NOS ANIMAIS DE 21 DIAS DE VIDA, CUJAS RATAS PROGENITORAS FORAM SUPLEMENTADAS OU NÃO COM ÓLEO DE PEIXE. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS INTRAPERITONIAL DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,01$ vs ANIMAIS SALINA. $n = 5$ /GRUPO.

Paralelamente ao reduzido número de neurônios TH-ir, a quantificação estriatal das concentrações do neurotransmissor DA e seus metabólitos mostrou que os animais expostos ao LPS tinham menos DA quando comparados aos animais que receberam injeção de salina [ANOVA $F(1,19) = 5,60$; $p < 0,05$] (FIGURA 19A). Em contraste, a suplementação com óleo de peixe [ANOVA $F(1,19) = 0,58$; $p = 0,45$] e a interação entre os fatores [ANOVA $F(1,19) = 0,97$; $p = 0,33$] mostraram-se ineficazes em modificar esta redução. Ainda, não encontramos efeito da exposição ao LPS nas concentrações de DOPAC [ANOVA $F(1,19) = 0,99$; $p = 0,33$], HVA [ANOVA $F(1,19) = 0,03$; $p = 0,95$], e suas respectivas taxas de renovação [ANOVA $F(1,19) = 0,59$; $p = 0,45$] e [ANOVA $F(1,19) = 1,72$; $p = 0,20$], ou efeito da suplementação ($p > 0,05$) nas concentrações dos metabólitos avaliados (FIGURA 19B-E).

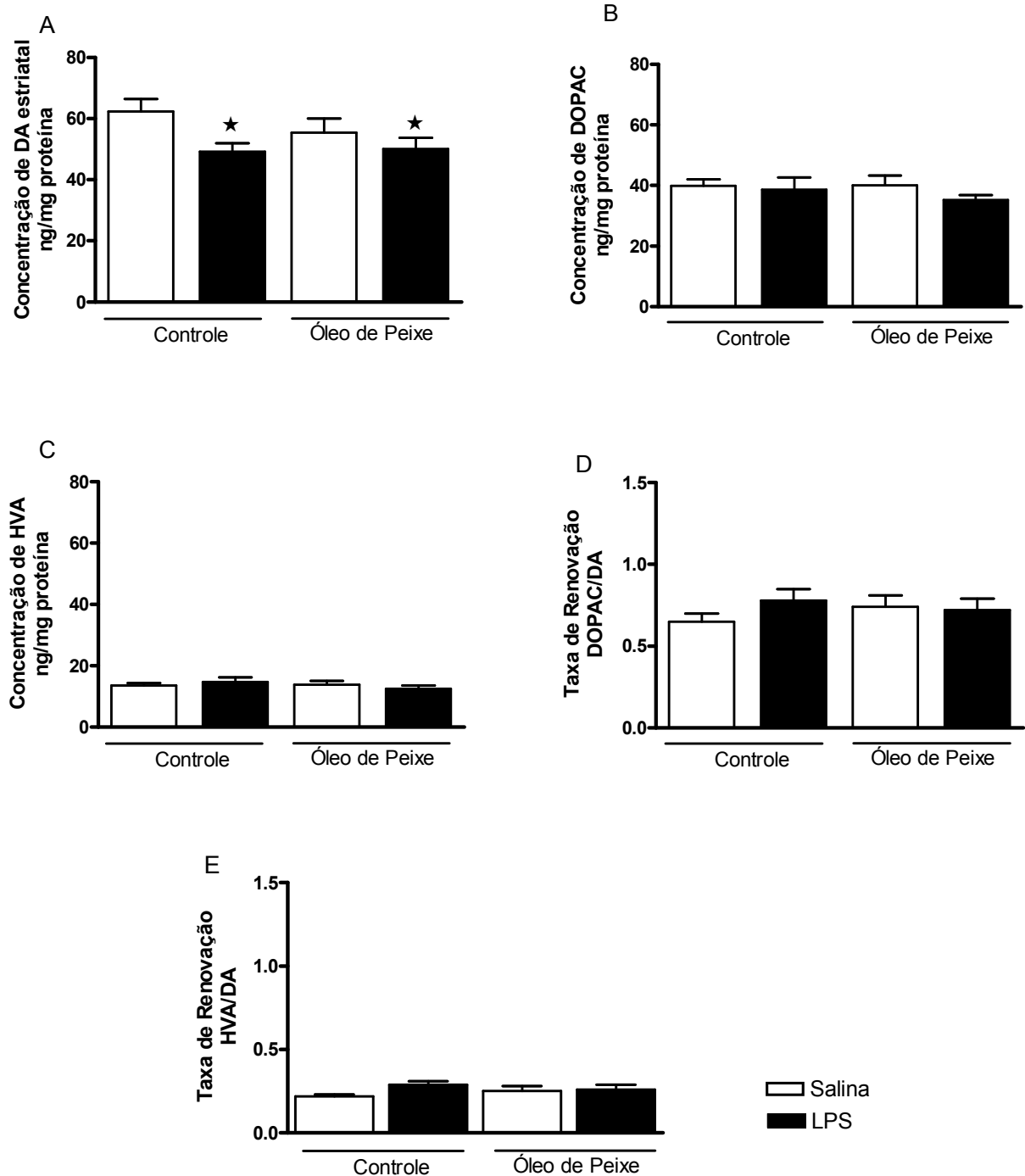


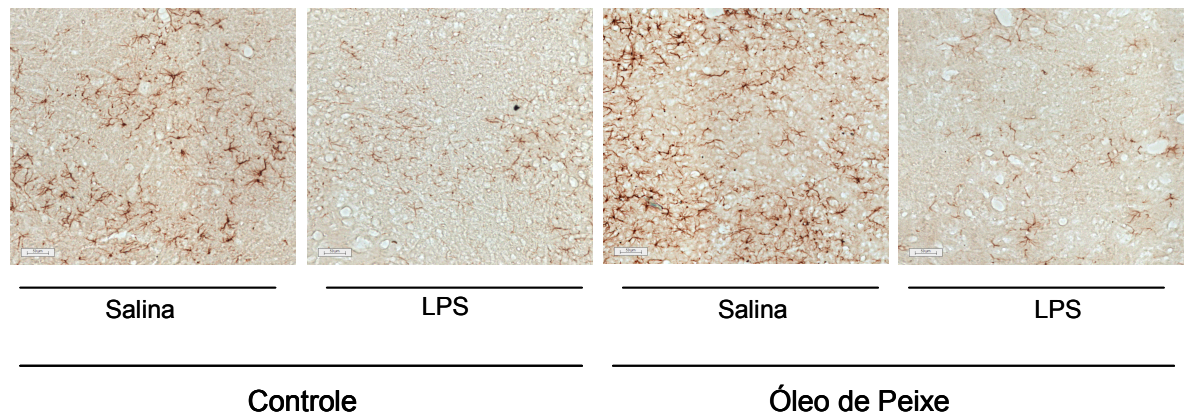
FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA (DA) (A), SEUS METABÓLITOS DOPAC (B) E HVA (C), E RESPECTIVAS TAXAS DE RENOVAÇÃO (D e E). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS i.p. DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. $n=5-6$ /GRUPO.

Por outro lado, a análise microscópica das secções da SNpc, e os resultados obtidos a partir da quantificação por DOI mostram que, quando os animais foram expostos ao LPS, tinham nesta região, significante redução na marcação astrocitária

(GFAP) [ANOVA $F(1,14) = 26,08$; $p < 0,001$] (FIGURA 20). Esta redução, não se mostrou apenas restrita à SNpc, mas de uma maneira padronizada em todo o mesencéfalo (dados não mostrados). Apesar desta alteração, observamos que a presença da suplementação não modificou a densidade astrocitária nos animais que o receberam [ANOVA $F(1,14) = 0,21$; $p = 0,65$].

A análise da substância negra mostrou que, aos 21 dias de vida, a expressão das proteínas anti-apoptótica Bcl-2 [ANOVA $F(1,16) = 0,19$; $p = 0,66$], pró-apoptótica Bax [ANOVA $F(1,16) = 0,57$; $p = 0,45$], e a razão entre ambas [ANOVA $F(1,16) = 0,06$; $p = 0,79$] não estavam alteradas nos ratos que receberam LPS (FIGURA 21). Semelhantemente, na avaliação por ANOVA não encontramos diferença estatística entre os grupos suplementados como óleo de peixe e controle, nos três parâmetros avaliados: Bcl-2 [ANOVA $F(1,16) = 0,86$; $p = 0,36$], Bax [ANOVA $F(1,16) = 0,02$; $p = 0,87$], e razão entre ambas [ANOVA $F(1,16) = 0,50$; $p = 0,48$].

A



B

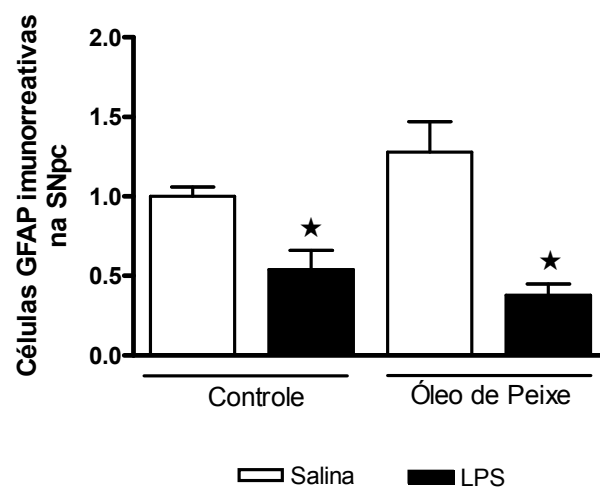


FIGURA 20 – FIGURA REPRESENTATIVA (A) E DENSIDADE ÓPTICA INTEGRADA DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL (GFAP) NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA (B) NOS ANIMAIS DE 21 DIAS DE VIDA CUJAS RATAS PROGENITORAS FORAM SUPLEMENTADAS OU NÃO COM ÓLEO DE PEIXE. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS INTRAPERITONIAL DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$ vs ANIMAIS SALINA. $n = 4-5$ /GRUPO.

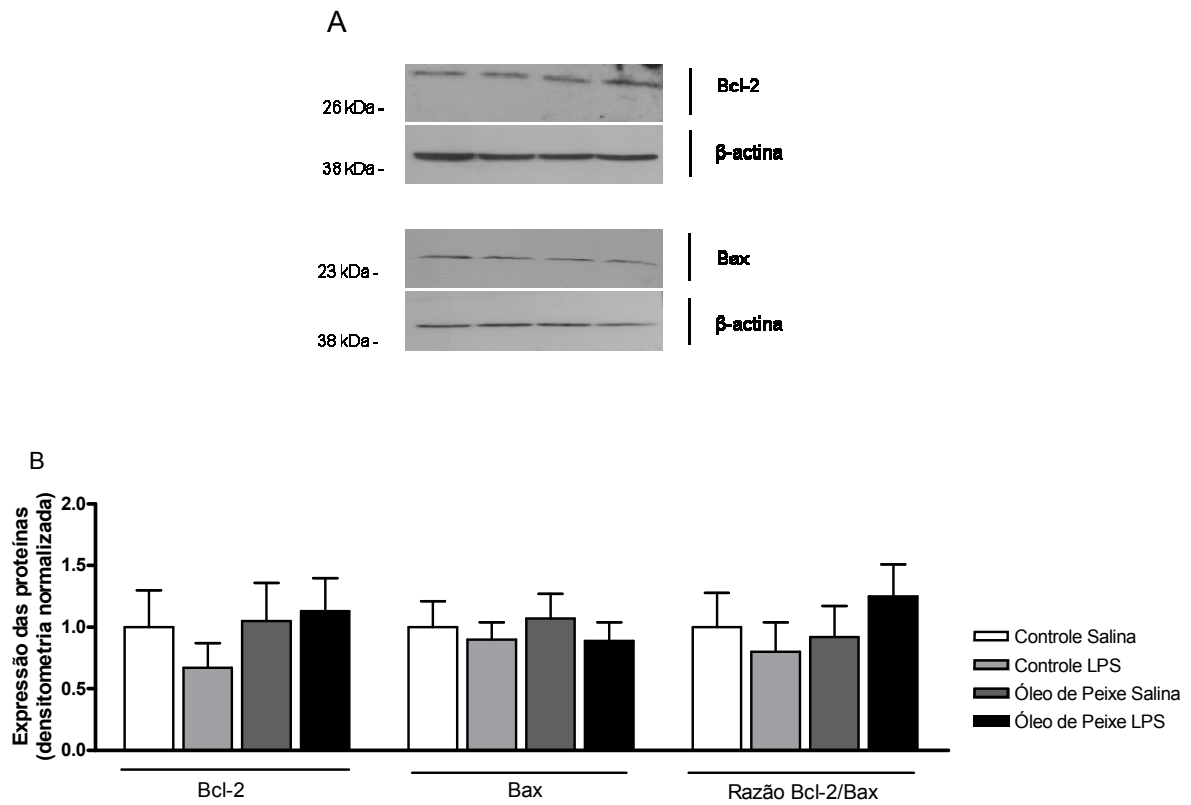


FIGURA 21 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E RAZÃO ENTRE AMBAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 21 DIAS (B). OS VALORES FORAM NORMALIZADOS PELA PROTEÍNA β -ACTINA (A). OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA E REPRESENTADOS COMO PORCENTAGEM DO CONTROLE. ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. $n=5$ /GRUPO.

6.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS NOS ANIMAIS DE 100 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO AO LPS INTRANIGRAL

A Figura 22 ilustra o comportamento motor dos animais no teste do campo aberto. Observamos a ausência de modificação em todos os parâmetros, quando avaliados 7 dias após a injeção intranigral de LPS ($p > 0,05$). Nesta figura também demonstramos que a suplementação com óleo de peixe na gestação e lactação não exerceu influência no desempenho de deambulação na fase adulta do animal ($p > 0,05$). Além disso, a exposição pré-natal ao LPS não precipitou possível efeito sinérgico com a exposição pós-natal capaz de alterar os parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

Os dados referentes à memória não-espacial, apresentados na Figura 23A, mostram que os animais salina pré e pós-natal passaram maior tempo explorando o objeto na nova posição em comparação ao objeto na posição familiar ($p < 0,05$). Através da análise dos dados por ANOVA de três vias observamos significativo déficit de memória causado pela aplicação do LPS tanto pré-natal [ANOVA $F(1,83) = 4,55$; $p < 0,05$], como pós-natal [ANOVA $F(1,83) = 11,79$; $p < 0,01$] quando avaliado o índice de discriminação entre os dois objetos (FIGURA 23B). Observamos também que o tratamento com óleo de peixe mostrou-se eficaz em aumentar a capacidade de o animal distinguir os dois objetos [ANOVA $F(1,172) = 5,88$; $p < 0,05$] (FIGURA 23A), além de significativa interação entre suplementação e a exposição pós-natal ao LPS ser evidenciada [ANOVA $F(1,83) = 22,39$; $p < 0,0001$] (FIGURA 23B).

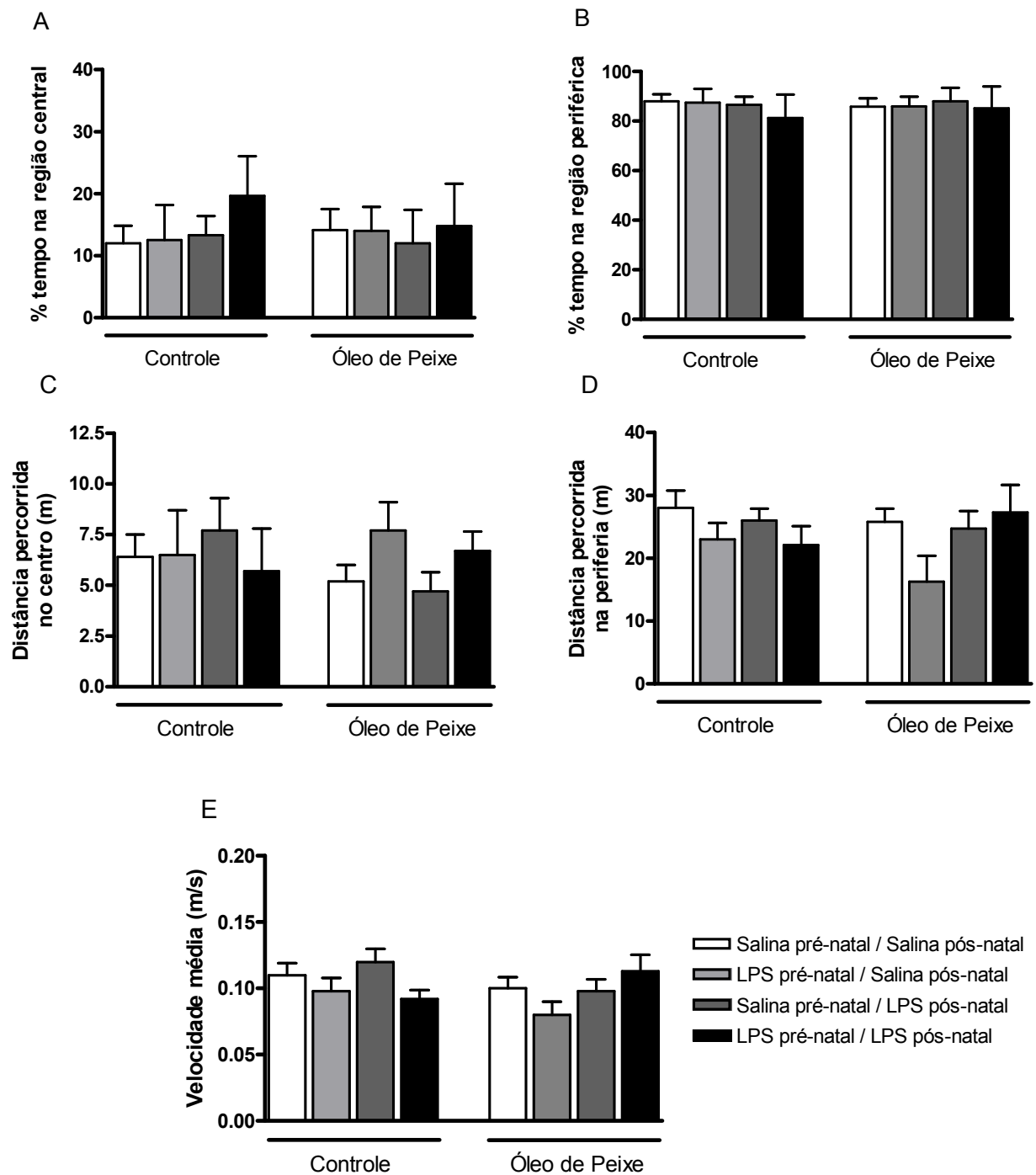


FIGURA 22 – DESEMPENHO MOTOR AVALIADO NO TESTE DE CAMPO ABERTO 7 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO INTRANIGRAL AO LPS. OS ANIMAIS DO GRUPO ÓLEO DE PEIXE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO. A EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LPS DEU-SE ATRAVÉS DE INJEÇÃO i.p. NAS MATRIZES NO 11º DE VIDA INTRA-UTERINA. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE DUNCAN. n=9-10 /GRUPO.

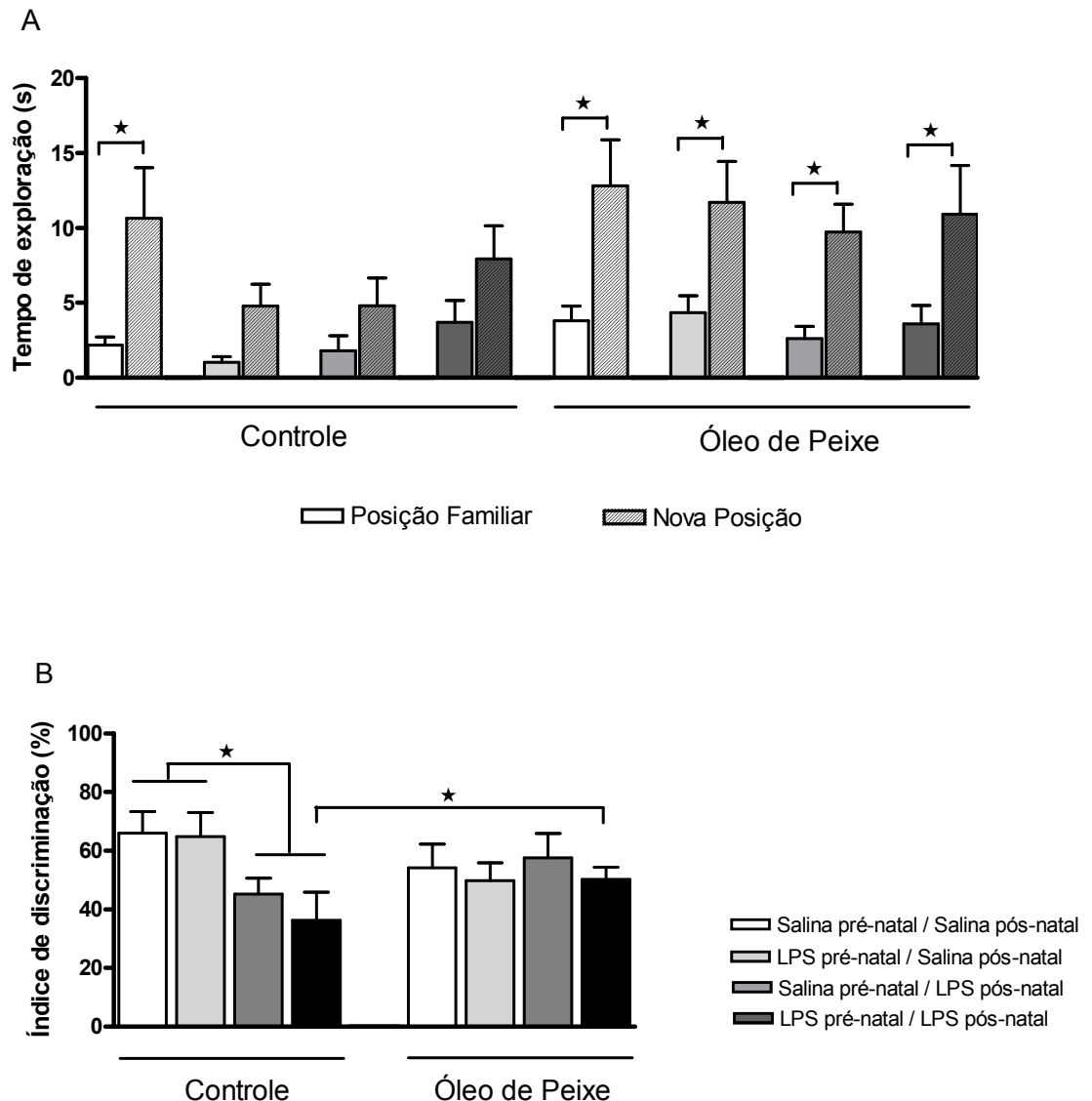


FIGURA 23 – AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO-ESPACIAL REALIZADO NO TESTE DE RECONHECIMENTO DO NOVO OBJETO 7 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO INTRANIGRAL AO LPS (A). OS ANIMAIS DO GRUPO ÓLEO DE PEIXE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO. A EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LPS DEU-SE ATRAVÉS DE INJEÇÃO i.p. NAS MATRIZES NO 11º DE VIDA INTRA-UTERO. ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO CALCULADO PELA FÓRMULA $[(\text{TEMPO NA POSIÇÃO NOVA} - \text{TEMPO NA POSIÇÃO FAMILIAR}) / (\text{TEMPO DE EXPLORAÇÃO TOTAL}) \times 100]$ (B). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$. $n = 9-13/\text{GRUPO}$.

A avaliação do número de neurônios TH-ir na SNpc (FIGURA 24) demonstrou que o dano consequente à injeção pré-natal de LPS manteve-se presente aos 100 dias de vida [ANOVA $F(1,28) = 21,15$; $p < 0,0001$] com redução de -41% e -32% nos animais controle e óleo de peixe respectivamente. Ao mesmo tempo, os animais que receberam LPS somente na vida adulta mostraram perda

neuronal de -28% no grupo controle e -10% no grupo óleo de peixe, mantendo-se estatisticamente igual ao grupo controle ($p > 0,05$). A ação da injeção pós-natal de LPS foi observada nos animais que já tinham sido expostos ao LPS durante período pré-natal [ANOVA $F(1,28) = 7,41$; $p < 0,01$], o que gerou redução de -66% e -61% no número de células imunorreativas nos grupos controle e óleo de peixe respectivamente. Entretanto, a análise de ANOVA de três vias não mostrou interação entre a exposição pré e pós-natal [ANOVA $F(1,28) = 0,06$; $p = 0,80$] uma vez que a perda neuronal do grupo que recebeu LPS nos dois períodos manteve-se estatisticamente igual ao que recebeu somente exposição pré-natal. Ao analisarmos a ação da suplementação com óleo de peixe sobre a morte neuronal, observamos ausência de efeito deste composto em todos os grupos testados [ANOVA $F(1,28) = 0,23$; $p = 0,63$].

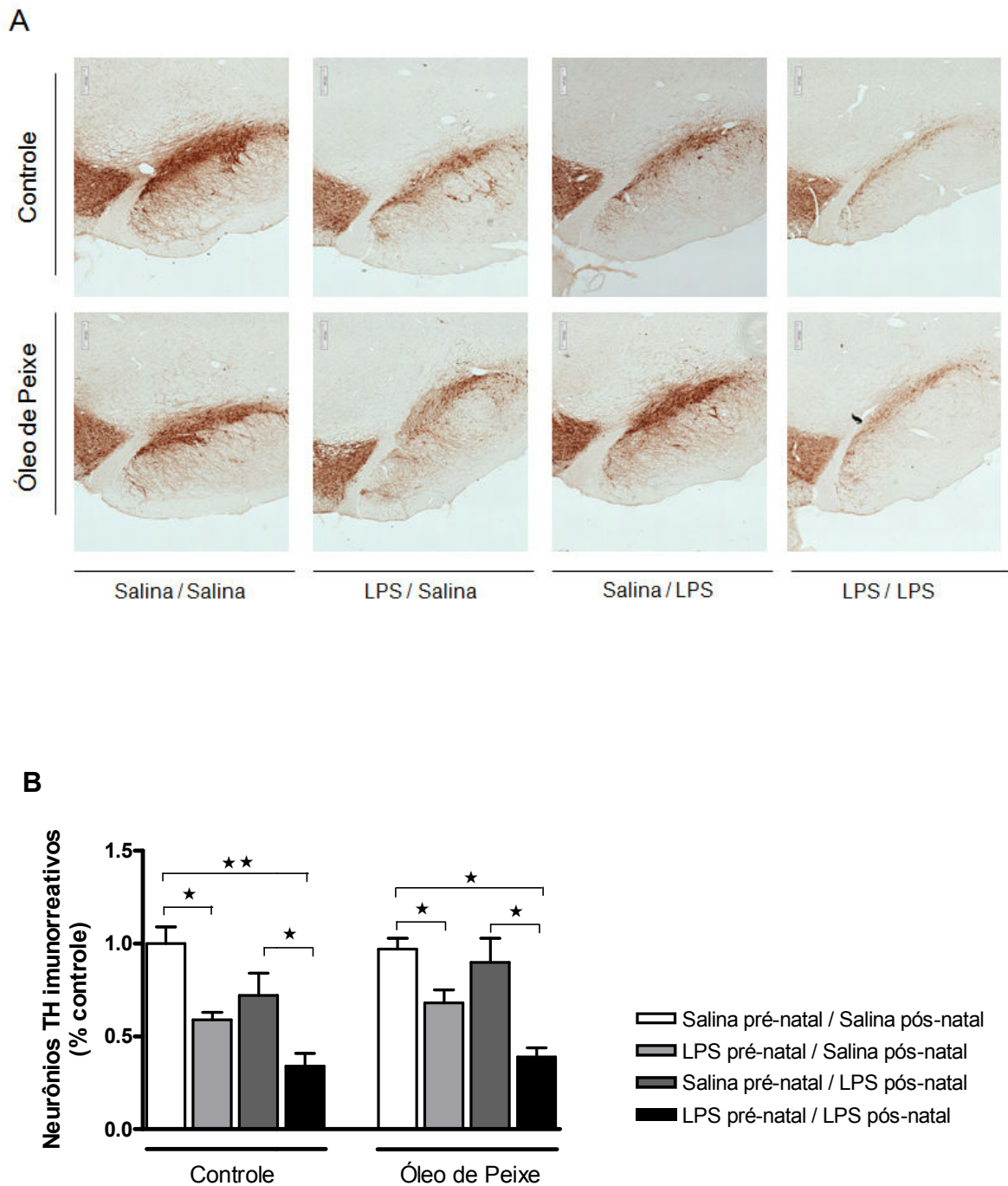


FIGURA 24 – FIGURA REPRESENTATIVA (A) DOS NEURÔNIOS TIROSINA-HIDROXILASE (TH) IMUNORREATIVOS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA, AVALIADOS AOS 100 DIAS DE VIDA (B). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO (LPS PRÉ-NATAL), E A RE-EXPOSIÇÃO AO LPS ATRAVÉS DE INJEÇÃO INTRANIGRAL (LPS-PÓS-NATAL) NOS GRUPOS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE OU NÃO. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n = 5/\text{GRUPO}$.

A concentração de DA nos animais que receberam suplementação com óleo de peixe mostrou-se significativamente inalterada na vida adulta, mesmo quando os ratos foram re-expostos à neurotoxina, confirmando efeito benéfico destes AGPIs [ANOVA $F(1,31) = 18,48$; $p < 0,001$] (FIGURA 25A). Contrariamente, nos animais do grupo controle a exposição pré-natal precipitou a redução deste neurotransmissor na vida adulta [ANOVA $F(1,31) = 15,48$; $p < 0,001$], demonstrando similar efeito à injeção intranigral de LPS somente no período pós-natal [ANOVA $F(1,31) = 20,15$; $p < 0,0001$]. Além disso, o efeito combinado da exposição pré e pós-natal ao LPS potencializou a redução de DA (-60%), fato que foi prevenido pela suplementação com óleo de peixe ($p < 0,001$). Os níveis de DOPAC e HVA não foram alterados pelos fatores suplementação [ANOVA $F(1,31) = 1,29$; $p = 0,26$] e [ANOVA $F(1,31) = 0,62$; $p = 0,43$], pela exposição ao LPS pré-natal [ANOVA $F(1,31) = 1,55$; $p = 0,22$] e [ANOVA $F(1,31) = 0,87$; $p = 0,35$], ou LPS pós-natal [ANOVA $F(1,31) = 2,82$; $p = 0,10$] [ANOVA $F(1,31) = 0,10$; $p = 0,74$] respectivamente (FIGURA 25B e C). As taxas de renovação, quando avaliado DOPAC (FIGURA 25D) e HVA (FIGURA 25E), mostraram-se intensamente aumentadas no grupo controle que recebeu LPS pré e pós-natal, quando comparado a todos os demais grupos ($p < 0,05$). Isto ressalta o efeito da suplementação com óleo de peixe [ANOVA $F(1,31) = 6,28$; $p < 0,05$] que manteve os valores estatisticamente iguais nos quatro subgrupos analisados que o receberam.

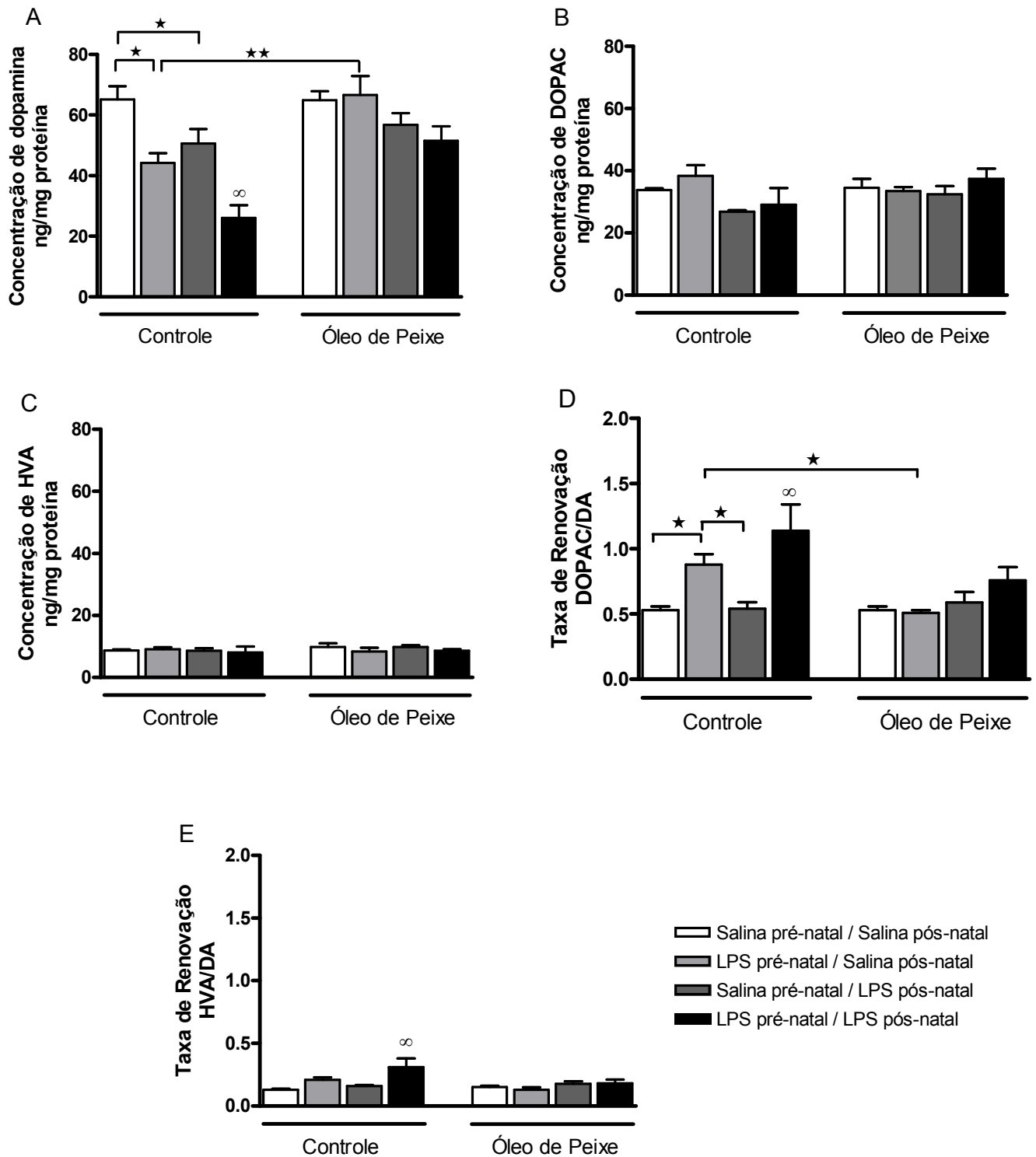


FIGURA 25 – CONCENTRAÇÃO ESTRIATAL DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA (DA) (A), SEUS METABÓLITOS DOPAC (B) E HVA (C), E RESPECTIVAS TAXAS DE RENOVACÃO (D E E) AVALIADOS 7 DIAS APÓS A RE-EXPOSIÇÃO INTRANIGRAL AO LPS. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA DO PÓS-TESTE DE DUNCAN. $n=4-5/\text{grupo}$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. $\infty p<0,05$ COMPARADO A TODOS OS GRUPOS.

As alterações densitométricas para células GFAP imunorreativas na SNpc estão representadas na Figura 26. A partir da análise desses dados verificamos significativo aumento da marcação em consequência à exposição de LPS pós-natal [ANOVA $F(1,31) = 48,01$; $p < 0,0001$]. Ainda, o mesmo padrão de aumento foi observado entre o grupo controle e óleo de peixe, confirmando a ausência do efeito da suplementação neste parâmetro [ANOVA $F(1,31) = 0,84$; $p = 0,36$]. Os resultados também demonstram que, nesta fase, os animais que foram expostos ao LPS pré-natal mostravam marcação astrocitária semelhante aos animais salina [ANOVA $F(1,31) = 0,11$; $p = 0,73$].

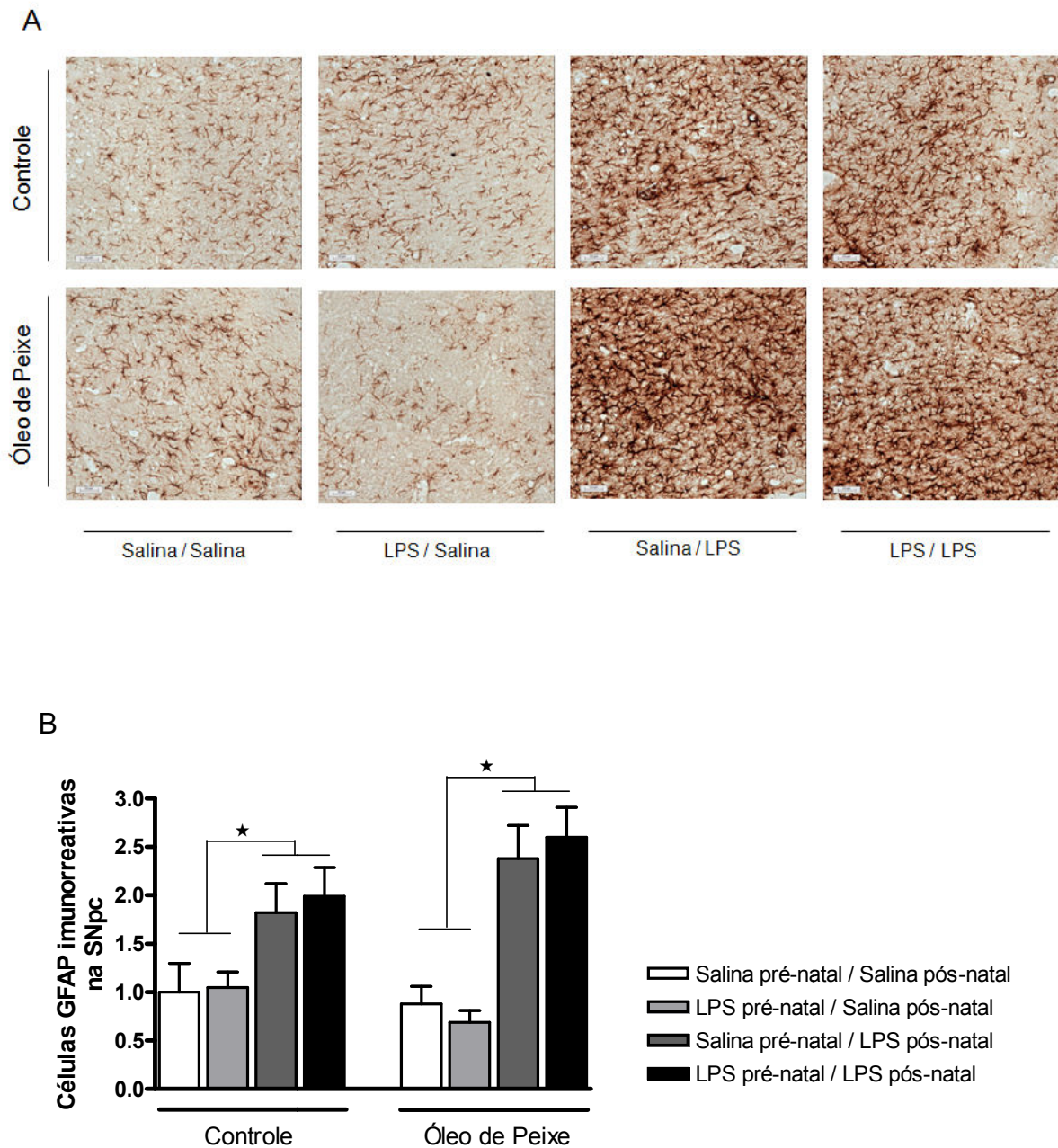


FIGURA 26 – FIGURA ILUSTRATIVA (A) DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS GFAP IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA AVALIADA AOS 100 DIAS DE VIDA (B). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO (LPS PRÉ-NATAL) E A RE-EXPOSIÇÃO AO LPS ATRAVÉS DE INJEÇÃO INTRANIGRAL (LPS-PÓS-NATAL) NOS GRUPOS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE OU NÃO. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. * $p < 0,05$. $n = 4-5$ /GRUPO

A ativação microglial foi avaliada utilizando marcação de anticorpo monoclonal para OX-42. A partir da intensidade da marcação, pudemos observar que a exposição pré-natal não foi suficiente para alterar estes valores quando

analisados na vida adulta [ANOVA $F(1,31) = 0,52$; $p = 0,47$]. Os dados representados na Figura 27 também mostram que a suplementação não influenciou esta ativação [ANOVA $F(1,31) = 1,28$; $p = 0,26$] consequente à injeção de LPS intranigral no período pós-natal [ANOVA $F(1,31) = 10,53$; $p < 0,01$].

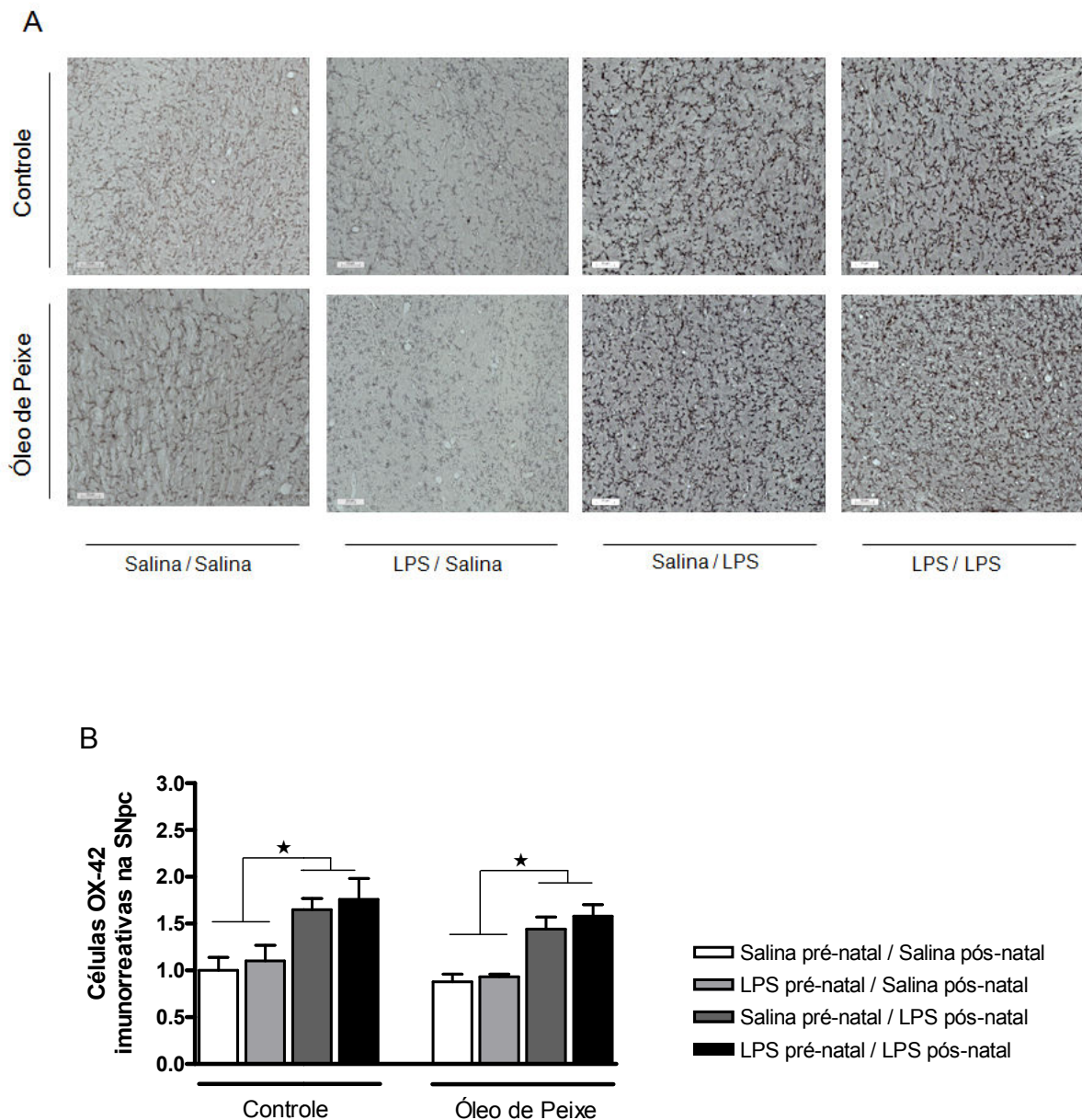


FIGURA 27 – FIGURA ILUSTRATIVA (A) DA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS OX-42 IMUNORREATIVAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA AVALIADA AOS 100 DIAS DE VIDA (B). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. $*p < 0,05$. $n = 4-5$ /GRUPO.

Em relação à expressão das proteínas Bcl-2, Bax e a razão entre ambas (FIGURA 28A e B), observamos que a exposição pré-natal ao LPS não causou modificações nestes valores na vida adulta [ANOVA $F(1,23) = 0,27$; $p = 0,60$], [ANOVA $F(1,23) = 3,38$; $p = 0,08$] e [ANOVA $F(1,23) = 2,9$; $p = 0,10$] respectivamente. Além disso, a análise dos dados indicou que 48 horas após a injeção intranigral de LPS, os níveis de expressão dessas proteínas permaneceram inalterados nos grupos que receberam a neurotoxina pós-natal [ANOVA $F(1,23) = 0,65$; $p = 0,43$] para Bcl-2, [ANOVA $F(1,23) = 0,21$; $p = 0,65$] para Bax, e [ANOVA $F(1,23) = 0,0008$; $p = 0,97$] para a razão entre ambas. Os valores referentes aos animais que receberam suplementação com óleo de peixe também são demonstrados na Figura 28B, e evidenciam a ausência de efeito deste composto nos dados analisados ($p > 0,05$).

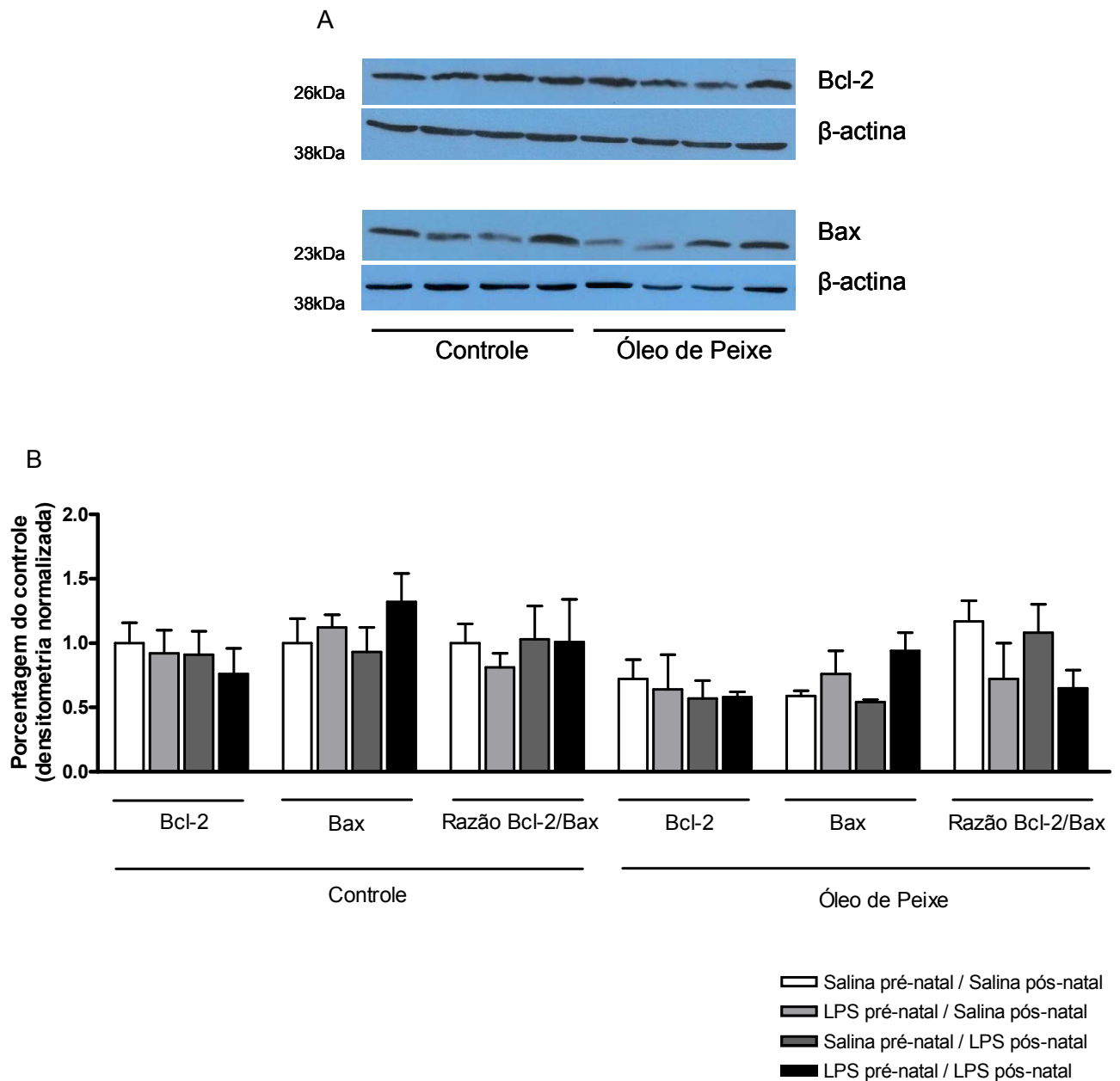


FIGURA 28 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E RAZÃO ENTRE AMBAS NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 100 DIAS (B). A EXPRESSÃO FOI NORMALIZADA PELA PROTEÍNA B-ACTINA (A). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA, E INDICAM O EFEITO DA APLICAÇÃO DE LPS DURANTE O PERÍODO EMBRIONÁRIO (LPS PRÉ-NATAL) E A RE-EXPOSIÇÃO AO LPS ATRAVÉS DE INJEÇÃO INTRANIGRAL (LPS PÓS-NATAL) NOS GRUPOS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE OU NÃO. ANOVA DE TRÊS VIAS SEGUIDA PELO PÓS-TESTE DE DUNCAN. $n=4$ /GRUPO.

Para determinar a concentração de AIF intranuclear nas células presentes na substância negra, realizamos a técnica de Western Blot, após protocolo de fracionamento celular. Os resultados apresentados na Figura 29 nos mostram que os animais do grupo salina, tanto controle como óleo de peixe, apresentavam uma quantidade basal de AIF intranuclear. Associado a isto, a análise por ANOVA Kruskal-Wallis evidenciou que a concentração desta proteína, 7 dias após a injeção intranigral de LPS, permanecia estatisticamente igual em todos os grupos estudados [ANOVA Kruskal-Wallis $H(7,24) = 6,34$; $p = 0,49$].

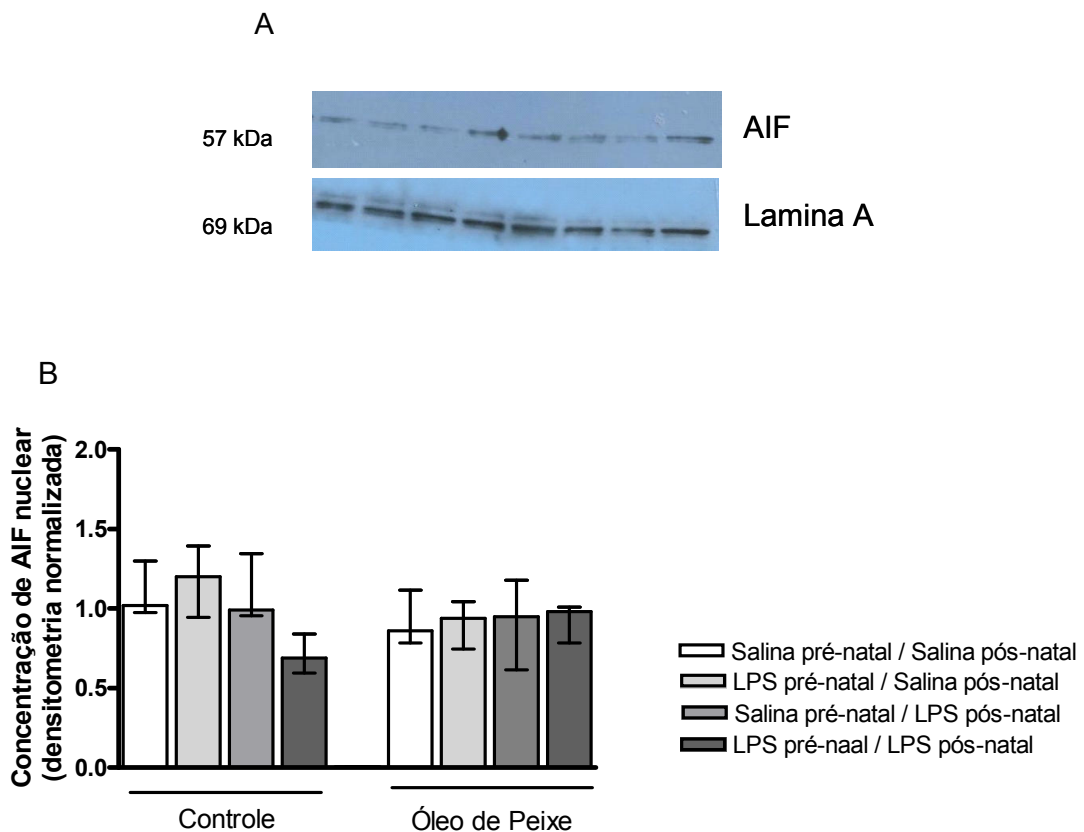


FIGURA 29 – EXPRESSÃO INTRANUCLEAR DA PROTEÍNA AIF NA SUBSTÂNCIA NEGRA NOS ANIMAIS AOS 100 DIAS (B). A EXPRESSÃO FOI NORMALIZADA PELA PROTEÍNA LAMINA-A (A). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MEDIANA E INTERVALO INTERQUARTIL (Q25/75). ANOVA KRUSKAL-WALLIS. N=3/GRUPO.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a capacidade da suplementação materna com AGPIs ω -3 gerar modificações funcionais no microambiente glial e neuronal da prole e sua capacidade em atenuar ou reverter a neurotoxicidade causada pela inflamação, e conseqüente dano aos neurônios dopaminérgicos em modelo animal de DP.

A DP é uma patologia neurodegenerativa complexa que inclui sintomas cognitivos, motores e não-motores, com fatores etiológicos ainda estudados, e, atualmente, com tratamentos baseados em cuidados e medicamentos paliativos. Essas observações reforçam a necessidade do estudo de terapias de neuroproteção que produzam benefícios duradouros, e influenciem favoravelmente a etiologia da doença e/ou déficits subseqüentes como a morte neuronal, e a expressiva redução de DA estriatal.

Nas últimas duas décadas pesquisadores começaram a desvendar a ação dos AGPIs ω -3 na doença DP. Estudos arguem a ligação entre a patologia e a disfunção do metabolismo encefálico dos ácidos graxos (JULIEN *et al.*, 2006), e embasam a hipótese de que a dieta rica em ω -3 é benéfica em pacientes parkinsonianos (de LAU *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2008). Os efeitos observados quando a sintomatologia da doença foi extrapolada aos modelos animais, em primatas não-humanos e roedores, também refletiram potencial efeito neuroprotetor desses ácidos graxos (SAMADI *et al.*, 2006; BOUSQUET *et al.*, 2008; BOUSQUET *et al.*, 2009; DELATTRE *et al.*, 2010). Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que a suplementação com 3mg/kg/dia de óleo de peixe em ratos adultos submetidos à injeção estriatal de 6-OHDA, foi altamente eficaz em reduzir a morte dos neurônios dopaminérgicos, a ativação microglial e astrocitária, e os níveis da enzima oxido nítrico sintase induzível na SNpc (dados não publicados). A partir das evidências desse conjunto de estudos pré-clínicos comprovou-se que o consumo de AGPIs ω -3 durante o insulto neurotóxico com 6-OHDA, MPTP ou LPS, exerce ação neuroprotetora em diferentes aspectos de avaliação no sistema dopaminérgico (revisado por BOUSQUET *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012).

No entanto, se avaliarmos o aspecto translacional dos resultados acima descritos, nos deparamos com algumas dificuldades. Sabe-se que os sintomas motores (e, conseqüentemente o diagnóstico) da DP começam a se tornar mais

evidentes quando a neurodegeneração dopaminérgica excede 50-60%, e a redução de DA estriatal aproximadamente 70% (DEBEIR *et al.*, 2005). Antes disso, os sinais motores não são tão claros, e dessa forma, o início da DP ocorre progressivamente de maneira silenciosa. Como ao longo das últimas décadas mudanças qualitativas extremas na nutrição ocorreram, e hoje a dieta de uma sociedade industrializada é caracterizada por um aumento do consumo de gordura saturada e de AGPI ω -6, e deficitária em AGPIs ω -3, reduzida parcela da população é beneficiada com o efeito neuroprotetor do ômega-3 sobre a morte dos neurônios dopaminérgicos no decorrer da fase pré-diagnóstica da DP. Assim, nosso propósito quando optamos pela suplementação maternal foi restringir o período da ingesta de ômega-3 e analisar seu possível efeito preventivo na morte dos neurônios dopaminérgicos na fase adulta sem, necessariamente, sua presença na dieta posterior.

Estudos em humanos e roedores demonstram que uma dieta perinatal deficiente em AGPIs ω -3 pode levar a uma variedade de anormalidades neuronais, e contribuir para o surgimento de patologias como: déficit de atenção e hiperatividade, depressão, esquizofrenia, autismo e ansiedade (revisado por JANSSEN e KILIAAN, 2014). Por outro lado, o efeito da suplementação materna com AGPIs durante a gestação é bastante difundido como determinante no crescimento e desenvolvimento neural (HADDERS-ALGRA, 2011). Pesquisa realizada recentemente em nosso laboratório mostrou impacto positivo da suplementação com óleo de peixe, durante o período de desenvolvimento encefálico pré e pós-natal, em prevenir a ocorrência de comportamento depressivo e ansiogênico em modelo animal de depressão submetidos à bulbectomia olfatória na fase adulta (PUDELL *et al.*, 2014). Contudo, ao nosso conhecimento, não existem evidências na literatura de trabalho prévio que investigou o efeito da suplementação materna com AGPIs em doenças neurodegenerativas como a DP.

7.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA GERAÇÃO F₁ AOS 21 DIAS, E DA APLICAÇÃO DE LPS NA FASE EMBRIONÁRIA

A composição das membranas celulares está em constante processo de remodelamento, e as concentrações de AGPIs ω -3 e ω -6 acumulados nas células e tecidos refletem qualitativamente a maneira com que nos alimentamos (LES, 2012). Usando a técnica de cromatografia gasosa, foi demonstrado que o fornecimento indireto de óleo de peixe à prole modificou o conteúdo de DHA nas membranas da substância negra. Devido a ampla função desempenhada pelo DHA no tecido neuronal, seu conteúdo é constantemente repostado diretamente pela dieta ou através de seus precursores. No SNC, o tecido endotelial e os astrócitos são hábeis em sintetizar DHA a partir dos seus precursores por mecanismo de conversão a partir de cadeias com 18 (α -linolênico), 20 (ácido eicosatetraenóico e EPA), 22 (ácido docosapentaenóico) e 24 carbonos (ácido tetracosahexaenóico) (MOORE, 2001; HORROCKS e FAROOQUI, 2004). Assim, com os resultados de incorporação lipídica no tecido encefálico realizado neste experimento, no qual se observou elevado índice de DHA e manutenção dos níveis de EPA, levantamos a hipótese de que o conteúdo adicional de EPA fornecido aos animais suplementados possa ter sido utilizado como precursor na cascata de conversão que culmina com a formação de DHA. Além disso, não pode-se descartar o fato de que o EPA sofre β -oxidação 2,5 vezes mais rápida que o DHA (CHEN *et al.*, 2011) e pode entrar em várias vias de sintetização, incluindo derivados como os eicosanóides, que geralmente são formados a partir de cadeia carbônica de 20 carbonos (CALDER, 2006).

No presente trabalho além de estudar o efeito do óleo de peixe, fornecido durante a formação do SNC sobre a doença neurodegenerativa, o associamos à hipótese de que a causa da DP é resultante da interação sinérgica de múltiplos fatores. Nos últimos anos, alguns autores demonstraram que fatores específicos – como o processo inflamatório - que ocorreram ainda com o indivíduo na vida intra-uterina ou no período perinatal, podem predispor o sistema nigroestriatal a um dano posterior (revisado por BARLOW *et al.*, 2007). Isso se torna importante pois infecções por bactérias Gram negativas, incluindo *Escherichia coli* e *Gardinerella vaginalis* são comuns durante a gestação humana. Aproximadamente 90% dos casos de infecção do trato urinário são causadas por *Escherichia coli*, e afetam 25-

35% das mulheres entre 20-40 anos, e 14% das gestantes (THORSEN *et al.*, 1998; MITTAL e WING, 2005). Infecções bacterianas, particularmente as infecções assintomáticas durante a gestação podem levar a sérias complicações, incluindo nascimento pré-termo, baixo peso ao nascimento, retardo mental e morte fetal (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Em nosso experimento, não encontramos redução do peso médio dos filhotes. Porém, significativa redução no número total de componentes da prole foi demonstrada em decorrência do processo inflamatório.

Como a prole foi exposta sistemicamente ao LPS, atentamos-nos a investigar possíveis déficits de motricidade e de memória nesses jovens animais. Quando os ratos foram submetidos ao teste de campo aberto, observamos maior índice de permanência na região periférica do aparato nos quatro grupos experimentais. Isto denota, em nosso experimento, um comportamento aversivo inerente ao animal frente a um novo desafio, sem implicar prejuízos causados pela aplicação do LPS. Por outro lado, os animais que foram expostos ao LPS mostraram-se mais ativos desempenhando maior distância total percorrida, e maior velocidade média quando comparados aos seus respectivos que receberam injeção de salina. Trabalho realizado por Kirsten *et al.*, (2010) mostrou que a prole, cujas mães haviam recebido 100µg/kg de LPS i.p. no dia 9,5 gestacional, teve reduzida interação social, mas inalterado comportamento deambulatório. Em protocolo semelhante, a aplicação de 66µg/kg i.p. de LPS no dia 10,5 de gestação causou resposta de ansiedade, elevado estresse na prole, e maior distância percorrida no campo aberto pelas filhotes fêmeas, mas não pelos machos (LIN *et al.*, 2012). Esses trabalhos ilustram a diversidade de protocolos e resultados encontrados na literatura em relação ao comportamento motor após a aplicação de LPS durante a gestação (LING *et al.*, 2009; PENTEADO *et al.*, 2014; STIGGER *et al.*, 2013). Sabe-se que tanto a exposição pré-natal ao LPS como a aplicação sistêmica desta toxina em ratos adultos induz a uma série de alterações fisiológicas, e podem ser amplamente utilizados como modelo de depressão (WATANABE *et al.*, 2004; LIN e WANG, 2014). Assim, em nosso experimento, baseados nos achados de maior distância total percorrida e maior velocidade média desempenhada pela prole que foi exposta ao LPS, sugerimos que o viés tipo-depressivo esteja presente, uma vez que a hiperatividade é parte integrante da sintomatologia apresentada em modelos animais de depressão como a bulbectomia olfatória (revisado por HARKIN *et al.*, 2003; PUDELL *et al.*, 2014).

Nos últimos anos os testes de reconhecimento (NORT – do inglês *novel-object recognition test*) e de localização de objetos (OLT – do inglês *object localization test*) tornaram-se paradigmas bastante utilizados. Estes são usados para medir a preferência espontânea dos animais, sem necessidade de privação de comida ou água, e sem a exigência de estendido treinamento. Em nossos resultados mostramos que a exposição sistêmica ao LPS pré-natal gerou déficit de memória espacial e não-espacial. Na memória espacial, a preferência, e conseqüentemente maior tempo de exploração no objeto cuja posição era nova foi demonstrado nos animais que não receberam LPS (+49% e +53%), reproduzindo a confiabilidade do teste na avaliação da memória (MUMBY *et al.*, 2002; ENNACEUR *et al.*, 2005). Estudo realizado por Popovic *et al.*, (2006) avaliou a prole de ratas expostas ao etanol durante a gestação e lactação, e mostrou que foram intensamente afetados quanto ao desempenho no teste de memória espacial com objetos. Os autores discutem que este déficit está relacionado ao dano da região CA1 hipocampal durante a formação do SNC. Na realidade, o hipocampo tem um papel central na aprendizagem e memória, e é particularmente vulnerável a insultos durante a formação do SNC (revisado por LEVY *et al.*, 2009). Crescente número de evidências mostram a associação entre fatores inflamatórios na gestação, e a sua influência nos processos de aprendizagem e memória. A injeção pré-natal de 0,79mg/kg de LPS nas ratas nos dias 8, 10 e 12 de gestação mostrou precipitar déficits cognitivos hipocampo-dependentes na geração F₁ (HAO *et al.*, 2010). Para os autores estes achados embasam a hipótese de que a inflamação materna sistêmica pode alterar o estado dos astrócitos da prole por longo tempo, e com isso afetar neurônios e o desenvolvimento das sinapses, resultando em diminuição da memória e do aprendizado (Hao *et al.*, 2010). Nossos resultados confirmam esta labilidade hipocampal frente ao insulto com LPS e a neuroproteção causada pela suplementação com óleo de peixe. Ao que parece, a presença de DHA hipocampal durante a formação do indivíduo tem importante papel na prevenção de dano causado pela inflamação. Recentemente, alguns trabalhos mostraram o efeito benéfico da suplementação com óleo de peixe durante a gestação e lactação sobre a memória e formação hipocampal (FENG *et al.*, 2012; VINES *et al.*, 2012; SABLE *et al.*, 2013; PUDELL *et al.*, 2014). Todavia, nenhum aborda a lesão inflamatória causada pela exposição ao LPS neste período. Tuzun *et al.*, (2013) mostrou que a suplementação materna com ômega-3 atenuou a apoptose após hiperóxia induzida,

e aumentou a contagem de neurônios na região de CA1 e giro denteado do hipocampo, e córtex parietal dos filhotes logo ao nascimento. Trabalhos recentes também mostraram que a suplementação durante a gestação e lactação manteve níveis de serotonina e de BDNF hipocampais aumentados em animais jovens e adultos (VINES *et al.*, 2012), e foi eficaz em melhorar a memória hipocampo-dependente em modelo de depressão (PUDELL *et al.*, 2014). Assim, da mesma forma que o hipocampo é sensível ao insulto durante a formação do SNC, mostra-se bastante moldável à ação protetora do ômega-3, uma vez que este pode aumentar fatores que promovem o potencial de longa duração (LTP) e fortalecer a plasticidade sináptica para o aprendizado espacial e formação de memória; além de promover efeitos celulares como sinaptogênese, aumento das densidades dendríticas e neurogênese, e ainda influenciar processos como o de apoptose, inflamação e estresse oxidativo (McNAMARA e CARLSON, 2006; SU, 2010).

Semelhante neuroproteção causada pelo óleo de peixe foi observada em nosso experimento na memória não-espacial. O teste de cognição espontânea, utilizando o NORT pode ser correlacionado à memória episódica em humanos (KART-TEKE *et al.*, 2006; MORRIS, 2001; WINTERS *et al.*, 2008), que está comprometida nos pacientes com DP, principalmente nas fases tardias da doença (WHITTINGTON *et al.*, 2000; BARAN *et al.*, 2009). Pesquisas com animais demonstram a influência do sistema nigroestriatal no desempenho nesse teste de memória. A injeção sistêmica de antagonista do receptor dopaminérgico D₁ causou considerável piora no comportamento de escolha do objeto (BESHEER *et al.*, 1999; de LIMA *et al.*, 2011). Além disso, estudo publicado recentemente demonstrou que a interação entre as projeções nigroestriatais e o córtex pré-frontal medial é essencial para o desempenho no NORT, mas não no OLT em ratos submetidos à injeção de 6-OHDA (CHAO *et al.*, 2013). Alguns estudos investigaram a influência da inflamação pré-natal sobre possíveis déficits no NORT na prole. A injeção de 4mg/kg intravenosa de ácido polinosínico-policidílico (PolyI:C) – que mimetiza os efeitos de infecção viral no animal – durante o dia 15 gestacional, mostrou ineficácia em modificar o comportamento no NORT no período púbere dos animais (HOWLE *et al.*, 2012). Entretanto, dois estudos com ratos expostos ao LPS pré-natal relataram resultados distintos. Golan *et al.* (2005) surpreendentemente mostraram que quando testados, os ratos tiveram maior preferência de exploração pelo novo objeto, e discutem que o dano materno no 17º dia gestacional não modifica este tipo de

memória. Enquanto Coyle *et al.*, (2009) encontraram déficit de memória após exposição de LPS no dia 9 gestacional. Estes autores arguem que quanto mais inicial a exposição ao LPS, mais influenciável é o processo de maturação neuronal e sinaptogênese para que ocorram danos futuros (Coyle *et al.*, 2009). Em nosso experimento, mostramos que a injeção de LPS no 11º dia de gestação causou significativo déficit na distinção entre os dois objetos nos animais de 21 dias. Por outro lado, a presença do óleo de peixe nesta fase de formação neuronal preveniu este comportamento. Poucos estudos foram designados a investigar compostos neuroprotetores, fornecidos durante a gestação, que desencadeassem prevenção dos déficits no NORT gerados pelo LPS pré-natal. Dentre eles, Coyle *et al.*, (2009) mostraram que a dieta rica em zinco durante a gestação, mesmo sem alterar a expressão gênica, proveu estratégia nutricional protetora que limitou o dano comportamental gerado durante o neurodesenvolvimento. No presente trabalho, não conseguimos indicar com precisão o mecanismo pelo qual o óleo de peixe exerceu o efeito neuroprotetor. Entretanto, ao que parece, este composto influenciou a função neuronal modificando a resposta comportamental, sem, todavia, alterar o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc.

Nos últimos anos, o impacto da inflamação pré-natal sobre os neurônios dopaminérgicos tem sido descrito na literatura. Baseados nos achados de que citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no encéfalo de pacientes com DP, alguns autores hipotetizaram que a administração de LPS, em ratas grávidas, pudesse ser potencialmente relevante para a degeneração dopaminérgica resultante de condições de infecção bacteriana durante a gestação em humanos. Em estudo realizado por Ling *et al.*, (2002) uma única administração i.p. de 1mg/kg de LPS, em ratas no dia 10,5 da gestação, foi suficiente para reduzir o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc e na área tegmentar ventral (VTA), além de diminuir significativamente a concentração de DA estriatal nos filhotes. Trabalhos posteriores do mesmo grupo mostraram que, associado à redução de neurônios TH-ir, a aplicação de LPS pré-natal ocasionou considerável aumento dos níveis de TNF- α estriatal (LING *et al.*, 2004b), gerou distúrbio da homeostase da glutatona (ZHU *et al.*, 2007), além de observadas inclusões citoplasmáticas tipo-corpos de Lewy imunorreativas à α -sinucleína na SNpc e no córtex (LING *et al.*, 2009). Na tentativa de delinear efetivamente o processo de morte neuronal após o insulto inflamatório (SNYDER-KELLER e STARK, 2008) estudaram *in vivo* células da SNpc e do

estriado retiradas de animais que receberam LPS no dia 10, 14 e 18 de gestação. Os autores discutem que, principalmente nas duas datas iniciais o LPS além de reduzir drasticamente a densidade dos neurônios dopaminérgicos, seus núcleos estavam claramente fragmentados, e com processo de retração. Adicionalmente, os achados indicam que a exposição inflamatória não apenas afeta os neurônios dopaminérgicos diretamente, mas também pode modificar fatores críticos no desenvolvimento do estriado, como fatores neurotróficos providos pelo microambiente (SNYDER-KELLER e STARK, 2008).

Em nosso experimento, o efeito deletério do LPS foi observado tanto no número de neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc, quanto na redução da concentração de DA estriatal (Figuras 18 e 19). Entretanto, surpreendentemente, mesmo com a incorporação de DHA nas membranas neuronais, não observamos resultado de neuroproteção do óleo de peixe nesses parâmetros. Para Wang *et al.*, (2009) os mecanismos pelos quais a injeção de LPS pré-natal interfere na ontogênese dos neurônios dopaminérgicos ainda não são claros. Pesquisas que tiveram como princípio a aplicação de LPS durante o período embrionário, mostraram reduzida neurogênese e baixa concentração de BDNF hipocampal (LIN e WANG, 2014), decréscimo na arborização dendrítica no córtex pré-frontal medial e no hipocampo (BAHARNOORI *et al.*, 2009), e significativo aumento de IL-1 β e do número de corpos apoptóticos na substância branca periventricular (KUMRAL *et al.*, 2007). Por outro lado, vasta literatura mostra que o fornecimento de ômega-3 durante a gestação pode atuar, separadamente, nesses quesitos. Dieta rica em DHA, ou DHA e EPA fornecida às ratas matizes restaurou os níveis de glutathione (PATTEN *et al.*, 2013a), e reverteu os déficits na plasticidade sináptica hipocampal (PATTEN *et al.*, 2013b) causados pela exposição pré-natal ao etanol; além de reduzir a apoptose pós-hiperoxia induzida (TUZUN *et al.*, 2012). Em adição, a suplementação nesta janela temporal foi capaz de aumentar os níveis de BDNF e de serotonina no encéfalo de ratos jovens e adultos (VINES *et al.*, 2012; PUDELL *et al.*, 2014). Baseados nos dados expostos, e à inegável ação anti-inflamatória do ômega-3 (revisado por CALDER, 2006; CALDER, 2012a), inclusive em doenças neurodegenerativas (CALON e COLE, 2007; BOUSQUET *et al.*, 2011;), acreditávamos que, em nosso trabalho, pudéssemos observar ação neuroprotetora na morte neuronal. Recentemente, trabalho publicado por Rose *et al.*, (2014) utilizou protocolo semelhante ao utilizado em nosso experimento, forneceu às ratas

progenitoras dieta rica em resveratrol durante a gestação, e analisou a prole aos 21 dias de vida. O resveratrol – um composto comumente encontrado em frutas e bagas – inibiu a redução da expressão de TH estriatal e o decréscimo nas concentrações de DA, DOPAC e HVA nesta estrutura. Por outro lado, a expressão de DAT no tecido estriatal não foi alterada pela injeção de LPS ou pela alimentação com resveratrol (ROSE *et al.*, 2014). A compatibilidade do tema estudado por Rose *et al.*, (2014) com o do nosso experimento confirma a atualidade do nosso objeto de pesquisa, e a importância da descoberta de agentes preventivos da morte neuronal dopaminérgica após insulto pré-natal. Todavia, nossos resultados, ao analisarmos os animais aos 21 dias, mostram que o fornecimento suplementar de ômega-3 não alterou a capacidade de manutenção do número de neurônios dopaminérgicos, e não preveniu a redução de DA estriatal pós-insulto inflamatório pré-natal, considerado, na literatura, como intenso (SNYDER-KELLER e STARK, 2008).

Apesar dos mecanismos envolvidos na morte celular dopaminérgica gerado por insulto de LPS no período embrionário serem pouco esclarecidos, estudo *in vitro* realizado por Snyder-Keller e Stark., (2008) confirmou que havia fragmentação e retração nuclear nessas células. Assim, um dos nossos objetivos foi avaliar a concentração de proteínas pró- e anti-apoptóticas e seu possível envolvimento na morte celular, além de investigar se a suplementação com óleo de peixe poderia alterar estas concentrações na SNpc. Oskvig *et al.*, (2012) constataram alteração em 3.285 genes em diferentes categorias funcionais na prole, 4 horas após a aplicação de 0,25mg/kg de LPS i.p. nas ratas prenhas. Dentre as alterações, mostraram aumento da expressão de RNA mensageiro para estresse celular, e genes envolvidos na morte celular como o gene Bcl-2/adenovirus E₁, cuja função envolve supressão da expressão de proteínas Bcl-2 (OSKVIK *et al.*, 2012). Em nosso experimento, constatamos que, aos 21 dias de vida, a concentração de Bcl-2 e Bax, nos animais que receberam LPS encontravam-se significativamente iguais aos animais que não o receberam. Todavia, não podemos descartar, com estes resultados, que possa ter ocorrido um aumento dessas proteínas, ainda no período intra-uterino, e que isso de alguma maneira tenha contribuído para a morte celular por apoptose dos neurônios dopaminérgicos. Trabalho publicado por Rousset *et al.*, (2006) confirmaram a presença de sinal TUNEL positivo em células da região periventricular, relacionando-o à morte celular programada por apoptose em decorrência da exposição a 300µg de LPS i.p. nos dias 19 e 20 gestacional. Em

contrapartida, durante o desenvolvimento neuronal existem mecanismos extremamente atuantes para o controle restrito dos níveis de Bcl-2 e Bax, de acordo com cada região encefálica. Segundo Mooney e Miller (2000) no encéfalo normal de ratos, a concentração mesencefálica de Bcl-2 mostrou crescente aumento do 16º dia gestacional ao 6º dia pós-natal, mantendo-se constante até o 30º dia pós-natal. Os níveis de Bax aumentaram do 16º dia de gestação ao 12º dia pós-natal, e também permaneceram constantes após este período. Assim, em nosso estudo, não podemos descartar a possibilidade de a injeção com LPS ter aumentado os níveis dessas proteínas durante horas ou poucos dias após o procedimento, e atuado de forma ativa na redução dos neurônios dopaminérgicos, mas que os mecanismos intrínsecos à manutenção da homeostase encefálica mantiveram-os, aos 21 dias de vida, em níveis fisiológicos. Por outro lado, ao adotarmos esta hipótese, apontamos a ausência de efeito anti-apoptótico da suplementação indireta aos filhotes. A literatura nos mostra que o DHA e seu derivado neuroprotectina-1 são responsáveis pela super-expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, e redução nas concentrações das proteínas Bax, Bid e Bad (revisado por BOUSQUET *et al.*, 2011), proteínas sabidamente envolvidas no processo apoptótico na DP (ALVES DA COSTA e CHECLER, 2011). Recentemente, estudo realizado por Afshordel *et al.*, (2014) mostrou que o fornecimento de óleo de peixe em ratos idosos teve como consequência profundo efeito na composição da membrana mitocondrial, melhora da função do complexo respiratório I e IV, e aumento considerável nos níveis de Bcl-2 no homogenato encefálico. Diante da ausência de efeitos do óleo de peixe nas concentrações de Bcl-2 e Bax nos animais de 21 dias em nosso experimento, e pela reduzida literatura que investigou este tipo de protocolo, podemos levantar as seguintes hipóteses: (i) que a suplementação indireta, fornecida às ratas progenitoras não é suficiente para modificar os níveis dessas proteínas no encéfalo da prole; (ii) que a morte neuronal dopaminérgica gerada pela aplicação i.p. de LPS não envolva, necessariamente, os mecanismos Bax/Bcl-2; e (iii) que o insulto com LPS, e consequentemente a morte neuronal, foram muito intensos, e assim, inacessíveis para um efeito neuroprotetor do óleo de peixe.

É bastante descrito na literatura que o efeito da exposição materna ao LPS no desenvolvimento encefálico fetal não é diretamente ligado ao LPS, mas indiretamente pela indução de citocinas pró-inflamatórias na circulação materna, na placenta e no encéfalo fetal (BOKSA, 2010). Neste contexto, a microglia e os

astrócitos entram como suporte ao dano neuronal. Semelhante aos achados de Bell e Hallenbeck (2002), não encontramos marcação para microglia ativada (OX-42) ao avaliarmos os encéfalos aos 21 dias (dados não mostrados). Para Cai *et al.*, (2000) a administração periférica de LPS induz a ativação microglial no encéfalo que perdura durante 7 dias, retornando ao estado de repouso após este período.

Alguns estudos mostraram que o aumento astrocitário está presente em regiões no encéfalo (principalmente no hipocampo) de ratos adultos que sofreram exposição ao LPS no período intra-uterino (BOKSA, 2010; HAO *et al.*, 2010). Todavia, poucos estudos direcionaram suas análises ao encéfalo de animais neonatos ou na fase jovem que passaram por este insulto. Em nosso experimento, ratos com 21 dias de vida foram analisados, e mostramos que frente à aplicação de LPS, a SNpc tinha reduzida marcação astrocitária – GFAP positiva. Recentemente, trabalho realizado por Arsenault *et al.*, (2014) também mostrou, através da técnica de Western Blot, reduzida marcação para GFAP e para neurônios em homogenato encefálico de ratos com 10 dias de vida que haviam sofrido aplicações de 120µg/kg de LPS i.p. nos dias 15-17 de gestação. Para Jarlestedt *et al.*, (2013) a neurogênese é particularmente susceptível ao processo inflamatório. Na formação do encéfalo, os astrócitos desempenham importante atividade influenciando a neurogênese, a proliferação, e a diferenciação de células tronco neuronal (JARLESTEDT *et al.*, 2013). Além disso, como a maior parte da proliferação e a diferenciação dos astrócitos acontece nas fases mais tardias da gestação, e início da vida pós-natal (CAI *et al.*, 2000), a atividade astrocitária pode modular tanto a formação das sinapses (CHUNG e BARRES, 2011), como a própria atividade sináptica (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Pesquisas demonstram que os astrócitos interagem ativamente durante a sinapse, e são essenciais para a circuitaria neural, além de influenciar fortemente a remodelação sináptica no encéfalo normal ou em resposta à lesão neuronal (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Desta forma, com nossos resultados, mostramos que a aplicação de LPS reduziu a formação astrocitária encefálica, e este fato pode ter influenciado diretamente os neurônios dopaminérgicos. Ainda, a partir dos resultados que mostraram significativo déficit de memória, encontrado nos nossos testes comportamentais, pressupomos que a formação sináptica, e a circuitaria dopaminérgica podem ter sido intensamente influenciadas em decorrência da redução astrocitária e da sua função. Além disso, não podemos descartar que uma das possíveis explicações do melhor desempenho

cognitivo nos testes comportamentais, encontrado nos animais que receberam óleo de peixe, esteja correlacionado à neuroproteção da função sináptica e/ou da circuitaria neuronal em decorrência do melhor suporte astrocitário nesta fase.

7.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA GERAÇÃO F₁, E DA RE-EXPOSIÇÃO AO LPS INTRANIGRAL DURANTE A VIDA ADULTA (100 DIAS DE VIDA)

Emergente linha de estudos postula que a suscetibilidade ao aparecimento de neopatologias na fase adulta é estabelecida durante o desenvolvimento na vida intra-uterina ou no período perinatal. Isto porque uma das mais significantes alterações no tecido neural é a toxicidade silenciosa, descrita como estado de lesões morfológicas e bioquímicas persistentes que ficam clinicamente mascaradas, através de mecanismos compensatórios, até um limite máximo, mas que aumentam consideravelmente a vulnerabilidade de morte celular frente a insultos posteriores (GIORDANO e COSTA, 2012). Estes danos posteriores, segundo Costa *et al.*, (2004), podem ter característica física ou exposição toxicológica; fisiopatológica tal como doenças, estresse ou desnutrição; ou mesmo eventos endógenos normais, como o envelhecimento. Neste contexto, em nosso experimento, as ratas matrizes foram expostas primariamente à injeção sistêmica de 1mg/kg de LPS i.p. durante o 11º dia de gestação e posteriormente, na fase adulta a geração F₁ foi re-exposta ao LPS intranigral.

Estudo realizado por Ling *et al.*, (2004b) questionou se o dano gerado ao sistema dopaminérgico, conseqüente à exposição pré-natal ao LPS, poderia deixá-lo mais vulnerável aos efeitos tóxicos da neurotoxina 6-OHDA, em uma futura exposição. Estes autores verificaram que, aos 120 dias de vida, o animal exposto pré-natalmente ao LPS ainda apresentava uma redução significativa das células TH-ir, e aumentado índice de TNF- α . Além disso, essas alterações contribuíram significativamente para uma perda adicional de neurônios dopaminérgicos após a injeção de 6-OHDA, sugerindo que indivíduos expostos ao LPS, durante a vida fetal, teriam aumento risco de aparecimento da DP.

Embasados nas indubitáveis evidências do envolvimento inflamatório na DP, optamos, neste experimento, em expor os animais a um segundo insulto

inflamatório. Este insulto na SNpc teve intuito de mimetizar, em última instância, as consequências tardias geradas por um processo de inflamação sistêmica (FERRARI e TARELLI, 2011). Assim, com a aplicação deste protocolo, conseguiríamos verificar se o dano neuronal encontrado aos 21 dias seria potencializado pela aplicação de LPS na vida adulta, e importantemente, se a suplementação com óleo de peixe durante a formação do SNC apresentaria, em longo prazo, efeito neuroprotetor.

Para avaliarmos o comportamento motor e cognitivo, os ratos foram submetidos aos testes de campo aberto e ao teste de reconhecimento do novo objeto. No teste de campo aberto, os resultados demonstraram que a aplicação bilateral de 2µg de LPS na SNpc não modificou o desempenho motor dos animais. A manutenção deste parâmetro foi similar ao descrito em estudos anteriores (de MEIRA SANTOS LIMA *et al.*, 2006; DELATTRE *et al.*, 2013) e indicam que a aplicação intranigral de LPS abstém-se de prover marcado déficit motor, quando comparado às demais toxinas classicamente usadas em modelos animais de DP (ARIZA *et al.*, 2010). Os dados também confirmaram que os animais previamente expostos ao LPS intra-utero, não mostraram, na vida adulta, alterações na deambulação.

Por outro lado, podemos apontar que a ação do LPS está diretamente relacionada ao comprometimento cognitivo. O déficit de memória não-espacial (NORT), encontrado nos animais de 21 dias, persistiu ao longo do tempo, e manteve-se presente aos 100 dias de vida (FIGURA 23). A imensa maioria dos trabalhos publicados que correlacionam a exposição pré-natal ao déficit de memória em longo prazo, o fazem direcionando à memória hipocampo-dependente. Exceções se deram nos trabalhos de Graciarena *et al.*, (2010) e Chen *et al.*, (2011) que utilizaram o teste de NORT. Graciarena *et al.*, (2010) confirmaram a falha no aprendizado nos animais na vida adulta em decorrência da inflamação pré-natal, e discutem que este dado está amplamente correlacionado à redução de neurogênese encefálica. Já Chen *et al.*, (2011) especificam que a lesão pré-natal pode acelerar os prejuízos na memória espacial e não-espacial, decorrentes do envelhecimento normal em camundongos. Nossos resultados corroboram estes déficits, e suportam a idéia de que o insulto pró-inflamatório intra-utero tem efeito deletério sobre o sistema nigroestriatal, que são refletidos na fase adulta. Desde o final da década de 1990, a aplicação intranigral de LPS é classicamente aceita como modelo de DP (LIU E BING, 2011); no entanto, poucos autores o utilizam para avaliação cognitiva.

Com nossos resultados, comprovamos que a aplicação de LPS na SNpc em ratos adultos acarretou significativo déficit de memória não-espacial, e o sugerimos como uma ferramenta para o estudo da cognição em modelo neurodegenerativo.

Ao nosso conhecimento, este é primeiro trabalho que realiza comparação comportamental-cognitiva entre os animais que foram expostos ao LPS pré e pós-natal. Surpreendentemente, mostramos que o dano gerado pelo insulto pré-natal foi tão significativo quanto a aplicação de neurotoxina diretamente efetuada na SNpc. Este dado confirma o relevante papel do período de desenvolvimento embrionário e fetal no processo de saúde/doença na vida adulta. Além disso, um dos fatores mais importantes dos nossos resultados foi demonstrar que a função cognitiva foi preservada, em ambos os insultos, pela suplementação com óleo de peixe. Com o presente trabalho não conseguimos explicitar os mecanismos envolvidos nesta proteção funcional em longo prazo, entretanto a literatura nos mostra que os AGPIs são conhecidos mediadores da expressão gênica no SNC (KITAJKA *et al.*, 2004). Para Luchtman e Song (2013), através dos efeitos na expressão gênica, os AGPIs ω -3 podem atuar ativamente na neurogênese e sinaptogênese, plasticidade sináptica, na memória e no aprendizado. Elegante trabalho realizado por Kitajka *et al.*, (2002) mostrou que ratos que receberam dieta rica em DHA e EPA, do momento da concepção à vida adulta, tiveram significativa alteração em 102 cDNAs, representando 3,4% do total de 3.200 DNAs investigados. Os autores mostraram que 55 genes estavam super-expressos e 47 com reduzida expressão, comparados aos controles alimentares. Dentre as alterações, encontravam-se genes envolvidos com a plasticidade sináptica, citoesqueleto, proteínas regulatórias, transdução de sinais, formação de canais iônicos, metabolismo energético, e os que regulam a neuroproliferação e diferenciação (KITAJKA *et al.*, 2002). Além disso, estudo em humanos avaliou 7.421 crianças e verificou que mães que consumiram peixe 4 vezes na semana durante a gestação, tinham filhos com melhor desempenho em tarefas de linguagem e comunicação aos 18 meses de idade (DANIELS *et al.*, 2004). Outro grupo de pesquisadores avaliou a relação entre nutrição com ômega-3 e o desenvolvimento cognitivo mais tardio em humanos (HELLAND *et al.*, 2003). Aos 4 anos de idade, crianças cujas mães haviam sido suplementadas diariamente com óleo contendo 1180mg de DHA e 800 mg de EPA, a partir da 18ª semana de gestação até o 3º mês após o nascimento, tiveram melhor desempenho no teste de QI comparado às crianças controles (HELLAND *et al.*, 2003). A partir da literatura

acima exposta, e dos nossos resultados no teste de memória, podemos inferir que o fornecimento de AGPIs ω -3 durante a formação do SNC deixa profundas alterações funcionais neste sistema, e que podem prevenir insultos posteriores, durante a vida adulta, mantendo o bom desempenho cognitivo da prole.

Além do fator cognitivo, podemos estender o efeito neuroprotetor do DHA e do EPA especificamente sobre a função dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que observamos seus efeitos na prevenção da redução de DA estriatal nos animais experimentais que receberam LPS intranigral no período pós-natal. Ainda, surpreendentemente, os animais que receberam LPS intra-útero e foram suplementados, mostraram, na vida adulta, reversão da baixa concentração de DA, mantendo-a em nível semelhante aos animais controles (FIGURA 25A). Em contrapartida, nossos resultados mostram que esta prevenção/reversão na concentração do neurotransmissor gerada pelo óleo de peixe não foi acompanhada por modificações no número de neurônios dopaminérgicos na SNpc. Na realidade, ao que parece, os AGPIs ω -3 tem efeito generalizado sobre a função sináptica e a sua integridade neuroquímica. Os mecanismos exatos envolvidos neste processo ainda não são totalmente conhecidos, mas provavelmente envolvam uma complexa interação de efeitos sinérgicos sobre a estrutura da membrana neuronal e sua função, e sobre a expressão gênica (revisado por LUCHTMAN e SONG, 2013). Chalon *et al.*, (2006) mostraram que a ocorrência de profunda deficiência de AGPIs ω -3 durante a formação do SNC pode resultar em dano irreversível na função encefálica do núcleo accumbens, córtex pré-frontal e no hipocampo, envolvendo os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica e o dopaminérgica (CHALON, 2006). Lesa *et al.*, (2003) estudaram o desenvolvimento neuronal em animal geneticamente modificado, com depleção do gene *fat-3* e, conseqüentemente, ausência total de AGPIs. Os autores evidenciaram que os maiores déficits encontrados eram funcionais, do que propriamente a falha no neurodesenvolvimento. Estes animais mutantes tiveram reduzida liberação dos neurotransmissores estudados (colinérgicos e serotoninérgicos); e, segundo os autores, claramente esta redução não ocorreu pela falha em liberar o neurotransmissor na fenda sináptica, mas sim pela redução no número das vesículas preparadas para a exocitose (LESA *et al.*, 2003). Assim, diante dos nossos resultados, podemos inferir que o efeito neuroprotetor do óleo de peixe está diretamente ligado à função neuronal, e que pode em situações adversas, mesmo em logo prazo, manter os níveis fisiológicos de

DA estriatal para que funções cognitivas, comportamentais e até possivelmente motoras possam permanecer inalteradas.

Mostramos que, na vida adulta, a redução no número de neurônios dopaminérgicos decorrentes da exposição pré-natal foi tão importante quando a aplicação de neurotoxina intranigral. Entretanto, não mostramos efeito cumulativo entre as aplicações pré e pós-natal (FIGURA 18). Estudos prévios mostraram que ratos re-expostos a 6-OHDA aos 120 dias (LING *et al.*, 2004b), ou rotenona aos 16 meses de vida (LING *et al.*, 2004a) tiveram efeito sinérgico, e aumentado índice de morte neuronal dopaminérgica nos animais que tinham histórico de insulto inflamatório no período intra-utero. Semelhantemente, pesquisa investigativa realizada por Ling *et al.*, (2006) mostrou que a liberação de LPS em doses constantes (0,02µg/h) durante 14 dias na SNpc de ratos com 7 meses de idade, provocou progressiva ativação microglial e morte neuronal dopaminérgica, que foram amplamente potencializadas pela exposição pré-natal ao LPS. Porém, estes estudos acima citados, diferem-se do nosso protocolo no quesito tempo de re-exposição à neurotoxina. Em nosso experimento, indicamos que a aplicação de única dose de 2µg de LPS intranigral em ratos com 91 dias de vida não foi potencializada pelo insulto pró-inflamatório durante a fase embrionária. Porém, a partir da literatura, e dos nossos resultados, podemos apontar importantes aspectos elucidativos na geração da DP, embasados no paradigma dos múltiplos insultos inflamatórios: (i) que a morte neuronal dopaminérgica decorrente do processo inflamatório pré-natal é de grande importância, e persiste durante toda fase adulta do indivíduo; (ii) que somente o insulto pré-natal, acrescido da morte neuronal decorrente do envelhecimento natural não é suficiente para gerar os sintomas da DP (LING *et al.*, 2009); e (iii) que o insulto pré-natal é decisivo para potencializar o aparecimento da DP, todavia, o(s) insulto(s) posteriores (*e.g.* inflamações sistêmicas) deve(m) acontecer em idades mais avançadas do indivíduo, uma vez que, aparentemente, é tempo-dependente. Complementarmente, com este protocolo aplicado aos 100 dias de vida, não evidenciamos ação do óleo de peixe sobre a morte neuronal dopaminérgica. Entretanto não podemos descartar que em fases mais tardias, nas quais existe este efeito potencializador entre as lesões, os ácidos graxos possam atuar de forma neuroprotetora.

Trabalhos realizados nos últimos anos confirmam que a inflamação sistêmica e a ativação microglial podem acelerar os eventos patológicos

relacionados à sintomatologia da DP. Como a relação cronológica entre estes fatores ainda não está bem definida, têm-se aventado a hipótese cíclica, na qual uma autossustentada ativação microglial, e a morte dos neurônios dopaminérgicos estejam diretamente interligados (TANSEY *et al.*, 2007; TANSEY e GOLDBERG, 2010; COLLINS *et al.*, 2012). Com nosso experimento mostramos que o insulto inflamatório pré-natal no 11º dia de gestação *per se* não causou alteração da atividade microglial e astrocitária, aos 100 dias de vida do animal. Interessantemente, alguns autores mostraram que, quando realizaram insulto inflamatório durante a gestação, havia ativação destas células no hipocampo (logo ao nascimento) (ROUMIER *et al.*, 2008), na área peri- e subventricular e no estriado (no 1º e no 7º dia de vida) (ROUSSET *et al.*, 2006), e no hipocampo, córtex frontal e tálamo (aos 8 dias de vida pós-natal) (CAI *et al.*, 2000). Todavia, todos estes estudos aplicaram LPS em fases mais tardias da formação neuronal, como nos dias 15 (ROUMIER *et al.*, 2008), 18 e 19 (CAI *et al.*, 2000), e 19 e 20 de gestação (ROUSSET *et al.*, 2006). Assim, os resultados encontrados na literatura acima expostos, e a ausência de ativação visualizada em nosso experimento, vão de encontro à teoria de que a neurogênese precede a gliogênese. Durante as primeiras três semanas de desenvolvimento pós-natal, a população glial, que contém predominantemente astrócitos, se expande de 6 a 8 vezes no encéfalo de roedores (GE *et al.*, 2012). Desta forma, a aplicação de LPS mais tardiamente pode alterar profundamente o processo de formação e/ou ativação glial pelo aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no encéfalo fetal (CAI *et al.*, 2000). Por outro lado, não podemos ignorar a ação do LPS pré-natal, aplicado nesta fase mais inicial da formação do SNC sobre a glia. Neste período, ainda que menos de 30% das células microgliais e astrocíticas estejam presentes, a atividade inflamatória parece marcá-las com alterações irreversíveis. Ling *et al.*, (2006) e Ling *et al.*, (2004a) ao avaliarem a SNpc de ratos que tinham recebido exposição prévia de 1mg/kg de LPS no dia 10,5 gestacional, comprovaram presença de quantidade aumentada de microglia ativada aos 7 e 16 meses de vida respectivamente, nesta região. Neste contexto, sugerimos que o dano glial, em decorrência da aplicação de LPS no dia 10,5 ou 11º dia de gestação, permaneça de maneira quiescente, e com o decorrer do envelhecimento seja exponencialmente potencializado. Confirmamos ainda, em nosso experimento, que a aplicação de LPS intranigral no rato adulto aumentou significativamente a densidade das células microgliais e astrocíticas no local da lesão. Diferentemente

de Ji *et al.*, (2012) que mostraram que a presença de suplementação com óleo de peixe, concomitante à injeção de 5µg de LPS intranigral, foi decisivo na redução da ativação microglial, nossos resultados ausentaram-se em mostrar efeito neuroprotetor nestes parâmetros quando a suplementação foi realizada no período gestacional (FIGURAS 26 e 27). Estudos *post-mortem* em encéfalos de pacientes com DP confirmam a existência de microglia ativada, que coincide com a morte neuronal dopaminérgica (HIRSCH e HUNOT, 2009). Entretanto, estes dados refletem o estado nas horas terminais da vida do paciente; como estava esta atividade nos dias, meses ou anos precedentes ainda continua uma incógnita (McGEER e McGEER, 2008). O uso de modelos animais induzido por neurotoxinas é crucial para a elucidação da patofisiologia da DP, e para desenvolver estratégias baseadas no aspecto translacional dos resultados obtidos para a aplicação clínica (BOVE e PERIER, 2011). Assim, nossos resultados ressaltam o efeito crucial da suplementação com óleo de peixe, durante a formação do SNC, sobre a função cognitiva e comportamental do animal. Em contrapartida, sugerimos que, para este composto atuar como redutor do processo inflamatório (CALDER, 2012b) e, conseqüentemente seu potencial efeito deletério, como ativação glial e astrocitária no SNC (COLLINS *et al.*, 2012), a presença dele na dieta, no momento do insulto, é essencial.

Como a morte celular é um importante contribuinte para a patogenia da DP, o envolvimento das proteínas da família Bcl-2 foram alvo de investigações no processo de apoptose (VAN der HEIDE e SMIDT, 2013). Porém, para Levy *et al.*, (2009) pelo rápido estado transitório de ativação, restrita literatura consegue mostrar esta correlação em pacientes com DP. Para este autor, esse é um dos fatores para se encontrar tantas divergências a respeito do envolvimento dessas proteínas na morte dos neurônios dopaminérgicos. Jellinger, (2000) examinou o encéfalo de 4 portadores de DP e mostrou que nenhum tinha sinal TUNEL-positivo, ou diferença nas concentrações de Bcl-2, Bax e Bcl-XL na SNpc; e suscita a possibilidade de mecanismo alternativo para a morte celular, diferente da apoptose clássica. Contrariamente Tatton, (2000) mostrou, ao analisar o encéfalo de 10 pacientes parkinsonianos, aumentada concentração de caspase-3 e Bax. Devido à difícil comprovação em estudo em humanos, investiu-se em estudos *in vitro* e em modelos animais. Nestes, várias alterações em proteínas apoptóticas foram encontradas, porém, segundo Levy *et al.*, (2009), específicas de cada modelo. Isto foi

exemplificado em pesquisa com cultura primária modificada geneticamente que super-expressava Bcl-2, realizado por Malley *et al.*, (2003). Nesta publicação mostrou-se que o Bcl-2 reduziu a morte celular causada pelo MPP⁺, mas que permaneceu inalterada com a aplicação de 6-OHDA, confirmando que diferentes vias estão associadas ao mecanismo de morte celular em cada neurotoxina. Poucos estudos relacionam diretamente a aplicação de LPS com investigação de Bcl-2 e Bax, uma vez que os alvos principais de investigação pós-inflamação encefálica incluem: ativação microglial, geração de espécies reativas de oxigênio e interleucinas. Arimoto *et al.*, (2007) mostraram, após 72 horas da injeção de 5µg de LPS intranigral, manutenção dos níveis de Bcl-2 e aumentado índice de Bax nesta estrutura. Nossa investigação é única na literatura em avaliar o efeito de insulto inflamatório pré e pós-natal em modelo animal de DP sobre as concentrações de proteínas apoptóticas. Mostramos, com nossos animais que 2µg de LPS não gerou modificação na concentração de Bcl-2 e Bax na substância negra 48 horas após o insulto. E que, aos 100 dias de vida, a exposição pré-natal não teve efeito sinérgico consequente à exposição prévia na vida intra-uterina. Todavia, como em nossos resultados mostramos intensa ativação glial e astrocitária, e significativa morte de neurônios dopaminérgicos 7 dias após a lesão, não podemos descartar a hipótese de que 72 ou 96 horas após o insulto pudesse ser visualizada alteração nas concentrações destas proteínas (BURGUILLOS *et al.*, 2011). Por outro lado, podemos afirmar que a suplementação na gestação não alterou este ambiente de morte celular. Acreditávamos que os animais suplementados poderiam ter um aumento na concentração dos níveis de Bcl-2 basal, e que isto gerasse neuroproteção. Porém, nossos resultados mostram que isto não ocorreu. Assim, ao que parece, a presença do DHA nas membranas neuronais e/ou no interior das células, é crucial para alterar o microambiente de morte neuronal quando existe o envolvimento das proteínas Bcl-2 e Bax (AFSHORDEL *et al.*, 2014).

Como a capacidade de inibidores de caspases conferirem proteção à morte neuronal dopaminérgica era bastante controversa (LOTHARIUS *et al.*, 1999), surgiram, no meio científico, comprovações de que vias alternativas caspase-independente poderiam atenuar neste processo. Estudos em diferentes modelos animais comprovaram envolvimento da translocação do AIF ao núcleo na morte de neurônios hipocámpais, após aplicação sistêmica de LPS (CZAPSKI *et al.*, 2010); na morte de neurônios corticais, após trauma cerebral (PIAO *et al.*, 2012); e na redução

de células hipocâmpais em CA1 após isquemia global em camundongos (THAL *et al.*, 2011). Em modelo animal de DP, foi demonstrado que a morte dos neurônios dopaminérgicos na SNpc consequente à aplicação de MPTP também foi mediada por translocação nuclear do AIF (WANG *et al.*, 2003). Elegante trabalho realizado por Burguillos *et al.*, (2011) comprovou que a ação do LPS intranigral era caspase-3 independente, e consistentemente induzida pela presença de AIF intranuclear. Como os estudos acima citados investigaram esta proteína após 1 e 24 horas (CZAPSKI *et al.*, 2010), 72 horas (THAL *et al.*, 2011), e 2 dias (BURGUILLOS *et al.*, 2011) após a lesão neuronal, nos propomos, com nosso experimento, investigar a presença de AIF intranuclear 7 dias após a aplicação de LPS na SNpc. Sabemos que a aplicação de LPS leva a uma continuada ativação microglial e astrocitária que pode perdurar, segundo Iravani *et al.*, (2005) até 30 dias após a aplicação intranigral desta neurotoxina. Além disso, para Hirsch e Hunot, (2009) após uma inapropriada ativação, a microglia é capaz de exercer cíclica toxicidade celular, através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de citocinas inflamatórias como TNF- α que pode, nos neurônios dopaminérgicos, levar à morte por apoptose. Indagamos se a aplicação pré-natal associada à lesão pós-natal poderia manter a translocação de AIF ao núcleo mesmo após o pico neurodegenerativo do LPS – quarto dia pós-injeção (CASTANO *et al.*, 1998). Para isto, analisamos através do fracionamento celular a presença desta proteína no núcleo em todos os grupos experimentais. Nossos resultados mostraram conteúdo de AIF intranuclear mesmo nos animais ausentes de processo inflamatório. Este dado também foi mostrado em estudos prévios (LI *et al.*, 2007; CZAPSKI *et al.*, 2010), porém não encontramos trabalhos na literatura que discutissem esta presença. Sugerimos que seja decorrente de processo basal de apoptose neuronal, uma vez que excluímos, em nosso protocolo, a contaminação de AIF mitocondrial (Anexo 02). Ainda, mostramos que a concentração de AIF não estava estatisticamente alterada, no período de análise em questão, nos animais que receberam LPS tanto pré como pós-natal. Isto mostra que uma vez terminado o auge do processo inflamatório, o translocamento de AIF ao núcleo cessa, independentemente do processo de ativação microglial e/ou astrocitário continuarem. Semelhantemente às proteínas Bcl-2 e Bax, a suplementação com óleo de peixe na gestação e lactação, não alterou o microambiente apoptótico e a morte neuronal dopaminérgica. Além disso, acreditamos que a exacerbação da

morte neuronal dopaminérgica potencializada pelo fator tempo-dependente descrito em estudos prévios (LING *et al.*, 2004b; LING *et al.*, 2006) não seja influenciada por um novo processo de translocação de AIF ao núcleo, uma vez que Yu *et al.*, (2011) não encontraram significativo aumento desta proteína intranuclear em células neuronais de ratos com 24 meses de vida.

Em suma, os resultados deste experimento ressaltam a importância do período de gestação como desencadeantes de patologias na vida adulta. Também mostram que a suplementação com óleo de peixe durante a gestação e lactação é essencial para proteger dos danos cognitivos gerados pela aplicação pré e pós-natal de LPS. Todavia, incentivamos que estudos complementares futuros sejam realizados para verificar o possível efeito neuroprotetor do óleo de peixe em fases mais tardias deste protocolo, nas quais existe um indicativo de efeito sinérgico entre os insultos pré e pós-natal sobre a morte neuronal e ativação microglial na SNpc.

8 CONCLUSÕES

- 1- A significativa incorporação lipídica de DHA nas membrans neuronais dos animais com 21 dias de vida, não se mostrou eficaz em alterar o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc.
- 2- A aplicação sistêmica de LPS nas ratas matrizes gerou déficits cognitivos na prole, relacionados à memória espacial e não-espacial que foram prevenidos pela suplementação com óleo de peixe.
- 3- A aplicação de LPS intra-utero acarretou danos funcionais no tecido nervoso como reduzida concentração de DA estriatal e metabólitos, e reduzido número de astrócitos na SNpc nos animais jovens, que não foram influenciados pela presença de óleo de peixe durante a formação do SNC.
- 4- Aos 21 dias de vida os níveis de proteínas pró- e anti-apoptótica, Bax e Bcl-2, não foram alteradas tanto pela inflamação sistêmica no 11º dia de gestação como pela suplementação com AGPIs ω -3.
- 5- Na fase adulta, ressaltamos a utilização do LPS como modelo de fases iniciais da DP, uma vez que se isenta em prover déficits motores, e sensivelmente gera déficits cognitivos.
- 6- O efeito dos AGPIs ω -3 em alterar a função do SNC foi amplamente visualizado, uma vez que a suplementação durante a gestação e lactação manteve inalterados as respostas cognitivas, e os níveis de dopamina, mesmo após as exposições pré e pós-natal.
- 7- Não encontramos efeito sinérgico de ambos insultos na morte neuronal dopaminérgica, e nas ativações glial e astrocitária aos 100 dias de vida, e indicamos que sejam eventos tempo-dependentes influenciados pelo envelhecimento.
- 8- O processo continuado de ativação microglial e astrocitária não induz a manutenção de translocamento de AIF da mitocondria ao núcleo, em processo de apoptose caspase independente.

9 REFERÊNCIAS

AFSHORDEL S, HAGL S, WERNER D, RÖHNER N, KÖGEL D, BAZAN NG, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging - Impact of Bcl-2 e NPD-1 like metabolites. **Prostagleins, Leukotrienes e Essential Fatty Acids**, 2014 in press.

AJAMI B, BENNETT JL, KRIEGER C, TETZLAFF W, ROSSI FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance e function throughout adult life. **Nat Neurosci**, v. 10, p. 1538-1543, 2007.

AKIYAMA H, MCGEER PL. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. **Brain Res**, v. 489, p. 247-53, 1989.

ALABDULKARIM B, BAKEET ZAN, ARZOO S. Role of some functional lipids in preventing diseases e promoting health. **Journal of King Saud University - Science**, v. 24, p.319-329, 2012.

ALVES DA COSTA C, CHECLER F. Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic e sporadic Parkinsonism? **Cell Signal**, v. 23, p. 963-968, 2011.

ANGLADE P, VYAS S, JAVOY-AGID F, HERRERO MT, MICHEL PP, MARQUEZ J, *et al.* Apoptosis e autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. **Histol Histopathol**, v. 12,p. 25-31, 1997.

ARIMOTO T, CHOI DY, LU X, LIU M, NGUYEN XV, ZHENG N, *et al.* Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. **Neurobiol Aging**, v. 28, p. 894-906, 2007.

ARIZA D, LIMA MM, MOREIRA CG, DOMBROWSKI PA, AVILA TV, ALLEME A, *et al.* Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP e 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, p. 1620-1627, 2010.

ARSENAULT D, ST-AMOUR I, CISBANI G, ROUSSEAU LS, CICHETTI F. The different effects of LPS e poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development e inflammatory responses in pregnant mice e their offspring. **Brain Behav Immun**, v.38, p. 77-90, 2014.

AUESTAD N, INNIS SM. Dietary n-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body e growth-cone fatty acids. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 312S-314S, 2000.

BAHARNOORI M, BRAKE WG, SRIVASTAVA LK. Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex e hippocampus in rats. **Schizophr Res**, v. 107, p. 99-109, 2009.

BARAN B, TEKCAN AI, GURVIT H, BODUROGLU A. Episodic memory e metamemory in Parkinson's disease patients. **Neuropsychology**, v. 23, p. 736-745, 2009.

BARCELO-COBLIJN G, MURPHY EJ. Alpha-linolenic acid e its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health e a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. **Prog Lipid Res**, v. 48, p. 355-374, 2009.

BARKER DJ, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, e ischaemic heart disease in Engle e Wales. **Lancet**, v.1, p. 1077-1081, 1986.

BARLOW BK, CORY-SLECHTA DA, RICHFIELD EK, THIRUCHELVAM M. The gestational environment e Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. **Reprod Toxicol**, v. 23, p. 457-470, 2007.

BARRON KD. The microglial cell. A historical review. **J Neurol Sci**, v. 134 Suppl: 57-68, 1995.

BELL MJ, HALLENBECK JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. **J Neurosci Res**, v. 70, p. 570-579, 2002.

BESHEER J, JENSEN HC, BEVINS RA. Dopamine antagonism in a novel-object recognition e a novel-object place conditioning preparation with rats. **Behav Brain Res**, v. 103, p. 35-44, 1999.

BJORKLUND A, DUNNETT SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends Neurosci**, v. 30, p. 194-202, 2007.

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can Biochem**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BLUM D, TORCH S, LAMBENG N, NISSOU M, BENABID AL, SADOUL R, *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine e MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 65, p. 135-72, 2001.

BOKSA P. Effects of prenatal infection on brain development e behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav Immun**, v. 24, p. 881-897, 2010.

BORSICS T, LUNDBERG E, GEERTS D, KOOMOA DL, KOSTER J, WESTER K, *et al.* Subcellular distribution e expression of prenylated Rab acceptor 1 domain family, member 2 (PRAF2) in malignant glioma: Influence on cell survival e migration. **Cancer Sci**, v. 101, p. 1624-1631, 2010.

BOURRE JM, BONNEIL M, CHAUDIERE J, CLEMENT M, DUMONT O, DURE G, *et al.* Structural e functional importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. **Adv Exp Med Biol**, v. 318, p. 211-229, 1992.

BOUSQUET M, CALON F, CICCHETTI F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Res Rev**, v. 10, p. 453-463, 2011.

BOUSQUET M, GIBRAT C, SAINT-PIERRE M, JULIEN C, CALON F, CICCHETTI F. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, p. 1401-1408, 2009.

BOUSQUET M, SAINT-PIERRE M, JULIEN C, SALEM N, JR., CICCHETTI F, CALON F. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **Faseb J**, v. 22, p. 1213-1225, 2008.

BOVE J, PERIER C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2011.

BRAAK H, DEL TREDICI K, RUB U, DE VOS RA, JANSEN STEUR EN, BRAAK E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, p. 197-211, 2003.

BRAAK H, SASTRE M, DEL TREDICI K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 114, p. 231-41, 2007.

BRADFORD MM. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRONSTEIN DM, PEREZ-OTANO I, SUN V, MULLIS SAWIN SB, CHAN J, WU GC, *et al.* Glia-dependent neurotoxicity e neuroprotection in mesencephalic cultures. **Brain Res**, v.704, p. 112-116, 1995.

BURGUILLOS MA, HAJJI N, ENGLUND E, PERSSON A, CENCI AM, MACHADO A, *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients. **Neurobiol Dis**, v. 41, p. 177-188, 2011.

CAI Z, PAN ZL, PANG Y, EVANS OB, RHODES PG. Cytokine induction in fetal rat brains e brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. **Pediatr Res**, v. 47, p. 64-72, 2000.

CALDER PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, e inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 83, p. 1505S-1519S, 2006.

CALDER PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **J Nutr**, v. 142, p. 592S-599S, 2012a.

CALDER PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids e inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **Br J Clin Pharmacol**, v.75, p. 645-662, 2012b.

CALDER PC, DANGOUR AD, DIEKMAN C, EILEER A, KOLETZKO B, MEIJER GW, *et al.* Essential fats for future health. Proceedings of the 9th Unilever Nutrition Symposium, 26-27 May 2010. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, Suppl 4, p. S1-13, 2010.

CALON F, COLE G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. **Prostagleins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 77, p. 287-293, 2007.

CARDOSO HD, DOS SANTOS JUNIOR EF, DE SANTANA DF, GONCALVES-PIMENTEL C, ANGELIM MK, ISAAC AR, *et al.* Omega-3 deficiency e neurodegeneration in the substantia nigra: involvement of increased nitric oxide production e reduced BDNF expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, p. 1902-1912, 2014.

CASTANO A, HERRERA AJ, CANO J, MACHADO A. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction e damage in nigrostriatal dopaminergic system. **J Neurochem**, v. 70, p. 1584-1592, 1998.

CHAABANE W, USER SD, EL-GAZZAH M, JAKSIK R, SAJJADI E, RZESZOWSKA-WOLNY J, *et al.* Autophagy, apoptosis, mitoptosis e necrosis: interdependence between those pathways e effects on cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, p. 43-58, 2013.

CHALON S. Omega-3 fatty acids e monoamine neurotransmission. **Prostagleins Leukot Essent Fatty Acids**, v.75, p. 259-269, 2006.

CHAO OY, PUM ME, HUSTON JP. The interaction between the dopaminergic forebrain projections e the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: implications for Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 247, p. 373-382, 2013.

CHEN GH, WANG H, YANG QG, TAO F, WANG C, XU DX. Acceleration of age-related learning e memory decline in middle-aged CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy. **Behav Brain Res**, v. 218, p. 267-279, 2011.

CHEN H, JACOBS E, SCHWARZSCHILD MA, MCCULLOUGH ML, CALLE EE, THUN MJ, *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drug use e the risk for Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 58, p. 963-967, 2005.

CHEN H, ZHANG SM, HERNAN MA, SCHWARZSCHILD MA, WILLETT WC, COLDITZ GA, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs e the risk of Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.60, p. 1059-1064, 2003.

CHEUNG EC, MELANSON-DRAPEAU L, CREGAN SP, VEERLUIT JL, FERGUSON KL, MCINTOSH WC, *et al.* Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent e BAX-independent mechanisms. **J Neurosci**, v. 25, p. 1324-1334, 2005.

CHUNG WS, BARRES BA. THE ROLE OF GLIAL CELLS IN SYNAPSE ELIMINATION. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, p. 438-445, 2011.

CICCHETTI F, LAPOINTE N, ROBERGE-TREMBLAY A, SAINT-PIERRE M, JIMENEZ L, FICKE BW, *et al.* Systemic exposure to paraquat e maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. **Neurobiol Dis**, v. 20, p. 360-371, 2005.

COLANGELO AM, ALBERGHINA L, PAPA M. Astroglisis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neurosci Lett**, v. 565, p. 59-64, 2014.

COLLINS LM, TOULOUSE A, CONNOR TJ, NOLAN YM. Contributions of central e systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v.62, p. 2154-2168, 2012.

CORY-SLECHTA DA, THIRUCHELVAM M, BARLOW BK, RICHFIELD EK. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. **Environ Health Perspect**, v. 113, p. 1263-1270, 2005.

COSTA LG, ASCHNER M, VITALONE A, SYVERSEN T, SOLDIN OP. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 87-110, 2004.

COYLE P, TRAN N, FUNG JN, SUMMERS BL, ROFE AM. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. **Behav Brain Res**, v.197, p. 210-218, 2009.

CUADROS MA, NAVASCUES J. The origin e differentiation of microglial cells during development. **Prog Neurobiol**, v. 56, p. 173-189, 1998.

CUNNANE SC, EERSON MJ. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. **J Nutr**, v.127, p. 146-52, 1997.

CZAPSKI GA, GAJKOWSKA B, STROSZNAJDER JB. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular e morphological alterations in the hippocampus. **Brain Res**, v. 1356, p. 85-94, 2010.

DA SILVA TM, MUNHOZ RP, ALVAREZ C, NALIWAIKO K, KISS A, EREATINI R, *et al.* Depression in Parkinson's disease: a double-blind, reomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J Affect Disord**, v. 111, p. 351-359, 2008.

DAMIER P, HIRSCH EC, ZHANG P, AGID Y, JAVOY-AGID F. Glutathione peroxidase, glial cells e Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 52, p. 1-6, 1993.

DANIELS JL, LONGNECKER MP, ROWLE AS, GOLDING J. Fish intake during pregnancy e early cognitive development of offspring. **Epidemiology**, v.15, p. 394-402, 2004.

DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms e models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAVALOS D, GRUTZENDLER J, YANG G, KIM JV, ZUO Y, JUNG S, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v.8, p. 752-758, 2005.

DE BOO HA, HARDING JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, V. 46, p. 4-14, 2006.

DE LAU LM, BORNEBROEK M, WITTEMAN JC, HOFMAN A, KOUDSTAAL PJ, BRETELER MM. Dietary fatty acids e the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. **Neurology**, v. 64, p. 2040-2045, 2005.

DE LIMA MN, PRESTI-TORRES J, DORNELLES A, SCALCO FS, ROESLER R, GARCIA VA, *et al.* Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, p. 305-310, 2011.

DE MEIRA SANTOS LIMA M, BRAGA REKSIDLER A, MARQUES ZANATA S, BUENO MACHADO H, TUFIK S, VITAL MA. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Res**, v. 1101, p. 117-125, 2006.

DEBEIR T, GINESTET L, FRANCOIS C, LAURENS S, MARTEL JC, CHOPIN P, *et al.* Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex e globus pallidus. **Exp Neurol**, v. 193, p. 444-454, 2005.

DELATTRE AM, CARABELLI B, MORI MA, PUDELL C, DA SILVA DR, MENEZES I, *et al.* Multiple intranigral unilateral LPS infusion protocol generates a persistent cognitive impairment without cumulative dopaminergic impairment. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, p. 1002-1010, 2013.

DELATTRE AM, KISS A, SZAWKA RE, ANSELMO-FRANCI JA, BAGATINI PB, XAVIER LL, *et al.* Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral e neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neurosci Res**, v. 66, p. 256-264, 2010.

DIAU GY, HSIEH AT, SARKADI-NAGY EA, WIJENDRAN V, NATHANIELSZ PW, BRENNAN JT. The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid e arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. **BMC Med**, v. 3, p. 11, 2005.

DOORN KJ, LUCASSEN PJ, BODDEKE HW, PRINS M, BERENDSE HW, DRUKARCH B, *et al.* Emerging roles of microglial activation e non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 98, p. 222-238, 2012.

ENNACEUR A, MICHALIKOVA S, BRADFORD A, AHMED S. Detailed analysis of the behavior of Lister e Wistar rats in anxiety, object recognition e object location tasks. **Behav Brain Res**, v. 159, p. 247-66, 2005.

ESPOSITO E, DI MATTEO V, BENIGNO A, PIERUCCI M, CRESCIMANNO G, DI GIOVANNI G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 205, p. 295-312, 2007.

FAROOQUI AA, HORROCKS LA, FAROOQUI T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, e involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000.

FENG Z, ZOU X, JIA H, LI X, ZHU Z, LIU X, *et al.* Maternal docosahexaenoic acid feeding protects against impairment of learning e memory e oxidative stress in prenatally stressed rats: possible role of neuronal mitochondria metabolism. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, p. 275-289, 2012.

FERRARI CC, TARELLI R. Parkinson's disease e systemic inflammation. **Parkinsons Dis**, p. 436813, 2011.

GAO X, CHEN H, FUNG TT, LOGROSCINO G, SCHWARZSCHILD MA, HU FB, *et al.* Prospective study of dietary pattern e risk of Parkinson disease. **Am J Clin Nutr**, v. 86, p. 1486-1494, 2007.

GAUTIER CA, CORTI O, BRICE A. Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)**, v. 170, p. 339-343, 2014.

GE WP, MIYAWAKI A, GAGE FH, JAN YN, JAN LY. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. **Nature**, v. 484, p. 376-380, 2012.

GERHARD A, PAVESE N, HOTTON G, TURKHEIMER F, ES M, HAMMERS A, *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 21, p. 404-412, 2006.

GHAVAMI S, SHOJAEI S, YEGANEH B, EE SR, JANGAMREDDY JR, MEHRPOUR M, *et al.* Autophagy e apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Prog Neurobiol**, v. 112, p. 24-49, 2014.

GIORDANO G, COSTA LG. Developmental neurotoxicity: some old e new issues. **Toxicol**, v. 2012, p. 814795, 2012.

GJERSTAD MD, ALVES G, WENTZEL-LARSEN T, AARSLE D, LARSEN JP. Excessive daytime sleepiness in Parkinson disease: is it the drugs or the disease? **Neurology**, v. 67, p. 853-858, 2006.

GOLAN HM, LEV V, HALLAK M, SOROKIN Y, HULEIHEL M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 903-917, 2005.

GRACIARENA M, DEPINO AM, PITOSI FJ. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis e memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta1 downregulation. **Brain Behav Immun**, v. 24, p. 1301-1309, 2010.

HADDERS-ALGRA M. Prenatal e early postnatal supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids: neurodevelopmental considerations. **Am J Clin Nutr**, v. 94, p. 1874S-1879S, 2011.

HAGGARTY P. Placental regulation of fatty acid delivery e its effect on fetal growth-- a review. **Placenta**, v. 23 Suppl A, p. S28-38, 2002.

HAO LY, HAO XQ, LI SH, LI XH. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. **Neuroscience**, v. 166, p. 763-770, 2010.

HARKIN A, KELLY JP, LEONARD BE. A review of the relevance e validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. **Clinical Neuroscience Research**, v. 3, p. 253-262, 2003.

HAUSER DN, HASTING TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of disease**, v. 35-42, 2013.

HELLAND IB, SMITH L, SAAREM K, SAUGSTAD OD, DREVON CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy e lactation augments children's IQ at 4 years of age. **Pediatrics**, v. 111, p. e39-44, 2003.

HENNEBERGER C, PAPOUIN T, OLIET SH, RUSAKOV DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. **Nature**, v. 463, p. 232-236, 2010.

HERRERA AJ, CASTANO A, VENERO JL, CANO J, MACHADO A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. **Neurobiol Dis**, v. 7, p. 429-447, 2000.

HIRSCH EC, HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurol**, v. 8, p. 382-397, 2009.

HORROCKS LA, FAROOQUI AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance e restoration of neural membrane function. **Prostagleins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 70, p. 361-372, 2004.

HOWLE JG, CAZAKOFF BN, ZHANG Y. Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, e locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. **Neuroscience**, v. 201, p. 184-198, 2012.

INNIS SM. Dietary omega 3 fatty acids e the developing brain. **Brain Res**, v. 1237, p. 35-43, 2008.

IRAVANI MM, LEUNG CC, SADEGHIAN M, HADDON CO, ROSE S, JENNER P. The acute e the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction e glial cell activation. **Eur J Neurosci**, v. 22, p. 317-330, 2005.

JANG H, BOLTZ D, STURM-RAMIREZ K, SHEPHERD KR, JIAO Y, WEBSTER R, *et al.* Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system e induce neuroinflammation e neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 14063-14068, 2009.

JANKOVIC J. Parkinson's disease: clinical features e diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 79, p. 368-376, 2008.

JANSSEN CI, KILIAAN AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, e neurodegeneration. **Prog Lipid Res**, v. 53, p. 1-17, 2014.

JARLESTEDT K, NAYLOR AS, DEAN J, HAGBERG H, MALLARD C. Decreased survival of newborn neurons in the dorsal hippocampus after neonatal LPS exposure in mice. **Neuroscience**, v. 253, p. 21-28, 2013.

JELLINGER KA. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 107, p. 1-29, 2000.

JI A, DIAO H, WANG X, YANG R, ZHANG J, LUO W, *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation e dopaminergic injury in rats. **Neurotoxicology**, v. 33, p. 780-788, 2012.

JOSEPH JD, ACKMAN RG. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils e fish oil ethyl-esters - Collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 75, p. 488-506, 1992.

JOSEPHS KA, PARISI JE, DICKSON DW. Alpha-synuclein studies are negative in postencephalic parkinsonism of von Economo. **Neurology**, v. 59, p. 645-646, 2002.

JULIEN C, BERTHIAUME L, HADJ-TAHAR A, RAJPUT AH, BEDARD PJ, DI PAOLO T, *et al.* Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients e parkinsonian monkeys. **Neurochem Int**, v. 48, p. 404-414, 2006.

KART-TEKE E, DE SOUZA SILVA MA, HUSTON JP, DERE E. Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. **Neurobiol Learn Mem**, v. 85, p. 173-182, 2006.

KAUR D, PENG J, CHINTA SJ, RAJAGOPALAN S, DI MONTE DA, CHERNY RA, *et al.* Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. **Neurobiol Aging**, v. 28, p. 907-913, 2007.

KIM HS, SUH YH. Minocycline e neurodegenerative diseases. **Behav Brain Res**, v. 196, p. 168-179, 2009.

KIRSTEN TB, TARICANO M, MAIORCA PC, PALERMO-NETO J, BERNARDI MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, p. 240-251, 2010.

KITAJKA K, PUSKAS LG, ZVARA A, HACKLER L, JR., BARCELO-COBLIJN G, YEO YK, *et al.* The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 2619-2624, 2002.

KITAJKA K, SINCLAIR AJ, WEISINGER RS, WEISINGER HS, MATHAI M, JAYASOORIYA AP, *et al.* Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 10931-10936, 2004.

KOCHANEK KD, XU J, MURPHY SL, MINIÑO AM, KUNG H. Deaths: Preliminary Data for 2009. **National Vital Statistics Reports**, v. 54, p. 1-51, 2011.

KRANTIC S, MECHAWAR N, REIX S, QUIRION R. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life e death. **Prog Neurobiol**, v. 81, p. 179-196, 2007.

KULISEVSKY J, LUQUIN MR, ARBELO JM, BURGUERA JA, CARRILLO F, CASTRO A, *et al.* Advanced Parkinson's disease: Clinical characteristics e treatment. Part II. **Neurologia**, 2013.

KUMRAL A, BASKIN H, YESILIRMAK DC, ERGUR BU, AYKAN S, GENÇ S, *et al.* Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. **Neonatology**, v. 92, p. 269-278, 2007.

LADEBY R, WIRENFELDT M, GARCIA-OVEJERO D, FENGER C, DISSING-OLESEN L, DALMAU I, *et al.* Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, p. 196-206, 2005.

LES B. Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* 2012; 4, p. 1338-57.

LAURITZEN L, HANSEN HS, JORGENSEN MH, MICHAELSEN KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development e function of the brain e retina. **Prog Lipid Res**, v. 40, p. 1-94, 2001.

LEHNARDT S, MASSILLON L, FOLLETT P, JENSEN FE, RATAN R, ROSENBERG PA, *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 8514-8519, 2003.

LESA GM, PALFREYMAN M, HALL DH, CLEININ MT, RUDOLPH C, JORGENSEN EM, *et al.* Long chain polyunsaturated fatty acids are required for efficient neurotransmission in *C. elegans*. **J Cell Sci**, v. 116, p. 4965-4975, 2003.

LEVANT B, RADEL JD, CARLSON SE. Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats that are differentially affected by dietary remediation. **Behav Brain Res**, v. 152, p. 49-57, 2004.

LEVY OA, MALAGELADA C, GREENE LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, e final steps. **Apoptosis**, v. 14, p. 478-500, 2009.

LI X, NEMOTO M, XU Z, YU SW, SHIMOJI M, ERABI SA, *et al.* Influence of duration of focal cerebral ischemia e neuronal nitric oxide synthase on translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus. **Neuroscience**, v. 144, p. 56-65, 2007.

LIN YL, LIN SY, WANG S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases anxiety-like behaviors e enhances stress-induced corticosterone responses in adult rats. **Brain Behav Immun**, v. 26, p. 459-468, 2012.

LIN YL, WANG S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors e reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 259, p. 24-34, 2014.

LING Z, GAYLE DA, MA SY, LIPTON JW, TONG CW, HONG JS, *et al.* In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Mov Disord**, v. 17, p. 116-124, 2002.

LING Z, CHANG QA, TONG CW, LEURGANS SE, LIPTON JW, CARVEY PM. Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally. **Exp Neurol**, v. 190, p. 373-383, 2004a.

LING ZD, CHANG Q, LIPTON JW, TONG CW, LEERS TM, CARVEY PM. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure e postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. **Neuroscience**, v. 124, p. 619-628, 2004b.

LING Z, ZHU Y, TONG C, SNYDER JA, LIPTON JW, CARVEY PM. Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. **Exp Neurol**, v. 199, p. 499-512, 2006.

LING Z, ZHU Y, TONG CW, SNYDER JA, LIPTON JW, CARVEY PM. Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. **Exp Neurol**, v. 216, p. 312-320, 2009.

LIU M, BING G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p. 327089, 2011.

LONG-SMITH CM, SULLIVAN AM, NOLAN YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 89, p. 277-287, 2009.

LORENZO HK, SUSIN SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. **Drug Resist Updat**, v. 10, p. 235-255, 2007.

LOTHARIUS J, DUGAN LL, O'MALLEY KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. **J Neurosci**, v. 19, p. 1284-1293, 1999.

LUCHTMAN DW, SONG C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: findings from animal e clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 550-565, 2013.

MACHADO RB, TUFIK S, SUCHECKI D. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels e brain serotonin content. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 1211-1224, 2008.

MALLEY R, HENNEKE P, MORSE SC, CIESLEWICZ MJ, LIPSITCH M, THOMPSON CM, *et al*. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 1966-1971, 2003.

MARUYAMA W, AKAO Y, CARRILLO MC, KITANI K, YOUDIUM MB, NAOI M. Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease: suppression of apoptosis e induction of prosurvival genes. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, p. 675-682, 2002.

MATTSON MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, p. 120-129, 2000.

MATTSON MP, CHAN SL. Calcium orchestrates apoptosis. **Nat Cell Biol**, v. 5, p. 1041-1043, 2003.

MAZZA M, POMPONI M, JANIRI L, BRIA P, MAZZA S. Omega-3 fatty acids e antioxidants in neurological e psychiatric diseases: an overview. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, p. 12-26, 2007.

MCDERMOTT S, CALLAGHAN W, SZWEJBKA L, MANN H, DAGUISE V. Urinary tract infections during pregnancy e mental retardation e developmental delay. **Obstet Gynecol**, v. 96, p. 113-119, 2000.

MCGANN JC, LIOY DT, MEEL G. Astrocytes conspire with neurons during progression of neurological disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, p. 850-858, 2012.

MCGEER PL, ITAGAKI S, BOYES BE, MCGEER EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's e Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, p. 1285-91, 1988.

MCGEER PL, MCGEER EG. Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 23, p. 474-483, 2008.

MCNAMARA RK, CARLSON SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development e function: potential implications for the pathogenesis e prevention of psychopathology. **Prostagleins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, p. 329-349, 2006.

MITTAL P, WING DA. Urinary tract infections in pregnancy. **Clin Perinatol**, v. 32, p. 749-764, 2005.

MITTELBRONN M, DIETZ K, SCHLUESENER HJ, MEYERMANN R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. **Acta Neuropathol**, v. 101, p. 249-255, 2001.

MOGI M, HARADA M, KONDO T, RIEDERER P, INAGAKI H, MINAMI M, *et al.* Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor e transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v. 180, p. 147-150, 1994a.

MOGI M, HARADA M, RIEDERER P, NARABAYASHI H, FUJITA K, NAGATSU T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain e in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v. 165, p. 208-210, 1994b.

MOGI M, TOGARI A, KONDO T, MIZUNO Y, KOMURE O, KUNO S, *et al.* Brain-derived growth factor e nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 270, p. 45-48, 1999.

MOGI M, TOGARI A, KONDO T, MIZUNO Y, KOMURE O, KUNO S, *et al.* Caspase activities e tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. **J Neural Transm**, v. 107, p. 335-341, 2000.

MOLENDI-COSTE O, LEGRY V, LECLERCQ IA. Why e How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? **Gastroenterol Res Pract**, p. 364040, 2011.

MOONEY SM, MILLER MW. Expression of bcl-2, bax, e caspase-3 in the brain of the developing rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 123, p. 103-117, 2000.

MOORE SA. Polyunsaturated fatty acid synthesis e release by brain-derived cells in vitro. **J Mol Neurosci**, v. 16, p. 195-200; discussion 215-221, 2001.

MORRIS RG. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms e the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, p. 1453-1465, 2001.

MOSLEY RL, BENNER EJ, KADIU I, THOMAS M, BOSKA MD, HASAN K, *et al.* Neuroinflammation, Oxidative Stress e the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin Neurosci Res**, v. 6, p. 261-281, 2006.

MUMBY DG, GASKIN S, GLENN MJ, SCHRAMEK TE, LEHMANN H. Hippocampal damage e exploratory preferences in rats: memory for objects, places, e contexts. **Learn Mem**, v. 9, p. 49-57, 2002.

NIEHAUS I, LANGE JH. Endotoxin: is it an environmental factor in the cause of Parkinson's disease? **Occup Environ Med**, v. 60, p. 378, 2003.

NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, p. 1314-1318, 2005.

ORR CF, ROWE DB, HALLIDAY GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 68, p. 325-340, 2002.

OSKVIK DB, ELKAHLOUN AG, JOHNSON KR, PHILLIPS TM, HERKENHAM M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration e oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain Behav Immun**, v. 26, p. 623-634, 2012.

OTERA H, OHSAKAYA S, NAGAURA Z, ISHIHARA N, MIHARA K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. **Embo J**, v. 24, p. 1375-1386, 2005.

PALANISAMY A. Maternal anesthesia e fetal neurodevelopment. **Int J Obstet Anesth**, v. 21, p. 152-162, 2012.

PANATIER A, VALLEE J, HABER M, MURAI KK, LACAILLE JC, ROBITAILLE R. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. **Cell**, v. 146, p. 785-798, 2011.

PARKINSON J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, p. 223-36; discussion 222, 2002.

PATTEN AR, BROCARDO PS, CHRISTIE BR. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels e prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. **J Nutr Biochem**, v. 24, p. 760-769, 2013a.

PATTEN AR, SICKMANN HM, DYER RA, INNIS SM, CHRISTIE BR. Omega-3 fatty acids can reverse the long-term deficits in hippocampal synaptic plasticity caused by prenatal ethanol exposure. **Neurosci Lett**, v. 551, p. 7-11, 2013b.

PATTERSON E, WALL R, FITZGERALD GF, ROSS RP, STANTON C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. **J Nutr Metab**, v. 2012: 539426, 2012.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 5th edition, 2005.

PENTEADO SH, TEODOROV E, KIRSTEN TB, ELUF BP, REIS-SILVA TM, ACENJO MK, *et al*. Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, e induces anxiety: Studies of F1 e F2 generations. **Eur J Pharmacol**, v. 738, p. 342-351, 2014.

PIAO CS, LOANE DJ, STOICA BA, LI S, HANSCOM M, CABATBAT R, *et al.* Combined inhibition of cell death induced by apoptosis inducing factor e caspases provides additive neuroprotection in experimental traumatic brain injury. **Neurobiol Dis**, v. 46, p. 745-758, 2012.

POLSTER BM. AIF, reactive oxygen species, e neurodegeneration: a "complex" problem. **Neurochem Int**, v. 62, p. 695-70, 2013.

POLYMEROPOULOS MH, LAVEDAN C, LEROY E, IDE SE, DEHEJIA A, DUTRA A, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, p. 2045-2047, 1997.

POPOVIC M, CABALLERO-BLEDA M, GUERRI C. Adult rat's offspring of alcoholic mothers are impaired on spatial learning e object recognition in the Can test. **Behav Brain Res**, v. 174, p. 101-111, 2006.

PUDELL C, VICENTE BA, DELATTRE AM, CARABELLI B, MORI MA, SUCHECKI D, *et al.* Fish oil improves anxiety-like, depressive-like e cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. **Eur J Neurosci**, v. 39, p. 266-274, 2014.

QIN L, WU X, BLOCK ML, LIU Y, BREESE GR, HONG JS, *et al.* Systemic LPS causes chronic neuroinflammation e progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, p. 453-462, 2007.

RAPPOLD PM, TIEU K. Astrocytes e therapeutics for Parkinson's disease. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 413-423, 2010.

REKHA KR, SELVAKUMAR GP. Gene expression regulation of Bcl2, Bax e cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. **Chem Biol Interact**, v. 217, p. 57-66, 2014.

RODRIGUES RW, GOMIDE VC, CHADI G. Astroglial e microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. **Int J Neurosci**, v. 109, p. 91-126, 2001.

ROSE KM, PARMAR MS, CAVANAUGH JE. Dietary supplementation with resveratrol protects against striatal dopaminergic deficits produced by in utero LPS exposure. **Brain Res**, v. 1573, p. 37-43, 2014.

ROUMIER A, PASCUAL O, BECHADE C, WAKSELMAN S, PONCER JC, REAL E, *et al.* Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. **PLoS One**, v. 3, p. e2595, 2008.

ROUSSET CI, CHALON S, CANTAGREL S, BODARD S, ERES C, GRESSENS P, *et al.* Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule e programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. **Pediatr Res**, v. 59, p. 428-433, 2006.

SABLE PS, KALE AA, JOSHI SR. Prenatal omega 3 fatty acid supplementation to a micronutrient imbalanced diet protects brain neurotrophins in both the cortex e hippocampus in the adult rat offspring. **Metabolism**, v. 62, p. 1607-1622, 2013.

SAIJO K, WINNER B, CARSON CT, COLLIER JG, BOYER L, ROSENFELD MG, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia e astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. **Cell**, v. 137, p. 47-59, 2009.

SAMADI P, GREGOIRE L, ROUILLARD C, BEDARD PJ, DI PAOLO T, LEVESQUE D. Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. **Ann Neurol** v. 59, p. 282-288, 2006.

SAMII A, NUTT JG, RANSOM BR. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 363, p. 1783-1793, 2004.

SCHLETTER J, HEINE H, ULMER AJ, RIETSCHHEL ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. **Arch Microbiol**, v. 164, p. 383-389, 1995.

SCHUCHARDT JP, HAHN A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. **Prostaglains Leukot Essent Fatty Acids**, v. 89, p. 1-8, 2013.

SIAN J, DEXTER DT, LEES AJ, DANIEL S, *et al.* Alterations in glutathione level in Parkinson's disease and other neurodegenerative disesorders affecting basal ganglia. **Ann Neurol**, v. 348-355, 1994.

SIMOPOULOS AP. n-3 fatty acids e human health: defining strategies for public policy. **Lipids**, v. 36 Suppl, p. S83-89, 2001.

SNYDER-KELLER A, STARK PF. Prenatal inflammatory effects on nigrostriatal development in organotypic cultures. **Brain Res**, v. 1233, p. 160-167, 2008.

SOFRONIEW MV, VINTERS HV. Astrocytes: biology e pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, p. 7-35, 2010.

STABLES MJ, GILROY DW. Old e new generation lipid mediators in acute inflammation e resolution. **Prog Lipid Res**, v. 50, p. 35-51, 2011.

STIGGER F, LOVATEL G, MARQUES M, BERTOLDI K, MOYSES F, ELSNER V, *et al.* Inflammatory response e oxidative stress in developing rat brain e its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS e perinatal anoxia. **Int J Dev Neurosci**, v. 31, p. 820-827, 2013.

STILLWELL W, WASSALL SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chem Phys Lipids**, v. 126, p. 1-27, 2003.

STOLP HB, DZIEGIELEWSKA KM. Review: Role of developmental inflammation e blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental e neurodegenerative diseases. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 35, p. 132-146, 2009.

SU HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development e maintenance of learning memory performance. **J Nutr Biochem**, v. 21, p. 364-373, 2010.

SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, HIRSCH T, MARCHETTI P, MACHO A, *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **J Exp Med**, v. 184, p. 1331-1341, 1996.

TANSEY MG, GOLDBERG MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death e implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis**, v. 37, p. 510-518, 2010.

TANSEY MG, MCCOY MK, FRANK-CANNON TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease potential environmental triggers, pathways, e targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**, v. 208, p. 1-25, 2007.

TATTON NA. Increased caspase 3 e Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation e neuronal apoptosis in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 166, p. 29-43, 2000.

TATTON WG, CHALMERS-REDMAN R, BROWN D, TATTON N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. **Ann Neurol**, v. 53 Suppl 3, p. S61-70; discussion S70-72, 2003.

TAVEIRA DA SILVA AM, KAULBACH HC, CHUIDIAN FS, LAMBERT DR, SUFFREDINI AF, DANNER RL. Brief report: shock e multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. **N Engl J Med**, v. 328, p. 1457-1460, 1993.

THAL SE, ZHU C, THAL SC, BLOMGREN K, PLESNILA N. Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice. **Neurosci Lett**, v. 499, p. 1-3, 2011.

THORSEN P, JENSEN IP, JEUNE B, EBBESEN N, ARPI M, BREMMELGAARD A, *et al.* Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, p. 580-587, 1998.

TOMAS-CAMARDIEL M, RITE I, HERRERA AJ, DE PABLOS RM, CANO J, MACHADO A, *et al.* Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, e damage in the nigral dopaminergic system. **Neurobiol Dis**, v. 16, p. 190-201, 2004.

TUZUN F, KUMRAL A, OZBAL S, DILEK M, TUGYAN K, DUMAN N, *et al.* Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, p. 315-323, 2012.

TZIFI F, ECONOMOPOULOU C, GOURGIOTIS D, ARDAVANIS A, PAPAGEORGIOU S, SCORILAS A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute e Chronic Leukemias. **Adv Hematol**, v. 2012, p. 524308, 2012.

ULUKAYA E, ACILAN C, YILMAZ Y. Apoptosis: why e how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 468-480, 2011.

VAN DER HEIDE LP, SMIDT MP. The BCL2 code to dopaminergic development e Parkinson's disease. **Trends Mol Med**, v. 19, p. 211-216, 2013.

VINES A, DELATTRE AM, LIMA MM, RODRIGUES LS, SUCHECKI D, MACHADO RB, *et al.* The role of 5-HT(1)A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus e cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, 62, p. 184-191, 2012.

WANG H, SHIMOJI M, YU SW, DAWSON TM, DAWSON VL. Apoptosis inducing factor e PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 991, p. 132-139, 2003.

WANG Y, DAWSON VL, DAWSON TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. **Exp Neurol**, v. 218, p. 193-202, 2009.

WATANABE S, KANADA S, TAKENAKA M, HAMAZAKI T. Dietary n-3 fatty acids selectively attenuate LPS-induced behavioral depression in mice. **Physiol Behav**, 81, p. 605-613, 2004.

WHITTINGTON CJ, PODD J, KAN MM. Recognition memory impairment in Parkinson's disease: power e meta-analyses. **Neuropsychology**, v. 14, p. 233-246, 2000.

WINTERS BD, SAKSIDA LM, BUSSEY TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation e retrieval. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, p. 1055-10570, 2008.

WIRDEFELDT K, ADAMI HO, COLE P, TRICHOPOULOS D, MEEL J. Epidemiology e etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, v. 26 Suppl 1, p. S1-58, 2011.

WONG SW, KWON MJ, CHOI AM, KIM HP, NAKAHIRA K, HWANG DH. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization e recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **J Biol Chem**, v. 284: 27384-27392, 2009.

YAMADA M, KIDA K, AMUTUHAIRE W, ICHINOSE F, KANEKI M. Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 402, p. 312-318, 2010.

YASUDA Y, SHIMODA T, UNO K, TATEISHI N, FURUYA S, YAGI K, *et al.* The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes e cytokine/chemokine levels in different mice strains. **J Neuroimmunol**, v. 204: 43-51, 2008.

YAVIN E. Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- e anti-oxidant features to regulation of gene expression. **Prostagleins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, p. 203-211, 2006.

YU SW, ERABI SA, WANG H, KIM NS, POIRIER GG, DAWSON TM, *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 18314-18319, 2006.

YU W, GUBKINA O, MECHAWAR N, ELWELL D, QUIRION R, KRANTIC S. Expression of apoptosis-inducing factor (AIF) in the aged rat brain. **Neurobiol Aging**, v. 32, p. 179-180, 2011.

ZHU Y, CARVEY PM, LING Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. **Neurochem Int**, v. 50: 671-680, 2007.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 503

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

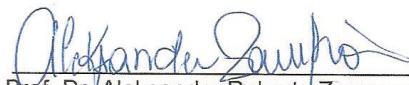
PROCESSO: 23075.050376/2010-77

APROVADO: 14/12/2010 – R.O. 11/2010

TÍTULO: Influência da suplementação com ácidos graxos da família ômega-3 sobre a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos em ratos expostos ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

AUTORES: Anete Curte Ferraz, Ana Marcia Delattre, Conrado Borges, Laís Soares Rodrigues, Camila Marques, Marina Sonagli

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA

ANEXO 2

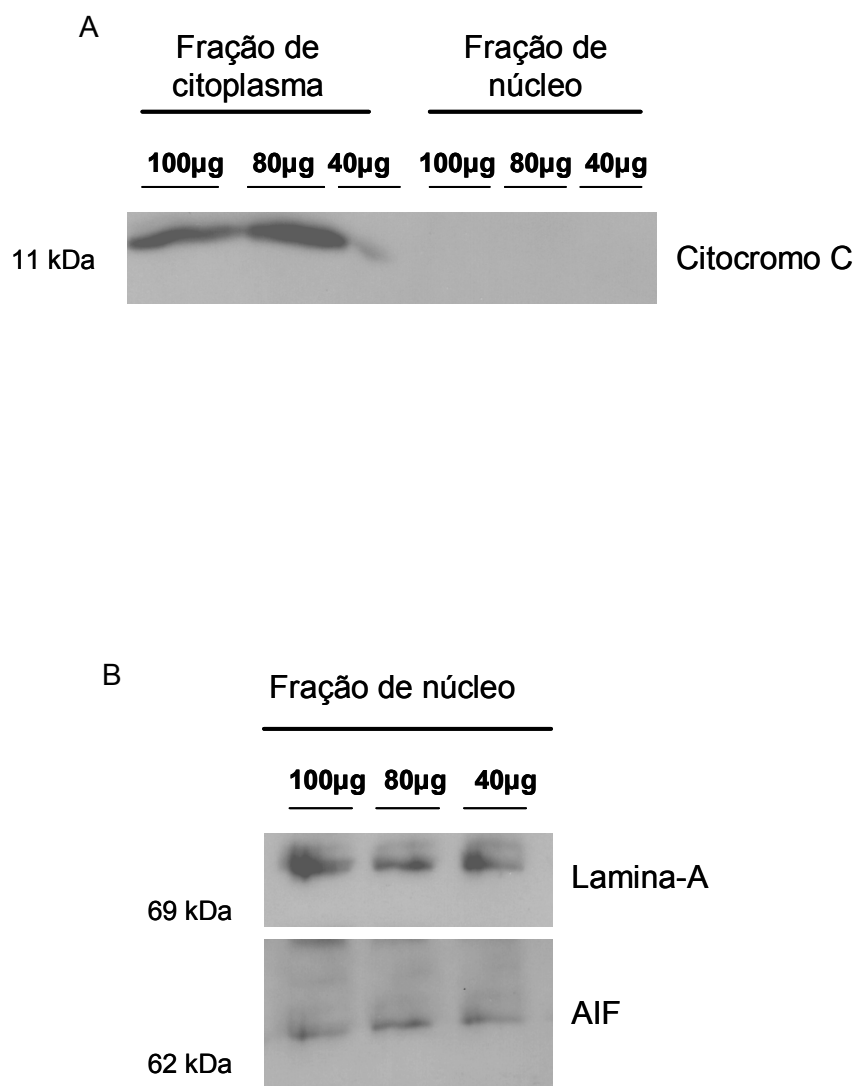


FIGURA 30 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DO FRACIONAMENTO CELULAR MOSTRANDO A AUSÊNCIA DE CITOCROMO C NA FRAÇÃO DE NÚCLEO (A) E A PRESENÇA DE AIF NAS AMOSTRAS (B).