



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALEXANDRE SALES BARROS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO ESTRIATAL
COM 6-OHDA**

Sobral – CE
2013

ALEXANDRE SALES BARROS

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO ESTRIATAL
COM 6-OHDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Sobral – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- B273e Barros, Alexandre Sales.
Efeitos comportamentais e neuroquímicos da suplementação de ácidos graxos ômega-3 em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-OHDA. / Alexandre Sales Barros. – 2013.
61 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
Área de Concentração: Macromoléculas / Neurofarmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.
1. Doença de Parkinson. 2. Ácidos graxos ômega-3 I. Título.

ALEXANDRE SALES BARROS

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO ESTRIATAL
COM 6-OHDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em: 28 / 02 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao autor da vida.

A minha esposa e filho, Alberlane e
Alexandre Filho.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

À minha esposa Alberlane, por ser uma forte e bela guerreira companheira, me apoiando e compreendido os momentos de ausência.

Ao meu filho Alexandre, pelo sorriso e abraço de todos os dias que me dão forças para continuar, e por tudo o que tem me ensinado desde o dia em que veio ao mundo.

À professora Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, pela orientação e ensinamentos com firmeza e ética exemplar, mas sem nunca perder a ternura.

Ao corpo docente do programa de Biotecnologia, pela oportunidade de receber conhecimentos que permitiram meu crescimento pessoal e profissional, pelos momentos de reflexões e críticas construtivas.

Aos alunos de iniciação científica, Jonatas, Juliana, Luziana, Emanuel e Yuri. que como alunos, se mostraram exímios professores, foram muitas vezes meus braços, minhas pernas, minha visão nas duras horas de experimentos e hoje estão em meu coração.

Aos colegas de mestrado pelo apoio nas disciplinas, em especial Anita e Ricardo, que nos momentos finais, foram decisivos na conclusão desta dissertação.

À equipe de apoio do laboratório e hospedaria de animais, por sempre garantir que os experimentos sempre tivessem sucesso.

Aos animais que sacrificaram à vida no altar da ciência e garantem um mundo melhor para nós humanos.

A equipe do Laboratório Farmacologia da UFC Fortaleza, pelo apoio nos análises no HPLC.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. A degeneração neuronal pode resultar da convergência de um conjunto de diferentes fatores patogênicos, incluindo apoptose, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação. Muitos estudos ressaltam a importância dos ácidos graxos ômega-3 (w-3) em processos vitais, como a manutenção das propriedades das membranas celulares, participação na transdução de sinais e na atividade biodinâmica das membranas neuronais. O presente trabalho objetivou determinar os efeitos da suplementação com w-3 em cérebro de ratos submetidos ao modelo experimental da DP induzido por 6-OHDA. Ratos Wistar machos (200-250g) receberam w-3 (1,5 e 3mg/kg, por gavagem) durante 28 dias. No 4º dia de tratamento foi realizada a injeção de 6-OHDA no estriado direito (ED). O grupo sham recebeu salina. No 25º dia de tratamento foi observado o comportamento rotacional induzido por apomorfina e no 28º dia os animais foram sacrificados. Os resultados mostraram aumento do número de rotações induzidas por apomorfina nos animais controles (6-OHDA), quando comparado ao grupo sham. Uma recuperação motora parcial foi observada nos animais tratados com w-3, que reduziu o número de rotações em torno de 40 e 75 % (1,5 e 3,0 g/kg, respectivamente). O grupo controle apresentou um declínio de cerca de 70 % sobre na atividade locomotora quando comparado ao grupo sham e o tratamento com w-3, promoveu aumento na atividade exploratória horizontal. A 6-OHDA aumentou o conteúdo de MDA no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) (6-OHDA: 75 %, 44 % e 104 %; respectivamente) quando comparado com o sham. O w-3 foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em torno de 40%. O w-3 promoveu redução na concentração de nitrito/nitrato em todas as áreas testadas. Observou uma redução significativa da concentração de dopamina (DA) no lado ipsilateral dos controles (61 %). No entanto, nos animais tratados com w-3 essa redução foi menor. Os resultados deste estudo sugerem que a suplementação com w-3 reverteu às alterações comportamentais e neuroquímicas da 6-OHDA, apresentando efeitos possivelmente benéficos no tratamento da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, ômega-3, neuroproteção

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The neuronal degeneration may result from the convergence of a number of different pathogenic factors, including apoptosis, excitotoxicity, oxidative stress and inflammation. Many studies emphasize the importance of omega-3 (w-3) in vital processes such as maintenance of the properties of cell membranes, participate in signal transduction and biodynamic activity of neuronal membranes. This study aimed to determine the effects of supplementation with w-3 in the brain of rats subjected to an experimental model of PD induced by 6-OHDA. Male Wistar rats (200-250g) received W-3 (1.5 and 3mg/kg, orally) for 28 days. On the 4th day of treatment was performed 6-OHDA injection into the striatum right (SR). The sham group received saline. On the 25th day of treatment was observed rotational behavior induced by apomorphine and by day 28 the animals were sacrificed. The results showed an increase in the number of apomorphine-induced rotations in the control animals (6-OHDA) compared to the sham group. A motor partial recovery was observed in animals treated with w-3, which reduced the number of rotations around 40 and 75% (1,5 and 3,0 g / kg, respectively). The control group showed a decline of about 70% on locomotor activity when compared to the sham group and treatment with n-3, increased the horizontal exploratory activity. The 6-OHDA promoted increase in MDA content in the prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HC) and striatum (CE) (6-OHDA: 75%, 44% and 104%, respectively) compared to sham. The w-3 was capable of reducing the lipid peroxidation about 40%. The w-3 caused a reduction in the concentration of nitrite / nitrate in all areas tested. We observed a significant reduction in the concentration of dopamine (DA) on the ipsilateral controls (61%). However, in animals treated with n-3 this reduction was minor. The results of this study suggest that supplementation with n-3 reversed the behavioral and neurochemical changes of 6-OHDA, with effects potentially beneficial in the treatment of PD.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização simplificada do circuito motor extrapiramidal.....	19
Figura 2 - Representação esquemática da via nigroestriatal normal e na doença de Parkinson.....	20
Figura 3 - Equação e fórmula química estrutural dos triglicerídeos, glicerol e ácidos graxos.....	28
Figura 4 - Semelhança entre as estruturas das catecolaminas e da 6-OHDA.....	41
Figura 5 - Demonstração do local da injeção estereotáxica e sentidos da rotação ipsilateral e contralateral.....	42
Figura 6 - Animal durante teste rotacional (em rotação contralateral à lesão estriatal).....	43
Figura 7 - Fixação do animal no aparelho estereotáxico.....	44
Figura 8 - Injeção esterotáxica.....	44
Figura 9 - Animal em teste de campo aberto.....	45

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Reações de formação de eicosanóides à partir dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.....	34
Esquema 2 -	Cronograma esquemático do tratamento, cirurgia esterotáxico, testes comportamentais e sacrifício dos animais tratados com ômega-3.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Determinação dos efeitos do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) durante 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA.....	50
Gráfico 2 -	Determinação do efeito do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no número de cruzamentos no teste de campo aberto, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA.....	52
Gráfico 3 -	Determinação do efeito do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no número de grooming no teste de campo aberto, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA.....	54
Gráfico 4 -	Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.....	56
Gráfico 5 -	Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.....	57
Gráfico 6 -	Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.....	58
Gráfico 7 -	Determinação das concentrações de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	62

Gráfico 8 -	<i>Determinação das concentrações de NA e 5-HT e seu metabólito (5-HIAA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....</i>	63
Gráfico 9 -	Determinação da concentração de Aspartato em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	66
Gráfico 10 -	Determinação da concentração de Glutamato em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	67
Gráfico 11 -	Determinação da concentração de Glicina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	68
Gráfico 12 -	Determinação da concentração de Taurina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	69
Gráfico 13 -	Determinação da concentração de Taurina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias).....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	A Doença de Parkinson.....	17
2.2	Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	17
2.2.1	<i>Relação entre Doença de Parkinson, neurotransmissão monoaminérgica e aminoácidos.....</i>	21
2.3	Tratamentos para a Doença de Parkinson.....	22
2.4	Doença de Parkinson e processo inflamatório.....	23
2.5	Doença de Parkinson e morte neuronal	24
2.6	Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo.....	26
3	OS ÁCIDOS GRAXOS (Lipídios).....	27
3.1	Os ácidos graxos essenciais.....	28
3.2	Fontes alimentares e Biodisponibilidade dos Ácidos Graxos.....	29
3.3	Necessidades de ácidos graxos.....	29
3.4	Os Ácidos graxos ômega-3 e efeito cardioprotetor.....	31
3.4.1	<i>Influência dos Ácidos Graxos Ômega-3 nos processos inflamatórios.....</i>	31
3.5	Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e Doença de Parkinson.....	33
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	Geral.....	38
4.2	Específicos.....	39
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	Animais.....	39
5.2	Aspectos éticos.....	39
5.3	Tratamento dos animais.....	39
5.4	Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA.....	40
5.5	Estudo comportamental.....	44
5.5.2	<i>Teste rotacional.....</i>	44

5.5.2	<i>Teste de campo aberto</i>	44
5.6	Determinação da Atividade dos Sistemas Antioxidantes	46
5.6.1	<i>Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</i>	46
5.6.2	<i>Determinação do conteúdo de nitrito e nitrato</i>	46
5.6.2.1	<i>Preparação da Curva Padrão</i>	46
5.6.3	<i>Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC</i>	47
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
7	RESULTADOS	49
7.1	Determinação dos efeitos do ômega 3 no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos submetidos ao modelo da 6-OHDA	49
7.2	Análise do comportamento locomotor no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com ômega 3	51
7.3	Determinação dos efeitos do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica em ratos submetidos à injeção intraestriatal com 6-OHDA	55
7.4	Efeitos do ômega 3 sobre a produção de nitrito/nitrato em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA	59
7.5	Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC E HVA), Noradrenalina (NA), Serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com omega 3	60
7.6	Determinação das concentrações dos aminoácidos aspartato (ASP), glutamato (GLU), glicina (GLI), taurina (TAU) e GABA no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com ômega- 3	64
8	DISCUSSÃO	71
9	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, que relacionou as características clínicas principais do Parkinsonismo. Esses consistem em tremor de repouso, rigidez, bradicinesia-hipocinesia, postura em flexão, perda dos reflexos posturais e o fenômeno do congelamento. A DP é caracterizada por uma degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. Essa destruição neuronal leva a perda dos terminais dopaminérgicos do estriado e também das regiões dos gânglios basais e cortical (MOSLEY *et al.*, 2006).

Entre as doenças neurodegenerativas relacionadas à idade avançada a DP é uma das mais comuns, ficando atrás somente do Mal de Alzheimer. Sua incidência se eleva com o aumento da idade, com prevalência de 0,25% a 4,5% na população acima dos 65 anos. (MAYEUX, 2003; DE LAU & BRETELER, 2006).

A origem dessa degeneração neuronal é desconhecida e provavelmente envolve muitos eventos celulares e moleculares, incluindo estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Recentemente tem sido sugerido que a reação das células da glia e o processo inflamatório também podem participar da cascata de eventos que levam a degeneração neuronal (MOSLEY *et al.*, 2006).

Apesar das causas da DP não estarem bem determinadas, vários estudos sugerem que as toxinas ambientais à que somos expostos, mutações e alterações genéticas pré-existentes são fatores que isolados em conjunto contribuem para o desenvolvimento da DP. (GORELL *et al.*, 2004; HUNG *et al.*, 2010).

Desordens relacionadas aos núcleos da base resultam em distúrbios cognitivos e sensoriais e são demonstradas em modelos experimentais da DP, corroborando com a idéia de serem os núcleos da base estruturas com função integrativa entre áreas que estão anatomicamente separadas, mas que precisam de uma harmonia sincrônica para realizar suas funções, apresentando um potencial terapêutico para restaurar os déficits de dopamina (DACUNHA *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2002; SHIN & DIXON, 2011).

Como é uma doença progressiva, que afeta principalmente pessoas a partir dos 65 anos e usualmente acarreta incapacidade severa após 10 a 15 anos, o impacto social e financeiro é elevado, particularmente na população mais idosa. É estimado que o custo anual mundial com medicamentos antiparkinsonianos esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo cerca de 3 a 4 vezes mais caro para os pacientes na fase avançada da doença (BRASIL, 2006).

O tratamento atual para esta doença está restrito ao alívio sintomático, porque até o presente momento não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Esses tratamentos levam a uma melhora inicial dramática enquanto a doença progride e com o passar do tempo sua eficácia diminui bastante. Outra limitação desses medicamentos consiste nos seus efeitos colaterais, como o desenvolvimento das discinesias que acabam por impossibilitar a continuação do tratamento (XU *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de novos tratamentos que melhoram a sintomatologia da DP com menos efeitos colaterais são importantes em curto prazo, mas o tratamento ideal seria aquele o qual se pudesse aliar a essa terapêutica convencional drogas que impedissem a progressão da doença, como os neuroprotetores. Essas estratégias neuroprotetoras estão sendo propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DP estão sendo elucidados. As estratégias que podem ser consideradas para neuroproteção devem ter como alvo não apenas receptores de neurotransmissores (como receptores do glutamato ou da adenosina), mas também alvos farmacológicos menos convencionais como receptores de fatores neurotróficos, proteínas apoptóticas, fatores de transcrição, radicais livres, toxinas mitocondriais e desregulação proteossomal (DAWSON; DAWSON, 2003; RAVINA *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2005).

A quantidade de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), aumenta bastante durante o período embrionário da divisão das células neurais, sugerindo que esses ácidos realmente desempenham papel importante na funcionalidade do cérebro. (CRAWFORD *et al.*, 1981; INNIS, 1991).

Os ácidos graxos possuem um importante papel na estrutura e função das células nervosas e constituem cerca de 40 % a 60 % do conteúdo estrutural do

cérebro (GREEN E YAVIN, 1996; CRAWFORD *et al.*, 1997; SINCLAIR *et al.*, 1997), onde os mais presentes no cérebro são os particularmente o ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5n-3) e docosaexaenoico (DHA 22:6n-3) (SALVAT *et al.*, 2002).

Hoje podemos enumerar diversas funções importantes relacionadas AGPIs, como na composição das membranas celulares (HICHAMI *et al.*, 2007; SUMIYOSHI *et al.*, 2008), a modulação da expressão gênica (MAZZA *et al.*, 2007), na sinalização celular (FARKAS *et al.*, 2002; McNAMARA; CARLSON, 2006), a geração de segundos mensageiros e regulação de canais iônicos e receptores (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000), síntese de eicosanóides (CLARKE *et al.*, 2005; MAZZA *et al.*, 2007) e no desenvolvimento neuronal (LEVANT; RADEL; CARLSON, 2004). Tais evidências nos fazem acreditar em um real papel neuroprotetor destes ácidos graxos na DP.

Entretanto, existem poucos estudos relacionados com o uso dos PUFAs ômega-3 na DP. Um estudo epidemiológico desenvolvido por DE LAU e colaboradores (2005) verificou que uma dieta rica em PUFAs está diretamente associada a uma redução do risco de desenvolvimento de DP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Doença de Parkinson

Estudos epidemiológicos demonstram que a DP encontra-se disseminada em todas as camadas da sociedade, proporcionando graves implicações sociais. É uma desordem neurodegenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1% da população mundial com idade acima de 55 anos. É descrita como uma desordem motora em que os pacientes apresentam tremor, rigidez muscular, bradicinesia e distúrbios posturais. Além desses déficits motores podem ocorrer também disfunções cognitivas e em alguns casos demência, provavelmente pelo fato de o processo degenerativo não se limitar aos gânglios da base, afetando também outras áreas do cérebro (DEUMENS *et al.* 2002; BUSQUET *et al.* 2011).

A razão dos pacientes portadores da DP exibirem baixos níveis de dopamina cerebral ocorre devido à degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal, que é composta de neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na substância negra *pars compacta* e cujos axônios e nervos terminais são encontrados no corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). É necessária uma diminuição substancial de cerca de 80% nos níveis de dopamina estriatal para que os sintomas motores se manifestem (DEUMENS *et al.*, 2002). A neuropatologia da DP não está restrita apenas a via nigroestriatal, anormalidades histológicas podem ser encontradas em outros grupos de células dopaminérgicas e até não dopaminérgicas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

2.2 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

O mecanismo molecular da DP não é totalmente compreendido, o acúmulo desordenado das proteínas no citoplasma dos neurônios pode ser um dos fatores que contribuem para a morte neuronal (EMBORG, 2004). Algumas neurotoxinas utilizadas em modelos animais de DP têm ajudado na elucidação do mecanismo molecular da doença (BOVÉ *et al.*, 2005).

A perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra leva os pacientes portadores da DP a um declínio acentuado no que se refere às

habilidades de execução de tarefas motoras simples, levando-os a um quadro de dependência e perda de autonomia. (EMBORG, 2004).

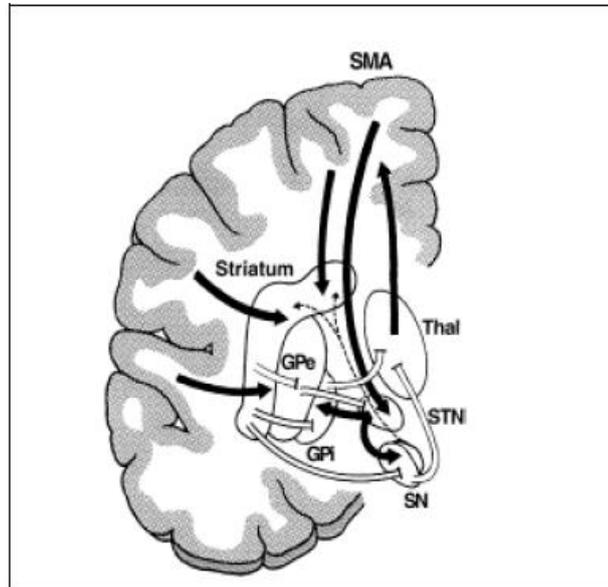
A segunda característica patológica mais comum na DP é a presença de inclusões intraneurais, conhecidos como corpúsculos de Lewy. Os corpúsculos de Lewy são agregados citoplasmáticos eosinofílicos esféricos compostos de uma variedade de proteínas, como a α -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos, que podem ser encontrados em toda região cerebral afetada (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Estudos sugerem que o mecanismo de morte neuronal na DP envolve a ativação de um fator etiológico como o acúmulo da proteína α -sinucleína mutante nos neurônios dopaminérgicos que desencadeia uma cascata de eventos, onde estão relacionados vários fatores como os radicais livres, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, inflamação e apoptose (PRZEDBORSKI, 2005).

Przedborski 2005, baseado em modelos neurotóxicos da DP, sugeriu que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra não resulta da ativação de apenas um único fato deletério, mas da convergência de múltiplos fatores patogênicos.

Entre o córtex, núcleos da base e tálamo existe o circuito motor extrapiramidal, que constitui uma das cinco vias que têm a função de processamento de informações entre o córtex e os núcleos da base (ALEXANDER & CRUTCHER, 1990). Impulsos provenientes de áreas motoras são processados pelo putâmen, estrutura que juntamente com o caudado forma o estriado. O putâmen envia informações motoras através de suas projeções para o globo pálido interno e substância negra reticulata, que são as estruturas responsáveis por enviar projeções inibitórias ao tálamo. Os núcleos da base também compreendem o globo pálido externo e núcleo subtalâmico. (Figura 1) (BARRET, 2001).

Figura 1: Organização simplificada do circuito motor extrapiramidal. SMA: Área motora suplementar; Striatum: estriado, que é formado pelo caudado + putâmen; Thal: núcleo motor do tálamo; SN: substância negra; GPe: Globo Pálido externo e GPi: Globo Pálido interno



Fonte: (BARRET, 2001).

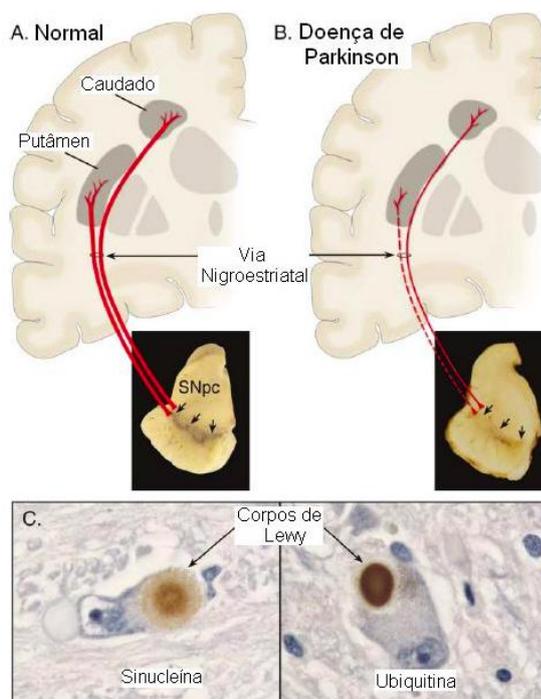
A anormalidade bioquímica fundamental encontrada na DP é o déficit na quantidade de DA no encéfalo, atribuída à perda dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Esta via (figura 2) é composta por neurônios cujos corpos celulares estão localizados na substância negra *pars compacta* (SNpc) e que projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado (BOVÉ *et al.*, 2005). A redução destes neurônios, que normalmente contêm neuromelanina, produz a despigmentação da SNpc (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003) e, associado a este fato, um dos achados fisiopatológicos mais frequentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy.

A DP não causa alterações somente no sistema motor, alterações cognitivas, deficiências de aprendizagem e memória também são detectados (DUBOIS & PILLON, 1997), podendo também apresentar síndromes depressivas (MAZZA, 2006). Os prejuízos, mais comumente observados, são constatados em tarefas que envolvem funções de memória, executiva e visuoespaciais (DUBOIS & PILLON, 1997).

A maioria destas alterações se manifesta nos primeiros estágios da DP, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores, onde o paciente apresenta dificuldades relacionadas à atenção seletiva, gerenciamento de tarefas,

planejamento, codificação, entre outras relacionadas a funções executivas (DUBOIS & PILLON, 1997).

Figura 2 - representação esquemática da via nigroestriatal normal (a) e na doença de parkinson (b). (c) detalhe das inclusões citoplasmáticas (corpos de lewy)



Fonte: DAUER E PRZEDORSKI (2003)

Existe uma relação entre o declínio cognitivo e a condição neuropatológica do paciente com a DP, sendo os sintomas cognitivos agravados com o transcorrer da doença, assim como ocorre com os sintomas relacionados à função motora. (BRAAK *et al*, 2006).

Entre as funções dos núcleos da base, existe o recebimento de informações de diversos sentidos como a visão, audição e tato, para que sejam processadas para auxiliar no movimento. Então os núcleos da base integram regiões separadas anatomicamente, que devem funcionar harmonicamente. (ADAMOVICH *et al*, 2001).

De acordo com o proposto acima os pacientes parkinsonianos exibem dificuldade em incorporação das informações sensoriais no planejamento motor. Esses pacientes demonstram dificuldades relacionadas à percepção do espaço,

como, por exemplo, relatam a sua dificuldade na locomoção em ambientes familiares, muitas vezes se chocando contra as portas e mobílias presentes no local; também relatam dificuldade para estimar relações espaciais entre objetos e demonstram alterações posturais como instabilidade postural e dificuldades em fazer curvas (DAVIDSDOTTIR *et al*, 2005).

2.2.1 Relação entre Doença de Parkinson, neurotransmissão monaminérgica e aminoácidos.

A importância da dopamina como o neurotransmissor mais envolvido no controle motor está diretamente associada às conseqüências clínicas decorrentes da degeneração da via nigroestriatal, como aquelas observadas na doença de Parkinson: tremor, rigidez e acinesia.

O sistema dopaminérgico inerva todos os núcleos da base, através da via nigroestriatal e, provavelmente, exerce um importante controle modulatório dos circuitos neuronais (vias direta e indireta). Os núcleos da base fazem parte de um complexo circuito neuronal organizado em paralelo para integrar atividades de diferentes regiões corticais. Além disso, os núcleos da base são intimamente interconectados com o *locus ceruleus* (núcleo noradrenérgico), núcleo da rafe (neurônios serotoninérgicos) e a formação reticular. O chamado “circuito motor” é, na verdade, o mais importante na fisiopatologia do movimento (OBESO *et al.*, 2002).

As áreas corticais enviam projeções glutamatérgicas ao estriado, que é a principal porta de entrada dos núcleos da base. O estriado envia projeções gabaérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a substância negra reticulada. Esses núcleos modulam o tálamo, que por sua vez envia projeções glutamatérgicas estimulatórias de volta ao córtex, facilitando com maior ou menor intensidade o início do movimento (OBESO *et al.*, 2002).

Além dos sintomas motores da doença de Parkinson, freqüentemente ocorrem sintomas não-motores como as alterações cognitivas e de comportamento, como a tendência ao isolamento, a ansiedade, distúrbios do sono, fadiga e depressão (LAUTERBACH, 2004; CHAUDHURI; NAIDU, 2008). Também são comuns as alterações sensoriais como dor, queimação e ardência na região de envolvimento motor e distúrbios autonômicos, como sialorréia, sudorese excessiva, pele oleosa e fria, constipação crônica, redução do esvaziamento da bexiga,

distúrbios sexuais, hipotensão postural, distúrbios na fala, na escrita e na expressão facial (SABATÉ *et al.*, 2008).

Todas essas alterações podem ter relação com as disfunções que ocorrem principalmente devido à redução das concentrações de dopamina e o consequente desequilíbrio dos outros sistemas (como o sistema colinérgico, serotoninérgico, gabaérgico e glutamatérgico) que estão integrados e onde a dopamina exerce um importante papel modulatório.

Vários estudos comprovam que em fases avançadas da doença de Parkinson ocorrem mudanças em outros neurotransmissores e em outros sistemas de neuromoduladores. A redução da noradrenalina está relacionada com a destruição de neurônios noradrenérgicos e é responsável por certos sintomas não motores da DP, como por exemplo, demência, depressão e estados vegetativos (FRANCIS; PERRY, 2007). Existe queda da concentração de serotonina (5-HT) demonstrada em todas as regiões cerebrais, embora não existam evidências de processos degenerativos envolvidos. Ocorre também uma diminuição na atividade da enzima glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese do ácido gama-aminobutírico (GABA), que pode ser consequência da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (FRANCIS; PERRY, 2007).

2.3 Tratamentos para a Doença de Parkinson

Ainda não existe tratamento adequado para a DP. A terapia atual está restrita ao alívio dos sintomas e nenhuma droga capaz de inibir a degeneração neuronal foi descoberta. Existe uma dramática necessidade de tratamentos neuroprotetores para as doenças neurodegenerativas e para isso várias substâncias com ação neuroprotetora têm sido testadas com a finalidade de inibir a progressão dessas doenças, incluindo a DP (BLUM *et al.*, 2004).

Dos tratamentos realizados para a DP, nenhum possui a capacidade de impedir o progresso da doença, nem regenerar ou restaurar a destruição neuronal. Com a elucidação do problema do déficit da dopamina, o tratamento com levodopa modificou drasticamente o tratamento da DP (SHIN & DIXON 2011).

O tratamento mais usado atualmente para a DP está restrito a reposição da dopamina utilizando seu precursor, a L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) associada a um inibidor da dopa-decarboxilase (benzerazida, carbidopa).

Inicialmente essa terapêutica se mostra bastante eficaz, mas com a continuidade do tratamento ocorrem efeitos colaterais como náuseas vômitos e hipotensão postural (XU *et al*, 2005).

O modelo de tratamento farmacológico para redução da sintomatologia da DP é utilizado nos dias atuais, onde os maiores efeitos são no controle dos tremores, drogas como o biperideno, orfenadrina, difenidramina, benztropina e prociclidina, que são agentes anticolinérgicos, mas não são eficazes em controlar outros sintomas motores. O tratamento com levodopa é o que possui maior eficácia no combate aos sintomas da DP, apesar de ser utilizada a mais de três décadas, 10% dos pacientes apresentam efeitos colaterais como discinesias e flutuações motoras (STOCCHI, 2003; LUCHTMAN *et al*, 2012).

O precursor metabólico da dopamina é a levodopa, e junto com um inibidor enzimático (dopa-descarboxilase periférica), *in vivo* ocorre a biotransformação para dopamina, compensando o déficit de dopamina no cérebro (LANG & OBESO, 2004).

Agonistas dopaminérgicos não seletivos, como a bromocriptina, pergolide e apomorfina são utilizados na terapêutica das flutuações motoras nos casos mais severos da DP, enquanto os agonistas seletivos como a cabergolina, lisuride, pramipexol e ropitino são utilizados de forma preventiva e nos estágios iniciais da DP. Também em estágios precoces podem ser utilizados inibidores da enzima monoamino oxidase B, como a selegilina e rasagilina; também possuem um efeito neuroprotetor (MILLER, 2002; STOCCHI, 2003).

A intervenção cirúrgica, apesar de ser menos utilizada, tem mostrado alguma eficácia, como as técnicas da talamotomia, a estimulação subtalâmica, a estimulação talâmica e a palidotomia (SCHULZ & GRANT, 2000).

2.4 Doença de Parkinson e processo inflamatório

Damier e colaboradores (1993) verificaram que a ativação das células da glia e o processo inflamatório participam da cascata de eventos que levam a degeneração neuronal. Muitos estudos têm constantemente relatado a presença de microglias ativadas na DP, corroborando com esses resultados (BANATI *et al.*, 1998; HIRSCH *et al.*, 2005; AILING *et al.*, 2012). A função dessas células da glia não está completamente elucidada. Alguns astrócitos podem agir como neuroprotetores

inativando radicais livres derivados do oxigênio e produzindo fatores neurotróficos que protegem os neurônios dopaminérgicos contra vários estímulos lesivos. Entretanto microglias ativadas podem estar envolvidas nos mecanismos de lesão dos neurônios dopaminérgicos (DAMIER *et al.*, 1993; PARAIN *et al.*, 1999; AILING *et al.* 2012).

A ativação das microglias está diretamente associada com a morte dos neurônios dopaminérgicos na DP, podendo até mesmo ser usada como marcador biológico para a doença. Realmente as microglias ativadas servem como indicadores *in vivo* da resposta inflamatória e contribuem significativamente para o processo degenerativo. Na DP as microglias próximas aos neurônios dopaminérgicos parecem aumentar a sua capacidade de produção das ROS, devido ao seu estado ativado, levando a um ciclo contínuo de lesão neuronal e ativação do sistema imunológico no local (MOSLEY, 2006).

Entre todas as origens patogênicas, a neuroinflamação pode ser uma das mais importantes na DP. A ativação das microglias pode produzir citocinas pró-inflamatórias, com possível efeito neurotóxico. Enzimas envolvidas na cascata do ácido araquidônico (AA) são ativadas na DP e podem ser ativadas por citocinas. A fosfolipase citosólica A2 (cPLA2) catalisa a liberação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 nas membranas dos neurônios, causando modificações na liberação da ciclooxigenase 2 (COX-2) levando a produção de espécie reativas oxidantes e eicosanoides pró-inflamatórios. (LUCHTMAN *et al.*, 2011).

Os mecanismos através dos quais as células da glia e as citocinas pró-inflamatórias causam danos aos neurônios dopaminérgicos da DP ainda não são totalmente compreendidos. Estudos sugerem que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células da glia durante o processo inflamatório participam dos eventos envolvidos na degeneração neuronal na DP. Baseado nesse princípio, foi demonstrado *in vitro*, que o interferon γ , a interleucina -1β e o TNF- α podem induzir a expressão da óxido nítrico sintase indutiva (NOSi), e foi observado que os níveis desta enzima encontram-se aumentados na substância negra de pacientes com PD (HIRSCH *et al.*, 2005).

Em um estudo recente, Kiecolt-Glaser *et al.* (2011) verificaram que o consumo de PUFAs ômega-3 influenciou na redução da ansiedade e inflamação em adultos jovens.

2.5 Doença de Parkinson e morte neuronal

Um desafio importante na pesquisa da DP é entender os mecanismos fisiopatológicos que levam a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. A perda neuronal é gradual e a possibilidade de interromper o processo é algo bastante valioso como opção de tratamento, além disso, existem evidências que a disfunção mitocondrial (principalmente na membrana mitocondrial) e o dano oxidativo são fatores que contribuem para a morte neuronal na DP (MEREDITH *et al.*, 2009; OZLEM *et al.* 2011). Estudos *post mortem* revelaram uma redução da atividade do complexo I mitocondrial em cerca de 30 a 40% em pacientes portadores de DP (SCHAPIRA, 1993).

A função mitocondrial preservada é imprescindível para a manutenção de quantidades adequadas de adenosina trifosfato (ATP) para os processos celulares básicos. A perda de ATP compromete, dentre outras atividades, o funcionamento das bombas iônicas, aumentando a formação de espécies reativas do oxigênio e reduzindo o potencial da membrana plasmática, que por sua vez reduz o limiar de ativação dos receptores NMDA do glutamato, aumentando a vulnerabilidade dos neurônios aos efeitos excitotóxicos desse neurotransmissor (MEREDITH *et al.*, 2009).

A excitotoxicidade aguda mediada pelo glutamato pode provocar morte celular por necrose (DIRNAGL *et al.*, 1999). No entanto, a exacerbação da sinalização glutamatérgica pode levar a morte celular programada, como ocorre na apoptose ou autofagia, estas ocorrem mais tardiamente quando o dano mitocondrial já está mais intenso e há um comprometimento maior da permeabilidade da membrana mitocondrial elevando as concentrações de cálcio no citoplasma (MEREDITH *et al.*, 2009).

O termo apoptose é derivado do grego com o significado “ser descartado”, em analogia às pétalas de uma flor quando desprendidas. Este processo mostra-se eficaz e necessário para a manutenção das populações celulares. (LEIST, 2001).

As deficiências nos processos de apoptose são responsáveis pela proliferação de células tumorais, e a exarcebação destes mecanismos apoptóticos podem estar envolvidos em várias condições patológicas como as doenças auto-imunes, as doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Esclerose Amiotrófica Lateral (ALS), Esclerose Múltipla dentre muitas outras (DONG *et al.*, 2009).

O mecanismo celular da apoptose é marcado por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial onde há formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para fosforilação oxidativa; há extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático; ativação de uma série de substâncias serino-proteases como as caspases, transglutaminases, endonucleases e fosfatidilserina / trombospondina. O processo implica na fragmentação da cromatina e das organelas com posterior clivagem das mesmas. Os corpúsculos apoptóticos formados são fagocitados por macrófagos, que reconhecem suas sinalizações (DAMIANI, 2004).

O estresse celular também pode levar a perda da integridade das membranas mitocondriais, provocando sua despolarização. Além disso, os radicais livres liberados pela mitocôndria funcionam como importantes moléculas de sinalização que contribuem para o aumento da inflamação e da apoptose, por exemplo, quando o edema mitocondrial culmina com a liberação do citocromo c e ativação das caspases (PIRIER *et al.*, 2005; REED, 2011).

Um dos principais modelos experimentais da DP é aquele induzido por injeção intraestriatal de 6-OHDA, que mimetiza alguns aspectos fisiopatológicos da doença em animais. Os mecanismos de morte celular induzida por 6-OHDA podem ser explicados de três maneiras: geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) por auto-oxidação intra ou extracelular, formação de peróxido de hidrogênio induzido pela monoamino oxidase e inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial (TANAKA *et al.*, 2006). Muitos trabalhos na literatura têm sugerido que a excessiva geração de espécies reativas do oxigênio produzida por 6-OHDA provoca estresse oxidativo que lesiona as células e induz morte celular por apoptose (TAKATA *et al.*, 2005; HANROTT *et al.*, 2006).

2.6 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas altamente reativas formadas a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma outra série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ROS) e se não neutralizadas podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e o dano tecidual (MOSLEY *et al.*, 2006).

Essas espécies químicas são abundantes na natureza, produzidas normalmente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente, facilmente formadas com exposição excessiva a luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. Existem enzimas antioxidantes protetoras e mecanismos que neutralizam os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona, glutatona peroxidase e redutase, a vitamina E, a vitamina C, e outras substâncias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (MOSLEY *et al.*, 2006).

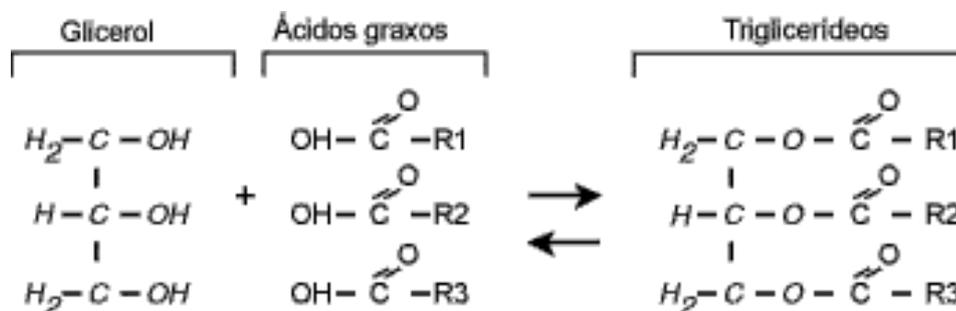
Vários estudos já comprovaram que as ROS podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução (NAKAMURA; LIPTON, 2009; REED *et al.* 2011).

3 OS ÁCIDOS GRAXOS (Lipídios)

A palavra lipídio possui origem do grego “*lipos*”, que significa gordura. Lípidos são compostos indispensáveis para funções orgânicas bioquímicas, estruturais e regulatórias. Os lipídios são moléculas orgânicas, constituídas por grupos de AG, ácidos carboxílicos com longas cadeias não ramificadas, formadas por inúmeros pares de átomos de carbono unidos por ligações simples ou duplas, podendo ou não possuir insaturações (CURI, 2002).

Os lipídios fazem parte da composição da membrana celular e influenciam, modificando a resposta imune e os processos inflamatórios. São moléculas bastante energéticas, fornecendo nove quilocalorias (kcal) por grama oxidada pelo processo da beta oxidação mitocondrial. Os AG são encontrados nas membranas ou como triglicerídeos (Figura 3), que são compostos de uma molécula de glicerol esterificado a três moléculas de AG (CURI, 2002).

Figura 3: Equação e fórmula química estrutural dos triglicerídeos, glicerol e ácidos graxos.



Fonte: (CURI, 2002)

3.1 Os ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos possuem cadeias carbonadas e são classificados de acordo com o comprimento desta cadeia e se possuem ou não de ligações duplas entre carbonos. São denominados de saturados quando não existem ligações duplas e de insaturados quando possuem uma ou mais ligações duplas em sua cadeia. No grupo dos ácidos graxo insaturados existem os monoinsaturados, que apresentam apenas uma ligação dupla entre carbonos na cadeia, e os poliinsaturados que têm mais que uma ligação dupla na cadeia carbonada. As características físicas dos ácidos graxos e dos compostos em que estão presentes, são determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da sua cadeia carbonada (MCKEE & MCKEE, 1999).

Os PUFAs insaturados existem como isómeros *cis* ou *trans* (MCKEE, & MCKEE, 1999), e as ligações duplas em *cis* promovem uma certa curvatura em sua cadeia (HAGG, 2001), e essa curvatura não permite um agrupamento compacto dos constituintes da cadeia, como se verifica nos saturados. Esta particularidade concede a ácidos gordos com o mesmo comprimento de cadeia pontos de fusão diferentes. Desta forma, os ácidos gordos insaturados apresentam menor ponto de fusão que os saturados, sendo que à temperatura ambiente (25°C) os saturados se apresentem sob consistência cerosa e os insaturados em estado líquido (MCKEE, & MCKEE, 1999).

3.2 Fontes alimentares e Biodisponibilidade dos Ácidos Graxos

Podemos encontrar AG essenciais tanto de origem animal quanto em vegetais, sendo o EPA e DHA encontrados em abundância em gorduras de peixes marinhos como cavala, sardinha e arenque. Os de origem vegetal, como o linoléico, presente no milho, girassol, açafrão, enquanto o linolênico pode ser encontrado na soja e na semente de linhaça. (MELANSON *et al.*, 2005).

O processo de preparo, cocção e pré-preparo de alimentos com ômega-3 afetam diretamente sua biodisponibilidade e a concentração deste nutriente na composição do alimento. Peixes selvagens possuem um maior teor de ômega-3 do que os criados em cativeiro. Para não sofrer peroxidação lipídica, o ômega-3 presente na linhaça, necessita que a mesma seja triturada e armazenada em um recipiente hermeticamente fechado, livre da luz e consumida no máximo em 72hs. Sendo os PUFAs de origem animal apresentam maior estabilidade á peroxidação lipídica do que os de origem vegetal (CAMPIOLI *et al.* 2012). Os hábitos alimentares da dieta ocidental induzem a um baixo consumo deste nutriente, que em médio ou longo prazo, pode ser extremamente prejudicial ao organismo (MELANSON *et al.*, 2005; CAMPIOLI *et al.* 2012).

3.3 Necessidades de ácidos graxos

De acordo com a recomendação da Associação Americana do Coração (American Heart Association) (Quadro 1), para um indivíduo saudável, 30% (ou menos) do total de energia consumida deverá ser proveniente da gordura da dieta, na seguinte proporção (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2003):

- 20 - 23% de AG poliinsaturados e monoinsaturados
- < 10% de AG saturados (para portadores de doenças coronarianas, < 7%)
- < 300 mg colesterol ao dia

Por possuir uma cadeia carbônica de 14 a 22 átomos do tipo poliinsaturado com a primeira insaturação no carbono três a partir do radical metil o ômega-3 recebe essa classificação. Epidemiologicamente, os esquimós possuem

uma baixa incidência de doenças cardiovasculares, relacionada à dieta, composta principalmente de salmão, atum e truta, todos ricos em ômega-3, que estimulou o interesse no estudo deste grupo de lipídeos. Além disso, também apresentaram diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e consequente aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (SANDERS *et al.*, 1997; NAKAMURA *et al.*, 1999)

Quadro1: recomendação de lipídios da Associação Americana do Coração (American Heart Association)

Faixa etária	Lipídios	Ômega-6	Ômega-3
Bebê			
0-6 meses	31 g	4,4 g	0,5
7-12 meses	30 g	4,6 g	0,5
Prematuro			
Nascimento-7 ^o dia	0,5-3,6g/kg de peso corpóreo		
7 ^o dia-saída da UTI	4,5-6,8g/kg de peso corpóreo		
Até 1 ano após saída da UTI	4,4-7,3g/kg de peso corpóreo		
Criança			
1-3 anos	30-40% do VCT*	7 g	0,7 g
4-10 anos	25-35% do VCT*		
4-8 anos		10 g	0,9 g
Grávidas			
Até 50 anos		13 g	1,4 g
Lactantes			
Até 50 anos		13 g	1,3 g
Adulto			
11-18 anos	25-35% do VCT*		
19-65 anos	20-35% do VCT*		
9-13 anos (homem/mulher)		12/10 g	1,2/1,0 g
14-18 anos (homem/mulher)		16/11 g	1,6/1,1 g
19-50 anos(homem/mulher)		17/12 g	1,6/1,1 g
> 50 anos(homem/mulher)		14/11 g	1,6/1,1 g
Idoso			
> 65 anos	20-35% do VCT	14/11 g	1,6/1,1 g

Fonte: (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2003).

*Considera-se o VCT (valor calórico total) pela fórmula de Harris e Benedict; para idosos, considerar uma redução das necessidades energéticas (2 a 4% por década) em função do declínio da atividade física e da massa corporal metabolicamente ativa.

3.4 Os Ácidos graxos ômega-3 e efeito cardioprotetor

Juntamente com baixa incidência de doenças cardiovasculares nos esquimós, também foi identificada uma baixa incidência de doenças inflamatórias e autoimunes, como diabetes tipo I, esclerose múltipla e asma. Já em comparação com a dieta dos países industrializados, que é rica em AGPI do tipo ômega-6 (com grande consumo de gordura saturada e óleos vegetais) e reduzida em AGPI do tipo ômega-3 (com reduzido consumo de peixes), verifica-se maior proporção de AGPI ômega-6 sobre os ômega-3 na composição das membranas celulares desses indivíduos (SANDERS *et al.* 1997; CALDER *et al.* 2002; TEHRANY *et al.* 2012).

As dietas ocidentais possuem uma proporção ômega-6/ômega-3 perto de 10 a 20:1. O aumento do consumo de AGPI ômega-3 na dieta irá resultar na substituição parcial dos AGPI ômega-6 na membrana celular dos eritrócitos, plaquetas, linfócitos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos, para citar alguns exemplos, que corrobora em um efeito protetor em condições inflamatórias e autoimunes como artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal, que são atribuídas à ação inibitória na produção de eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias (SANDERS *et al.* 1997).

3.4.1 Influência dos Ácidos Graxos Ômega-3 nos processos inflamatórios

Pelo menos três mecanismos antiinflamatórios são influenciados pelos AG ômega-3. A ativação dos PPARs (receptores de ativação de proliferação de peroxissomas), que exercem efeitos antiinflamatórios, a supressão da ativação de genes relacionados ao processo inflamatório e por ultimo a modulação da composição da membrana celular cujo mecanismo será abordado *a posteriori* (CALDER, 2002; 2012).

Várias evidências sugerem que os PUFAs w-3 e w-6 podem agir como ligantes dos receptores de ativação de proliferação de peroxissomas (PPARs) e então modular vários genes pró e anti-inflamatórios. De fato, o tão apreciado efeito antidislipêmico da suplementação com óleo de peixe pode, pelo menos em parte, ser explicado pela ação dos PUFAs w-3 ou seus metabólitos como agonistas PPAR (HUWILER & PFEILSCHIFTER, 2009).

Estudos epidemiológicos sugerem uma relação entre o consumo de peixe e a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares. Além disso, PUFAs ômega 3 tem sido estudados em outras condições e revelaram-se benéficos em várias outras doenças, como na artrite reumatoide, asma, colite, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, e também na redução do risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer (HUWILER & PFEILSCHIFTER, 2009).

Uma possível explicação para esse efeito anti-inflamatório e anti-tumorigênico é que o aumento do consumo de EPA e DHA de óleo de peixe resulta em uma maior incorporação desses PUFAs nos fosfolipídios. Consequentemente eles também substituem o ácido araquidônico como substrato para a COX (ciclooxigenase) e LO (lipoxigenase), levando a uma redução na formação de PGE₂, TXA₂, LTB₄ e LTE₄, e aumentando a geração de outros lipídios menos ativos como os leucotrienos LTB₅, LTC₅, LTD₅ e LTE₅ e prostanóides incluindo PGE₃ e TXA₃ (BAGGA *et al.*, 2003).

Os PUFAs w-3, através da alteração da composição lipídica da membrana, também podem afetar diretamente as funções das células imunológicas, incluindo a atividade fagocítica dos macrófagos, sinalização e proliferação de células T, e a apresentação do antígeno mediada pelas células dendríticas, além disso, podem também modular a transcrição de genes pró-inflamatórios e genes promotores de crescimento (CALDER, 2008; HUWILER & PFEILSCHIFTER, 2009).

A inflamação é atualmente reconhecida como um fator central na patogênese de várias doenças prevalentes na civilização moderna, como câncer, aterosclerose, diabetes, asma e também várias desordens neuropatológicas como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (BOUSQUET *et al.*, 2011).

Westphal *et al.* 2011 observaram uma possível relação entre o decréscimo de eicosanoides pró-inflamatórios com influência no surgimento de doenças cardíacas e a ingestão de PUFAs ômega-3.

Tem sido postulado que várias moléculas lipídicas controlam esses mecanismos inflamatórios e que algumas delas podem representar alvos importantes com possibilidade de serem usadas na terapêutica.

3.5 Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e Doença de Parkinson

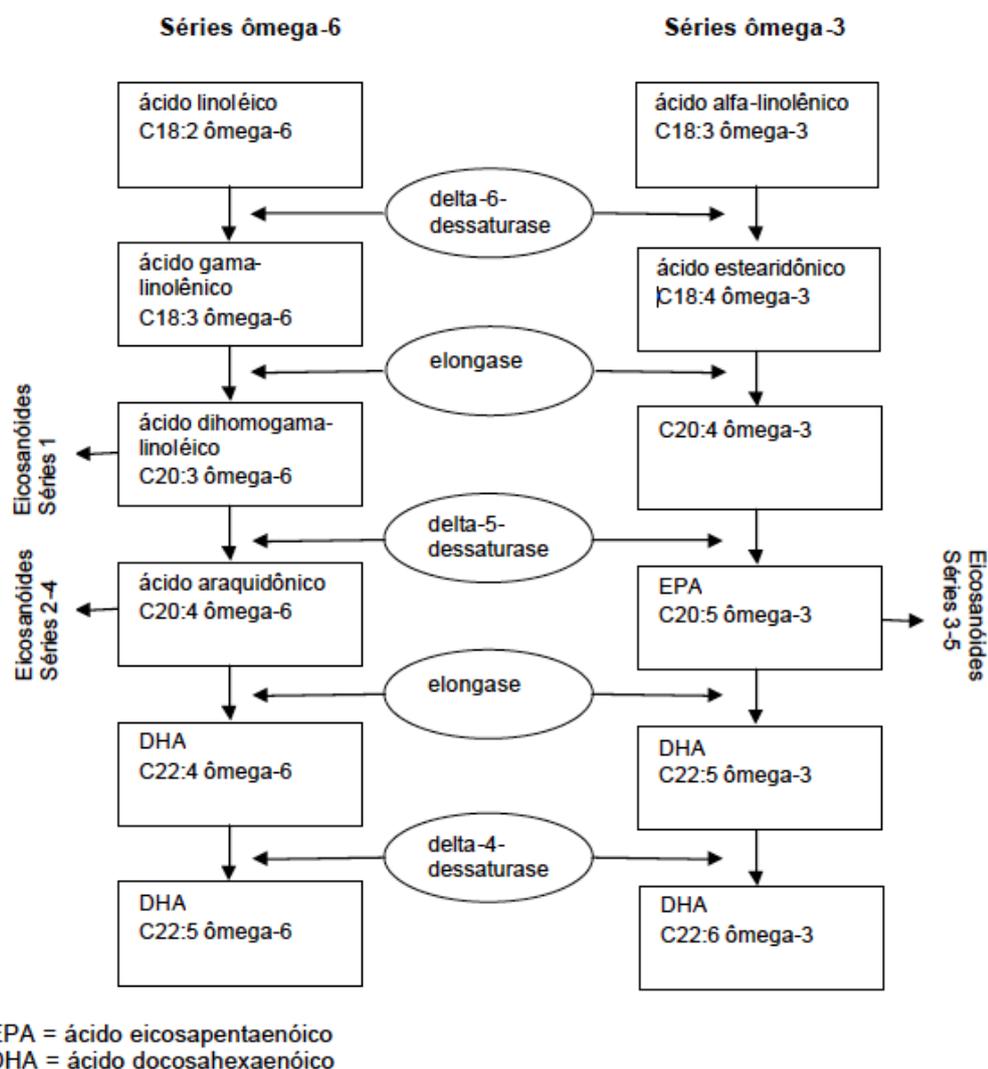
Existem vários fatores importantes envolvidos na geração e manutenção do processo neurodegenerativo, drogas que interferem nesses processos e reduzem a morte neuronal, ou seja, funcionam como neuroprotetores, estão sendo alvo de muitas pesquisas, pois não existem tratamentos farmacológicos eficientes disponíveis para muitas doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Huntington, a doença de Alzheimer e a DP (BLUM *et al.*, 2004; DELATTRE).

Os mamíferos não possuem as enzimas dessaturases especificamente responsáveis por adicionar uma insaturação antes do nono carbono a partir da extremidade distal. A delta-9 e delta -15 dessaturases são as enzimas necessárias para essa reação. Elas transformam o ácido oléico (18:1 ômega-9) em ácido linoléico (18:2 ômega-6) e ácido linolênico (18:3 ômega-3), ambos considerados PUFAs essenciais (AGE) (Esquema 1). Os Ácidos Graxos Essenciais (AGE) não são produzidos pela espécie humana, tendo que ser adquiridas à partir da alimentação diária (MARTIN, 2006) .

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são considerados essenciais porque os mamíferos não são capazes de sintetizá-lo, e, portanto esses PUFAs devem ser fornecidos ao organismo através da dieta (YOU DIM *et al.*, 2000; LAURITZEN *et al.*, 2001). Os PUFAs da família do ômega-3 são oriundos de peixes e algumas plantas e são representados principalmente pelo ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), encontrados em altas concentrações na membrana de fotoreceptores e nas células nervosas (BAZAN, 2005; CALON; COLE, 2007; MAZZA *et al.*, 2007).

Muitos estudos ressaltam a importância destes ácidos graxos em processos vitais, como a manutenção das propriedades da bicamada lipídica das membranas celulares, ação anti-apoptótica e antiinflamatória, participação na transdução de sinais e na atividade biodinâmica das membranas neuronais, regulação de canais iônicos e receptores e na transcrição gênica (BOURRE *et al.*, 1989; CLANDININ, 1999; YOU DIM *et al.*, 2000; BOWEN; JUMP, 2002; CALON *et al.*, 2004; LEVANT *et al.*, 2004; BAZAN, 2005).

Esquema 1: Reações de formação de eicosanóides à partir dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3.



Fonte: (MARTIN, 2006).

Os PUFAs ômega-3 estão diretamente relacionados com função neuronal e existe um grande interesse em se demonstrar qual o papel exercido por estes ácidos graxos em neuropatologias como a doença de Alzheimer, a esquizofrenia, a isquemia e epilepsia, esclerose múltipla e depressão (LAURITZEN *et al.*, 2001; BLONDEAU *et al.*, 2002; CALON *et al.*, 2004; WEINSTOCK-GUTTMAN *et al.*, 2005; McNAMARA; CARLSON, 2006; ROSS, 2007; DA SILVA *et al.*, 2008).

Entretanto, existem poucos estudos relacionados com o uso dos PUFAs ômega-3 na doença de Parkinson. Um estudo epidemiológico desenvolvido por DE LAU *et al.* (2005) verificou que uma dieta rica em PUFAs está diretamente associada a uma redução do risco de desenvolvimento de doença de Parkinson.

Samadi *et al.* (2006) demonstraram que a administração de DHA (100 mg/kg) promoveu uma redução em cerca de 40% da discinesia induzida por levodopa em um modelo de DP em primatas. Os autores propuseram que este efeito do DHA pode ser explicado pela ativação de receptores nucleares que operam como fatores de transcrição.

Os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em doenças neurológicas como a doença de Alzheimer, a DP, e a esclerose múltipla podem estar relacionados a sua capacidade de inibir vários mecanismos que induzem a lesão neuronal, incluindo a redução da apoptose e da neuroinflamação, essas características indicam que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) possuem um grande potencial clínico para serem usados em várias doenças neurodegenerativas, inclusive combinada com outras terapêuticas farmacológicas (DELATTRE *et al.*, 2010).

A adição de PUFAs na dieta influencia diretamente em processos biológicos importantes devido a alterações estruturais e funcional na membrana fosfolipídica, influenciando na produção de mediadores inflamatórios como os eicosanóides. A função imune e inflamatória pode ser regulada por AG ômega-3 e omêga-6 que são precursores de eicosanóides. Derivativos dos AGE, como o dihomogamalinolênico e o araquidônico, do tipo ômega-6, e o ácido eicosapentaenóico (EPA), da série ômega-3, são de importância impar, por serem precursores de mediadores lipídicos envolvidos em muitas funções metabólicas fisiológicas (Esquema 1) (SIMOPOULOS, 2002; CALDER, 2003)

Entre os AG de cadeia longa, os que mais incorporam às membranas celulares são: os ômega-3 (ácido eicosapentanóico (EPA) e o docosahexanóico (DHA)) o ácido araquidônico (ômega-6) e o ácido oleico (omega-9), todos em ordem de decrescente de concentração na membrana, tendo efeitos na estabilidade e fluidez da membrana. Os AGE são os que mais sofrem peroxidação lipídica por possuírem mais insaturações e, são mais instáveis que os AG monoinsaturados (AGMI) ômega-9 ou saturados. Os AGPI ômega-3 são oxidados mais rapidamente que os PUFAs ômega-6 e são mais susceptíveis a peroxidação lipídica (ANDERSSON *et al.*, 2002).

A importância da atividade dos PUFAs ômega-3 no sistema nervoso central e em diferentes patologias tem sido destacada em muitas pesquisas em animais e humanos (CALON; COLE, 2007; MAZZA *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*,

2008). Alguns autores referem que no envelhecimento, bem como em doenças neurodegenerativas como a DP e doença de Alzheimer, há uma redução desses PUFAs nas membranas dos neurônios (YOUUDIM *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos com PUFAs destacam o DHA, o ácido graxo com maior prevalência no sistema nervoso central, como sendo o responsável pelo fator bioativo na ação protetora em neuropatologias. O DHA é encontrado principalmente em membranas sinaptossomais, vesículas sinápticas e cones de crescimento e exerce um importante papel na membrana das células nervosas (BAZAN, 2005; SAMADI *et al.*, 2006; CALON; COLE, 2007).

Devido ao largo espectro de atividade dos PUFAs w-3, é possível que eles possam intervir em vários níveis no processo de degeneração neuronal observados na DP. Além do seu papel na fluidez das membranas, a liberação de PUFAs w-3 dentro das células pode ativar mecanismos de ação relacionados a fatores neurotróficos e redução do estresse oxidativo, da apoptose e da inflamação (BOUSQUET *et al.*, 2011).

Os efeitos modulatórios dos PUFAs w-3 sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado das células da glia (GDNF) tem atraído bastante atenção devido ao importante papel desses fatores neurotróficos na regeneração neuronal. Rao e colaboradores (2007) verificaram que em ratos com deficiência de PUFAs w-3 havia uma redução na expressão de BDNF através de uma via dependente de p38 MAPK. A supra-regulação de BDNF e do seu receptor tem sido identificada como um mecanismo potencial de ação subjacente ao efeito benéfico dos PUFAs w-3 observados em camundondos tratados com MPTP (BOUSQUET *et al.*, 2009).

Desde que foi observada uma redução dos níveis de BDNF no cérebro de pacientes com DP *post-mortem*, a administração de PUFAs w-3 passou a ser uma estratégia atrativa na tentativa de estimular a produção de BDNF no cérebro, uma vez que esses fatores neurotróficos são incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BOUSQUET *et al.*, 2011).

As propriedades antioxidantes dos PUFAs w-3 têm sido atribuídas a sua capacidade de modular a atividade da glutathione redutase, uma enzima antioxidante, bem como reduzir a quantidade de proteínas oxidadas, o dano ao DNA e as espécies reativas do oxigênio (BAZAN, 2005).

Foi demonstrado que o DHA e o seu derivado, a neuroprotectina-1, promovem aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 E BCL-XL, enquanto reduz a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como o BAX, BID e BAD, todas envolvidas nos processos de apoptose observados no cérebro de pacientes portadores da doença de Parkinson Além disso, os PUFAs w-3 parecem exercer seus efeitos anti-apoptóticos pelo menos em parte, através da modulação das caspases (BAZAN, 2005; ALVES DA COSTA & CHECLER, 2011).

Estudos em animais demonstram claramente que a ingestão oral de PUFAs ômega-3 pode alterar as concentrações cerebrais de DHA e, portanto modificar funções cerebrais. Isto pode sugerir que PUFAs ômega-3 poderiam ser utilizados como uma ferramenta nutricional ou farmacêutica em desordens neurológicas como a doença de Alzheimer e a DP. Os PUFAs ômega-3 são capazes de modificar o processo inflamatório, de ativar diferentes vias de sinalização celular e possuem propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas, essas ações estão relacionadas com possíveis efeitos neuroprotetores, portanto esses ácidos graxos parecem ter um grande potencial para serem utilizados na clínica.

Ainda existe a possibilidade da associação dos PUFAs ômega-3 com outras substancias farmacológicas já conhecidas (CALON; COLE, 2007). Contudo, muitos estudos são necessários para avaliar o papel dos PUFAs ômega-3 e elucidar seus efeitos na inibição da progressão da DP e no seu tratamento crônico, o que justifica a importância desse trabalho.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar os efeitos dos PUFAs ômega-3 (Proepa®) utilizando um modelo animal da DP produzido pela injeção estereotáxica da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em corpo estriado de rato e determinar seus efeitos sobre a neurodegeneração envolvida na fisiopatologia dessa doença.

4.2 Específicos

➤ Verificar as alterações comportamentais dos animais submetidos a lesão intraestriatal com 6-OHDA e tratados com suplementação diária de PUFAs ômega-3 (Proepa®);

➤ Avaliar o estresse oxidativo determinando o índice de peroxidação lipídica (TBARS), e a produção de nitrito/nitrato no corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal dos animais tratados com suplementação diária de PUFAs ômega-3 (Proepa®).

➤ Analisar as alterações dos neurotransmissores envolvidos no processo neurodegenerativo da DP, através da determinação nas concentrações das monoaminas: noradrenalina (NE), dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos no corpo estriado dos animais tratados com suplementação diária de PUFAs ômega-3 (Proepa®);

➤ Analisar as alterações dos neurotransmissores envolvidos no processo neurodegenerativo da DP, através da determinação das concentrações dos aminoácidos GABA, glutamato, aspartato, glicina e taurina no corpo estriado dos animais tratados com suplementação diária de PUFAs ômega-3 (Proepa®);

➤ Verificar o efeito dos PUFAs ômega-3 (Proepa®) sobre o perfil lipídico dos animais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, com peso variando entre 200-300g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com no máximo 6 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade.

5.2 Aspectos éticos

O protocolo experimental será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

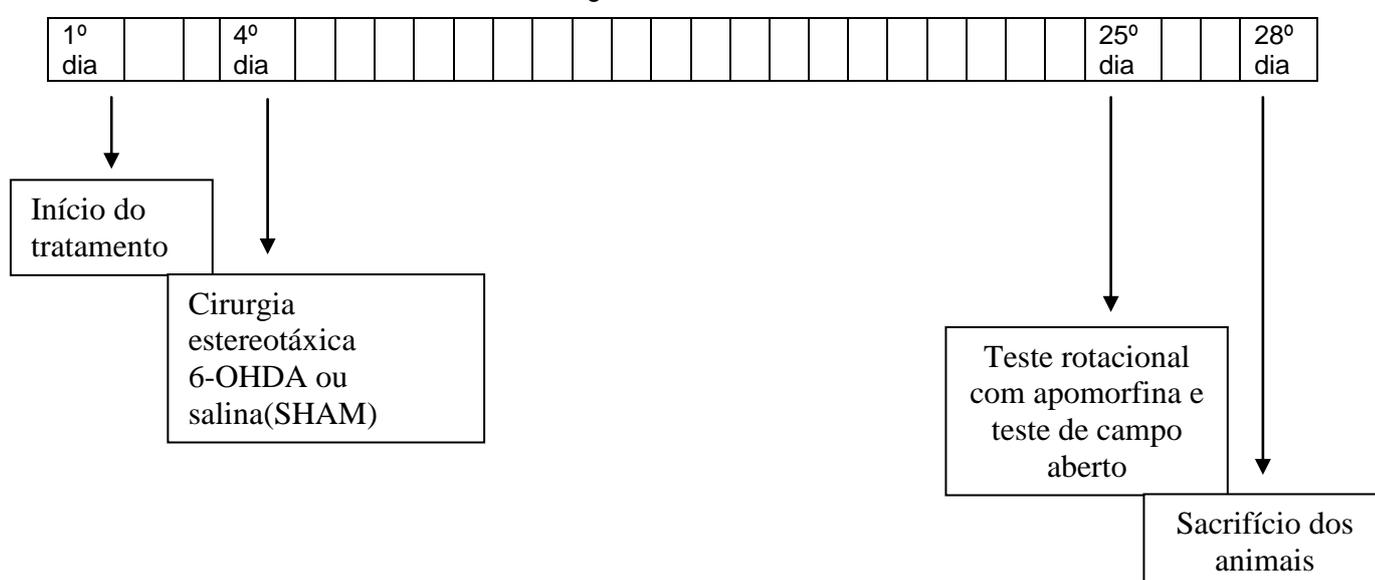
5.3 Tratamento dos animais

Os animais dos grupos 3 e 4 receberam dieta suplementar com PUFA ω -3 (Proepa $^{\text{®}}$ - ACHÉ, contendo 171mg/g de EPA e 114 mg/g de DHA) nas doses de 1,5 e 3 g/kg, via oral, por gavagem diariamente durante vinte e oito dias, enquanto os animais dos grupos 1 (sham) e 2 (6-OHDA) receberam solução salina (0,9%) nas mesmas condições. (Quadro 2). No quarto dia de tratamento os animais foram submetidos à lesão nigroestriatal unilateral com injeção estereotáxica de 6-OHDA, e vinte e cinco dias após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao teste rotacional com um agonista dopaminérgico, a apomorfina (3mg/kg, i.p.). (Esquema 2).

Quadro 2 – Protocolo de Tratamento Experimental

GRUPOS	Tratamento	Dose (g/kg)	Via de adm.	Duração do tto. (dias)
1- Falso operado (sham)	Salina (controle -)	-	VO	28
2- Controle (6-OHDA)	Salina (controle +)	-	VO	28
3- PUFA n-3 (2)	Proepa®	1,5	VO	28
4- PUFA n-3 (4)	Proepa®	3	VO	28

Esquema 2: cronograma esquemático do tratamento, cirurgia estereotáxica, testes comportamentais e sacrifício dos animais tratados com ômega-3.

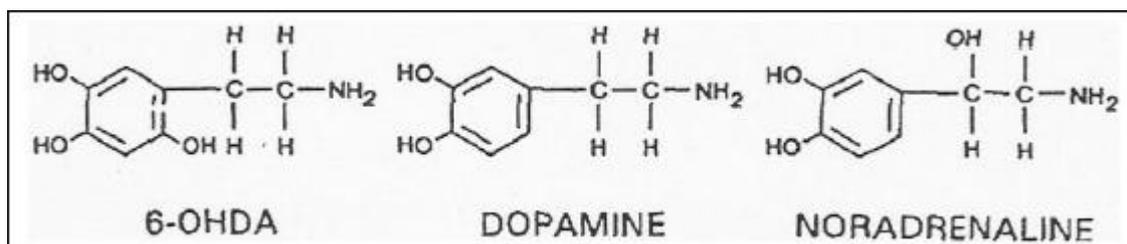


5.4 Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA

Existem hoje na literatura diversos modelos experimentais para o estudo da DP (BELLISSIMO *et al*, 2005). Entre estes modelos o da 6-OHDA (6-hidroxidopamina) é um dos mais utilizados por induzir a destruição de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, reproduzindo aspectos fisiopatológicos e farmacológicos da DP (DEUMENS *et al*, 2002).

A neurotoxina 6-OHDA possui sua estrutura molecular similar à estrutura das catecolaminas (Figura 4), onde é captada pelos neurônios catecolaminérgicos, pelos mesmos transportadores das catecolaminas para o interior do neurônio, simulando um neurotransmissor. (SCHWARTING & HUSTON, 1996).

Figura 4: Semelhança entre as estruturas das catecolaminas e da 6-OHDA



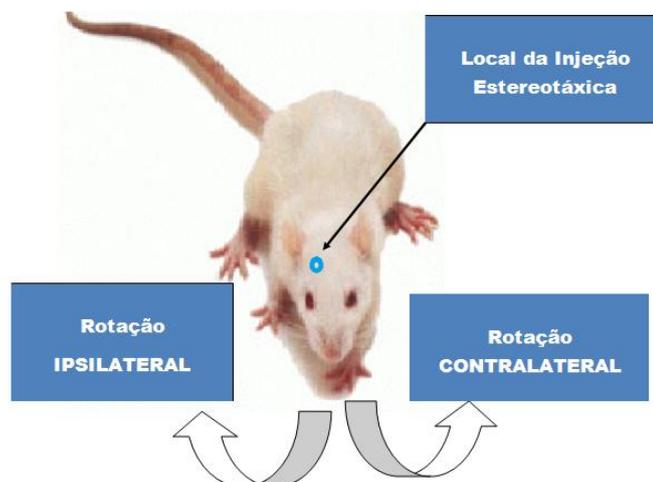
Fonte: (BELLISSIMO et al, 2005).

È necessário o uso de um antioxidante (ácido ascórbico a 0,2%) junto à 6-OHDA, pois a mesma é rapidamente oxidada, e é importante que a neurotoxina chegue intacta ao interior do neurônio para que sua oxidação só ocorra no interior do mesmo, ocasionando à produção de compostos neurotóxicos, como radicais livres, levando à danos nas proteínas, membrana e DNA (BOVÉ et al, 2005).

A administração de 6-OHDA diretamente nos núcleos da base é capaz de destruir, de forma seletiva, os neurônios catecolaminérgicos, ocasionando a diminuição de diversos neurotransmissores, inclusive a dopamina, nos locais administrados (SWARTING & HUSTON, 1996).

Nesse modelo ocorre uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em uma depleção dos níveis de dopamina no estriado ipsilateral (mesmo lado) à injeção. As mudanças unilaterais na via nigroestriatal causadas pela injeção de 6-OHDA levam a uma assimetria funcional a qual é quantificada utilizando-se um teste rotacional (Figuras 5 e 6) induzido por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (anfetamina) (DEUMENS *et al.*, 2002).

Figura 5: demonstração do local da injeção estereotáxica e sentidos da rotação ipsilateral e contralateral.



Fonte: do autor.

Figura 6: animal durante teste rotacional (em rotação contralateral à lesão estriatal).



Fonte: do autor

Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg, i.p.) e com xilasina (5 mg/kg, i.p.). Após a anestesia foi verificado se o animal apresentava

reflexos dolorosos, a cabeça do animal foi fixada no aparelho esterotáxico (INSIGHT, Ribeirão Preto) através de duas barras de fixação inseridas nos meatos auditivos externo do animal e uma barra de fixação nos incisivos (Figura 7).

Logo após, foi realizada a tricotomia e assepsia da região superior da cabeça. Após a incisão da pele com uma tesoura cirúrgica, foi feita a remoção do tecido subcutâneo e do periósteo, expondo o bregma e o lambda.

Após a marcação das coordenadas antero-posterior (A-P) e médio-lateral (M-L), foram perfurados 3 orifícios laterais no lado direito do crânio com broca elétrica e receberam uma aplicação em cada orifício com injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (injeções de $2\mu\text{l}$ de uma solução de 6-OHDA dissolvido em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico em uma concentração final de $12\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dentro do corpo estriado direito (A-P 0,9/1,4; M-L 3,8; D-V 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON 1986), usando uma seringa Hamilton de $5\mu\text{l}$. A seringa foi deixada no local de aplicação por 2 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois ela será retirada cuidadosamente (Figura 8) (KIM *et al*, 1998).

Figura 7: fixação do animal no aparelho esterotáxico.



Fonte: do autor.

Figura 8: injeção estereotáxica.



Fonte: do autor.

5.5 Estudo comportamental

5.5.1 Teste rotacional

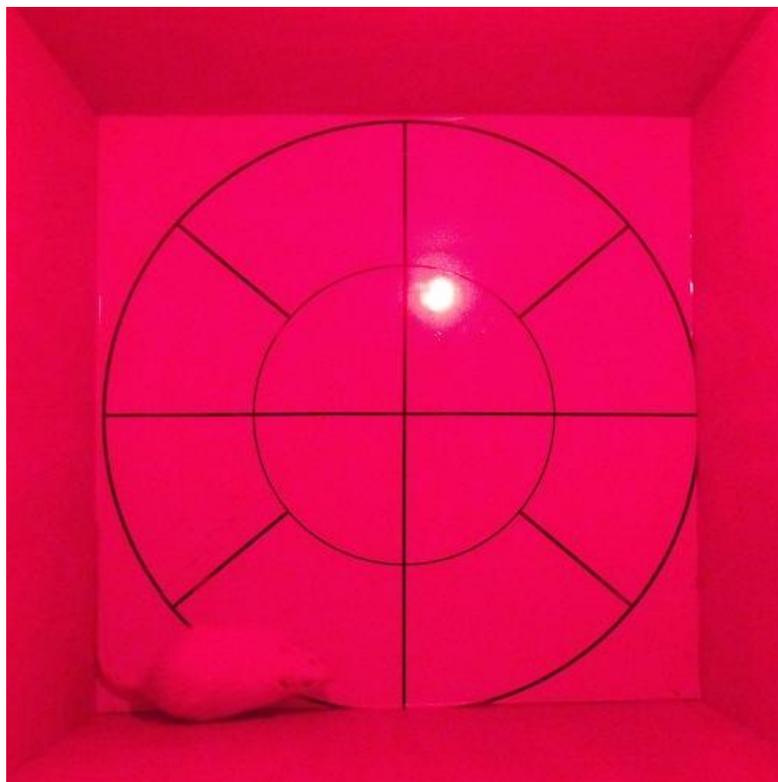
Os animais foram submetidos ao teste rotacional vinte e cinco dias após o início do tratamento com ômega-3. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas por apomorfina (3 mg/kg, i.p.), que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo foi observada durante 60 minutos (KIM *et al*, 1998).

5.5.2 Teste de campo aberto

Este teste foi baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e ratificado por Archer (1973), e permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto. Os animais foram colocados, 60 minutos após o tratamento, em um campo-aberto confeccionado de madeira, o chão é branco, impermeável e dividido em 25 quadrantes de 20 x 20 cm cada, totalizando uma superfície de 100 x 100 cm. Em volta de cada lado do quadrado há uma parede de

50 cm de altura. O ambiente do teste possui uma iluminação vermelha, para uniformizar as cores do campo visual do animal. O início do teste se dá quando o rato é colocado no centro do campo aberto, e a partir deste momento começa a contagem do tempo estabelecido: 5 minutos, sendo avaliados a atividade exploratória dos animais verificando o número de cruzamentos entre os quadrantes, o número total do levantar para explorar o ambiente (“rearing”), o número de auto-limpeza (“grooming”), o número de bolos fecais e o tempo em que os animais permaneceram parados (Figura 9).

Figura 9: animal em teste de campo aberto.



Fonte: do autor.

5.6 Determinação do índice de peroxidação lipídica e produção de nitrito

No vigésimo oitavo dia de tratamento, os animais foram sacrificados e as áreas cerebrais (corpo estriado esquerdo e direito, hipocampo e córtex frontal) foram retiradas e analisadas.

5.6.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

5.6.2 Determinação do conteúdo de nitrito e nitrato

5.6.2.1 Preparação da Curva Padrão

Foram pesados 7mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM) e feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981).

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μl do sobrenadante foi incubada com 100 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H_3PO_4 1 %/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H_3PO_4 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

5.6.3 Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC

Os níveis cerebrais de monoaminas foram estudados em homogenatos a 10% preparados em tampão fosfato de sódio (150mM; pH 7,4).

Para a determinação de neurotransmissores (DA, NE, 5-HT) e metabólitos (DOPAC, HVA, 5HIAA) foi utilizado um equipamento de HPLC da Shimadzu, modelo LCD-6A com detecção amperométrica. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna de fase reversa (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm). A fase móvel foi preparada com ácido cítrico monohidratado 150mM, octil sulfato de sódio 67mM, tetrahydrofurano 2%, acetonitrila 45, preparados em água deionizada. O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0, utilizando-se NaOH 10 mM. A quantificação dos picos obtidos foi realizada com o auxílio de uma curva-padrão.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diferentes grupos foi utilizado o teste t-Student (comparação entre duas médias) ou análise de variância seguida do teste de Tukey (*post hoc*). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os valores foram expressos como Média \pm EPM.

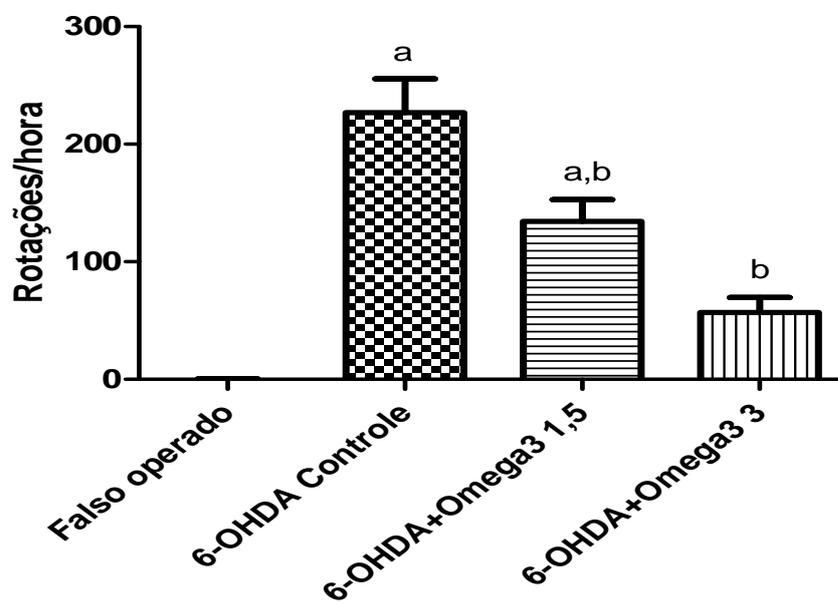
7 RESULTADOS

7.1 Determinação dos efeitos do ômega 3 no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos submetidos ao modelo da 6-OHDA

Três semanas após a injeção intraestriatal de 6-OHDA foi administrada apomorfina (3 mg/kg, i.p.) e os animais exibiram comportamento rotacional na direção oposta ao lado da lesão (rotação contralateral). Um aumento significativo no número de rotações induzidas por apomorfina foi observado nos animais controles lesionados com 6-OHDA, quando comparado ao grupo falso operado (sham) ($226,9 \pm 28,8$ vs. $0,2 \pm 0,1$ rotações/h; [F (3, 51)=20,78; $p < 0.001$]).

Uma recuperação motora parcial foi observada nos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com ômega 3, que reduziu significativamente o número de rotações induzidas por apomorfina em torno de 40 e 75 % (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, i.p., respectivamente), quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Determinação dos efeitos do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) durante 60 min, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA.



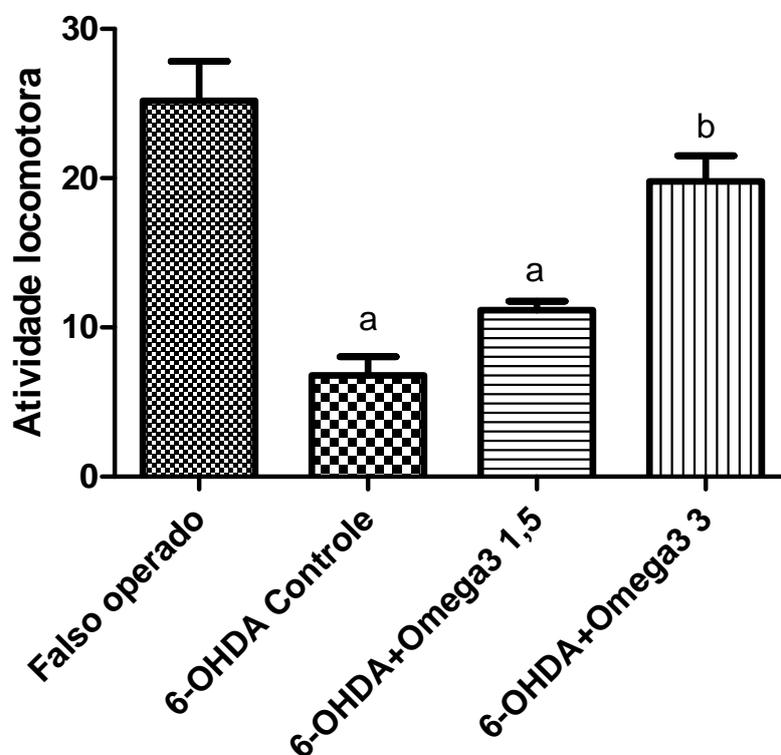
Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados o teste ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs falso operado, b vs controle (6-OHDA) e c vs ômega 3 1,5 respectivamente, com $p < 0,05$.

7.2 Análise do comportamento locomotor no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com ômega 3

A análise estatística indicou diferenças significativas no parâmetro locomotor no teste de campo aberto. O grupo lesionado com a 6-OHDA apresentou um declínio de cerca de 70 % sobre na atividade locomotora quando comparado ao grupo falso operado (Falso operado: $25,2 \pm 2,6$; 6-OHDA Controle: $6,7 \pm 1,2$).

O tratamento com ômega 3 nas duas doses, promoveu um aumento na atividade exploratória horizontal em torno de 66 e 195 % (ômega 3 1,5 e 3,0 g/kg, v.o., durante 28 dias, respectivamente), quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA [$F(3, 30) = 17,98$; $p < 0,001$] (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Determinação do efeito do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no número de cruzamentos no teste de campo aberto, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA,

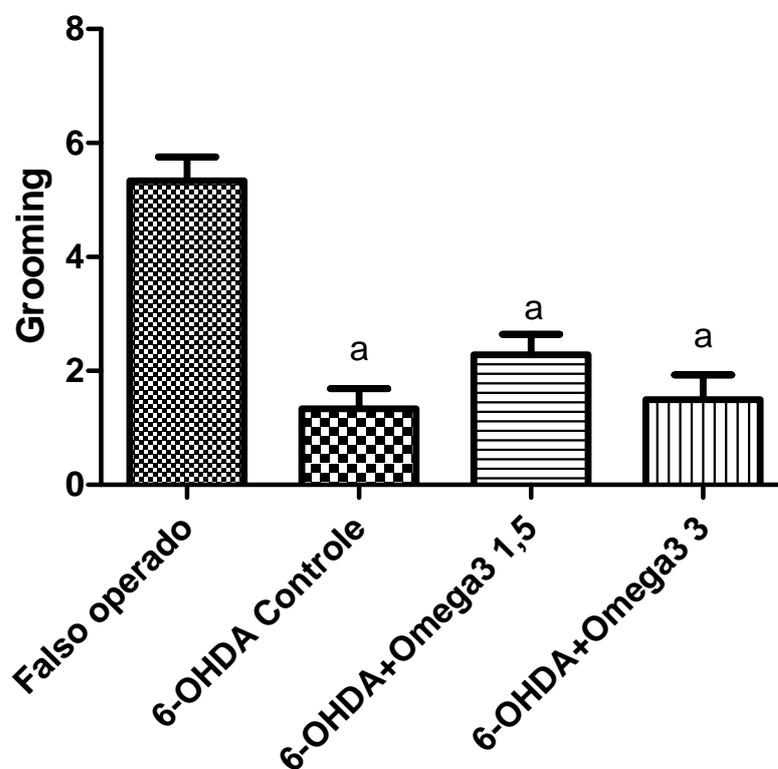


Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados o teste ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs falso operado, b vs controle (6-OHDA) e c vs ômega 3 1,5 respectivamente, com $p < 0,05$.

Na avaliação da atividade exploratória vertical (“rearing”) os resultados mostraram que os animais do grupo falso operado apresentaram uma maior frequência de rearing quando comparado ao grupo 6-OHDA controle (Falso operado: $12,1 \pm 1,6$; 6-OHDA Controle: $4,0 \pm 0,6$). Com relação aos grupos tratados com ômega 3 houve um aumento em cerca de 37 e 137% nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o., respectivamente, quando comparados ao grupo 6-OHDA controle [F (3, 26)=14,9; $p < 0,001$] (Gráfico 3).

Houve uma redução em 75 % do grooming nos animais do grupo 6-OHDA controle em relação aos animais do grupo falso operado (Falso operado: $5,3 \pm 0,4$; 6-OHDA Controle: $1,3 \pm 0,3$). Com relação aos grupos tratados com ômega 3 houve um aumento em cerca de 75 e 15% nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o., respectivamente, quando comparados ao grupo 6-OHDA controle [F (3, 30)=19,1; $p < 0,001$] (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Determinação do efeito do ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, v.o. diariamente durante 28 dias) no número de grooming no teste de campo aberto, em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA.



Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados o teste ANOVA e Tukey como teste *post hoc*. a vs falso operado, b vs controle (6-OHDA) e c vs ômega 3 1,5 respectivamente, com $p < 0,05$.

7.3 Determinação dos efeitos do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica em ratos submetidos à injeção intraestriatal com 6-OHDA

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com a finalidade de demonstrar a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA e os efeitos do ômega 3 sobre o estresse oxidativo.

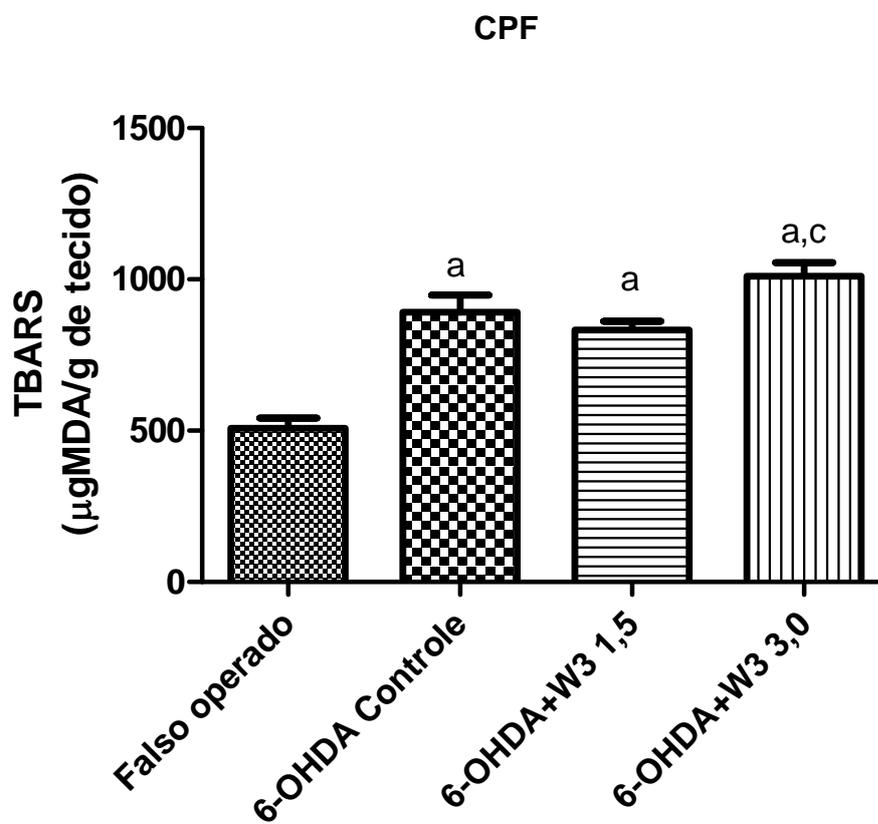
As figuras 06, 07 e 08 mostram os efeitos da administração crônica do ômega 3 nas doses de 1,5 g/Kg e 3,0 g/Kg sobre o conteúdo de MDA no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE), respectivamente.

Os resultados mostraram que a exposição das células do CPF, HC e CE a 6-OHDA (6 μ g/ μ l) causou um aumento no conteúdo de MDA de (6-OHDA: 75 %, 44% e 104 %; respectivamente) quando comparado com o grupo controle, demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA (Falso operado CPF, HC, CE: 508,7 \pm 33,5; 529,0 \pm 23,4; 326,3 \pm 35,5; 6-OHDA controle: 892 \pm 55,9; 763,9 \pm 33,9, 666,7 \pm 25,7; respectivamente) (Gráfico 4, Gráfico 5 e Gráfico 6)

No CPF os grupos lesionados e tratados com ômega 3 1,5 (833,2 \pm 28,7) ou ômega 3 3,0 (1011 \pm 45,6) não apresentaram diferença nos níveis de TBARS quando comparado com o grupo 6-OHDA controle (892 \pm 55,9) [F(3,23)=25,74; p<0,001] (Gráfico 4).

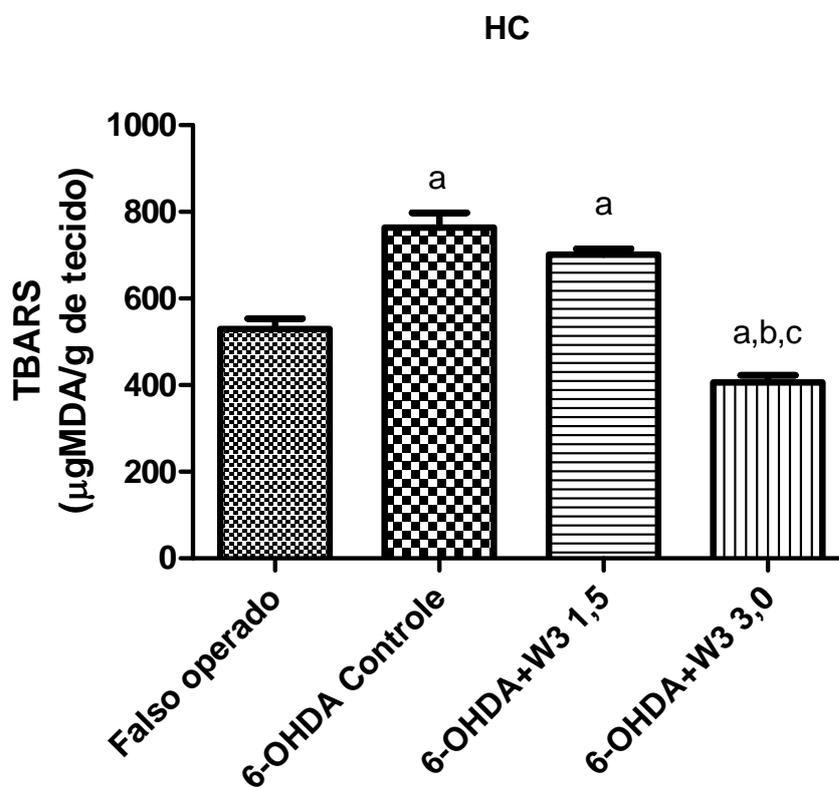
O ômega 3 foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no HC em 47%, somente na dose de 3,0 g/Kg e no CE houve redução de 17 % e 44 % nas doses de 1,5 g/Kg e 3,0 g/Kg, respectivamente, quando comparado ao grupo 6-OHDA controle [HC – F(3,23)=48,99;p<0,0001; CE- F(3,27)=31,22;p<0,0001] (Gráfico 5 e Gráfico 6).

Gráfico 4 - Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.



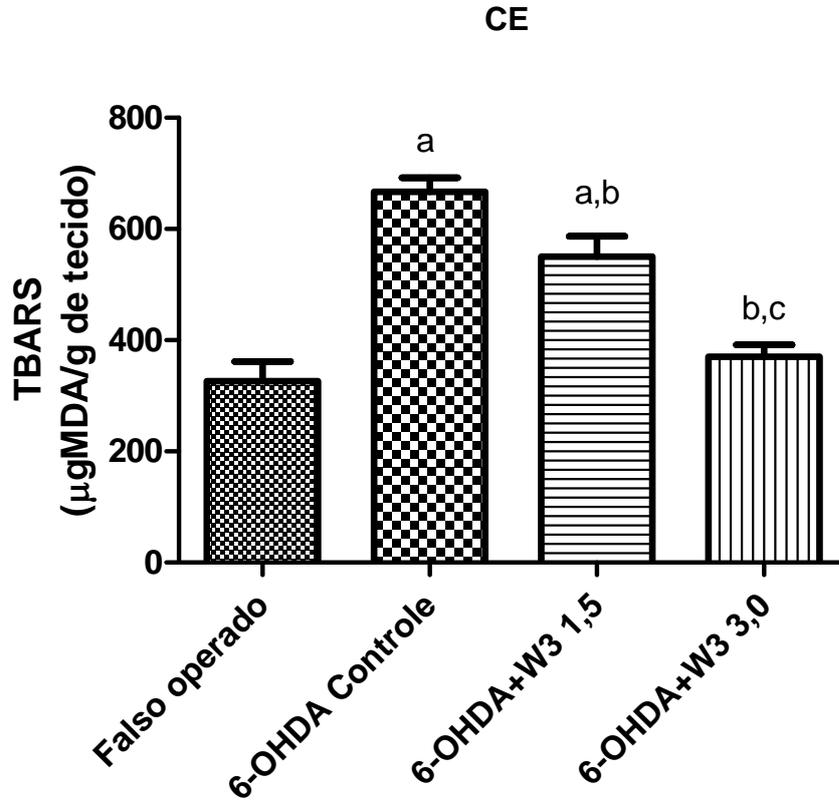
Nota: Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. Foram utilizados 6-8 animais por grupo; $p < 0,001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs falso operado, b vs 6-OHDA controle, c vs 6-OHDA+W3 1,5.

Gráfico 5 - Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.



Nota: Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. Foram utilizados 6-8 animais por grupo; $p < 0,001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs falso operado, b vs 6-OHDA controle, c vs 6-OHDA+W3 1,5.

Gráfico 6- Efeito do ômega 3 sobre a peroxidação lipídica no corpo estriado de ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA.



Nota: Os valores representam a média \pm E.P.M das quantidades de TBARS expressos em MDA/g de tecido. Foram utilizados 6-8 animais por grupo; $p < 0,001$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*). a vs falso operado, b vs 6-OHDA controle, c vs 6-OHDA+W3 1,5.

7.4 Efeitos do ômega 3 sobre a produção de nitrito/nitrato em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA

A concentração de nitrito/nitrato em condições fisiológicas é baixa, entretanto, quando há estresse oxidativo esse valor se eleva muito acima do normal. Isso é o que acontece em células expostas a 6-OHDA como mostram os resultados do CPF, HC e CE que apresentaram um aumento de 185 %, 158,7 % e 532 %, respectivamente (Falso operado: $4,1\pm 0,55$; $3,97\pm 0,67$; $1,89\pm 0,26$; 6-OHDA: $11,7\pm 0,68$; $10,27\pm 0,56$; $11,96\pm 1,2$, respectivamente) (Tabela 1).

O tratamento com ômega 3 na dose de 1,5 g/kg, v.o. promoveu uma redução na concentração de nitrito/nitrato em todas as áreas testadas, no córtex pré-frontal houve redução de 28 %, no hipocampo de 30 % e no corpo estriado de 57,7 %, quando comparados ao grupo 6-OHDA controle de cada área cerebral correspondente.

Tabela 1 - Efeitos do ômega 3 sobre a produção de nitrito/nitrato em ratos submetidos ao pré-tratamento com 6-OHDA

Grupos	Hipocampo	Córtex frontal	Corpo estriado
Falso operado	$3,97\pm 0,60$	$4,1\pm 0,55$	$1,89\pm 0,26$
6-OHDA Controle	$10,2\pm 0,56^a$	$11,7\pm 0,68^a$	$11,96\pm 1,2^a$
Ômega 3 1,5	$7,13\pm 0,47^{a,b}$	$8,4\pm 0,77^{a,b}$	$5,06\pm 0,59^{a,b}$

Fonte: primária.

Nota: O ômega 3 (1,5 e 3,0 g/kg, v.o.) foi administrado durante 28 dias. Os controles foram tratados com salina 0,9%. No 28º dia, após a realização dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados e o corpo estriado utilizado para determinação da concentração de nitrito/nitrato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido). Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (7-8). a vs Falso operado, com $p < 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey como teste *post hoc*).

7.5 Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC E HVA), Noradrenalina (NA), Serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com omega 3.

A injeção de 6-OHDA produz dano oxidativo que resulta em destruição neuronal, como indicado pela redução das concentrações das monoaminas e dos seus metabólitos no lado ipsilateral (35-60 %), quando comparado com o lado contralateral dos animais controles. Nenhuma diferença foi observada nos lados contralaterais entre grupos falso operado, controle lesionado com 6-OHDA e dos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com ômega 3.

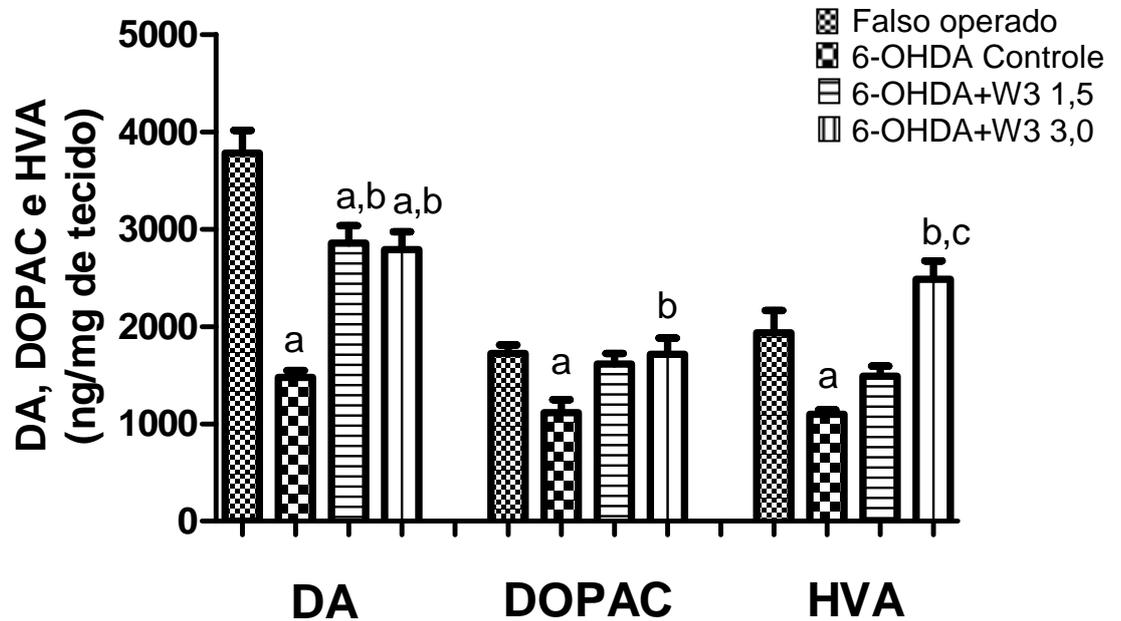
Foi observada uma redução significativa da concentração de dopamina (DA) no lado ipsilateral dos controles (61 %). No entanto, nos animais tratados com ômega 3 nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, essa redução foi de 24 e 26 %, respectivamente [F (3,29)=23,02; $p<0,0001$] (Gráfico 7), indicando uma recuperação significativa. O mesmo ocorreu com o seu metabólito, DOPAC, que teve uma redução de 35 % no grupo controle, e em torno de 6 e 0,3 % nos grupos tratados com ômega 3, nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, respectivamente [F (3,28)=3,98; $p<0,01$]. Além disso, a concentração de HVA também diminuiu em torno de 43 % nos controles, e cerca de 23 % no grupo lesionado e tratado com ômega 3 na dose de 1,5 e no grupo tratado com ômega 3 na dose de 3,0 foi verificado um aumento de 28 % nos níveis de HVA quando comparados ao grupo falso operado (F (3, 27)=10,70; $p<0,0001$) (Gráfico 7).

Foi observada uma redução da concentração de noradrenalina (NA) no lado ipsilateral dos animais controles (34 %), no grupo tratado com ômega 3, na dose de 1,5 não foi observada nenhuma redução e no grupo tratado com ômega 3, na dose de 3,0 mg/kg, uma redução de aproximadamente 20 % [F (3,29)=3,62; $p<0,05$], como mostrado na (Gráfico 8).

A concentração de serotonina (5-HT) reduziu em cerca de 60 % nos grupos controles (6-OHDA) no lado ipsilateral quando comparado ao grupo falso operado. Por outro lado, no grupo tratado com ômega 3, na dose de 1,5 mg/kg foi verificado um aumento de 15 % e, no grupo tratado com ômega 3, na dose de 3,0 mg/kg foi observada uma redução de 10% em comparação ao grupo falso operado [F (3, 23)=10,01; $p<0,001$]. A concentração de 5HIAA reduziu em cerca de 50 % nos

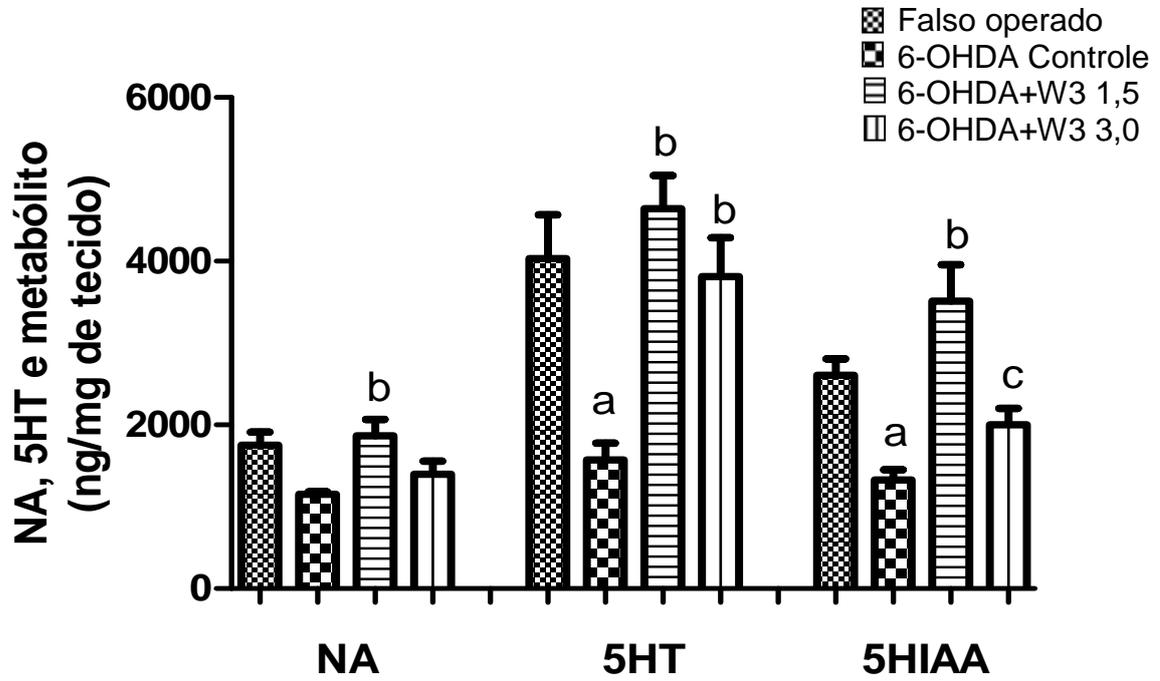
grupos controles (lesionados com 6-OHDA) no lado ipsilateral quando comparado ao grupo falso operado. Por outro lado, no grupo tratado com ômega 3, na dose de 1,5 mg/kg foi verificado um aumento de 35 % e, no grupo tratado com ômega 3, na dose de 3,0 mg/kg foi observada uma redução de 23 % [F (3, 24)=10,10; p<0,001] (Gráfico 8). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo falso operado (nos lados ipsilateral e contralateral) e o lado contralateral dos ratos lesionados com 6-OHDA (controle).

Gráfico 7 - Determinação das concentrações de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs W 3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

Gráfico 8- Determinação das concentrações de NA e 5-HT e seu metabólito (5-HIAA) em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

7.6 Determinação das concentrações dos aminoácidos aspartato (ASP), glutamato (GLU), glicina (GLI), taurina (TAU) e GABA no corpo estriado de ratos com lesão por 6-OHDA, tratados com omega 3.

Os Gráficos 9, 10, 11, 12 e 13 mostram que a lesão estriatal por 6-OHDA reduziu a concentração de aspartato ($1,63 \pm 0,2 \mu\text{mol/g}$ de tecido) e aumentou as concentrações de glutamato ($12,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/g}$ de tecido), glicina ($8,97 \pm 0,37 \mu\text{mol/g}$ de tecido), taurina ($8,86 \pm 1,0 \mu\text{mol/g}$ de tecido) e GABA ($25,58 \pm 1,77 \mu\text{mol/g}$ de tecido) quando comparado com o grupo falso operado (ASP: $4,9 \pm 0,4$; GLU: $0,46 \pm 0,02$; GLI: $4,6 \pm 0,27$; TAU: $5,36 \pm 0,3$; GABA: $5,52 \pm 0,6 \mu\text{mol/g}$ de tecido).

O tratamento com ômega 3 na dose de 1,5 g/kg promoveu uma recuperação dos níveis de aspartato para concentrações muito próximas daquelas encontradas no grupo falso operado, o aumento do conteúdo de aspartato foi de 187 % quando comparado ao grupo 6-OHDA controle (6-OHDA+W3 1,5: $4,69 \pm 0,42 \mu\text{mol/g}$ de tecido) [F (3, 29)=29,93; $p < 0,001$] (Gráfico 9).

O tratamento com ômega 3 na dose de 3,0 g/kg não alterou a redução do conteúdo de aspartato induzido por 6-OHDA, quando comparado ao grupo controle, lesionado com 6-OHDA e tratado com salina 0,9 %. (6-OHDA+W3 3,0: $1,34 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ de tecido) (Gráfico 9).

O Gráfico 10 mostra que a neurotoxina 6-OHDA promoveu um aumento de quase 30 vezes na concentração de glutamato quando comparado ao grupo falso operado e que o tratamento com ômega 3 nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, reduziu as alterações nos conteúdos de glutamato provocadas pela 6-OHDA, causando uma redução desses níveis de 61 % e 92 %, respectivamente (Falso operado: $0,46 \pm 0,02$; 6-OHDA Controle: $12,37 \pm 1,32$; 6-OHDA+W3 1,5: $4,8 \pm 0,45$; 6-OHDA+W3 3,0: $0,95 \pm 0,14 \mu\text{mol/g}$ de tecido) [F (3, 28)=60,69; $p < 0,001$].

Com relação às concentrações de glicina, o gráfico 11 mostra que nos animais do grupo controle (6-OHDA) houve um aumento na concentração de glicina em torno de 95 % quando comparado ao grupo Falso operado (Falso operado: $4,6 \pm 0,27$; 6-OHDA Controle: $8,97 \pm 0,37$) e que o tratamento com ômega 3 na dose de 1,5 g/kg não promoveu nenhuma alteração significativa nos níveis de glicina, já o tratamento com a maior dose (3,0 g/kg) foi capaz de reduzir as alterações nos

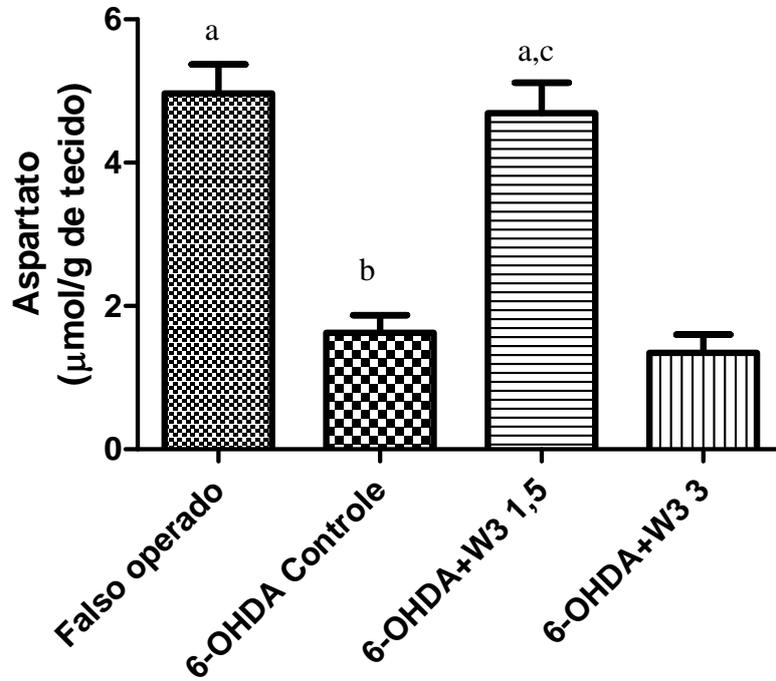
conteúdos de glicina provocadas pela 6-OHDA, promovendo uma recuperação para níveis próximos daqueles observados nos animais do grupo Falso operado (6-OHDA+W3 1,5: $8,42 \pm 0,43$; 6-OHDA+W3 3,0: $3,95 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) [F (3, 25)=61,20; $p < 0,0001$].

Um resultado semelhante foi observado com relação ao aminoácido taurina, como mostra a Gráfico 12. Nos animais do grupo 6-OHDA Controle foi verificado um aumento na concentração de taurina em torno de 65 % quando comparado ao grupo Falso operado (Falso operado: $5,36 \pm 0,3$; 6-OHDA Controle: $8,86 \pm 1,0$). O tratamento com ômega 3 na dose de 1,5 g/kg não promoveu nenhuma alteração significativa nos níveis de taurina, já o tratamento com a maior dose (3,0 g/kg) foi capaz de reduzir as alterações nos conteúdos de taurina provocadas pela 6-OHDA, promovendo uma recuperação para níveis próximos daqueles observados nos animais do grupo Falso operado (6-OHDA+W3 1,5: $7,33 \pm 0,84$; 6-OHDA+W3 3,0: $5,58 \pm 0,56$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) [F (3, 26)=5,06; $p < 0,01$].

O Gráfico 13 mostra que a neurotoxina 6-OHDA promoveu um aumento de quase 5 vezes na concentração de GABA quando comparado ao grupo Falso operado e que o tratamento com ômega 3 nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg, reduziu as alterações nos conteúdos de GABA provocadas pela 6-OHDA, causando uma redução desses níveis em 47 % e 78 %, respectivamente (Falso operado: $5,52 \pm 0,66$; 6-OHDA Controle: $25,58 \pm 1,77$; 6-OHDA+W3 1,5: $13,44 \pm 1,19$; 6-OHDA+W3 3,0: $5,6 \pm 0,44$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) [F (3, 30)=66,04; $p < 0,0001$].

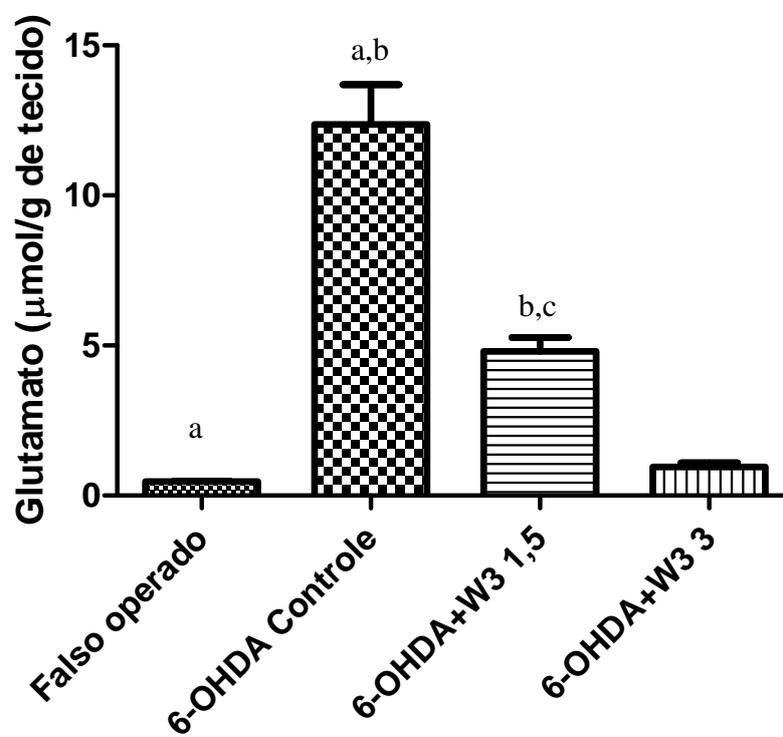
Esses resultados indicam uma recuperação parcial, mas significativa, dos efeitos da neurotoxina após tratamento com ômega 3.

Gráfico 9 - Determinação da concentração de Aspartato em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



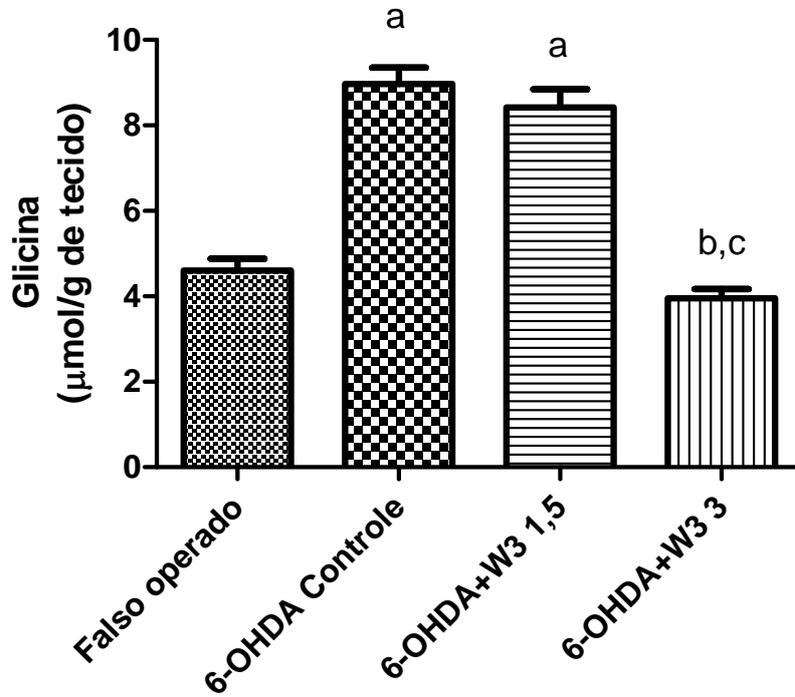
Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs 6-OHDA+W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

Gráfico 10 - Determinação da concentração de Glutamato em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



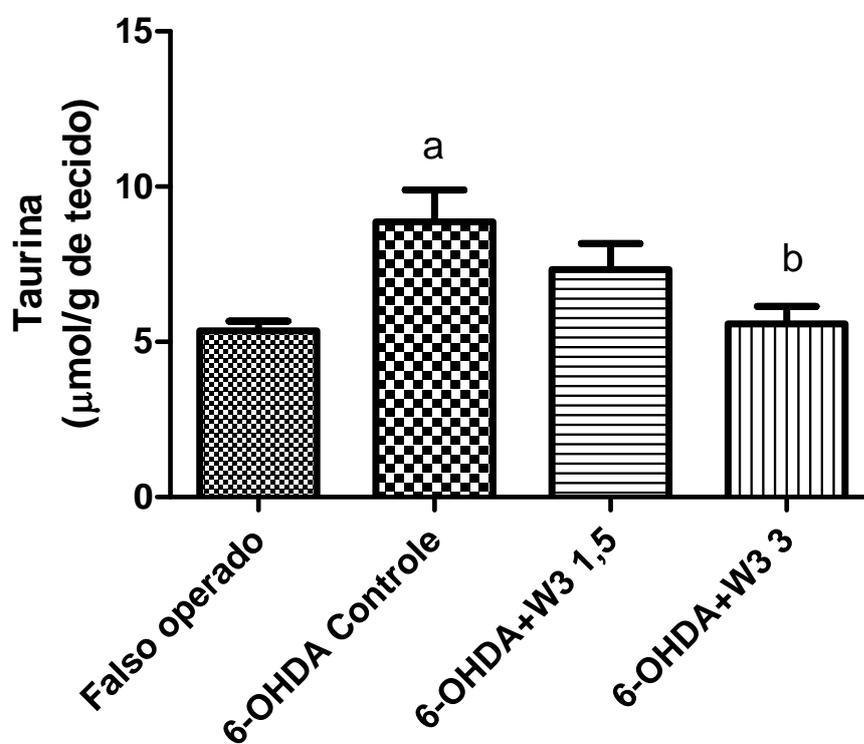
Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs 6-OHDA+W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

Gráfico 11 - Determinação da concentração de Glicina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



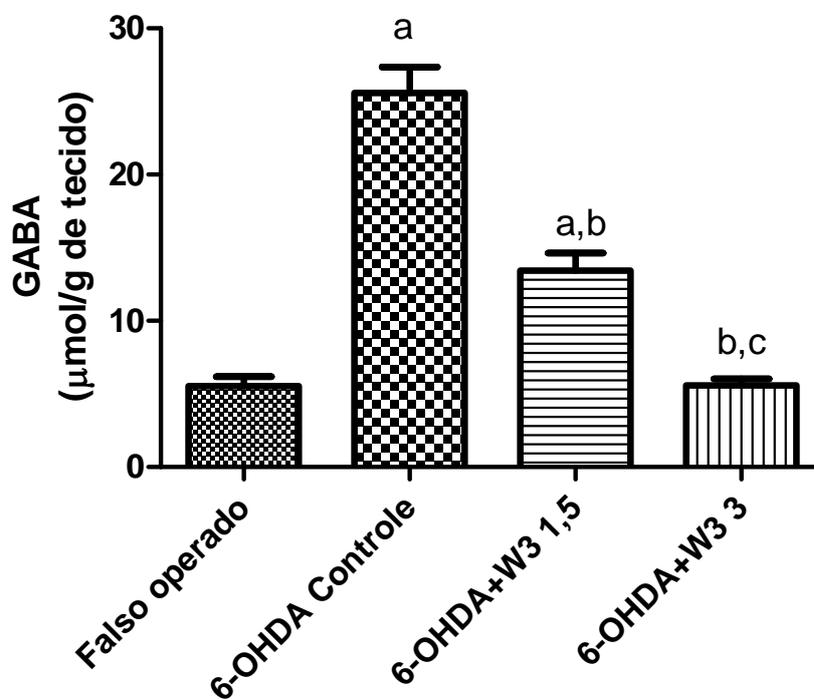
Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs 6-OHDA+W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

Gráfico 12 - Determinação da concentração de Taurina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs 6-OHDA+W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

Gráfico 13 - Determinação da concentração de Taurina em corpo estriado de ratos com lesão induzida por 6-OHDA, e tratados com ômega 3 (nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, v.o. diariamente durante 28 dias)



Nota: Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). a vs Falso operado, b vs Controle (6-OHDA) e c vs 6-OHDA+W3 1,5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Teste de Tukey *post hoc*).

8 DISCUSSÃO

A doença de Parkinson é a segunda doença degenerativa mais comum depois da demência de Alzheimer e é considerada uma importante causa de incapacidade crônica na população acima dos 55 anos de idade. Essa doença é caracterizada por uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc), e em menor extensão da área tegumentar ventral (VTA), que causa uma intensa redução na concentração de dopamina no estriado (DELATTRE *et al.*, 2010; BOUSQUET *et al.*, 2011).

As manifestações motoras da doença de Parkinson ocorrem devido ao processo de degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais que leva a uma redução da modulação da dopamina estriatal e conseqüentemente, a alterações motoras, como a hipocinesia (CALABRESI *et al.*, 2007). A rigidez e o tremor envolvem distúrbios neuroquímicos mais complexos de outros neurotransmissores (particularmente acetilcolina, noradrenalina, serotonina e GABA), bem como dopamina (OLANOW *et al.*, 1996).

A etiologia da doença de Parkinson ainda não está completamente esclarecida, mas sabe-se que a degeneração neuronal pode resultar da convergência de um conjunto de diferentes fatores patogênicos, incluindo distúrbios na homeostase do cálcio, apoptose, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação (ESPOSITO *et al.*, 2007).

Embora ainda não exista um tratamento efetivo que seja capaz de restaurar o número de neurônios dopaminérgicos estriatais, o tratamento com um precursor dopaminérgico L-DOPA é considerado como sendo a droga mais eficaz no controle dos sintomas da doença de Parkinson, mas ele apresenta muitos efeitos colaterais, particularmente a discinesia que limitam bastante o seu uso (SAMADI *et al.*, 2006).

Samadi *et al.* (2006) demonstraram que a administração de DHA (100 mg/kg) promoveu uma redução em cerca de 40% da discinesia induzida por levodopa em um modelo de doença de Parkinson em primatas. Os autores propuseram que este efeito do DHA pode ser explicado pela ativação de receptores nucleares que operam como fatores de transcrição.

Bousquet *et al.* (2008) realizaram um estudo utilizando o modelo animal de doença de Parkinson induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino (MPTP) em camundongos e demonstraram que os PUFAs ômega-3 foram capazes de proteger os neurônios contra a neurotoxicidade causada pelo MPTP.

A lesão nigroestriatal unilateral induzida por 6-OHDA (6-hidroxidopamina) tem sido largamente usada como um modelo animal da doença de Parkinson. Nesse modelo ocorre uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em uma depleção dos níveis de dopamina no estriado ipsilateral a injeção. As mudanças unilaterais na via nigroestriatal causadas pela injeção de 6-OHDA levam a uma assimetria funcional a qual é quantificada utilizando-se um teste rotacional induzido por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (anfetamina) (DEUMENS *et al.*, 2002).

O presente trabalho mostrou que a injeção unilateral com 6-OHDA no estriado produziu rotações induzidas por apomorfina, corroborando com os dados da literatura descritos no parágrafo anterior. Esse efeito provavelmente envolve supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos causada pela perda dos terminais dopaminérgicos, resultando em uma significativa redução da concentração de dopamina no estriado lesionado com 6-OHDA (JOGHATAIE *et al.*, 2004).

Os resultados mostrados neste trabalho demonstraram que a suplementação com ômega 3 nas doses de 1,5 e 3,0 g/kg promoveu uma recuperação parcial no déficit motor representado pela redução do comportamento rotacional induzido pela apomorfina apresentado pelos animais com lesão estriatal por 6-OHDA. Essa redução pode ser atribuída aos efeitos benéficos do ômega 3, atenuando a degeneração estriatal.

Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados por Delattre *et al.* (2010) que demonstraram uma marcante redução no comportamento rotacional de animais que receberam suplementação de PUFAs (provenientes de óleo de peixe) e posteriormente foram submetidos a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Esses pesquisadores sugeriram que o ômega 3 pode reduzir o déficit motor através da estimulação do *turnover* dopaminérgico nos terminais remanescentes do estriado lesionado, como foi determinado pelo aumento da taxa de conversão DOPAC/DA e HVA/DA verificado por eles.

O teste do campo aberto tem como objetivo estudar a ação do sistema dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico no comportamento emocional e exploratório através da exploração horizontal (locomoção), vertical (rearing) e auto-limpeza (grooming). É um teste muito utilizado como ferramenta na avaliação de substâncias com ação sobre esses sistemas de neurotransmissão que provoquem alterações motoras (bradicinesia ou hiperlocomoção) e emocionais (ansiedade) (GHIDINI, 2006).

O ômega 3 promoveu uma melhora da função motora dos animais não só demonstrada pela redução do comportamento rotacional induzido por apomorfina, mas também na atividade exploratória horizontal e vertical observada no teste do campo aberto. Esse efeito pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante, que culminou com a proteção dos neurônios dopaminérgicos contra a ação lesiva dos radicais livres produzidos pela auto-oxidação da 6-OHDA e redução da morte neuronal com conseqüente redução da hipersensibilização dos receptores dopaminérgicos e recuperação dos níveis de dopamina, levando assim, a essa recuperação motora.

O presente estudo mostrou que a injeção unilateral com 6-OHDA no estriado causou uma diminuição significativa nos concentrações de noradrenalina (NE), dopamina (DA), DOPAC e HVA no lado ipsilateral quando comparados ao grupo falso operado. Também foi observada uma redução na concentração de serotonina (5-HT) e do seu metabólito, 5-HIAA. Esses resultados são consistentes com outros estudos que descrevem as alterações bioquímicas no estriado lesionado com 6-OHDA (ICHITANI *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos (LUTTMAN *et al.*, 1994; MOLINA-HOLGADO *et al.*, 1993) na literatura verificaram uma diminuição significativa nas concentrações de 5-HT e 5-HIAA em estriado de ratos após lesão com 6-OHDA.

O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Karstaedt *et al.* (1994). Estes pesquisadores mostraram que seis semanas após a lesão com 6-OHDA, as concentrações de 5-HT e 5-HIAA diminuíram significativamente em corpo estriado de ratos. Segundo estes autores, a perda da inervação dopaminérgica no estriado leva a um aumento do "turnover" da 5-HT e uma depleção completa da 5-HT no corpo estriado.

No presente estudo, a demonstração de que o tratamento com ômega 3 pode atenuar os déficits motores induzidos por apomorfina sugere aumento na concentração de dopamina no estriado lesionado e conseqüente redução da supersensibilidade do receptor. Esses resultados foram comprovados pela dosagem das concentrações de dopamina e seus metabólitos que foram parcialmente recuperados no lado ipsilateral dos grupos tratados com ômega 3 e lesionados com 6-OHDA.

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com ômega 3 em ratos lesionados com 6-OHDA reverteu significativamente a redução das concentrações estriatais das monoaminas (NE, DA e 5-HT), assim como dos conteúdos dos seus metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA), indicando um potencial benéfico do ômega 3 na doença de Parkinson.

Vários estudos já demonstraram a ocorrência de alterações em outros neurotransmissores decorrentes da degeneração dos neurônios dopaminérgicos estriatais na doença de Parkinson. Entre elas a redução da concentração de serotonina no corpo estriado e na substância negra (BERNHEIMER *et al.*, 1961), a redução do conteúdo de noradrenalina na substância negra, núcleo accumbens, hipotalâmico e regiões límbicas (SHANNAK, 1994), mudanças na atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase, responsável pela síntese do GABA, na substância negra e no corpo estriado (KISH *et al.*, 1986, 1987; HORNYKIEWICZ, 1998) e redução na densidade de receptores GABA na substância negra e no hipocampo (HATZIPETROS; YAMAMOTO, 2006).

Uma das mudanças celulares características na doença de Parkinson é a hiperativação da transmissão glutamatérgica corticoestriatal e, indiretamente, no núcleo subtalâmico. Muitos estudos em diferentes modelos experimentais da doença de Parkinson mostraram que a normalização da transmissão glutamatérgica pode ser útil na melhoria dos sintomas motores (BRADLEY *et al.*, 2000; GREENAMYRE, 2001; PLATT, 2007). No modelo experimental da doença de Parkinson obtido com lesão unilateral na substância negra com a neurotoxina 6-OHDA, ocorre um aumento significativo da atividade glutamatérgica corticoestriatal e também alterações dos receptores glutamatérgicos dessa região (BLANDINI *et al.*, 1996; GREENAMYRE, 2001; GUBELLINI *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2008).

No presente trabalho, os resultados das dosagens de glicina, taurina, GABA e glutamato mostraram um aumento das concentrações desses aminoácidos após lesão com 6-OHDA e uma redução dos níveis de aspartato, corroborando com os dados da literatura que apontam a existência de um desequilíbrio em outros neurotransmissores após desnervação dopaminérgica.

Assim como foi observado que o tratamento com ômega 3 produziu bloqueio dos efeitos da 6-OHDA nos níveis das monoaminas, o presente trabalho também observou o bloqueio da liberação de GABA e glutamato no lado ipsilateral do estriado de ratos lesionados com 6-OHDA após o tratamento com ômega 3.

Este trabalho está de acordo com estudos anteriores (PERRY *et al.*, 1983) que mostraram uma elevação significativa nos níveis de GABA no putâmem de pacientes com doença de Parkinson. Esses autores também dosaram o conteúdo de GABA em ambos os lados do estriado de ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA, e observaram que o conteúdo de GABA estava significativamente elevado no estriado ipsilateral.

Embora o glutamato desempenhe um importante papel na plasticidade do sistema nervoso central, a atividade excessiva do sistema glutamatérgico é altamente tóxica e a toxicidade do glutamato pode contribuir para os danos neuronais observados em várias doenças agudas e crônicas do SNC (SHELDON *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2010).

O tratamento com ômega 3 reduziu o aumento dos níveis de glutamato induzido por 6-OHDA de maneira dose-dependente, onde a maior dose (3,0 g/kg) produziu o melhor efeito, com recuperação do conteúdo de glutamato para níveis próximos aos dos animais falso operados.

Essa reversão dos efeitos da neurotoxina 6-OHDA se estendeu para os demais aminoácidos neurotransmissores onde a maior dose (3,0 g/kg) apresentou também os melhores efeitos. Essa recuperação dos conteúdos dos aminoácidos para níveis mais próximos daqueles observados nos animais falso operados demonstra mais uma vez um possível efeito neuroprotetor do ômega 3, que foi capaz de reverter a toxicidade da 6-OHDA.

Embora a etiologia da doença de Parkinson permaneça desconhecida, uma série de evidências sugere que um desequilíbrio do metabolismo energético e fatores que levam a um aumento do estresse oxidativo podem estar envolvidos. Dentre eles a disfunção mitocondrial, a peroxidação lipídica, o aumento do acúmulo

de ferro livre, e o aumento da atividade da superóxido dismutase (LEVY *et al.*, 2009; RAO, 2009).

Estudos anteriores mostraram que a 6-OHDA é transportada para dentro dos neurônios dopaminérgicos onde é oxidada produzindo peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxil (BLUM *et al.*, 2001; BOVE *et al.*, 2005). A administração de 6-OHDA resulta na formação de espécies reativas do oxigênio (ROS), e produz uma potente inibição dos complexos I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, *in vitro* (MAZZIO *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2008).

Kumar *et al.* (1995) mostraram que ratos com lesão estriatal por 6-OHDA apresentaram um aumento de cerca de 40 % nas concentração de malonildialdeído, indicando altos índices de peroxidação lipídica. Esses efeitos foram associados à redução dos conteúdos de GSH, SOD e GSH-Px (glutathiona peroxidase), juntos esses fatores podem levar ao aumento da geração de radicais livres.

Gomez-Lazaro *et al.* (2008), demonstraram que alterações mitocondriais estão associadas com o efeito citotóxico da 6-OHDA, que promove o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e leva a liberação do citocromo c. Esses autores observaram que a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, que está envolvida com mecanismos de morte celular, foi ativada durante a apoptose induzida por 6-OHDA, e que o tratamento com um inibidor da MAPK p38 bloqueou muitos eventos neurotóxicos induzidos por 6-OHDA.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a 6-OHDA promoveu aumento dos conteúdos de MDA em todas as áreas cerebrais estudadas, assim como aumento dos níveis de nitrito/nitrato, comprovando o aumento do estresse oxidativo. O tratamento com ômega 3 na maior dose reduziu os níveis de MDA promovendo diminuição da peroxidação lipídica e proteção contra o estresse oxidativo. Foi observada também uma redução dos níveis de nitrito/nitrato nos grupos tratados com ômega 3 na dose de 1,5 g/kg.

Recentemente, Delattre *et al.* (2010), avaliaram os efeitos da suplementação crônica de PUFA's ômega-3 no modelo de doença de Parkinson induzido pela injeção estereotáxica de 6-OHDA e verificaram uma redução da peroxidação lipídica provocada pela 6-OHDA e um aumento do *turnover* de dopamina estriatal sugerindo que os PUFA's ômega-3 provavelmente melhorariam a atividade dos neurônios remanescentes.

Alguns estudos demonstraram possíveis efeitos neuroprotetores do DHA, e um dos primeiros mecanismos propostos para esse efeito é a sua atividade antioxidante *in vivo*. Existem evidências de que o DHA eleva a atividade da enzima glutathione redutase, reduz o acúmulo de proteínas oxidadas, a peroxidação lipídica, as espécies reativas do oxigênio e a ativação das caspases (HASHIMOTO *et al.*, 2002; CALON *et al.*, 2004; BAZAN, 2005).

Os efeitos benéficos dos PUFAs ômega-3, em sua maioria, tem sido atribuídos a sua capacidade de reduzir o processo inflamatório e/ou a morte celular por apoptose, ambos intimamente relacionados com a degeneração neuronal.

Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) resultam em redução dos níveis de ácido araquidônico nas células, reduzindo assim a produção de eicosanóides pró-inflamatórios, como a PGE₂ (BOUSQUET *et al.*, 2008).

Os PUFAs n-3 promovem mudanças na composição lipídica da membrana celular, podendo afetar diretamente as funções das células do sistema imunológico, incluindo a atividade fagocítica dos macrófagos, a sinalização e proliferação das células T e a apresentação do antígeno pelas células dendríticas. Além disso, os PUFAs n-3 podem modular a transcrição gênica de genes pró-inflamatórios e promotores de crescimento, reduzir a expressão de interleucina-8 (IL-8) e das moléculas de adesão intracelulares (ICAM) (DELATTRE *et al.*, 2010).

Os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em doenças neurológicas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, e a esclerose múltipla podem estar relacionados a sua capacidade de inibir vários mecanismos que induzem a lesão neuronal, incluindo a redução da apoptose e da neuroinflamação, essas características indicam que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) possuem um grande potencial clínico para serem usados em várias doenças neurodegenerativas, inclusive combinada com outras terapêuticas farmacológicas (DELATTRE *et al.*, 2010). Muitos estudos experimentais ainda são necessários para determinar melhor seu mecanismo de ação no metabolismo cerebral e seu potencial benefício na terapia celular e molecular.

9. CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- A injeção intraestriatal de 6-OHDA causou destruição celular e déficit motor evidenciado pelo comportamento rotacional induzido pela apomorfina. O tratamento com ômega 3 promoveu uma redução do número de rotações de maneira dose-dependente. A suplementação com ômega 3 promoveu uma recuperação da lesão, provavelmente devido ao aumento das concentrações de dopamina no estriado lesionado e a redução da supersensibilidade do receptor dopaminérgico.
- O tratamento com ômega 3 nas duas doses, também promoveu aumento na atividade exploratória horizontal e vertical (rearing) no teste do campo aberto quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA, comprovando a recuperação motora.
- A exposição das células do CPF, HC e CE a 6-OHDA causou um aumento no conteúdo de MDA e nitrito/nitrato, demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA.
- As concentrações de nitrito/nitrato e a geração de peroxidação lipídica apresentaram uma redução no corpo estriado dos animais tratados com ômega 3, mostrando um possível efeito antioxidante desse composto.
- As concentrações das monoaminas e dos seus metabólitos diminuíram significativamente (60%) no estriado lesionado dos animais controle (6-OHDA) e essas concentrações foram parcialmente recuperadas nos animais lesionados e tratados com ômega 3.
- A redução da concentração de dopamina devido à destruição dos neurônios dopaminérgicos estriatais causou desequilíbrio em outros sistemas como os sistemas gabaérgico e glutamatérgico. Como foi observado, a 6-OHDA promoveu aumento significativo das concentrações de GABA e glutamato.

Houve também aumento das concentrações de glicina e taurina e uma redução dos níveis de aspartato.

- Os conteúdos de GABA e glutamato foram reduzidos após tratamento com ômega 3. Além disso, o ômega 3 promoveu redução das concentrações de glicina e taurina, bem como a elevação dos níveis de aspartato. A recuperação das concentrações desses aminoácidos sugere que o ômega 3 pode restabelecer o equilíbrio entre esses neurotransmissores.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, G.E.; CRUTCHER, M.D.; Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neuroscience**. v. 13, p. 266-271, 1990.
- ALEXANDER,G.E.; CRUTCHER,M.D.; Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trend Neurosciece**. v.13, p.266-271, 1990.
- AGUIAR L.V.M., MACÊDO D.S., VASCONCELOS, M.M.S., OLIVEIRA, A.A., de SOUSA, F.C.F., VIANA, G. S. B. CSC, an adenosine A_{2A} receptor antagonist and MAO B inhibitor, reverses behavior, monoamine neurotransmission, and amino acid alterations in the 6-OHDA-lesioned rats. **Scienc Direct**. V.1191, p. 192-199, 2008.
- ARAB-TEHRANY, E., JACQUOT, M., GAIANI, C., IMRAN, M., DESOBRY, S., LINDER, M., Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**. v. 25, p. 24-33, 2012.
- ANDERSSON A, NALSEN, C., TENGBLAD, S., VESSBY, B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. **Am J Clin Nutr.**; v.76:1222-1229, 2002 .
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.
- BAGGA, D., WANG, L., FARIAS-EISNER, R., GLASPY, J.A., REDDY, S.T. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 100, p. 1751-1756, 2003.
- BANATI, R.B., DANIEL, S.E., BLUNT, S.B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. **Mov Disord**; v.13:221-7, 1998.
- BARRET, A.M.; CRUCIAN, G.; SCHWARTZ,R. NALLANMSHETTY,H.; HEILMAN,K.M. Seeing trees but not the forest- Limited perception of large configurations in PD. **Neurology**. V. 56, p. 724-729, 2001.
- Bazan, N.G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress, **Brain Pathol.**, v.15, p.159–166, 2005.
- BELLISSIMO, M.I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M.M.; OLIVEIRA, B.H.; CANTERAS, N.S.; DaCUNHA, C. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiology of Learning and Memory**. v.82, p. 150-158, 2004.

BLONDEAU, N., WIDMANN, C., LAZDUNSKI, M., HEURTEAUX, C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. **Neuroscience** . v.109, p.231–241, 2002.

BLUM D, CHTARTO A, TENENBAUM L, BROTCHE J, LEVIVIER M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiol Dis.** v.17, p.359-366, 2004

BOURRE, J.M., FRANCOIS, M., YOUYOU, A., DUMONT, O., PICIOTTI, M., PASCAL, G. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. **J. Nutr.**, v.119, p.880–1892, 1989.

BOUSQUET, M., SAINT-PIERRE M., JULIEN C., SALEM J.N., CICCETTI 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**, in press., 2008

BOUSQUET, M., SAINT-PIERRE M., JULIEN C., SALEM J.N., CICCETTI F., CALON 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., CALON, F., CICCETTI, F., Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews.** v. 10, p.453-463, 2011.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's Disease. **The journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 2 p. 484-494, 2005.

BOWEN, R.A.R., CLANDININ, M.T. Dietary low linolenic acid compared with docosahexaenoic acid alter synaptic plasma membrane phospholipids fatty acid composition and sodium-potassium ATPase kinetics in developing rats. **J. Neurochem.** v.83, p.764–774, 2002.

BRAAK, H.; RUB, U.; TREDICI, K.D. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Science.** 2006.

BRANTON, R. L.; CLARKE, D. J. Apoptosis in primary cultures of E14 rat ventral mesencephala: time course of dopaminergic cell death and implications for neural transplantation. **Exp Neurol.**, v. 160, p.88-98, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

CALDER P. C. Dietary fatty acids and the immune system. **Lipids.**, v. 34, p. 137-40, 1999.

CALDER P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, p.433-446, 2003.

CALDER P. C., GRIMBLE R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur J Clin Nutr.**, v.56 (Suppl 3), p.14-9, 2002.

CALDER, P. C., Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Mol Nutr Food Res**, v.52, p. 885–897, 2008.

CALDER P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proc Nutr Soc.**, v. 61, p. 345-358, 2002.

CALDER P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **Eur J of Pharmacology.**, v. 668, 2002.

CALON F, COLE G. **Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p.287-293, 2007.

CALON, F., LIM, G.P., YANG, F., MORIHARA, T., TETER, B., UBEDA, O., ROSTAING, P., TRILLER, A., SALEM, J.R.N., ASHE, K.H., FRAUTSCHY, S.A., COLE, G.M., Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model, **Neuron**. v.43, p. 633–645, 2004.

CAMPIOLI, E., RUSTICHELLI C., AVALLONE, R., n-3 Dietary supplementation and lipid metabolism: Differences between vegetable- and fish- derived oils. **SciVerse ScienceDirect**. v. 4, p.207-212, 2012.

CLANDININ, M.T. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, v. 34, p. 131–135, 1999.

CLARKE, J., HERZBERG, G., PEELING, J., BUIST, R., CORBETT, D. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. **Experimental Neurology**, v. 191, p. 119-127, 2005.

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

CRAWFORD, M. A., COSTELOC, K., GHEBREMESKEL, K. *et al.* Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? . **Am. J. Clin. Nutr.** v.66, p. 1032-1041, 1997.

CURI, Rui., POMPÉIA Celine., MIYASAKA, Célio Kenji, PROCÓPIO, Joaquim. **Entendendo as Gorduras: Os ácidos graxos.** São Paulo. Manole 2002.

DA SILVA, T.M., MUNHOZ, R.P., ALVAREZ, C., NALIWAIKO, K., KISS, A., ANDREATINI, R., FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: a double-blind,

randomized, placebo controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J. Affect.**, v. 111, p. 351–359, 2008.

DACUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E.C.; MIYOSHI, E.; FERRO, M.M.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; CANTERAS.N.S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 79, p. 236 – 242, 2003.

DAMIANI, D. **Mecanismos da Apoptose. Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica**. < www.sistemanervoso.com> . Acesso em: 10 janeiro 2013.

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

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

DAWSON, T. M., DAWSON, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, v. 302, p. 819-822, 2003.

DE LAU, L.M.L., BORNEBROEK, M., WITTEMAN, J.C.M., HOFMAN, A., KOUDSTAAL, P.J., BRETELER, M.M.B. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, v, 64, p. 2040–2045, 2005.

DELATTRE, M.A., KISS, A., SZAWKA, R.E., *et al.* Evaluation os chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neurosci. Res.**, v.66, p. 256-264, 2010.

DEUMENS, R., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol**. v. 175, p. 303-17, 2002.

DEUMENS,R., BLOKLAND,A., PRICKARERTS,J. Modeling Parkinso´s Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesion of the Nigrostriatal Pathway. **Experimental Neurology**. v. 175, p. 303-307, 2002.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neuroscience**, v. 22, p. 391-397.

DONG, X. X., WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 30, p. 379-387, 2009

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-31, 1990.

DUBOIS, B., PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal Neurology**. V. 244, p.2-8, 1997.

DUNHAM, N.M., MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Amer. Pharmac. Ass.** v.46, p. 208-212, 1957.

ELSTNER EF, HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Anal Biochem.** v. 70, p. 616-20. 1976.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 121-143, 2004.

FADEEL. B., ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? **Biochem Biophys Res Commun.** v. 266, p. 699-717. 1999.

FARKAS, E. WILDE, M. C.; KILIAAN, A.J.; MEIJER, J.; KEIJSER J.N.; LUITEN, P.G. M. Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, v. 954, p. 32-41, 2002.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, function, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physic of Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000.
GORELL, J. M., Multiple Risk Factors for Parkinson's Disease. **Journal Neurology Science**, v. 271, p. 169-174, 2004.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-8. 1981.

GREEN, P.; YAVIN, E. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. **Lipids**, v.31, p. 859-865, 1996.

HAGG M.: Poly-unsaturated fatty acids: their cellular role and clinical applications. **The Medicine Journal**, v. 43, p. 13-17, 2001.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HANROTT, K.; GUDMUNSEN, L.; O'NEILL, M. J.; WONNACOTT, S. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5373-5382. 2006.

HASHIMOTO M, HOSSAIN S, SHIMADA T, SUGIOKA K, YAMASAKI H, FUJII Y, ISHIBASHI Y, OKA J, SHIDO O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats, **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1084-1091, 2002.

HICHAMI, A.; DATICHE, F.; ULLAH, S.; LIÉNARD, F.; CHARDIGNY, J.; CATTARELLI, M.; KHAN, N.A.; Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered in n-3 fatty acid-depleted rats. **Behavioural Brain Research**, v. 184, p. 1-10, 2007.

HIRSCH, E.C., HUNOT, S., HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. v. 11, p. 9-15, 2005.

HUNG, C-W., *et al.* Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Rewiws**, v.95, p.36-46, 2010.

HUONG NT, MATSUMOTO K, KASAI R, YAMASAKI K, WATANABE H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol Pharm Bull**. v. 21:p. 978-81, 1998.

HUWILER, A., PFEILSCHIFTER, J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 124, p. 96-112, 2009.

INNIS, S. M.; AKRABAWI, S.S.; DIERSEN-SCHADE, D.A.; DOBSON, M.V.; GUY, D.G. Visual acuity and blood lipids in term infants fed human milk or formulae. **Lipids**, v. 32, n. 1, p. 63-72, 1997.

INNIS, S. M.; DYER, R. Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in formula-fed piglets. **J. Nutr.**, v.127, p.1311-1319, 1997.

JI, A., DIAO, H., WANG, X., YANG, R., ZHANG, J., LUO, W., CAO, R., CAO, Z., WANG, F., CAI, T., n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. **NeuroToxicology**. v. 33, p. 780-788, 2012.

JUMP, D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin.* **Lipidol.**, v. 13, p. 155–164, 2002

KIECOLT-GLASER, J.K. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: A randomized controlled trial. **Brain, Behavior, and Immunity**., v.25, p.1725-1734, 2011.

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H. AND PARK, C.W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KRIS-ETHERTON PM, HARRIS WS, Appel LJ; AHA Nutrition Committee. American Heart Association. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new

recommendations from the American Heart Association. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 23, p. 151-2, 2003.

LAURITZEN, L., HANSEN, H.S., JORGENSEN, M.H., MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.*, v. 40: p. 1–94, 2001.

LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2: p. 589-98, 2001.

LEVANT, B., RADEL, J.D., CARLSON, S.E. 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.

LEVANT, B.; RADEL, J. D.; CARLSON, S. E. Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats are differentially affected by dietary remediation. **Behavioural Brain Research**. v. 152, p. 49-57, 2004.

LUCHTMAN D.W.; MENG, Q; SONG C. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research** v. 226, p.386– 396, 2012.

MARTIN C.A. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 19, p. 761-770, 2006.

MAYEX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review Neuroscience**, v. 26, p. 81-104, 2003.

Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric disease: an overview. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p. 12–26, 2007.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P.; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric disease: An overview. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p. 12-26, 2007.

MAZZA, M; POMPONI, M; JANIRI, L; BRIA, P; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: Na overview. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v.31, p12-26, 2006.

MCKEE, T. AND MCKEE, J.R. **Lipids and membranes**. In Biochemistry in an introduction. MacGraw Hill.; Cap.IX, p. 216-221, 1999.

MCNAMARA, R.K., CARLSON, S.E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention

of psychopathology. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v. 75, p. 329–349, 2006.

McNAMARA, R.K.; CARLSON, S.E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 329- 349, 2006.

MELANSON SF, LEWANDROWSKI EL, FLOOD JG, LEWANDROWSKI KB. Measurement of organochlorines in commercial over-the-counter fish oil preparations: implications for dietary and therapeutic recommendations for omega-3 fatty acids and a review of the literature. **Arch Pathol Lab Med.**, v.129: p. 74-7, 2005.

MEREDITH, G.E., TOTTERDEL, S., BEALES, M., MESHUL, C. K., Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology.** v. 219, p. 334-340, 2009.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal Ganglia Output and Cognition: Evidence from Anatomical, Behavioral, and Clinical Studies. **Brain and Cognition.** v. 42, p. 183-200, 2000.

MILLER, J.L. Parkinson´s Disease Primer. **Geriatric Nursing.** v.23, p.69-75, 2002.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI,S.; CAMPLESSEI,M.; SILVEIRA,R.; TAKAHASHI,E.N.; DACUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesion. **Brain Research Bulletin.**, v.58, p. 41-47, 2002.

MOSLEY RL, BENNER EJ, KADIU I, THOMAS M, BOSKA MD, HASAN K, LAURIE C, GENDELMEN HE. Neuroinflammation, oxidative stress and pathogenesis os Parkinson´s disease. **Clin Neurosci Res.**, v. 6, p. 291-311, 2006

NAKAMURA N, HAMAZAKI T, OHTA M, *et al.* Joint effects of HMG-CoA reductase inhibitors and eicosapentaenoic acids on serum lipid profile and plasma fatty acid concentrations in patients with hyperlipidemia. **Int J Clin Lab Res.**, v. 29, p. 22-5, 1999.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. **Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases.** **Apoptosis**, v. 14, p. 455-468, 2009.

NORDOY A, BONAA KH, SANDSET PM, Hansen JB, Nilsen H. Effect of omega-3 fatty acids and simvastatin on hemostatic risk factors and postprandial hyperlipemia in patients with combined hyperlipemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v. 20, p.259-65., 2000

OZSOY, O., SEVAL-CELIK, Y., HACIOGLU, G., YARGICOGLU P., DEMIR R., AGAR. A., ASLAN, M., The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid

on a mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**. v. 59. p.664-670, 2011.

PACKARD, M.G.; HIRSH, R.; WHITE, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesion on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **Journal of Neuroscience**. v. 9, p. 1465-1472, 1989.

PARAIN, K., MURER, M.G., YAN, Q., FAUCHEUX, B., AGID, Y., HIRSCH, E., RAISMAN-VOZARI, R. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. **Neuroreport**., v. 10, p. 557-61. 1999.

PAXINOS, G. AND WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 2nd Edn, 1986.

PERIER, C., TIEU, K., GUEGAN, C., CASPERSEN, C., JACKSON-LEWIS, V CARELLI, A., HIRANO, S. PRZEDBORSKI, M.V. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. **Proc. Natl. acad. Sci. U. S. A.** v. 102, p. 19126-19131, 2005.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 11, p. 3-7, 2005.

RAO, J.S., ERTLEY, R. N., LEE, H.J., DeMAR, J.C., ARNOLD, J.T., RAPOPORT, S.I., BAZINET, R.P. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. **Mol. Psychiatry**, v. 12, p. 36-46, 2007.

RAVINA, B. M.; FAGAN, S. C.; HART, R. G.; HOVINGA, C. A.; MURPHY, D. D.; DAWSON, T. M.; MARLER, J. R. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. **Neurology**, v. 60, p. 1234-1240. 2003.

REED, T.T., Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v.51, p. 1302-1319, 2011.

ROCHE HM, GIBNEY MJ. Postprandial triacylglycerolaemia: the effect of low-fat dietary treatment with and without fish oil supplementation. **Eur J Clin Nutr**. v. 50, p. 617-24, 1996.

ROSS, B.M. w-3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipids metabolism. **Med. Hypotheses**, v. 68, p. 515-524, 2007,

SALVATI, S.; ATTORI, L.; AVELLINO, C.; Di BIASI, A; SANCHEZ, M. Diets, lipids and brain development. **Developmental Neuroscience** , v.22, p. 481-487, 2002.

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**. p. 59, v. 282-288, 2006.

SANDERS TA, OAKLEY FR, MILLER GJ, MITROPOULOS KA, CROOK D, OLIVER MF. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 17, p. 3449-60, 1997.

SCHULZ,G.M.; GRANT,M.K. Effects of speech therapy and pharmacologic and surgical treatments on voice and speech in Parkinson´s disease: A review of the literature. **Journal Commun. Disorders.** v. 33, p.59-88, 2000.

SCHWARTING, R.K.W.; HUSTON, J.P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analyses of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology.** v. 50, p. 275-331, 1996.

SHIN, S; DIXON, E. Oral fish oil restores striatal dopamine release after traumatic brain injury. **Neuroscience Letters.** V. 296 p168-171, 2011.

SELIGER, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, v.21, p.227-236, 1946.

SIMOPOULOS AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J Am Coll Nutr.**, v.21,p. 495-505, 2002.

SINCLAIR, A. J.; WEISINGER, H. S.; VINGRYS, A. J. Neural function following dietary n-3 fatty acid depletion. *in*: YEHUDA, S.; MOSTOFSKY, D. I. (Eds.) Handbook of essential fatty acid biology. TOTOWA, N. Y.: **Human Press**,. cap. 9, p. 201-213, 1997

STOCCHI, F. Prevention and treatment of motor fluctuations. **Parkinsonism and Related Disorders.** v.9, p. 73-81, 2003.

SUMIYOSHI,T.; MATSUI, M.; ITOH, H.; HIGUCHI, Y.; ARAI, H.; TAKAMIYA, C.; KURACHI, M. Essential polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 157, p. 87-93, 2008.

TAKATA, M. K.; YAMAGUCHI, F.; NAKANOSE, K.; WATANABE, Y.; HATANO, N.; TSUKAMOTO, I.; NAGATA, M.; IZUMORI, K.; TOKUDA, M. Neuroprotective effect of D-psicose on 6 hydroxydopamine- induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 100, p. 511–516, 2005.

TANAKA, K., OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6- hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neurosci. Lett.**, v. 410, p. 85–89, 2006.

WAITZBERG D.L., BORGES VC. GORDURAS. *IN*: WAITZBERG DL, **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 3a ed. São Paulo: Atheneu;. p. 55-78. 2000.

WEINSTOCK-GUTTMAN, B., BAIEN, M., PARK, Y., FEICHTER, J., LEE-KWEN, P., GALLAGHER, E., VENKATRAMAN, J., MEKSAWAN, K., DEINEHERT, S., PEDERGAST, D., AWAD, A.B., RAMANATHAN, M., MUNSCHAUER, F., RUDICK,

R. Low fat dietary intervention with v-3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 73, p. 397–404, 2005.

WESTPHAL, C., KONKEL, A., SCHUNCK, W-H. CYP-eicosanoids-A new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators.**, v.96, p.99-108. 2011.

XU, K, BASTIA, E., SCHWARZSCHILD, M. Therapeutic potential of adenosine A(2A) receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther.**, v. 105 p. 267-310. 2005.

YOU DIM, K.A., MARTIN, A., JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 383–399, 2000.