

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ANA PAULA CHUPROSKI

**EFEITO NEUROPROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS
ÔMEGA-3 NAS ALTERAÇÕES NÃO-MOTORAS DA DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDA PELA 6-OHDA EM RATOS**

**PONTA GROSSA
2018**

ANA PAULA CHUPROSKI

**EFEITO NEUROPROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS
ÔMEGA-3 NAS ALTERAÇÕES NÃO-MOTORAS DA DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDA PELA 6-OHDA EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas, Área de Concentração Fisiologia e Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

**PONTA GROSSA
2018**

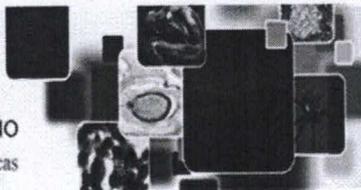
C559 Chuproski, Ana Paula
Efeito neuroprotetor da suplementação com ácidos graxos
ômega-3 nas alterações não-motoras da doença de Parkinson
induzida pela 6-OHDA em ratos/ Ana Paula Chuproski. Ponta
Grossa, 2018.
90 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas – Área de
concentração – Fisiologia e Fisiopatologia do Sistema Nervoso
Central), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

1. Doença de Parkinson. 2. 6-hidroxidopamina. 3.
Neuroproteção. I. Ferro, Marcelo Machado. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Biomédicas.
III. T.

CDD : 616.8



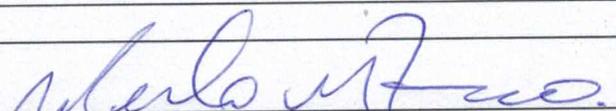
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 01/2018, DA MESTRANDA ANA PAULA CHUPROSKI REALIZADO NO DIA 05 DE FEVEREIRO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos cinco dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 09hs00min, na sala 120, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Marcelo Machado Ferro** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Ana Paula Chuproski** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Edmar Miyoshi (UEPG/Pr)** e **Professor Dr. Marcelo de Meira Santos Lima (UFPR/Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“EFEITO NEUROPROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA – 3 NOS SINTOMAS NÃO - MOTORES DA DOENÇA DE PARKISON INDUZIDA PELA 6 – OHDA EM RATOS.”** Encerrada a defesa, e após reunião, a comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como Aprovada considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

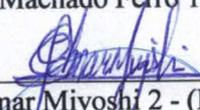
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

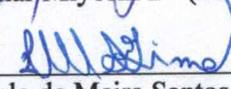
Novo título: _____



Marcelo Machado Ferro 1- (DEBIO - UEPG) - Presidente



Edmar Miyoshi 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular



Marcelo de Meira Santos Lima 3- (UFPR) – Titular

Ponta Grossa, 05 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Onipotente e misericordioso Deus, que me agracia com tantos dons e me fortalece na caminhada; a Nossa Senhora a quem dedico minha proteção (“*Totus tuus*”) e à Igreja Católica, alicerce de minha fé, que colaborou em grande parte de minha formação humana e me faz desejar a Eternidade.

A minha família, uma verdadeira dádiva recebida de Deus, sobretudo aos meus pais. À minha mãe Pilar, exemplo de dedicação, o alicerce de nossa casa, pela caridade e generoso amor, também expressos em suas orações diárias em minha intenção. Ao meu pai, Ezequiel, pelo seu constante carinho e estímulo.

Aos meus entes queridos: meus irmãos, Edenilson e Paulo, minha cunhada Kelly e sobrinhas Karen e Sofia, pela compreensão das ausências e pelo carinho transmitido a mim, ainda que à distância.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro, pela oportunidade e confiança em mim depositada, pela paciência, disponibilidade e por todos os conhecimentos compartilhados comigo.

Aos professores membros da banca de qualificação, Edmar Miyoshi e Giovani Marino Fávero, pelas importantes contribuições que enriqueceram a versão final deste trabalho.

Aos professores membros da banca de defesa, Edmar Miyoshi e Marcelo de Meira Santos Lima, pelo aceite e disponibilidade, contribuindo para o aprimoramento científico deste trabalho.

Ao professor José Carlos Rebuglio Velloso, pela colaboração para a realização dos ensaios bioquímicos; e ao Bruno Rodrigo Minozzo, pelo auxílio com as técnicas e na interpretação dos resultados desses experimentos.

Ao doutorando Bruno Popik, do laboratório de Neurobiologia da Memória do PPG Neurociências da UFRGS, pela colaboração sobre protocolos para teste de memória.

Aos professores e pós-graduandos responsáveis por outros laboratórios da UEPG, que compartilhamos materiais, reagentes e equipamentos, os quais facilitaram/viabilizaram a execução desse projeto de pesquisa.

Às alunas de Iniciação Científica: Bruna, Caroline, Eduarda, Evany e Larissa pelo auxílio nos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia (nosso “lab 22”): mestrandos Anderson, Lilian e Susi, doutoranda em Química Ana Caroline, alunos de Iniciação Científica e demais alunos que se utilizaram do mesmo e com quem tive a possibilidade de conviver nesses 2 anos.

Ao colega de mestrado Anderson Gustavo dos Santos, pelo dedicado e gentil auxílio nos experimentos bioquímicos; e por sua agradável companhia no laboratório.

A meu amigo Luiz, com quem tive o privilégio da fraterna convivência por 5 anos. Meu sincero agradecimento por todo apoio, amizade e incentivo que contribuíram para que eu pudesse chegar aqui.

Aos pacientes neurológicos que atendi na clínica como fonoaudióloga, que motivaram minha escolha acadêmica pela Neurociência e cuja lembrança continua renovando meu desejo em prosseguir nessa linha de pesquisa.

Aos alunos do projeto social “Grupo de estudos pré-vestibular Bom Jesus”, que me proporcionaram a experiência de ser professora e, certamente, revigoraram meu desejo pela carreira docente. Fui para ensinar, sem saber que aprenderia tanto com vocês!

À Paróquia Senhor Bom Jesus, pelo importante apoio espiritual.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, instituição em que ingressei há 6 anos e que tornou-se minha segunda casa, pela oportunidade em realizar meus estudos de graduação e mestrado.

Às funcionárias do biotério pela atenção e cuidado prestado aos animais utilizados nessa pesquisa.

Ao laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima e à doutoranda Juliane Fagotti pelo apoio concedido para realização dos experimentos de histologia, cujos dados também integram este trabalho e serão publicados brevemente.

À Fundação Herbarium de Pesquisa e Inovação, que gentilmente fez a doação das cápsulas de óleo de peixe utilizadas nesta pesquisa.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que me fortaleceram e aperfeiçoaram profissional e humanamente nesta caminhada, ainda que de forma involuntária, o meu sincero agradecimento.

“A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si.”

(Carta Encíclica *Fides et Ratio* – São João Paulo II)

RESUMO

CHUPROSKI, Ana Paula. **Efeito Neuroprotetor da suplementação com ácidos graxos ômega-3 nas alterações não-motoras da doença de Parkinson induzida pela 6-OHDA em ratos.** 2018. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem crônica, degenerativa e progressiva causada pela perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SN_{pc}) do mesencéfalo. Acompanhando ou antecedendo os sinais motores, são observadas alterações sensoriais, autonômicas e distúrbios neuropsiquiátricos como depressão, ansiedade e demência, chamados de sintomas não-motores da DP. Como o tratamento atual para a DP permanece sintomático e paliativo, busca-se terapias neuroprotetoras capazes de retardar a degeneração neuronal em fases iniciais. Entre estas substâncias estão os ácidos graxos ômega-3 (ω -3), componentes alimentares com funções estruturais, metabólicas e funcionais, cuja importância vem sendo demonstrada para o bom funcionamento do sistema nervoso, no neurodesenvolvimento e na prevenção de doenças neurodegenerativas, entre elas a DP. Apesar disso, em decorrência de mudanças do comportamento alimentar da sociedade atual, a ingestão de alimentos ricos em ω -3 vem reduzindo significativamente. O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos da suplementação subcrônica com ω -3 em relação a um possível papel neuroprotetor para os comportamentos tipo depressivo, ansioso e déficit de memória em ratos adultos lesados pela 6-OHDA e se este efeito neuroprotetor está relacionado ao aumento da capacidade antioxidante neuronal pelos níveis de glutatona (GSH). Para realização dos experimentos, foram utilizados 49 ratos machos linhagem *Wistar* com peso entre 280 a 320 g, divididos em 4 grupos: SHAM/salina (n=12), SHAM/OP (n=12), 6-OHDA/salina (n=14), 6-OHDA/OP (n=11). Nos grupos OP, foi administrado via gavagem óleo de peixe (OP) contendo ácidos graxos ω -3 (50%DHA e 20% EPA) durante o período de 21 dias (2 g/kg/dia), sendo 14 dias antes e 7 dias após a lesão nigroestriatal. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão da neurotoxina 6-OHDA ou solução salina (grupos SHAM) na SN_{pc}. Após o intervalo de três semanas, realizaram-se os testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos, preferência à sacarose e natação forçada. Ao término dos testes, os animais foram sacrificados, sendo retiradas amostras de córtex cerebral, estriado e mesencéfalo para análise bioquímica e histológica, respectivamente. Foi realizada análise bioquímica da concentração de GSH no córtex frontal e estriado. Verificou-se que a lesão bilateral gerada pela 6-OHDA na SN_{pc} foi capaz de provocar um comportamento tipo depressivo, sendo atenuado nos animais suplementados com ω -3. Da mesma forma, a lesão causou déficit na memória de reconhecimento, que se apresentou menos intenso nos animais suplementados com ω -3. Entretanto, não houve alteração nos níveis de GSH em decorrência da lesão, não sendo possível estabelecer uma relação entre os níveis desta enzima e a neuroproteção. Portanto, pode-se inferir que a suplementação com ácidos graxos ω -3 presentes no óleo de peixe ofereceu uma resposta neuroprotetora frente a este modelo animal de DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; 6-hidroxidopamina; Neuroproteção.

ABSTRACT

CHUPROSKI, Ana Paula. **Neuroprotective effect of omega-3 fatty acid supplementation on non-motor symptoms of Parkinson's disease induced by 6-OHDA in rats**. 2018. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

Parkinson's disease (PD) is a chronic, degenerative and progressive disorder caused by the loss of the dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta (SN_{pc}) on the midbrain. Accompanying or predating motor signals, sensorial, autonomic and neuropsychiatric disorders such as depression, anxiety and dementia, are observed, being called non-motor symptoms of PD. As the current treatment for PD remains symptomatic and palliative, there is a need for neuroprotective therapies capable of slowing neuronal degeneration in the early stages. Among these substances omega-3 fatty acids (ω -3) are found, food components with structural, metabolic and functional roles whose importance has been demonstrated for the proper functioning of the nervous system, neurodevelopment and prevention of neurodegenerative diseases, including PD. Despite this, due to last decades changes in the eating behavior, the ingestion of foods rich in ω -3 has been reducing significantly. The aim of this work was to evaluate the possible neuroprotective effects of subchronic ω -3 supplementation on depressive-like, anxiety-like and memory deficit of 6-OHDA-injured adult rats and if this neuroprotective effect is related to the improvement of the neuronal antioxidant capacity by glutathione levels (GSH). For the experiments, 49 male *Wistar* rats weighing between 280 and 320 g were divided into 4 groups: SHAM/saline (n=12), SHAM/OP (n=12), 6-OHDA/saline (n=14), 6-OHDA/OP (n=11). In the OP groups, fish oil containing ω -3 fatty acids (50% DHA and 20% EPA) was administered via gavage during the 21-day period (2 g/kg/day), 14 days before and 7 days after the injury. The animals were submitted to stereotaxic surgery to infuse neurotoxin 6-OHDA or saline (SHAM groups) into the SN_{pc}. After the three-week interval, the behavioral tests were performed: open field, elevated plus maze, object recognition task, sucrose preference and forced swimming. At the end of the tests, the animals were sacrificed, and samples of cerebral cortex, striatum and midbrain were removed for biochemical and histological analysis. Biochemical analysis of the concentration of GSH in the frontal cortex and striatum was performed. It was verified that the bilateral lesion generated by 6-OHDA in SN_{pc} was able to induce a depressive-like behavior, which was attenuated in the animals supplemented with ω -3. Similarly, the lesion caused recognition memory deficit, which was less intense in those supplemented with ω -3. There was no change in GSH levels after the lesion, and it was not possible to establish a relationship between the levels of this enzyme and neuroprotection. Therefore, it can be deduced that the supplementation with ω -3 fatty acids present in the fish oil demonstrated a possible neuroprotective response in this animal model of PD.

Keywords: Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine; Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BIOSÍNTESE E METABOLISMO DA DOPAMINA	18
FIGURA 2 - NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA	19
FIGURA 3 - VIAS DOPAMINÉRGICAS.....	21
FIGURA 4 - PROGRESSÃO DA DP SEGUNDO BRAAK et al (2003)	24
FIGURA 5 - ESTRUTURA DA 6-OHDA	34
FIGURA 6 - BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS ω -3.....	35
FIGURA 7 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS CÁPSULAS DE OP.....	42
FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DO BREGMA NO CRÂNIO DO RATO	43
FIGURA 9 - LOCAL DA INFUSÃO DA NEUROTOXINA 6-OHDA NA SNpc....	44
FIGURA 10 - CRONOGRAMA EXPERIMENTAL.....	45
FIGURA 11 - TESTE DE CAMPO ABERTO	45
FIGURA 12 - TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	46
FIGURA 13 - TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	47
FIGURA 14 – TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE	48
FIGURA 15 - TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - AMBULAÇÃO NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	52
GRÁFICO 2 - <i>REARING</i> NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	53
GRÁFICO 3 - TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE CAMPO ABERTO..	53
GRÁFICO 4 - PORCENTAGEM DE TEMPO GASTO NO BRAÇO ABERTO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	54
GRÁFICO 5 - NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	55
GRÁFICO 6 - PORCENTAGEM DE TEMPO GASTO NO BRAÇO FECHADO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	55
GRÁFICO 7 - NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	56
GRÁFICO 8 - PORCENTAGEM DE TEMPO DE GASTO NO CENTRO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	56
GRÁFICO 9 - – NÚMERO DE PASSAGENS PELO CENTRO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	57
GRÁFICO 10 - ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	58
GRÁFICO 11 - TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	58
GRÁFICO 12 - TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	59
GRÁFICO 13 - TEMPO DE NATAÇÃO NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	60
GRÁFICO 14 - TEMPO DE ESCALADA NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	60
GRÁFICO 15 - CONSUMO DE SACAROSE NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	61
GRÁFICO 16 - CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	62
GRÁFICO 17 - CONSUMO DE SACAROSE ANTES E APÓS A LESÃO NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE	62

GRÁFICO 18 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NO ESTRIADO	63
GRÁFICO 19 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NO CÓRTEX CEREBRAL	64

LISTA DE SIGLAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
5-HT	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
α -syn	Alfa-sinucleína
ω -3	Ácidos graxos ômega-3
ω -6	ácidos graxos ômega-6
ADH	Aldeído desidrogenase
AG	Ácidos graxos
ALA	Ácido alfa-linoléico
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DHA	Ácido docosahexanóico
DOPAC	Ácido diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DSM-V	Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais 5ª edição
EPA	Ácido eicosapentanóico
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GSH	Glutathiona reduzida
HVA	Ácido homovanílico
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LA	Ácido linoléico
LB	<i>Lewy bodies</i> (Corpos de <i>Lewy</i>)
L-dopa	L-3,4-diidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo

MAO	Monoamina oxidase
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
OP	Óleo de peixe
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por emissão de pósitrons)
PKA	Proteína quinase A
PUFA's	Ácidos graxos poliinsaturados
SOD	Superóxido dismutase
SN	Sistema Nervoso
SN _{pc}	Substância negra <i>pars compacta</i>
SN _{pr}	Substância negra <i>pars reticulata</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único)
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VTA	<i>Ventral tegmental area</i> (Área tegmentar ventral)
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. DOENÇA DE PARKINSON	15
2.1.1. HISTÓRICO.....	15
2.1.2. EPIDEMIOLOGIA	16
2.1.3. ETIOLOGIA	17
2.1.4. FISIOPATOLOGIA.....	17
2.1.4.1. Neurotransmissão Dopaminérgica.....	18
2.1.4.2. Formação de Corpos de <i>Lewy</i> e Progressão da DP.....	21
2.1.4.3. Mecanismos Moleculares da DP.....	24
2.1.5. QUADRO CLÍNICO.....	26
2.1.5.1. Sintomas motores.....	26
2.1.6. SINTOMAS NÃO-MOTORES	27
2.1.6.1. Depressão	28
2.1.6.2. Ansiedade.....	28
2.1.6.3. Declínio cognitivo e demência	29
2.1.7. DIAGNÓSTICO.....	30
2.1.8. TRATAMENTO	31
2.2. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE PARKINSON	32
2.2.1. 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)	33
2.3. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3	34
2.4. ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E DOENÇA DE PARKINSON	37
3 OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GERAL.....	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. ANIMAIS.....	41
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
4.3. TRATAMENTO	42
4.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	43
4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS	44
4.5.1. TESTE DO CAMPO ABERTO	45
4.5.2. TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	46
4.5.3. TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	46

4.5.4	TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	48
4.5.5.	TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	49
4.6.	DISSECAÇÃO DO TECIDO CEREBRAL.....	50
4.7.	ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	50
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1.	TESTES COMPORTAMENTAIS	52
5.1.1.	TESTE DO CAMPO ABERTO	52
5.1.2.	TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	54
5.1.3.	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	57
5.1.5.	TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	59
5.1.4	TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	61
5.2.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NO ESTRIADO	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UEPG)	

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem crônica, degenerativa e progressiva caracterizada pela perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* que formam a via nigroestriatal. É a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na população idosa, superada apenas pela doença de Alzheimer. Os pacientes acometidos pela DP apresentam sinais motores como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural.

Entretanto, reconhece-se que a DP é uma doença multissistêmica, que acomete diversos sistemas orgânicos e envolve sintomas motores e não motores. Dentre os sintomas não-motores estão alterações neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade e prejuízo cognitivo.

Atualmente, o tratamento é sintomático, não sendo capaz de reverter completamente a doença. Desta forma, busca-se terapias neuroprotetoras como uma estratégia para prevenir o desenvolvimento da DP.

Os modelos animais são uma importante ferramenta para o entendimento da fisiopatologia da doença, assim como para testes de novas formas de intervenção terapêutica. Dentre estes modelos, destaca-se a 6-OHDA, uma neurotoxina análoga à dopamina que promove a morte dos neurônios dopaminérgicos por meio do estresse oxidativo e perda da homeostase celular.

Os ácidos graxos ω -3 correspondem a uma classe de lipídios obtidos naturalmente da dieta. Um crescente número de estudos mostra a sua importância para a integridade estrutural e funcional da célula, efeito anti-inflamatório e antioxidante. Além disso, efeitos positivos da suplementação com o ω -3 estão sendo observados em doenças neurodegenerativas, como a DP. Porém, há escassez de estudos testando o potencial efeito neuroprotetor do ω -3 nos comportamentos tipo depressivo, ansioso e déficit de memória em modelo animal de DP a partir de lesões provocadas pela neurotoxina 6-OHDA em animais adultos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar se a suplementação subcrônica com ácidos graxos ω -3 apresenta efeito neuroprotetor em relação aos comportamentos tipo depressivo, ansioso e no déficit de memória observado em ratos adultos lesados pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1. HISTÓRICO

A primeira descrição científica da Doença de Parkinson ocorreu em 1817 na monografia “*An essay on the Shaking Palsy*” publicada pelo médico inglês James Parkinson. Neste trabalho, ele relata seis casos de pacientes com associação de sintomas motores como tremor, anormalidades posturais e da marcha sugerindo uma nova síndrome clínica, cuja causa atribuiu, inicialmente, a uma compressão da medula espinhal (PARKINSON, 1817).

O médico francês Jean-Martin Charcot (1825-1893) apresentou grande contribuição no estudo da Doença de Parkinson, sendo o primeiro a adotar esta terminologia em substituição à “Paralisia Agitante”. Charcot ampliou a descrição clínica original incluindo a presença de disfunção cognitiva, depressão, disautonomia e dor como parte dos sintomas da doença (GOETZ, 2011). Coube a ele ainda definir a presença de sintomas cardinais da doença, em especial, o tremor de repouso unilateral, diferenciando o tremor parkinsoniano daquele observado em outras doenças neurológicas (TEIVE, 1998). Em 1877, Charcot instituiu o primeiro tratamento farmacológico da doença, fundamentado no uso de substâncias anticolinérgicas, como a hioscinamida (TEIVE, 2001).

Um maior avanço para o entendimento da fisiopatologia da DP foi alcançado no início do século XX após a descoberta do neurotransmissor dopamina por Henry Dale (FAHN, 2008), sua biossíntese e vias de liberação, aliada ao exame de cérebros *post mortem* e o desenvolvimento do primeiro modelo animal utilizando a neurotoxina reserpina (HORNYKIEWICZ, 2002).

Posteriormente, uma compreensão ampliada sobre a farmacologia da dopamina possibilitou associar a DP a uma degeneração do sistema dopaminérgico nigroestriatal. Conseqüentemente, foi instituído o tratamento farmacológico de reposição de dopamina com Levodopa, considerada ainda hoje, o tratamento de eleição na DP (GOETZ, 2011; SARKAR et al, 2016).

2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade, superada apenas pela Doença de Alzheimer (GROVER et al, 2015; TIEU, 2011). Embora as estimativas não sejam precisas, acredita-se que a DP acomete aproximadamente 0,3% da população mundial (TODA; HARADA, 2010). Na população em geral, a taxa de incidência da DP é estimada em até 22 casos para cada 100.000 habitantes/ano (HIRTZ et al, 2007) e a taxa de prevalência em 66 a 258 por 100.000 habitantes/ano (DODEL et al, 1998).

Devido ao aumento exponencial observado nos grupos etários mais velhos, o envelhecimento pode ser considerado como um fator de maior suscetibilidade para a DP (RODRIGUÉZ et al, 2014). Isto pode ser observado pelo acréscimo significativo da sua incidência na faixa etária superior a 65 anos, atingindo entre 1 a 2% da população idosa (DE RIJK et al, 2000; DE LAU; BRETELER, 2003; KAUR et al, 2012; PEREIRA, GARRET, 2010). Já na população com idade igual ou superior a 80 anos a incidência chega a 4% (DE LAU; BRETELER, 2003).

Estima-se que existam aproximadamente 4,5 milhões de pessoas no mundo com DP (WIRDEFELDT et al., 2011). Na Europa, acredita-se que o número de pessoas acometidas pela doença irá dobrar em um período de 25 anos, passando a aproximadamente 8 milhões de doentes em 2030 (DORSEY et al, 2007).

Em decorrência do aumento da expectativa de vida mundial, a DP será um problema de saúde pública gerando significativo impacto econômico e na qualidade de vida dos pacientes (FINDLEY et al, 2011; LINDQVIST et al, 2012).

2.1.3. ETIOLOGIA

Embora a causa da DP ainda não seja conhecida, os estudos mostram fortemente que trata-se de uma doença com etiologia multifatorial (WIRDEFELDT et al., 2011). Acredita-se que a associação de fatores de suscetibilidade genética e exposição ambiental a compostos químicos, patógenos ou outros fatores de risco podem desencadear a doença (BLASZCZYK, 2017; BRECKENRIDGE et al, 2016; JAGMAG et al, 2016). Algumas comorbidades, como hipertensão e diabetes, além de hábitos de vida, como dieta e tabagismo, também estão sendo identificados no risco de desenvolvimento da DP (PEZZOLI; CEREDA, 2013).

A maioria dos casos é esporádica, correspondendo à doença de Parkinson idiopática (BEKRIS et al, 2010). Entretanto, em uma pequena porcentagem (5 a

10%) dos casos correspondentes à forma familiar da doença, há um envolvimento genético direto.

A base genética da DP está sendo amplamente estudada e torna-se cada vez mais complexa (NOYCE; BANDHOPADHYAY, 2017). A primeira mutação genética associada à DP foi uma herança autossômica não-dominante (4q21) ligada à expressão da proteína SNCA, observada em ítalo-americanos. Desde então, um total de 18 loci gênicos foram identificados e podem estar relacionados à DP. Destes, 6 mutações nos genes SNCA, LRRK2, PRKN, DJ1, PINK1 e ATP13A2 e outros 2 polimorfismos nos genes SNCA e LRRK2 estão conclusivamente ligadas à transmissão genética hereditária da DP (LESAGE; BRICE, 2009; BEKRIS et al, 2010).

O envolvimento de fatores ambientais foi primeiramente evidenciado na década de 1980 pelo efeito gerado pela toxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina), um contaminante da heroína que induzia uma forma subaguda severa de parkinsonismo em dependentes químicos (KURNICK; THOR, 2015).

Atualmente, atribui-se como fatores ambientais mais preponderantes para desencadear a doença a exposição a agroquímicos, metais pesados e outros contaminantes (BRECKENRIDGE et al, 2016; PEZZOLI; CEREDA, 2013). Uma maior incidência de DP é observada em populações que residem ou trabalham em regiões com alta exposição a compostos como pesticidas, herbicidas e fungicidas, a exemplo do Paraquat, Maneb e Mancozeb (NOYCE et al, 2012; PEZZOLI; CEREDA, 2013). A exposição a toxinas ambientais promove um aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio e interrupção da cadeia respiratória mitocondrial um fator importante na neurodegeneração da DP (LIU et al, 2017).

2.1.4. FISIOPATOLOGIA

A DP é uma doença crônica, degenerativa e progressiva, cuja principal característica neuropatológica é a perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SN_{pc}) do mesencéfalo (ALDAKHEEL et al, 2014; LEVERENZ et al, 2009). Conseqüentemente, há uma redução da transmissão dopaminérgica na via nigroestriatal, parte do circuito dos núcleos da base que controla o movimento voluntário (LUO; HUANG, 2016; TRITSCH; SABATINI, 2012).

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos pode ser observada macroscopicamente pela despigmentação da SN_{pc} devido à perda de

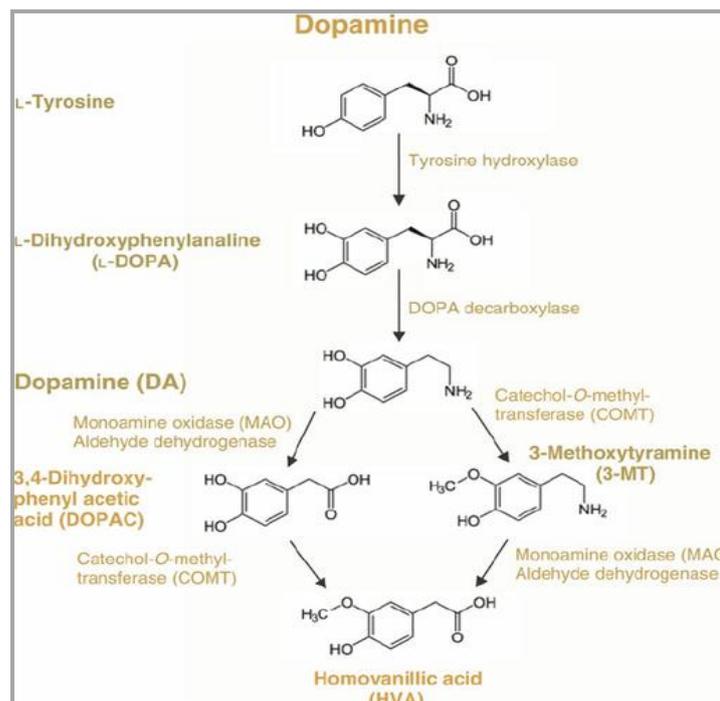
neuromelanina, um produto da auto-oxidação da dopamina (HAINING; ACHAT-MENDES, 2017; HERRERA et al, 2017; PRZDEBORSKI, 2005).

2.1.4.1. Neurotransmissão Dopaminérgica

A dopamina (DA) é um neurotransmissor pertencente ao grupo das monoaminas, assim como a adrenalina, noradrenalina, serotonina e histamina. Destes, a dopamina, adrenalina e noradrenalina são classificadas como neurotransmissores catecolaminérgicos, devido à sua estrutura química comum formada por um núcleo catecol (di-hidróxi-ortobenzeno) ligado a um grupo amina (NH_2) por uma ponte etil (C_2H_4) (Figura 1) (DI GIOVANNI et al, 2016).

A formação da DA segue uma mesma via de síntese dos neurônios catecolaminérgicos, derivados do aminoácido tirosina, obtido em sua maior parte da dieta ou sintetizado em pequena quantidade no fígado a partir da fenilalanina (STANDAERT; GALANTER, 2009). Em uma primeira etapa de síntese, a tirosina é convertida a L-dopa (L-3,4-diidroxifenilalanina) por ação da enzima tirosina hidroxilase. Em seguida, a L-dopa sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima Dopa descarboxilase formando a dopamina (ARREOLA et al, 2016).

FIGURA 1 – BIOSÍNTESE E METABOLISMO DA DOPAMINA

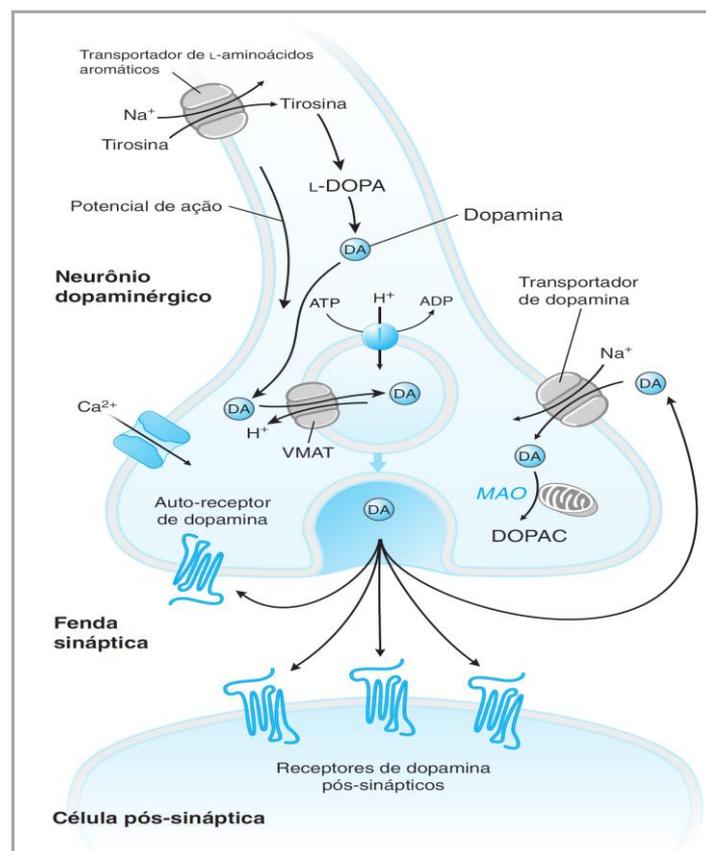


FONTE: BEUCHAINE et al (2009)

Após sua síntese, a DA acumula-se no citosol, sendo armazenada em vesículas dopaminérgicas pelo transportador VMAT2. A recaptação da fenda sináptica é realizada por um transportador específico (DAT) na membrana do neurônio pré-sináptico (ARREOLA et al, 2016).

A degradação da DA pode ocorrer pela ação de 2 tipos de enzimas: monoaminas oxidases (MAO-A e MAO-B) e catecol-O-metiltransferase (COMT). A MAO-A e MAO-B podem agir sobre a DA sintetizando 3,4 ácido diidroxifenil acético (DOPAC) em uma reação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ADH). O DOPAC pode ser convertido a ácido homovanílico (HVA) pela COMT. Já na reação iniciada pela COMT, há a produção de 3-metoxitiramina que é utilizada pela ADH para produzir HVA (DI GIOVANNI et al, 2016; HERRERA et al, 2017) (FIGURA 2).

FIGURA 2: NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA



Fonte: GOLAN et al (2009)

Todos os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos, ou seja, pertencem à família de receptores transmembrana acoplados à proteína G e tem como

finalidade ativar ou suprimir uma via de sinalização intracelular (RANGEL-BARAJAS et al, 2015). De acordo com seu papel de formação ou inibição do AMPc, os receptores são divididos em 2 classes e 6 subtipos: D1-like, que inclui os subtipos D1 e D5; e D2-like, que incluem os subtipos D2L, D2S, D3 e D4 (EMILIEN et al, 1999). Receptores D1 são excitatórios, pois ligam-se a proteína *G α s/olf*, que estimula a formação de AMPc, o qual ativa a proteína quinase A (PKA). Já os receptores tipo D2 são inibitórios, ligando-se a proteína *G α i/o* a qual inibe a formação do segundo mensageiro de sinalização intracelular e inibe PKA (BEUALIEU et al, 2015; ARREOLA et al, 2016).

Os receptores D1 e D2 são altamente expressos no estriado dorsal, estriado ventral (núcleo *accumbens*) e tubérculo olfatório. Os receptores D3 são encontrados no núcleo *accumbens*, tubérculo olfatório e hipotálamo, enquanto os receptores D4 são encontrados no córtex frontal, diencéfalo e tronco encefálico. Já os receptores D5 são expressos em baixos níveis no hipocampo, tubérculo olfatório e hipotálamo (TRITSCH; SABATINI, 2012).

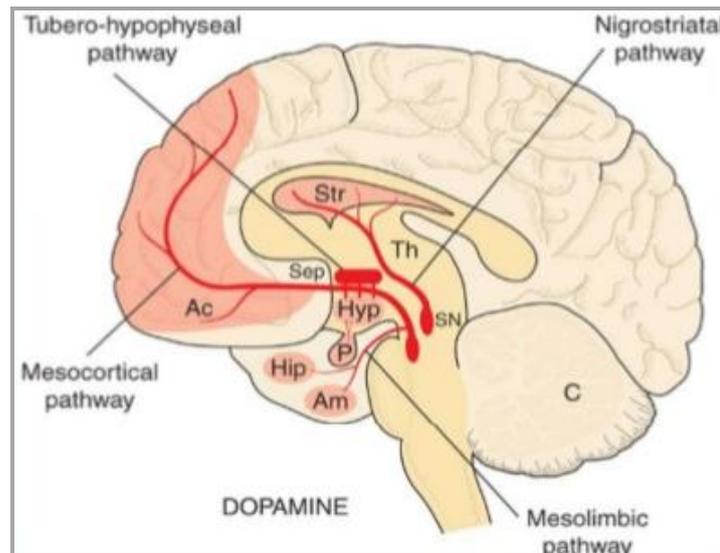
O sistema dopaminérgico no encéfalo forma quatro vias: túberoinfundibular, mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal. De forma geral, o sistema dopaminérgico no SNC modula diversos processos neuronais como cognição, controle motor, humor, sistemas de recompensa, percepção da dor e comportamento sexual (BAIK, 2013; BRICHTA; GREENGARD, 2014).

Os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos provêm, especialmente, de dois locais: da área tegmentar ventral (VTA) e da substância negra no mesencéfalo (DI GIOVANNI et al, 2016) (FIGURA 3). Originadas da VTA (grupo A10), partem fibras que projetam-se ao estriado ventral, sistema límbico e córtex pré-frontal constituindo as vias mesolímbica e mesocortical (LUO; HUANG, 2016).

A via nigroestriatal origina-se na substância negra (grupo A9) e projeta-se ao estriado dorsal (BRICHTA; GREENGARD, 2014). Esta via regula o controle da motricidade voluntária como parte dos circuitos dos núcleos da base (CALABRESI et al, 2014; LUO; HUANG, 2016). A DA liberada na via nigroestriatal modula o funcionamento do trato corticoespinhal, via que conecta as áreas motoras do córtex aos neurônios motores da medula, de forma a ativar ou suprimir o movimento (DI GIOVANNI et al, 2016).

Neurônios dopaminérgicos dispersos também são encontrados em núcleos do nervo vago, núcleo do trato solitário, substância cinzenta periaquedutal da ponte, bulbo olfatório e retina (THADDEU, 2004).

FIGURA 3 – VIAS DOPAMINÉRGICAS



Fonte: RANG et al (2006)

Na DP devido à redução nos níveis estriatais de DA, há um prejuízo na via de sinalização cortico-basal-talâmica mediada pelos gânglios da base, resultando em prejuízos no controle da atividade motora voluntária (THOMAS; BEAL, 2011; GALATI et al., 2015). Com a evolução da doença, outras vias dopaminérgicas podem ser prejudicadas, comprometendo as vias de sinalização mesocortical e mesolímbica (CICCHETTI et al, 2009; FERRER et al, 2011).

2.1.4.2. Formação de corpos de Lewy e Progressão da DP

A segunda característica neuropatológica mais importante na DP é a presença de corpos de Lewy (LB), inclusões protéicas insolúveis no citoplasma dos neurônios (JAGMAG et al, 2016; SONG; KIM, 2016; SPILLANTINI et al, 1997). A presença destes agregados protéicos foi descrita há mais de um século por Friedrich Lewy e é observada no cérebro de pessoas acometidas pela doença (DUNNING et al, 2013; LONGHENA et al, 2017; MCCANN et al, 2016).

Os agregados protéicos podem ser formados por até 100 diferentes proteínas, sendo mais comum a presença da proteína alfa-sinucleína (α -syn) (DUNNING; BRUDING, 2013). A α -syn é normalmente encontrada nas terminações sinápticas, sendo provavelmente relacionada ao transporte de vesículas e à liberação de neurotransmissores, além de interagir com outras proteínas de transmissão sináptica, como SNARE e SNAP (INGELSSON, 2016).

A formação dos LB precede a disfunção e morte neuronal na DP. A conformação anômala da proteína devido a alterações genéticas como mutações, duplicações e triplicações no gene da α -syn corresponderia ao início da forma familiar da doença (VAN DER BRUG et al, 2015). Uma hipótese que explica a sequência de eventos de uma α -sinucleinopatia propõe que, inicialmente, a proteína possui forma natural em monômeros. Devido a fatores endógenos e/ou exógenos (alterações genéticas, intoxicação ambiental e processos oxidativos celulares) formam-se oligômeros, pequenos peptídeos solúveis, também chamados de protofibrilas. Estas, por sua vez, formam fibrilas, que além de prejudicar a função normal da α -syn, a torna tóxica às células (INGELSSON et al, 2016).

Os efeitos tóxicos dos agregados de α -syn para as células são diversos. Contudo, os mecanismos propostos que levam a morte celular e neurodegeneração ainda não estão totalmente esclarecidos (DUNNING et al, 2013; INGELSSON, 2016). Os agregados protéicos levam à formação de espécies reativas de oxigênio, estimulam a micróglia e interferem com a atividade do complexo I mitocondrial reduzindo a síntese de ATP (DUNNING et al, 2013; MCCANN et al, 2016).

Um dos efeitos tóxicos dos LB é a perda da homeostase celular por alteração da permeabilidade de membrana devido à formação de poros na membrana celular. Outro mecanismo apontado para a neurotoxicidade desses agregados protéicos é o aumento da resposta inflamatória por liberação de citocinas e ativação da micróglia. Devido à sua importância na sinalização celular neuronal, os LB são envolvidos na falha na sinalização celular por comprometer a atividade do complexo de proteínas SNARE (DUNNING et al, 2013).

O acúmulo de oligômeros de α -syn ainda promove alterações subcelulares como disfunção do retículo endoplasmático e da mitocôndria (INGELSSON, 2016). Uma significativa e precoce morte neuronal ocorre em áreas do encéfalo implicadas no controle motor como substância negra, córtex motor suplementar, tálamo e grupo A10 da via mesocortical, originada na VTA (MCCANN et al, 2016).

Com base na deposição de α -syn e formação de LB, Braak e colaboradores (2003) propõem um modelo de estadiamento da DP (FIGURA 3). Este modelo baseia-se na premissa de uma correlação entre as regiões do Sistema Nervoso (SN) em que há acúmulo dos LB e a evolução clínica na DP (VISANJI et al, 2013).

Embora a DP seja descrita classicamente como uma degeneração na SN_{pc}, sabe-se que ela acomete áreas extranigrais no SN. Segundo o modelo desenvolvido por Braak, o processo patológico na DP é progressivo e tem uma sequência topográfica previsível, iniciando no tronco encefálico, evoluindo para o diencéfalo e córtex cerebral nos seus estágios finais (BRAAK et al, 2003).

O primeiro estágio corresponderia ao bulbo, mais especificamente, na substância cinzenta própria do bulbo, no núcleo motor dorsal dos nervos vago e glossofaríngeo (IX/X) e núcleo olfatório anterior. A consequência da formação dos LB nessas áreas são alterações do sistema nervoso autônomo e olfato.

Os LB disseminam-se progressivamente até o *locus ceruleus*, formação reticular e núcleos da rafe, levando ao desenvolvimento de distúrbios do sono e distúrbios do humor, como ansiedade e depressão.

No estágio 3, há o comprometimento da parte compacta da substância negra e amígdala. Essa fase corresponde ao início da manifestação dos sintomas motores. Nos estágios mais avançados da doença (4 a 6), há uma exacerbação dos sintomas motores. O acúmulo dos agregados protéicos atinge progressivamente estruturas do neocórtex, levando a prejuízo cognitivo mais intenso, alucinações visuais e mudanças de personalidade (BRAAK et al, 2003; BRAAK et al, 2005).

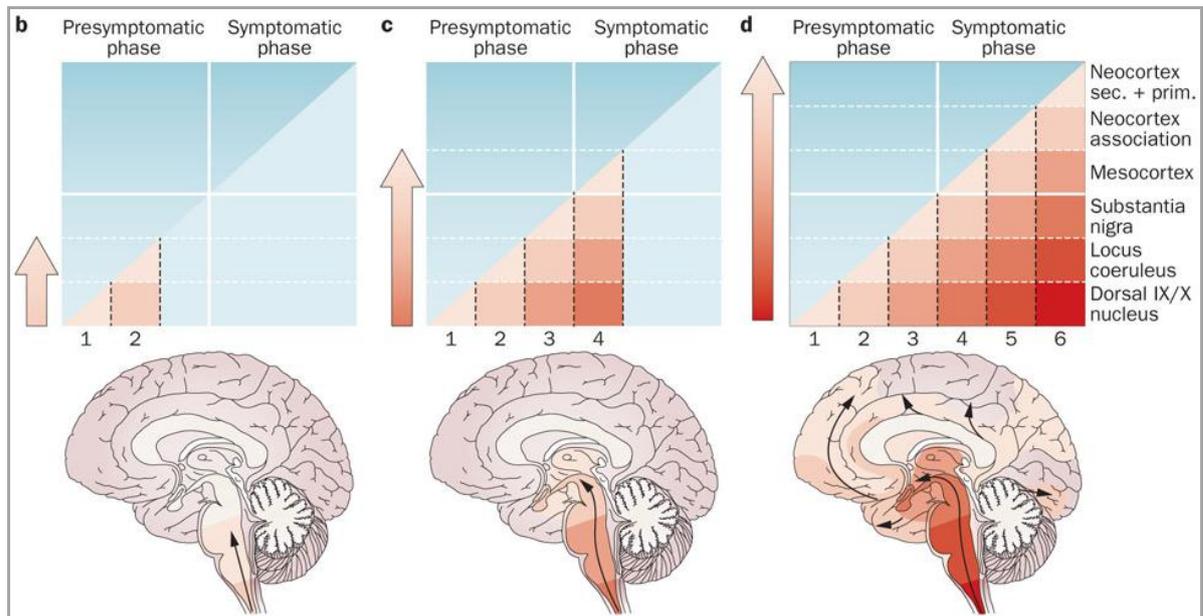
Os estágios 1 e 2 caracterizariam a fase prodrômica, pré-motora ou pré-clínica da DP. No estágio 3, os pacientes apresentarão ou não sintomas motores de parkinsonismo, dependendo do grau de deficiência dopaminérgica da via nigroestriatal (BRAAK et al, 2005).

Nos últimos anos, as pesquisas mostram um mecanismo príon-like na DP, ou seja, uma sequência de eventos que levam a proteína a adquirir uma conformação anômala e disseminar-se pelo SN (DUNNING et al, 2013). Entender o mecanismo príon-like permitiria desenvolver estratégias para bloqueá-lo e impedir toda a sequência de eventos que desencadearia a doença (IRWIN et al, 2017).

Algumas evidências apóiam a hipótese de uma transmissão célula a célula (*cell-to-cell propagation*) dos depósitos protéicos, ou seja, a α -syn pode mover-se de célula para célula por diferentes regiões do sistema Nervoso (LONGHENA et al,

2017). Esta teoria apóia-se na descoberta de LB em pacientes com DP que receberam neurônios transplantados de mesencéfalo embrionário, sugerindo a possibilidade que a forma anômala da α -syn pode ser transmitida a células saudáveis (KORDOWER et al, 2008; LI et al, 2008). Porém, a forma como ocorre essa disseminação dos LB ainda não está clara (DUNNING et al, 2013).

FIGURA 4 – PROGRESSÃO DA DP SEGUNDO BRAAK et al (2003)



FONTE: GOEDERT et al (2013)

2.1.4.3. Mecanismos Moleculares da DP

Embora a etiologia da DP ainda permaneça desconhecida, sabe-se que os processos patológicos da neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade são os prováveis mecanismos causadores da lesão que acomete os neurônios dopaminérgicos e culmina na morte celular (DIAS et al, 2013).

Estudos *post mortem* e modelos *in vivo* sugerem que a DP apresenta um importante componente neuroinflamatório. A micróglia, população de células imunes residentes do SNC, pode ser ativada em resposta à lesão a um estado inflamatório por citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ) produzidos pela própria micróglia ou por astrócitos. Uma vez ativada, a micróglia aumenta a expressão de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos pró-

inflamatórios como prostaglandinas e enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS) (PRINZ; PRILER, 2014).

Uma falha no suprimento de energia para a célula é um mecanismo relacionado à morte celular dopaminérgica. As mitocôndrias são organelas particularmente sensíveis a um evento nocivo, pois esta é responsável pela maior parte da produção de adenosina trifosfato (ATP) na célula. Assim, a ocorrência de disfunções nos complexos da cadeia mitocondrial resultaria em degeneração neuronal como consequência da diminuição da quantidade de ATP produzido. O dano mitocondrial conduz a dois eventos principais: a interrupção da cadeia transportadora de elétrons, devido à perda da homeostase iônica e ao extravasamento do citocromo c no citosol, iniciando a via apoptótica (FRANCO-IBORRA et al, 2015).

Esta disfunção mitocondrial parece ter um componente genético, pois um elevado número de mutações de DNA mitocondrial é observado em pacientes acometidos pela DP (BENDER et al, 2006).

O encéfalo é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto uso de oxigênio e glicose (metabolismo), elevada proporção de ácidos graxos poliinsaturados e presença de metais reativos como ferro e cobre (VALKO et al, 2007). Esta alta atividade metabólica também é um fator que o predispõe a formação de radicais livres. Os radicais livres são espécies químicas contendo um ou mais elétrons desemparelhados na órbita externa, o que lhes confere uma alta reatividade. Esta instabilidade química possui vários efeitos deletérios à célula como a oxidação de biomoléculas, dano ao DNA e peroxidação das membranas. O desequilíbrio entre os sistemas de geração e de eliminação de radicais livres resulta em uma condição chamada de estresse oxidativo (EBADI et al, 1996).

Para eliminação dos radicais livres, existem sistemas naturais antioxidantes, os quais dividem-se em sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. O primeiro inclui enzimas como catalase, superóxido dismutase e sistema glutatona (AHMADINEJAD et al, 2017). A glutatona é um peptídeo tiol que protege as células dos danos decorrentes do estresse oxidativo, por meio da quebra do H_2O_2 utilizando selênio como cofator. No sistema nervoso, a forma reduzida da glutatona (GSH) é um importante mecanismo de prevenção do estresse oxidativo (SMEYNE; SMEYNE, 2013).

Alguns estudos mostram que o sistema dopaminérgico de indivíduos com DP apresenta baixos níveis das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e catalase, (BOVÉ; PERIER, 2012), também sendo encontrados baixos níveis de GSH na substância negra (SMEYNE; SMEYNE, 2013).

Um questionamento muito presente em relação à fisiopatologia da DP é a explicação para a maior suscetibilidade da população neuronal dopaminérgica. Algumas evidências indicam que os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo são mais propensos à neurodegeneração, o que explicaria esta seletividade (BLASZCZYK, 2017; BRICHTA; GREENGARD, 2015), devido à presença de dopamina, altas quantidades de ferro e neuromelanina (SMEYNE; SMEYNE et al, 2013).

2.1.5. QUADRO CLÍNICO

A DP é reconhecida na Neurologia dentro da categoria de distúrbios do movimento, devido ao desenvolvimento da síndrome parkinsoniana. Contudo, além dos sintomas motores, ela implica em alterações cognitivas, psiquiátricas e autonômicas (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

Por isso, é reconhecida como uma doença multissistêmica por comprometer não somente os neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal, mas também áreas serotoninérgicas, noradrenérgicas do tronco cerebral e regiões colinérgicas do córtex frontal e tronco encefálico (GOLDMAN et al, 2014).

A seguir são descritos os sintomas motores e não-motores que compõem o quadro clínico da doença.

2.1.5.1. Sintomas motores

A DP é descrita como um distúrbio motor complexo que apresenta quatro sinais cardinais: bradicinesia, tremor de repouso, rigidez, instabilidade postural (GOLDMAN; POSTUMA et al, 2014; KAKKAR; DAHIYA, 2015; SONG; KIM, 2016).

A bradicinesia refere-se à lentidão e dificuldade em iniciar e executar atos motores voluntários e automáticos. O tremor de repouso de 4 a 6 Hz ocorre quase sempre distalmente em mãos, lábios, queixo e língua, sendo agravado por estresse ou excitação. O paciente também apresenta alterações na marcha, com andar lento, passadas curtas e tendência a arrastar os pés. A bradicinesia da mão dominante

acarreta uma escrita à mão imprecisa com letras pequenas, a chamada micrografia (BERARDELLI et al, 2001; PAULSON et al, 2004).

O início da doença é insidioso e a evolução tem um período de duração variável. A escala de Hoehn e Yahr propõe um modelo de evolução da DP com base nos déficits motores, iniciando-se com comprometimento leve unilateral evoluindo para dependência total e incapacidade física (HOEHN; YAHR, 1967; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

Além dos sintomas descritos acima, os pacientes parkinsonianos apresentam alterações vocais, respiratórias e articatórias compondo um distúrbio chamado de disartria hipocinética. A fala torna-se lenta, monótona, com pausas irregulares (PINTO et al, 2016). Devido à incoordenação e alteração do tônus muscular, aparecem distúrbios de deglutição (disfagia) e rigidez facial (hipomímia) (KAKKAR, DAHIYA, 2015)

Os sintomas motores manifestam-se quando já há a perda de 80% dos neurônios dopaminérgicos e em torno de 60% de depleção da dopamina, devido à capacidade adaptativa dos neurônios remanescentes (PRZEDOBORSKI, 2005).

2.1.6. SINTOMAS NÃO-MOTORES

Frequentemente, um conjunto de sintomas não-motores surge no quadro clínico da DP. Muitas vezes, estes antecedem em muitos anos a manifestação dos primeiros sinais motores (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

Os sintomas não-motores que acompanham a DP são disfunção autonômica, distúrbios do sono, alterações sensoriais, distúrbios gástricos, perda do olfato, ansiedade, depressão, prejuízo cognitivo e demência (KAKKAR; DAHIYA, 2015; MOHAMAD et al, 2015; ZHANG et al, 2016).

Um grande estudo multicêntrico (PRIAMO Study) com uma casuística de 1072 pacientes parkinsonianos mostrou que 98,6% dos pacientes apresentavam sintomas não-motores, sendo os mais comuns fadiga (58%), ansiedade (56%), dor (38%), urgência urinária (37%), sialorréia (31%) e dificuldade de concentração (31%). O aumento dos sintomas psiquiátricos esteve associado quantitativamente a uma pior qualidade de vida (BARONE et al, 2009). Em outro estudo multicêntrico com 1119 pacientes, a presença de sintomas não-motores ocorreu em 70,8% dos casos, sendo que a disfunção olfatória, depressão, apatia e ansiedade foram os sintomas mais freqüentes (ZHANG et al, 2016).

2.1.6.1. Depressão

A depressão é um dos sintomas neuropsiquiátricos mais freqüentes na DP, afetando de 40 a 70% dos pacientes, de acordo com o estágio de evolução da doença (HANGANU et al, 2017). Esta comorbidade afeta negativamente a qualidade de vida e desempenho das atividades de vida diária dos pacientes (LAWRENCE et al, 2014).

Os transtornos depressivos são caracterizados por humor triste, desânimo, redução do interesse e prazer pelas atividades diárias, acompanhada por alterações cognitivas e somáticas, diferindo quanto à etiologia e duração (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS, 2014).

A fisiopatologia da depressão na DP é complexa e não totalmente compreendida. A deficiência de outros sistemas de neurotransmissores além da dopamina, como alterações nos níveis de serotonina (5-HT) e noradrenalina parecem contribuir para o desenvolvimento deste transtorno (POEWE, 2008). A 5-HT regula a liberação de DA nos gânglios da base. Conseqüentemente, uma redução da 5-HT pode estar associada com redução da neurotransmissão dopaminérgica (SANTIAGO et al, 2014). Por outro lado, também são relatadas a perda da inervação dopaminérgica e noradrenérgica *no locus ceruleus*, sistema límbico, córtex cingulado, amígdala e tálamo (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; REMY et al, 2005).

Os transtornos depressivos estão relacionados a alterações estruturais observadas nos exames de neuroimagem funcional. Pacientes com DP mostram reduzida perfusão cerebral na área occipital (PALHAGEN et al, 2009), e alterações volumétricas no lobo frontal quando comparados a pacientes saudáveis (HU et al, 2014).

2.1.6.2. Ansiedade

A ansiedade é um sintoma bastante comum no curso da DP (WEINTRAUB; BURN, 2011). Estima-se que aproximadamente 40% dos pacientes acometidos pela DP experimentam sintomas de ansiedade no curso da doença. Estes sintomas podem variar desde ansiedade generalizada, transtorno do pânico, fobia social e transtorno obsessivo-compulsivo (AMINIAN; STRAFELLA, 2013).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionadas.

As características principais do transtorno de ansiedade generalizada são ansiedade e preocupação persistentes e excessivas em variadas situações que o indivíduo encontra dificuldade em controlar. Além disso, são experimentados sintomas físicos como inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, tensão muscular e perturbação do sono (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS, 2014)

2.1.6.3. Declínio cognitivo e demência

A memória é um termo amplo que descreve uma série de processos cognitivos responsáveis pela codificação, armazenamento, consolidação e recuperação das informações (COSTA et al, 2014).

O prejuízo cognitivo é bastante freqüente na DP (BALDÍVIA et al, 2011). Os pacientes podem desenvolver desde um comprometimento cognitivo mais leve até casos de demência, observados nos estágios mais tardios (DAVIS; RACETTE, 2016; SCHENEIDER et al, 2015). O perfil cognitivo na DP é heterogêneo com déficits categorizados em diferentes domínios: atenção, funções executivas, visuoespaciais e fluência verbal (GOLDMAN; POSTUMA, 2014; GRATWICKE et al, 2015).

A prevalência estimada para os déficits cognitivos é de 19 a 36% (AARSLAND et al, 2009; MUSLIMOVIC et al, 2005; SVENNINGSSON et al, 2012), sendo mais freqüente e grave nos estágios avançados da doença (EVANS et al, 2011). A demência é mais comum nos pacientes mais idosos e com mais tempo de desenvolvimento da doença (EVANS et al, 2011; GRATWICKE et al, 2015). Os fatores de risco para demência incluem idade avançada, progressão rápida, anosmia e subtipo não-tremor dominante (SHOJI et al, 2014).

No DSM-5 encontra-se a classificação “Transtorno Neurocognitivo maior ou leve devido à Doença de Parkinson”, um tipo de declínio cognitivo que ocorre no contexto da DP. Este transtorno tem como características principais: apatia, humor deprimido, humor ansioso, alucinações, delírios, mudanças da personalidade, transtorno comportamental do sono com movimento rápido dos olhos e sonolência excessiva durante o dia (MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DOS TRANSTORNOS MENTAIS, 2014).

Estudos prévios de neuroimagem funcional relacionam as deficiências executivas a hipoativação da via fronto-estriatal, que conecta o córtex pré-frontal ao estriado e tálamo. Pacientes com demência e DP apresentam degeneração dopaminérgica da via mesocortical, em especial nas suas projeções para a ínsula via receptores D2. Além disso, há hipoativação, atrofia e hipometabolismo de estruturas do lobo temporal medial como hipocampo, giro para-hipocampal, córtex entorrinal e perirrinal e amígdala, as quais estão envolvidas com armazenamento e recuperação da memória (GRATWICKE et al, 2015).

Outra entidade clínica semelhante à DP é a demência por corpos de Lewy. Nesse caso, há uma associação entre parkinsonismo, alucinações visuais, disfunção autonômica e demência. Porém, a demência manifesta-se já nos períodos iniciais da doença, anterior ao aparecimento dos sintomas motores (SVENNINGSSON et al, 2012).

2.1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença é fundamentalmente clínico. Um diagnóstico definitivo somente é possível por meio de uma autópsia *post mortem* do tecido cerebral (FEARNLEY; LESS, 1991). Porém, um diagnóstico provável é obtido mediante anamnese e detalhado exame clínico neurológico (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

Algumas características podem alertar o médico sobre a presença da doença como um tremor de repouso unilateral, bradicinesia do membro inferior, perda da destreza manual, redução do balanceio dos braços ao caminhar e fadiga. Segundo os critérios estabelecidos pela UK *Parkinson's disease Society Brain Bank* o diagnóstico da DP pode ser firmado diante da presença de bradicinesia associada a outro sintoma motor, como rigidez, tremor de repouso ou instabilidade postural (MASSANO, 2011).

Os exames de neuroimagem são particularmente úteis para um diagnóstico diferencial entre a DP idiopática e outras formas de parkinsonismo secundário, já que não há anormalidades típicas da DP. A diferenciação da DP com outras formas de parkinsonismo é de grande importância, pois outras doenças ou efeitos iatrogênicos de drogas podem expressar sintomas parkinsonianos (KASHMERE et al, 2002).

Alguns estudos com exames de imagem como *Positron Emission Tomography* e *Single Photon Emission Computed Tomography* (PET e SPECT) podem quantificar a dopamina e a atividade metabólica em algumas regiões do cérebro. Porém, como recurso diagnóstico estes métodos apresentam algumas limitações que necessitam ser aperfeiçoadas (ALDAKHEEL et al, 2014).

Atualmente, uma tendência promissora para um diagnóstico mais preciso e precoce da doença é o desenvolvimento de biomarcadores. Os biomarcadores são medidas objetivas que atuam como indicadores de um processo patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (SCHAPIRA, 2013).

As pesquisas em curso para desenvolver estes biomarcadores baseiam-se em métodos de imagem, bioquímicos e genéticos. Uma das técnicas mais promissoras baseia-se na detecção do acúmulo da proteína α -syn na forma de agregados ou LB em fluidos corporais como líquor (UNTERBERGER et al, 2014), saliva, sangue (MOLLENHAUER et al, 2017) e também em biópsias de glândulas e mucosas (ADLER et al, 2016; KIM et al, 2016). Outros biomarcadores incluem a dosagem de interleucinas (DE FARIAS et al, 2017) e o perfil da microbiota intestinal (SCHEPERJANS et al, 2014).

2.1.8. TRATAMENTO

O tratamento da DP permanece sintomático, pois até o momento, não há tratamento capaz de reverter a doença ou impedir o seu avanço (KASHMERE et al, 2002; SARKAR et al, 2016).

Desde a década de 1960, sabe-se que a degeneração dopaminérgica do sistema nigroestriatal é responsável pelos sintomas da DP. Desde então, o tratamento farmacológico tem como princípio a reposição de dopamina, por meio de sua precursora L-dopa. Geralmente, a L-dopa é administrada em associação com a carbidopa, um inibidor da dopa-descarboxilase, a qual bloqueia a conversão periférica da levodopa em DA, minimizando seus efeitos adversos periféricos (SCHAPIRA, 2005).

Outros fármacos também são utilizados como agonistas dopaminérgicos e inibidores da degradação de DA (HERRERO et al, 2011). As primeiras são utilizadas como opção inicial em relação à terapia dopaminérgica, pois possuem um menor efeito para o desenvolvimento de discinesias e flutuações motoras (CONSTANTINESCU, 2008).

O início da terapia de reposição dopaminérgica é um tema controverso, já que o uso crônico da Levodopa causa tolerância e sensibilização, necessitando-se de uma dose cada vez maior da droga para se obter a resposta terapêutica. Além disso, o uso continuado também pode levar a flutuações motoras e discinesias de difícil manejo clínico (OBESO et al, 2006; TEIVE, 2005).

2.2. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

Os modelos animais são uma importante ferramenta para o entendimento da fisiopatologia da doença, assim como para testes de novas formas de intervenção terapêutica (KURNIK; THOR, 2015). É desejável que um modelo possa reproduzir a fisiopatologia, os sintomas e os mecanismos patológicos observados nos pacientes (BEAL, 2001; TIEU, 2011).

Os modelos permitem avaliar os mecanismos e os principais processos celulares na DP, como neuroinflamação, neurodegeneração, estresse oxidativo e morte celular (HERNANDEZ-BALTAZAR et al, 2015).

Um modelo animal ideal para a DP deveria mimetizar as principais características neuropatológicas da doença como a degeneração dopaminérgica da SNpc e as inclusões protéicas neuronais (corpos de *Lewy*), os principais sintomas motores e não-motores e ser responsivo às opções terapêuticas existentes atualmente. Ainda, o início idade-dependente e o caráter progressivo da doença deveriam ser manifestados (TIEU, 2011). Entretanto, nenhum dos modelos disponíveis atualmente é capaz de satisfazer de forma plena a todos estes requisitos (JAGMAG et al, 2016).

Os modelos animais para a DP dividem-se em duas grandes categorias: modelos genéticos e modelos com toxinas (TIEU, 2011). Os modelos genéticos baseiam-se na deleção ou mutação de genes (PARKIN, LRRK2, por exemplo) de forma semelhante ao que é observado nos casos familiares da DP. Estes apresentam como vantagem a seleção de genes alvo e possíveis vias de sinalização envolvidas na patogenia da DP em humanos. Contudo, não são capazes de simular o fenótipo e evolução da doença (TIEU, 2011).

Já os modelos com toxinas têm como premissa o uso de substâncias tóxicas que lesam a via nigroestriatal. Essas toxinas induzem a morte celular, via interrupção da cadeia mitocondrial ou aumento do estresse oxidativo na célula (KURNIK; THOR, 2015; TIEU, 2011).

O primeiro modelo animal a ser desenvolvido para o estudo da DP, o qual foi de grande importância para ajudou a elucidar a importância do neurotransmissor DA para o controle do movimento foi a reserpina. Desde então, diferentes modelos foram estabelecidos com a característica comum da degeneração dopaminérgica, embora possuam mecanismos de ação e prejuízos comportamentais distintos (BOVÉ; PERIER, 2012). Atualmente, os modelos com toxinas mais utilizados são o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), rotenona, paraquat e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (JAGMAG et al, 2016; KURNIK; THOR, 2015).

O MPTP é uma neurotoxina lipofílica que causa lesão nigroestriatal muito próxima àquela observada na DP. Ele atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e é convertida a MPP+ pela ação da enzima MAO-B. Devido à sua alta afinidade pelo transportador de DA, é captado pelos neurônios dopaminérgicos e armazenado na mitocôndria, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (BEAL, 2001).

Assim como observado no MPTP, a rotenona é uma toxina altamente lipofílica com elevada afinidade a um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BEAL, 2001). Reproduz as características clínicas da DP, em especial a formação dos agregados protéicos citoplasmáticos (JAGMAG et al, 2016).

Já a toxicidade do Paraquat (N,N-dimethyl-4,4-bipyridiniumdichloride) ocorre por aumento do estresse oxidativo na célula por meio da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio. A degeneração dopaminérgica resultante induz a formação dos LB (CICCHETTI et al, 2005).

2.2.1. 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)

A 6-OHDA é uma neurotoxina análoga à dopamina, diferindo apenas pela presença de um grupo hidroxila adicional (FIGURA 4). Foi identificada há quase 50 anos, sendo muito empregada como modelo da DP em animais.

A 6-OHDA é seletiva tanto a neurônios dopaminérgicos quanto a neurônios noradrenérgicos devido à sua alta afinidade por transportadores de dopamina e noradrenalina (KURNIK; THOR, 2015; TIEU, 2011).

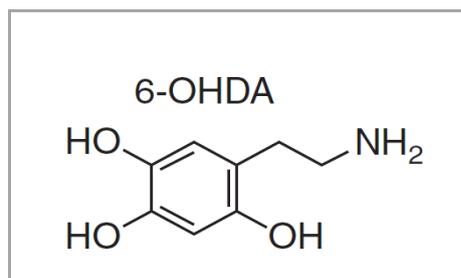
Para Hernandez-Baltazar et al (2015) há três mecanismos de citotoxicidade causada pela 6-OHDA: a formação de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido; a formação de peróxido de hidrogênio pela enzima monoaminoxidase e a interrupção da cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência, estes

processos culminam na formação de espécies reativas de oxigênio, levando a morte celular.

Devido às suas propriedades hidrofílicas, a 6-OHDA é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, necessitando ser infundida diretamente no encéfalo por estereotaxia. Os locais de infusão podem ser três regiões principais: SN_{pc}, feixe prosencefálico medial ou estriado (KURNICK; THOR, 2015; JAGMAG et al, 2016). Observa-se que as características da lesão diferem de acordo com a estrutura em que é infundida a neurotoxina. Quando realizada na substância negra ou no feixe prosencefálico medial, há uma rápida e completa lesão da via nigroestriatal (TIEU, 2011). Já quando esta é liberada no estriado, instaura-se um processo de morte neuronal mais lento com degeneração retrógrada da via nigroestriatal ao longo de três semanas (TIEU, 2011).

Em uma injeção unilateral de 6-OHDA, o comportamento rotatório pode ser observado após a administração de um agonista dopaminérgico como a apomorfina (BEAL, 2001). O modelo 6-OHDA pode ser utilizado para testar sintomas motores e não motores, como depressão, ansiedade e memória, além de dor, distúrbios do sono e disfunção gastrointestinal que compõem o quadro clínico da DP (KURNICK; THOR, 2015). Neste modelo, a presença de corpos de *Lewy* não é observada (JAGMAG et al, 2016).

FIGURA 5: ESTRUTURA DA 6-OHDA



Fonte: Adaptado de TIEU (2011)

2.3. ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3

Os ácidos graxos (AG) correspondem a uma classe de lipídios que apresentam uma estrutura química semelhante formada por uma cadeia de hidrocarbonetos contendo um grupo carboxila em uma extremidade e um grupo metil em outra extremidade. Os ácidos graxos podem ser classificados pelo número de carbonos, número de insaturações na cadeia e a posição da primeira insaturação.

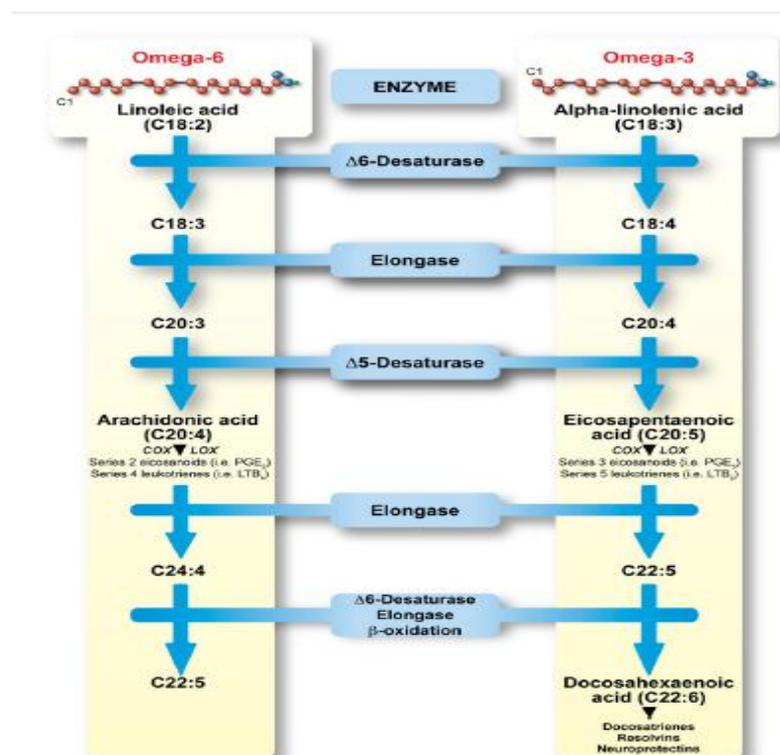
Ácidos graxos com mais de 2 duplas ligações na cadeia de hidrocarbonetos são chamados de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) (CALDER, YAKOUB, 2009).

Os ácidos graxos ω -3 (ω -3) são AG poliinsaturados, sendo que a primeira ligação dupla localiza-se no carbono 3 (carbono ω), contado a partir da extremidade metil (BOUSQUET et al, 2011; CALDER, 2012). O ácido α -linoléico (18:2; ω -3) é o ω -3 mais simples, sendo sintetizado a partir do ácido linoléico por ação da enzima delta-15 dessaturase. Esta enzima é ausente nos seres humanos, o que torna este um ácido graxo essencial, ou seja, ele não pode ser sintetizado endogenamente havendo a necessidade de ser obtido por meio da dieta (CALDER; YAKOUB, 2009).

Os PUFA's ω -6 possuem uma ou mais duplas ligações sendo que a primeira se localiza no carbono 6 a partir da extremidade metil. O ácido linoléico (C18:2), principal tipo de ω -6 é convertido a ácido araquidônico (C20:4), sendo posteriormente transformado em eicosanoides e leucotrienos (JUMP, 2002).

No processo de biossíntese de PUFA'S ω -3, o ácido α -linoléico pode ser convertido a vários ácidos graxos de cadeia longa, sendo os principais o ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) e ácido docosahexanóico (DHA) (C22:6). A via de biossíntese de ω -3 é demonstrada na figura 6 (BOUSQUET et al, 2011).

FIGURA 6: BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS ω -3



Fonte: BOUSQUET et al (2011)

As principais fontes alimentares de PUFA's ω -3 são os óleos encontrados em peixes como sardinha, salmão, truta, atum (ROSS, 2015) e óleos vegetais como linhaça, canola e soja (ARTERBURN et al, 2006).

Devido a mudanças no comportamento alimentar na sociedade ocidental, com aumento no consumo de alimentos industrializados, gorduras saturadas e *trans*, a ingestão média de ω -3 reduziu em 20% nos últimos 150 anos. Porém, houve um aumento expressivo do consumo de alimentos ricos em ω -6, consumido de 5 a 10 vezes mais que o ω -3 (KAUR et al, 2014).

Como os ácidos graxos ω -3 e ω -6 são substratos das mesmas enzimas nas suas vias metabólicas, existe uma competição entre o ALA e o LA. Assim, um maior consumo de PUFA's ω -6 leva a um aumento expressivo nas concentrações de AA, um precursor de uma ampla gama de mediadores pró-inflamatórios (ARTERBURN et al, 2006). Esta desproporção tem sido associada um estado inflamatório crônico com uma maior tendência a ocorrência de doenças cardíacas e infarto cerebral (SIMOPOULOS, 1999).

Os PUFA's ω -3 e ω -6 são ingeridos na forma de triacilgliceróis, sendo digeridos no intestino delgado e transportados pelo sangue ligados a proteínas plasmáticas como a albumina até os tecidos. O destino destes pode seguir três vias diferentes: a β -oxidação para produzir energia na forma de ATP; esterificação para outros lipídios como triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídios de membrana; e conversão para outros produtos de cadeia longa ou outros produtos insaturados. A maior parte do ALA dietético sofre β -oxidação nas mitocôndrias e somente uma pequena fração fica disponível para conversão para EPA e DHA (KAUR et al, 2015).

Os PUFA'S são importantes componentes das membranas celulares, em especial no encéfalo. Os ácidos graxos compõem 10% do peso seco do cérebro, sendo que o DHA é o ácido graxo mais abundante no organismo. No cérebro, o DHA representa de 12 a 16% dos ácidos graxos totais da substância cinzenta (JULIEN et al, 2016).

Os ácidos graxos ω -3 apresentam importantes propriedades fisiológicas. Eles são importantes componentes estruturais das membranas, pois como são esterificados aos fosfolipídios atuam na alteração de propriedades físicas da membrana, como na regulação da fluidez, movimento dos lipídios, criação dos *lipid rafts* (HAMILTON, BRUNNALDI, 2007; BOUSQUET et al, 2011).

Também desempenham importantes funções intracelulares pela modificação da expressão e da atividade de receptores, transportadores e canais iônicos na membrana celular (CALDER et al., 2009; BOUSQUET et al., 2011).

Os PUFA's ω -6 são precursores de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos. Já PUFA's ω -3 exercem efeito fisiológico oposto por ter efeito antiinflamatório via estimulação de mediadores lipídicos como resolvinas e protectinas (BOUSQUET et al, 2011; CALDER; YAQOUB, 2009). Resolvinas e protectinas tem uma importante função na proteção celular e tecidual contra processos inflamatórios por apresentarem papel anti-inflamatório e imunomodulatório (CALDER et al, 2009).

A importância da ingestão adequada de AG ω -3 está sendo demonstrada em diversas enfermidades, como diabetes (TOORANG et al, 2016), câncer (BLACK; RHODES, 2016; D'ELISEO; VELOTTI, 2016), depressão (ARBABI et al, 2014) e doenças cardiovasculares (MULERO et al, 2015).

2.4. ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E DOENÇA DE PARKINSON

O tratamento atual para a DP não é capaz de reverter a doença ou eficaz em impedir sua progressão. Assim, na atualidade, há uma procura crescente por terapias neuroprotetoras a partir de compostos capazes de retardar ou limitar a degeneração neuronal em estágios precoces (STOCCHI; OLANOW, 2013; SARKAR et al, 2016).

Observa-se um número significativo de evidências mostrando que os ácidos graxos ω -3 são fundamentais para o correto funcionamento das funções neurais. Eles aumentam a expressão de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e GDNF (fator neurotrófico derivado da glia). Também são capazes de regular os processos oxidativos celulares, por promover o equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante da célula (BOUSQUET et al, 2011). Por outro lado, dietas muito deficientes em ω -3 podem provocar significativas alterações bioquímicas e morfológicas no cérebro em desenvolvimento (LEE et al, 2015; AHMAD et al, 2008).

Evidências obtidas por meio de estudos clínicos mostram que o consumo de ω -3 pode reduzir o risco para doenças neurodegenerativas, entre elas a Doença de Alzheimer e a DP (BOUSQUET et al, 2008).

Um estudo populacional verificou que a dieta mediterrânea, particularmente rica em ω -3, estava associada com uma menor incidência de DP (GAO et al, 2007). O mesmo foi verificado em outro estudo de coorte longitudinal em que um menor risco para DP era observado em pessoas com alto consumo de ω -3 (DE LAU et al, 2005).

Ácidos graxos ω -3 também estão implicados na modulação da neuroinflamação, processo observado em diferentes condições neurológicas, entre elas a DP. Cerca de 90% do DHA e ARA são ligados a fosfolípidios de membranas, enquanto a proporção restante pode ser utilizada como substrato para síntese de mediadores inflamatórios ou pró-resolvinas. Os PUFA's EPA e DHA são mediadores de pró-resolvinas, atuando na resolução do processo inflamatório e facilitando o retorno à homeostase (TREPÁINER et al, 2016).

Estudos pré-clínicos mostram que a ingestão de PUFAs ω -3 pode ter um efeito neuroprotetor diante da lesão em modelos animais (BOUSQUET et al, 2008). Um estudo em um modelo de DP induzida pela neurotoxina MPTP, a suplementação com ácidos graxos ω -3 (DHA) durante 30 dias aumentou a imunorreatividade a tirosina-hidroxilase (OZSOY et al, 2011).

Luchtman et al (2012) observaram nos animais suplementados (ração + 0,8% EPA) uma redução da toxicidade do MPTP com maior incorporação de DHA no cérebro dos animais, acompanhada de redução dos níveis de TNF- α and IFN- γ , se comparada aos controles. Um resultado semelhante também foi verificado por Ji et al (2012) com um modelo de injeção direta de lipopolissacarídeo (LPS) na substância negra. A suplementação da dieta com 15% do óleo de peixe foi capaz de minimizar a reação inflamatória.

Delattre et al (2010) realizaram a suplementação crônica com ω -3 anteriormente à lesão com 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. No grupo suplementado houve aumento na incorporação de DHA na SNpc (36%) e córtex cerebral (30%), associado ao aumento do *turnover* da dopamina pela relação DOPAC/DA e redução da peroxidação lipídica. Barros et al (2016) também observaram redução da peroxidação lipídica nos animais tratados e redução dos níveis de nitrito.

Um trabalho com modelo de DP induzida por LPS a suplementação materna foi eficaz em prevenir o déficit de memória apresentado pelos filhotes lesados (DELATTRE et al, 2016).

Outro estudo recente propôs que os PUFA's ω -3 revertem a ativação microglial e a liberação de espécies reativas de oxigênio, por redução na produção de óxido nítrico sintase, enzima pró-inflamatória ativada na morte neuronal. Este potencial antioxidante também influenciaria na redução do processo inflamatório (MORI et al, 2017).

Diante da revisão da literatura realizada verifica-se que a ingestão de ω -3 pode prevenir a ocorrência da DP ou atenuar os sintomas. Entretanto, há escassez de estudos testando o potencial efeito neuroprotetor do ω -3 frente aos sintomas neuropsiquiátricos, como nos comportamentos tipo depressivo, ansioso e déficit de memória em modelo animal de DP a partir de lesões provocadas pela neurotoxina 6-OHDA em animais adultos. Da mesma forma, os mecanismos que explicam este efeito neuroprotetor não foram totalmente elucidados.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar se a suplementação subcrônica com ácidos graxos ω -3 apresenta efeito neuroprotetor pela prevenção das alterações comportamentais observadas em ratos adultos lesados pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

3.2. Objetivos específicos

- Testar o efeito da suplementação com ácidos graxos ω -3 em relação ao desenvolvimento do comportamento tipo depressivo em ratos lesados com 6-OHDA.
- Avaliar o efeito da suplementação com ácidos graxos ω -3 em relação ao desenvolvimento do comportamento tipo ansioso em ratos lesados com 6-OHDA.
- Verificar se a suplementação com ácidos graxos ω -3 apresenta efeito nootrópico nos ratos lesados com 6-OHDA.
- Avaliar o efeito da suplementação com ácidos graxos ω -3 na capacidade antioxidante neuronal em relação aos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no estriado e córtex cerebral nos ratos lesados com a 6-OHDA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos linhagem *Wistar* com 90 dias de vida e peso entre 280 a 320 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais eram mantidos em caixas de moradia feitas de polipropileno forradas com aparas de madeira, em grupos de 5, em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclo de claro/escuro de 12 h, sendo as luzes acesas às 7 horas. Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água durante os experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/UEPG, processo nº 9514/2016). Durante a execução dos experimentos, todos os cuidados necessários foram observados para minimizar os desconfortos causados aos animais de acordo com as práticas bioéticas de experimentação animal, conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (CONSELHO NACIONAL DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2013).

4.2. Delineamento experimental

No total, foram utilizados 49 animais, os quais foram distribuídos em 4 grupos: grupo falso lesado e tratado com salina (SHAM/salina, n=12); grupo falso lesado e tratado com ω -3 (SHAM/OP, n=12); grupo lesado e tratado com salina (6-OHDA/salina, n=14) e grupo lesado e tratado com ω -3 (6-OHDA/OP, n=11).

Aos grupos tratados, foi administrado via gavagem o óleo de peixe contendo ácidos graxos ω -3 pelo período de 21 dias. No 15º dia de tratamento, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão da neurotoxina 6-OHDA na SNpc. Nos grupos SHAM foi realizada a cirurgia estereotáxica, mas os animais receberam solução salina ao invés da infusão da neurotoxina 6-OHDA.

Os testes de comportamento ocorreram a partir do 21º dia após a lesão. O cronograma de testes obedeceu a uma ordem crescente de acordo com estresse imposto ao animal, de forma a minimizar o estresse gerado por um teste no comportamento do teste seguinte. A ordem para os testes foi: preferência à sacarose, campo aberto, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos, e natação forçada. Previamente, ao início do estudo, foi realizado um teste de

preferência à sacarose basal, para selecionar os animais que possuíam a preferência à sacarose, de forma a evitar um viés no resultado do teste.

Após o término dos testes, os animais foram decapitados e seus cérebros dissecados para retirada do estriado, córtex frontal e mesencéfalo para análises posteriores.

4.3. Tratamento

O tratamento consistiu na administração de óleo de peixe contendo ácidos graxos ômega-3 (ω -3) via gavagem na dose de 2g/kg/dia. A concentração de ω -3 no óleo de peixe administrado foi de 50% de DHA e 20% de EPA (Figura 7). Cápsulas de OP foram doadas pela *Herbarium Botânico S/A*® (lote 160793) e em cada dia do experimento, o óleo foi aspirado das cápsulas para uma seringa e administrado por cânulas de gavagem no volume calculado a partir do peso corporal. Para a realização do procedimento, foi utilizada uma cânula de gavagem de 8 cm de comprimento com ponta arredondada, a qual era introduzida na cavidade oral e gentilmente empurrada desde a faringe até o estômago. O peso dos animais era aferido a cada 3 dias para realização do cálculo da dose de ω -3 a ser administrada. O tratamento com óleo de peixe foi realizado durante o período de 21 dias, isto é, iniciado no 14º dia antes e encerrando-se no 7º dia após a realização da lesão por cirurgia estereotáxica.

FIGURA 7 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS CÁPSULAS DE OP

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção de 0,828 g (1 cápsula)		
	Quantidade por porção	%VD*
Valor energético	5 kcal=21 kJ	0%
Gorduras totais, das quais:	0,6 g	1%
Gorduras saturadas	0 g	0%
Gorduras trans	0 g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,1 g	**
Gorduras poli-insaturadas	0,5 g	**
Ômega 3 DHA (ácido docosahexaenoico)	300 mg	**
Ômega 3 EPA (ácido eicosapentaenoico)	120 mg	**
Colesterol	0 mg	**
Não contém quantidades significativas de proteínas, carboidratos, fibra alimentar e sódio.		
*Percentual dos Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.**VD não especificado.		

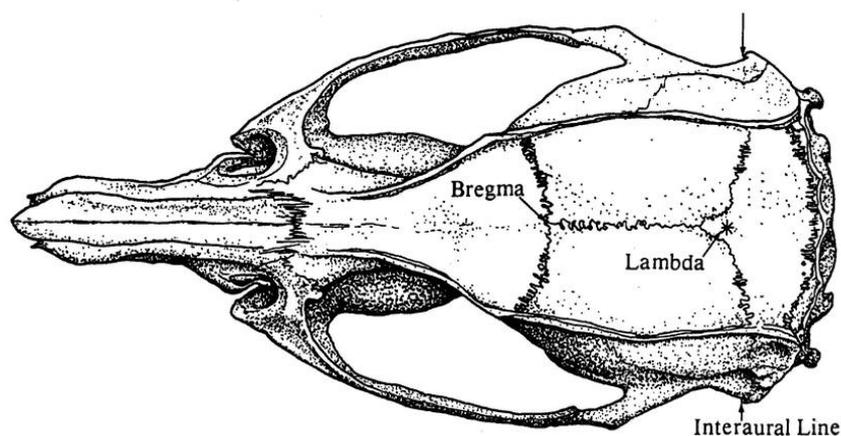
Fonte: Laboratório Herbarium Botânico.

4.4. Cirurgia estereotáxica

A realização da cirurgia estereotáxica ocorreu conforme o protocolo utilizado por Fontoura (2016). Para a realização do procedimento, foi realizada anestesia geral do animal com Tiopental 50 mg/kg, via intra-peritoneal cerca de 10 minutos antes da cirurgia. A seguir, realizou-se a tricotomia da região craniana. Em seguida, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, sendo administrada a anestesia local com Lidocaína (2%) 0,2 mL, via subcutânea. Com uma lâmina de bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 3 cm e o afastamento da pele e do músculo epicrânio. Após a exposição da superfície do crânio, foi localizado o bregma, local de fusão das suturas frontal e coronal do crânio e ponto de referência para determinação dos locais para inserção da agulha e injeção da neurotoxina 6-OHDA (ou solução salina) na SNpc do animal. De acordo com a localização do bregma, eram calculadas as coordenadas estereotáxicas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). As coordenadas utilizadas foram:

- Anteroposterior (AP) – 5,0 mm do bregma;
- Médio-lateral (ML) \pm 2,1 mm da linha média;
- Dorsoventral (DV) – 7,8 mm do crânio;
- Barra nasal – 3,3 mm (figuras 8 e 9).

FIGURA 8: LOCALIZAÇÃO DO BREGMA NO CRÂNIO DO RATO



FONTE: PAXINOS; WATSON (1997)

FIGURA 9: LOCAL DA INFUSÃO DA NEUROTOXINA 6-OHDA NA SNpc

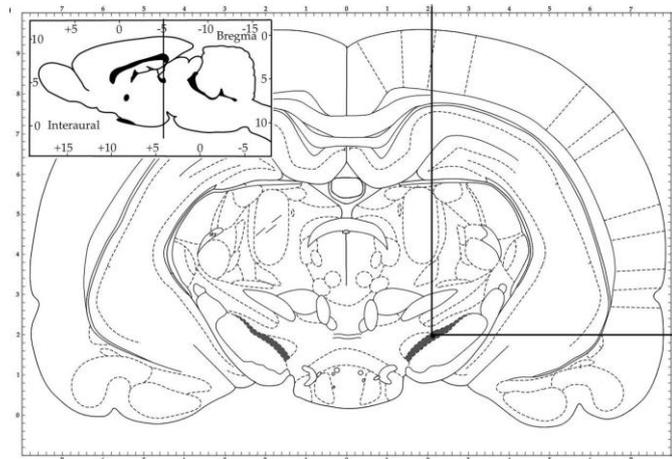


Figura 9. O local de infusão da neurotoxina é representado no ponto de intersecção entre as retas, correspondendo à SNpc, de acordo com as coordenadas descritas acima.
Fonte: PAXINOS; WATSON (1997)

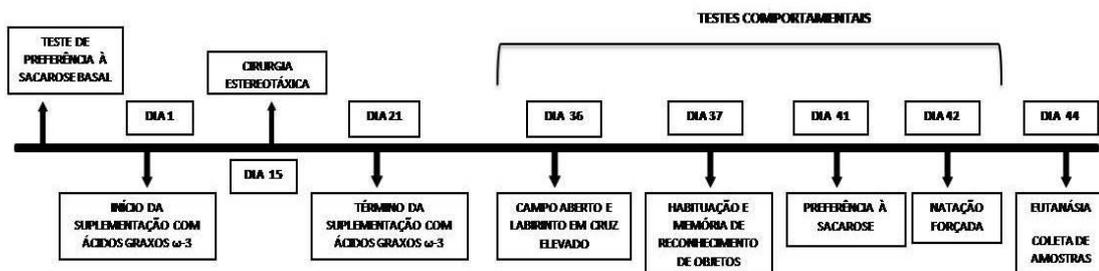
O crânio foi perfurado com uma broca de baixa rotação (BELTEC LB2000) e a agulha inserida até o ponto obtido de acordo com a coordenada dorsoventral. A infusão da neurotoxina ou solução salina foi realizada por meio de agulha gengival calibre 30 G conectada a uma microseringa Hamilton de 25 μL , por um tubo de polietileno ligado a uma bomba infusora (Harvard Apparatus®) com fluxo de 0,25 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. Cada microinfusão de 1 μL durou 4 minutos, sendo a agulha mantida no local por mais 2 minutos para evitar refluxo da solução e então, lentamente removida do crânio. A neurotoxina 6-OHDA foi solubilizada em ácido ascórbico 0,2% em solução de cloreto de sódio 0,9% (salina) no dia da cirurgia. A infusão da neurotoxina ou solução salina foi bilateral, sendo infundidos 6 μg em cada hemisfério, no volume de 1 μL , na substância negra *pars compacta*. Ao término da cirurgia, os animais foram suturados, sendo administrado antibiótico de uso veterinário (Benzilpenicilina Potássica 5.000.000 UI) na dose de 1 mL/Kg por via intramuscular, para profilaxia de infecções bacterianas decorrentes do procedimento. Após a realização da cirurgia, o animal foi aquecido e mantido em caixa individual até a total recuperação do procedimento, retornando posteriormente à sua caixa original.

4.5. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados três semanas (21 dias) após a realização da cirurgia estereotáxica. Os animais foram submetidos às mesmas

condições experimentais, sendo que os testes foram realizados no mesmo período do dia e filmados para a análise posterior. A ordem dos testes ocorreu de acordo com o cronograma a seguir (figura 10).

FIGURA 10 – CRONOGRAMA EXPERIMENTAL



Fonte: a autora.

4.5.1. Teste do Campo Aberto

O teste de campo aberto tem como objetivo avaliar a capacidade motora (SANTIAGO et al, 2014). O campo aberto consiste de uma caixa quadrada com área de 1 m² e com o piso dividido em 25 quadrados menores (20 x 20 cm) (figura 11). Os ratos eram colocados no centro da caixa, podendo explorar livremente este ambiente durante 5 minutos. Os parâmetros avaliados no teste foram a ambulação, de acordo com o registro do número de linhas cruzadas e o número de atos de levantar (*rearing*). Após cada teste, a caixa era higienizada com uma solução de etanol 5% para que o odor deixado pelo animal não interferisse no teste do animal seguinte.

FIGURA 11: TESTE DE CAMPO ABERTO



Fonte: a autora

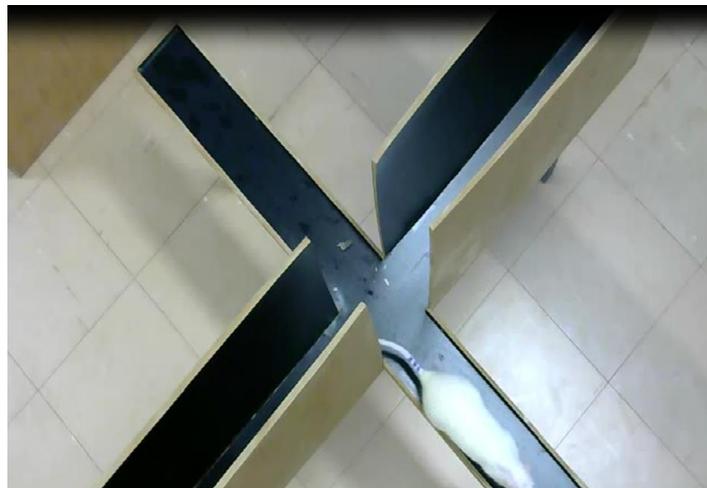
4.5.2. Teste de labirinto em cruz elevado

Este teste tem como finalidade avaliar o comportamento de ansiedade em ratos (PÊGO et al, 2008). O labirinto em cruz elevado é formado por dois braços abertos e dois braços fechados formando uma plataforma suspensa a uma altura aproximada de 50 cm do nível do solo (figura 12). O teste permite avaliar os seguintes parâmetros:

- Tempo de permanência nos braços abertos e fechados e na intersecção entre eles.
- Frequência de passagens nos braços abertos, braços fechados e no centro do labirinto.

Após cada sessão experimental, o labirinto era limpo cuidadosamente com papel toalha e álcool 5%, para que os odores deixados pelo animal não tivessem influência no teste seguinte.

FIGURA 12: TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



Fonte: a autora

4.5.3. Teste de reconhecimento de objetos

Este teste permite avaliar a memória de reconhecimento. O aparato utilizado para o teste era uma caixa quadrada com área de 1 m² e com o piso dividido em 25 quadrados menores (20 x 20 cm). O teste foi realizado em 4 dias consecutivos, sendo 3 dias para habituação do animal ao aparato de teste e 1 dia para a realização do teste propriamente dito, conforme protocolo adaptado de Ennaceur e Delacour (2000) . Nas três sessões de habituação, o animal era colocado no aparato

de teste durante o período de 10 minutos sem a presença de nenhum objeto. O objetivo da habituação prévia ao teste era adaptar o animal ao aparato para que o mesmo não se tornasse aversivo e influenciasse na performance do teste. No 4º dia, o teste foi realizado em 2 momentos, com intervalo de 30 minutos entre cada exposição. Inicialmente, foram colocados dois objetos idênticos no aparato, cada qual estando em um dos lados da caixa a uma distância aproximada de 10 cm das paredes. O animal era colocado no centro do aparato, tendo ele 5 minutos para investigar estes objetos. O comportamento de investigação era considerado quando o animal aproximava-se ao menos dois centímetros a sua narina do respectivo objeto. Após 30 minutos do primeiro período de investigação, o animal era recolocado no aparato, porém, um dos objetos utilizados no primeiro período de investigação era substituído por um novo objeto, tendo o animal novamente 5 minutos para investigá-los.

Com os valores referentes ao tempo de investigação no segundo período do teste, foi calculado o índice de discriminação (*ID*). O ID é obtido pela diferença entre o tempo gasto pelo animal na exploração do novo objeto (*b*) em relação ao objeto já conhecido (*a*) em razão do tempo total de exploração de ambos os objetos (*e2*), sendo calculado pela seguinte fórmula:

$$ID = b-a/e2$$

FIGURA 13 – TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

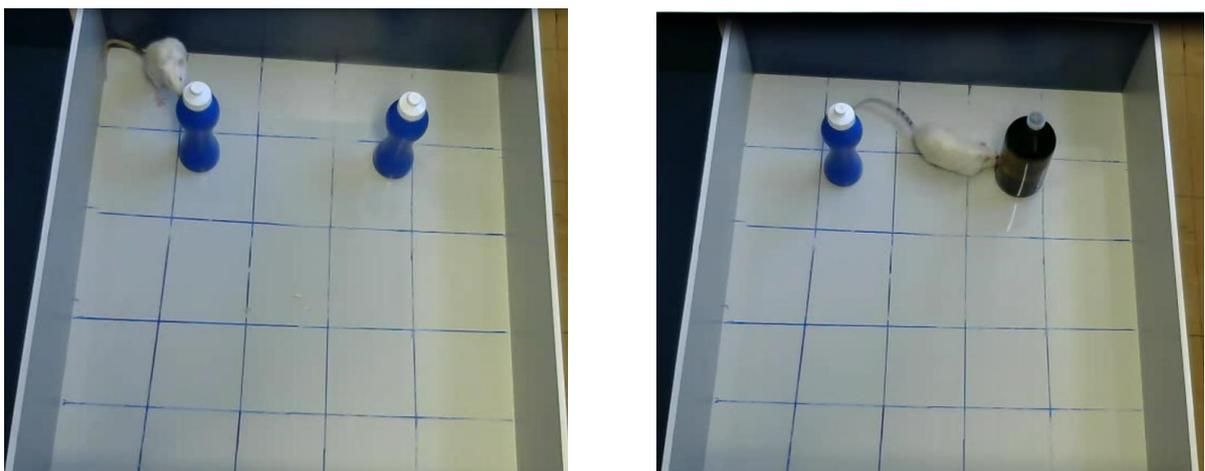


Figura 13. Teste de reconhecimento de objetos. À esquerda, está representada a exploração dos objetos idênticos da 1ª apresentação. Na figura da direita, o 2º período de investigação com 2 objetos diferentes, realizado 30 minutos após a 1ª apresentação.

Fonte: a autora

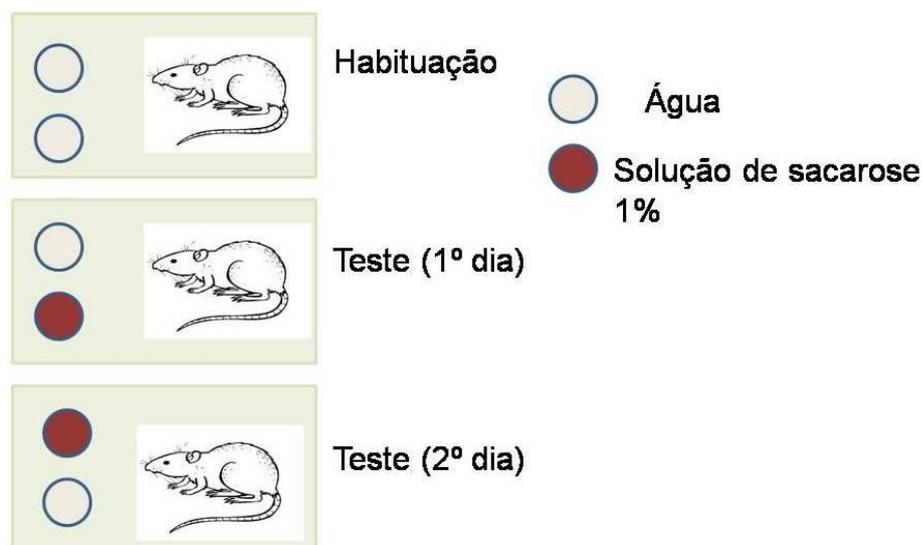
4.5.4. Teste de preferência à sacarose

Este teste tem como objetivo medir a anedonia nos animais (WANG et al, 2009). Os animais eram transferidos a caixas de moradia individuais com acesso livre a alimentação. Cada rato tinha acesso a duas garrafas com água durante a fase de 24 h de habituação, a fim de adaptar os animais à ingestão dos líquidos das duas garrafas. Após a fase de adaptação, a água de uma das garrafas foi substituída por solução de sacarose a 1% e 24 h depois as garrafas eram invertidas de sua posição inicial de forma a evitar a perseverança do animal por um dos lados. O consumo de água e da solução de sacarose foi estimado pela diferença dos pesos iniciais e finais de cada garrafa em relação ao consumo total de líquidos:

$$\text{Consumo de sacarose (\%)} = \frac{\text{peso inicial da garrafa} - \text{peso final da garrafa} * 100}{\text{Consumo total de líquidos}}$$

Antes da cirurgia, foi realizado um teste basal para selecionar os ratos que apresentassem preferência pela sacarose, sendo que os animais com preferência por sacarose menor que 70% foram excluídos do estudo (7 animais no total). A realização do teste é esquematizada na figura 14.

FIGURA 14 – TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE



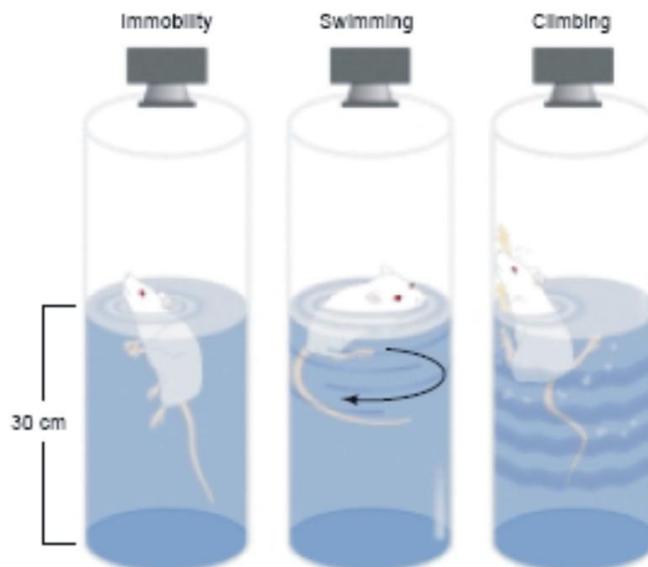
Fonte: a autora.

5.5. Teste de natação forçada

Este teste permite avaliar o comportamento tipo depressivo dos animais (PORSOLT, 1978). O teste se desenvolveu em duas etapas: uma sessão treino e o teste propriamente dito com um intervalo de 24 h entre eles. Os ratos foram submetidos a natação forçada em um tanque cilíndrico com 50 cm de altura e 20 cm de diâmetro impassível de fuga, contendo água em uma profundidade de 30 cm, a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. O teste consistiu em 2 momentos, uma sessão treino e outra sessão teste. Durante a sessão treino, os animais eram colocados no recipiente durante 15 minutos para adaptação. Após 24 horas da sessão de treino, era realizada a sessão teste também com duração de 5 minutos. O teste de natação forçada permite avaliar os seguintes parâmetros: tempo de imobilidade (immobility), escalada (climbing) e natação (swimming). O comportamento de imobilidade corresponde à manutenção de atividade mínima para que o animal mantivesse sua cabeça acima da superfície da água. O comportamento de escalada consiste em movimentos das patas dianteiras dirigidos para cima na lateral do cilindro de natação. O comportamento de natação foi definido como movimentos, em geral, horizontais, por toda a extensão do cilindro (SLATTERY; CRYAN, 2012). Estes comportamentos são ilustrados na figura 15.

Entre um teste e outro, a água do recipiente era trocada para que os odores deixados pelo animal não tivessem influência no teste seguinte. Os testes foram filmados para análise posterior.

FIGURA 15- TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA



4.6. Dissecação do tecido cerebral

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram guilhotinados com a finalidade de realizar a dissecação para retirada do estriado, córtex cerebral e mesencéfalo para análises posteriores.

4.7. Concentração da glutathiona reduzida (GSH) no estriado e córtex cerebral

A atividade enzimática da GSH foi avaliada por meio do protocolo proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Inicialmente, as amostras de estriado e córtex cerebral foram homogeneizadas com EDTA 0,02 M (proporção 1:10). Alíquotas (400 µL) do homogenato foram misturadas com 400 µL de água destilada (diluição 1:2). Novas alíquotas (400 µL) foram adicionadas a 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético 50 % (p/v) (Vetec®) para a precipitação de proteínas. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm (4°C) por 15 minutos. O sobrenadante (400 µL) foi misturado com 800 µL de tampão Tris/HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 µL de DTNB (*5,5''-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*, Sigma-Aldrich®) (0,01 M). A mistura foi agitada e a absorbância lida em espectrofotômetro (Biotek® Synergy H1 Hybrid Reader) a $\lambda = 412$ nm (as leituras foram feitas em quadruplicata). Uma curva padrão foi preparada com concentrações de GSH entre 0,1 mM a 1 mM. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em µg de GSH por grama de tecido (µg/g).

4.8. Análise Estatística

Previamente a realização dos experimentos, foi realizado um cálculo amostral com base em trabalhos publicados por outros grupos envolvendo comportamentos de ratos lesados na via nigroestriatal (Santiago et al., 2014). Os cálculos foram realizados utilizando o programa GPower 3.1 Germany (FAUL et al, 2007). Este cálculo resultou em 12 animais por grupo (n=48). Contudo, devido a mortes ocorridas no decorrer dos experimentos e à distribuição dos grupos houve um número diferencial de animais em cada grupo, totalizando 49 animais.

Os dados foram previamente testados para avaliar normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Sminorv. A análise dos dados foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newmann-Keuls. Os dados obtidos foram expressos em média \pm o erro padrão da média (e.p.m). No teste de preferência à sacarose, o consumo de sacarose antes e após a lesão foi avaliado por ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Bonferroni. As

diferenças entre os grupos eram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPadPrism® 5.01.

5 RESULTADOS

5.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

5.1.1. TESTE DO CAMPO ABERTO

Conforme apresentados nos gráficos 1, 2 e 3 para os resultados obtidos no teste de campo aberto em relação aos parâmetros ambulação ($F=1,910$, $p=0,141$) (gráfico 1), *rearing* ($F=1,476$, $p= 0,233$) (gráfico 2) e tempo de imobilidade ($F=0,494$, $p= 0,687$) (gráfico 3), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

GRÁFICO 1 – AMBULAÇÃO NO TESTE DE CAMPO ABERTO

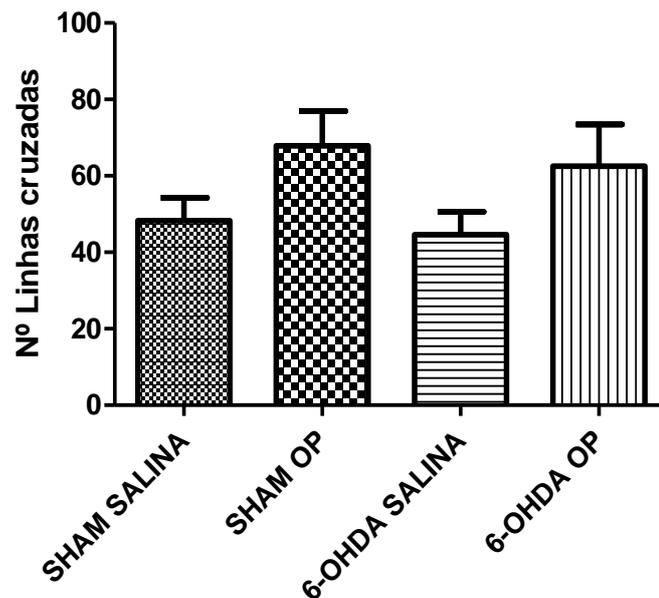


Gráfico 1. Ambulação no teste de campo aberto. Este parâmetro foi avaliado com base no número de linhas cruzadas (eixo y) no piso do campo aberto no período de 5 minutos em relação aos grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média ± SEM do número de linhas cruzadas pelos animais no piso do campo aberto (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 2 – REARING NO TESTE DE CAMPO ABERTO

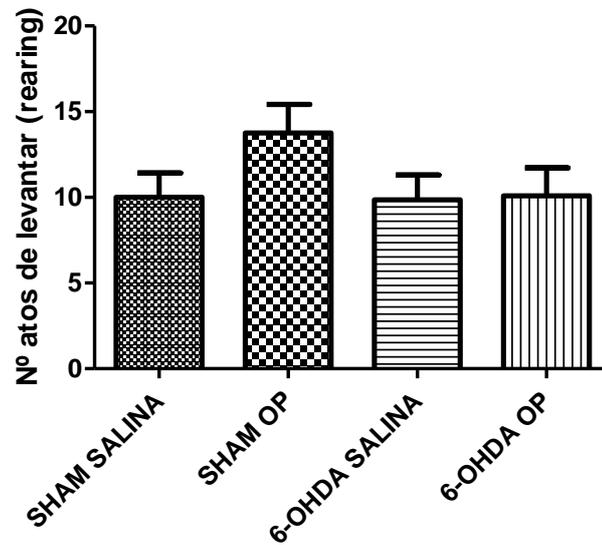


Gráfico 2. *Rearing* no teste de campo aberto. O *rearing* foi avaliado pelo número de atos de levantar (eixo y) realizadas pelo animal no campo aberto no período de 5 minutos quanto aos 4 grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número de vezes que os animais realizaram o comportamento de exploração vertical (*rearing*) no campo aberto (ANOVA de uma via +Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 3 – TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE CAMPO ABERTO

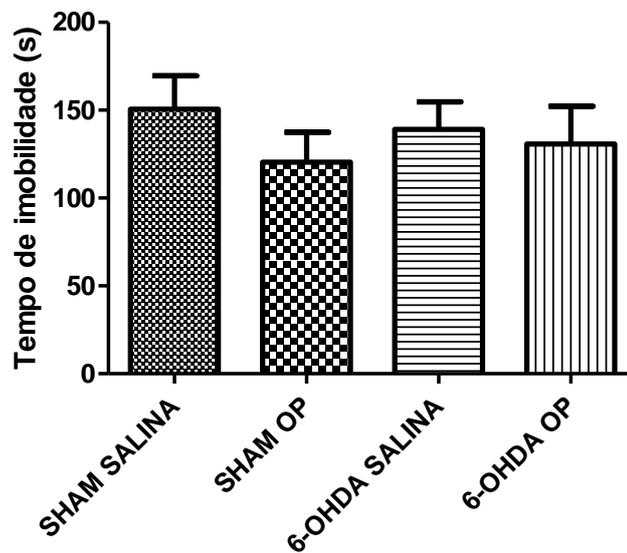


Gráfico 3. Tempo de imobilidade no teste de campo aberto. O eixo y apresenta os dados referentes ao tempo (s) em que os animais não apresentaram atividade motora no teste de campo aberto no período de 5 minutos. Os dados foram expressos como média \pm SEM do tempo de imobilidade no campo aberto (ANOVA de uma via + Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

5.1.2. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

No teste do labirinto em cruz elevado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os parâmetros analisados: porcentagem de tempo gasto no braço aberto ($F= 1,816$, $p= 0,164$), número de entradas no braço aberto ($F= 0,5224$, $p= 0,6691$), porcentagem de tempo gasto no braço fechado ($F= 0,6765$, $p= 0,5723$), número de entradas no braço fechado ($F= 0,1682$, $p= 0,9173$), porcentagem de tempo gasto no centro ($F= 0,1173$, $p= 0,9495$) e número de passagens pelo centro ($F= 0,2670$, $p= 0,8489$).

Os dados referentes a estes parâmetros são apresentados nos gráficos 4 a 9.

GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE TEMPO GASTO NO BRAÇO ABERTO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

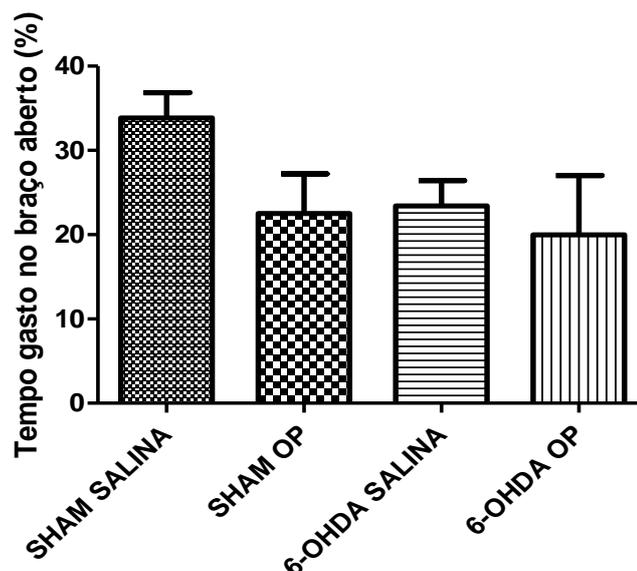


Gráfico 4. Tempo de permanência no braço aberto no teste de labirinto em cruz elevado. O tempo de permanência é representado em percentual (%) em relação aos quatro grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM da porcentagem de tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 5 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

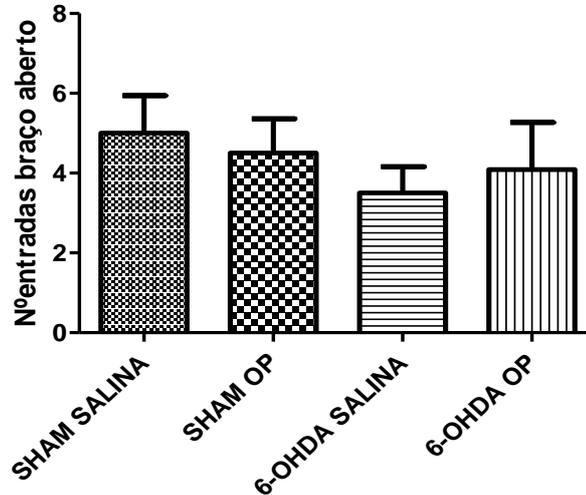


Gráfico 5. Número de entradas (eixo y) do animal no braço aberto do labirinto em cruz elevado realizado pelos animais dos 4 grupos analisados (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 6 – PORCENTAGEM DE TEMPO GASTO NO BRAÇO FECHADO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

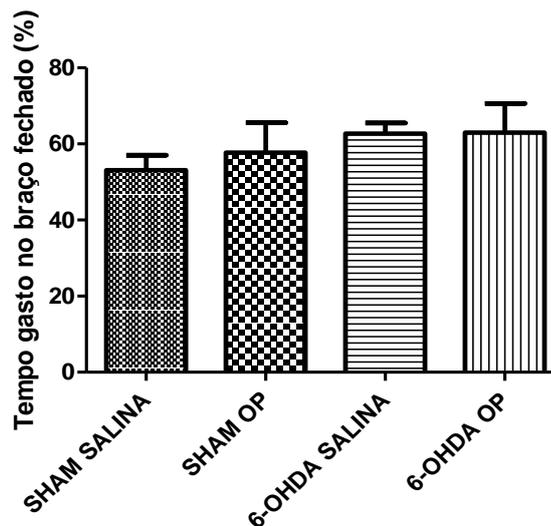


Gráfico 6. Tempo de permanência no braço fechado no teste de labirinto em cruz elevado. O tempo de permanência é representado em percentual (%) em relação aos quatro grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM da porcentagem de tempo gasto no braço fechado do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 7 – NÚMERO DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

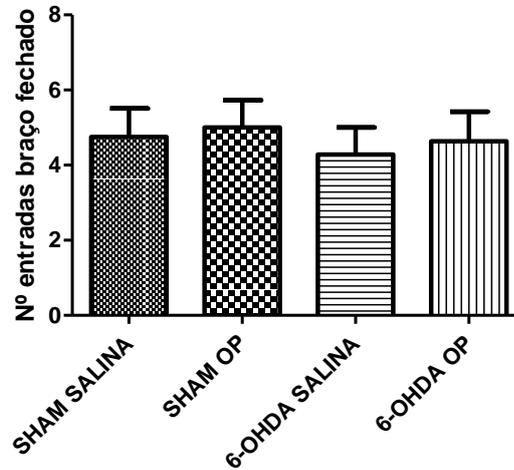


Gráfico 7. Número de entradas (eixo y) do animal no braço fechado do labirinto em cruz elevado realizado pelos animais dos 4 grupos analisados (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 8 – PORCENTAGEM DE TEMPO DE GASTO NO CENTRO (%) NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

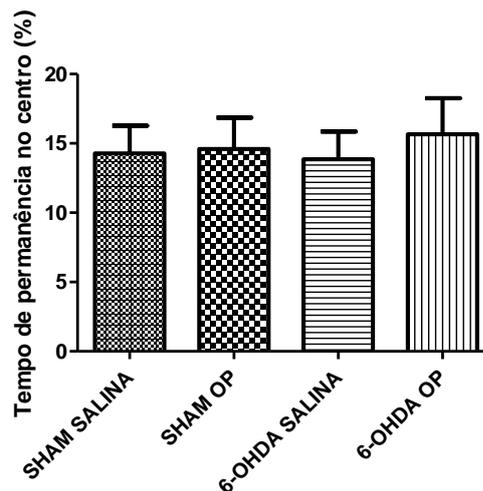


Gráfico 8. Tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado. O tempo de permanência é representado em percentual (%) em relação aos quatro grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM da porcentagem de tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 9 – NÚMERO DE PASSAGENS PELO CENTRO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

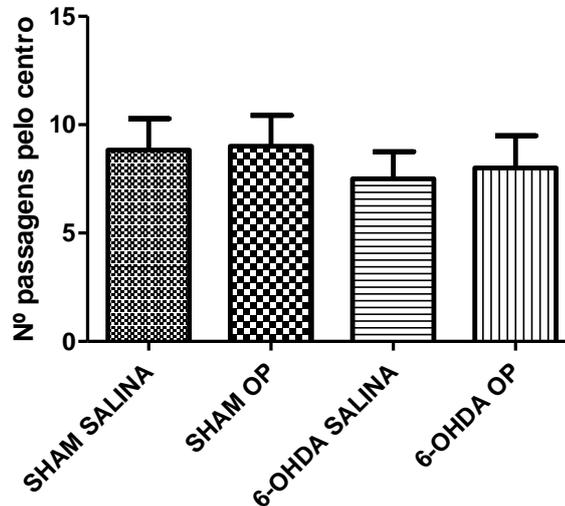


Gráfico 9. Número de passagens do animal (eixo y) no centro do labirinto em cruz elevado realizado pelos animais dos 4 grupos analisados (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM do número de passagens pelo centro do labirinto em cruz elevado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

5.1.2. TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O gráfico 10 mostra os valores referentes ao índice de discriminação (ID) obtidos no teste de memória de reconhecimento de objetos. O grupo lesado não-tratado (6-OHDA/salina) apresentou índice de discriminação significativamente menor que os demais grupos ($F= 5,196$; $p=0,005$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores apresentados pelo grupo 6-OHDA/OP em relação ao grupo 6-OHDA/salina, sendo que este não diferiu do grupo SHAM/salina.

O gráfico 11 apresenta os dados obtidos quanto ao tempo total de exploração dos objetos.

GRÁFICO 10 – ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

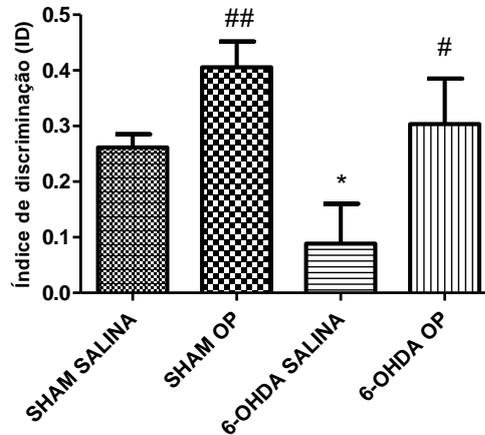


Gráfico 10. Índice de discriminação (ID) no teste de memória de reconhecimento de objetos. O ID é calculado pela diferença no tempo de exploração do objeto novo (b) e do tempo de exploração do objeto já conhecido (a), pelo tempo total de exploração destes dois objetos (e2), representado pela seguinte fórmula: $d2 = \frac{b-a}{e2}$. Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes ao índice discriminação (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). * $p < 0,05$ se comparado ao grupo SHAM/salina; # $p < 0,05$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina; ## $p < 0,01$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina.

GRÁFICO 11– TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

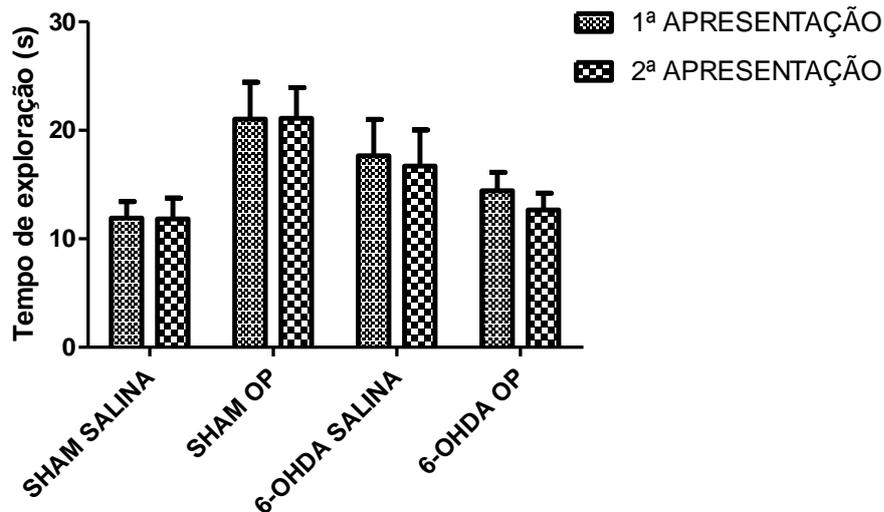


Gráfico 11. Índice de habituação correspondente ao tempo total de exploração dos objetos no teste de memória de reconhecimento de objetos. São mostrados os valores obtidos no treino (1ª apresentação) no teste (2ª apresentação). Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes ao índice de reconhecimento (ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni).

5.1.4. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

No teste de natação forçada, para o parâmetro imobilidade, o grupo 6-OHDA/salina apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior em relação aos demais grupos ($F= 5,453$; $p=0,0028$).

No parâmetro tempo de natação ($F= 8,146$; $p=0,002$), observou-se um tempo significativamente menor do grupo 6-OHDA/salina se comparado aos outros grupos. Não foi verificada uma diferença estatisticamente significativa no parâmetro tempo de escalada ($F= 0,2475$; $p= 0,8627$). Os dados referentes ao teste de natação forçada são apresentados nos gráficos de 13 a 15.

GRÁFICO 12 – TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

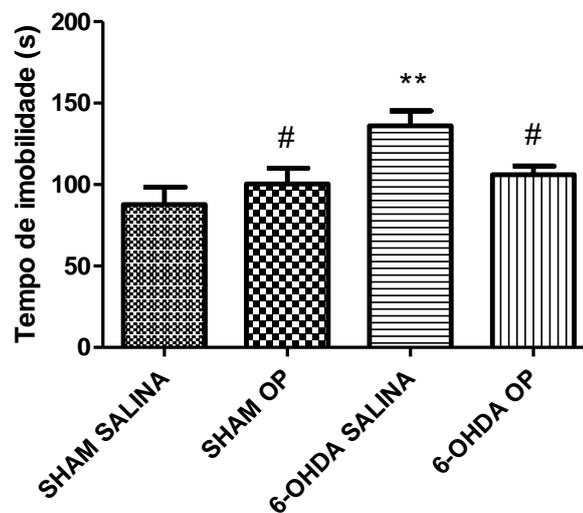


Gráfico 12. Tempo de imobilidade no teste de natação forçada, sendo que o eixo y representa o tempo de imobilidade (s) e o eixo x os grupos analisados. Os dados foram expressos como média \pm SEM do tempo de imobilidade dos animais no teste de natação forçada (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). ** $p<0,01$ se comparado ao grupo SHAM/salina; # $p<0,05$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina; ## $p<0,01$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina.

GRÁFICO 13 – TEMPO DE NATAÇÃO NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

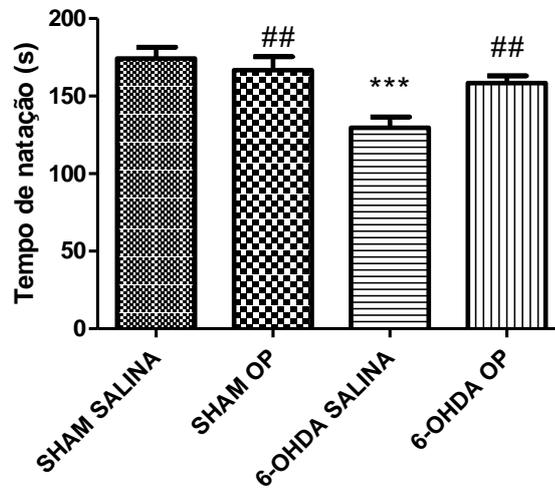


Gráfico 13. Tempo de natação no teste de natação forçada, sendo que o eixo y representa o tempo de imobilidade (s) e o eixo x os grupos analisados. Os dados foram expressos como média \pm SEM do tempo de natação dos animais no teste de natação forçada (ANOVA de uma via+Newman-Keuls) *** $p < 0,005$ se comparado ao grupo SHAM/salina; ## $p < 0,01$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina.

GRÁFICO 14 – TEMPO DE ESCALADA NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

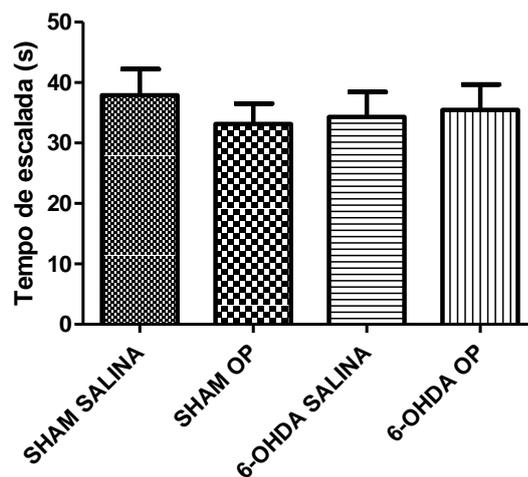


Gráfico 14. Tempo de escalada no teste de natação forçada. O eixo y representa o tempo de imobilidade (s) e o eixo x os grupos analisados. Os dados foram expressos como média \pm SEM do tempo de escalada dos animais no teste de natação forçada (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

5.1.5. TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

Conforme apresentado no gráfico 16, o consumo de sacarose no grupo 6-OHDA/salina foi significativamente menor se comparado ao grupo SHAM/salina e ao grupo SHAM/OP ($F= 6,402$; $p=0,001$). Entretanto, tal diferença não foi observada no grupo 6-OHDA/OP (lesado e suplementado) se comparado aos grupos SHAM.

Em relação ao consumo total de líquidos, que expressa a soma do consumo da solução de sacarose e do consumo total de líquidos (água+solução de sacarose), não houve diferença significativa entre os grupos analisados ($F= 0,3125$; $p= 0,8162$) (gráfico 17).

O gráfico 18 apresenta um comparativo entre o teste prévio de preferência à sacarose (anteriormente à suplementação e à lesão) e o teste realizado 21 dias após a lesão da via nigroestriatal. É possível observar que o grupo 6-OHDA/salina apresentou redução significativa no consumo de sacarose após a lesão. Um efeito semelhante também foi verificado no grupo 6-OHDA/OP.

GRÁFICO 15 – CONSUMO DE SACAROSE NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

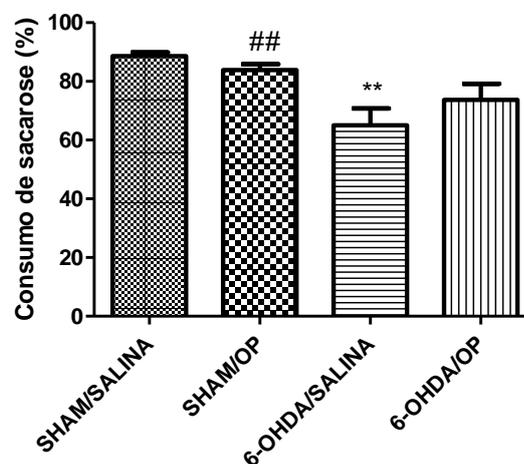


Gráfico 15. Percentual de consumo de sacarose (eixo y) para os diferentes grupos (eixo x). Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes ao percentual de consumo de sacarose (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). ** $p<0,01$ se comparado ao grupo SHAM/salina ; ## $p<0,01$ se comparado ao grupo 6-OHDA/salina.

GRÁFICO 16 – CONSUMO TOTAL DE LÍQUIDOS NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

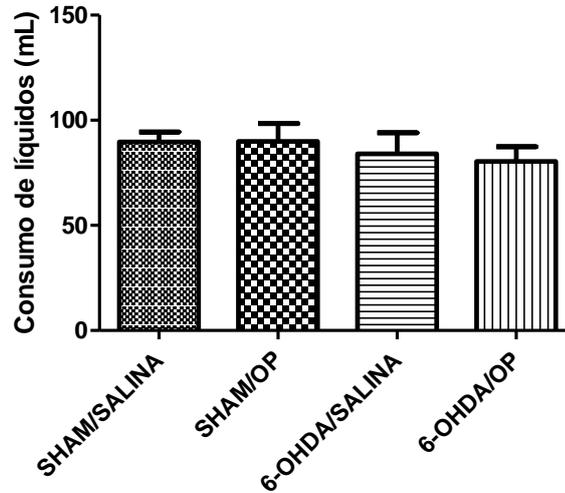


Gráfico 16. Consumo total de líquidos (mL) para os diferentes grupos (eixo x) no teste de preferência à sacarose. O consumo total de líquidos representa o consumo de água + consumo de sacarose. Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes ao consumo total de líquidos (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 17 – CONSUMO DE SACAROSE ANTES E APÓS A LESÃO NO TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

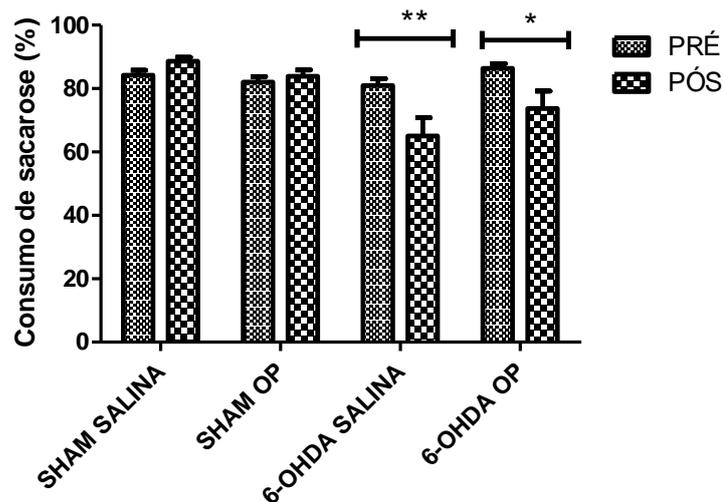


Gráfico 17. Percentual de consumo de sacarose no período antes e depois da lesão com 6-OHDA. Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes ao percentual do consumo de sacarose (ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Bonferroni). * $p < 0,05$ na diferença pré/pós; ** $p < 0,005$ na diferença pré-pós.

5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NO ESTRIADO E CÓRTEX CEREBRAL

Os gráficos 19 e 20 apresentam os resultados referentes à concentração de GSH ($\mu\text{g/g}$) verificadas no estriado e córtex cerebral. Tanto no estriado ($F= 1,588$; $p=0,2236$) quanto no córtex cerebral ($F= 1,119$; $p= 0,3800$) os níveis de glutathiona reduzida não diferiram significativamente entre os grupos.

GRÁFICO 18- CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NO ESTRIADO

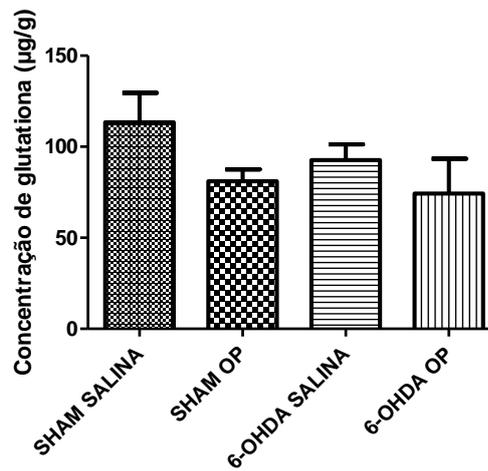


Gráfico 18. Concentração de glutathiona no estriado ($\mu\text{g/g}$). Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes à concentração de glutathiona reduzida ($\mu\text{g/g}$) no estriado (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

GRÁFICO 19- CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NO CÓRTEX CEREBRAL

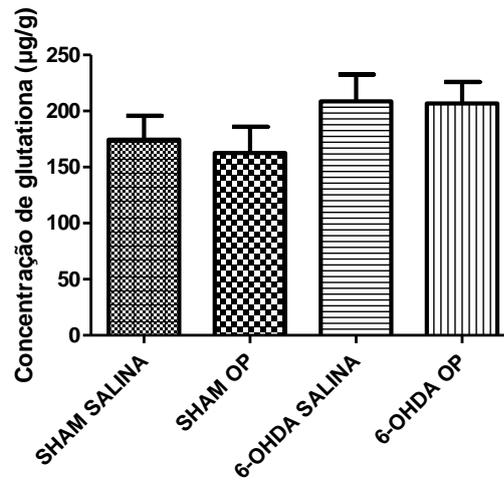


Gráfico 19. Concentração de glutathiona no córtex cerebral (µg/g). Os dados foram expressos como média \pm SEM dos valores referentes à concentração de glutathiona reduzida (µg/g) no córtex cerebral (ANOVA de uma via+Newman-Keuls). Não houve diferença estatística.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou se a administração subcrônica de ácidos graxos ômega-3 (ω -3) apresenta uma resposta neuroprotetora frente às alterações comportamentais induzidas pela infusão bilateral da neurotoxina 6-OHDA na SNpc de ratos adultos.

Os resultados observados no teste de campo aberto mostraram não haver diferença significativa entre os grupos avaliados para os parâmetros ambulação, *rearing* (exploração vertical) e tempo de imobilidade. Este teste é utilizado para medir a capacidade locomotora dos animais e verificar a existência de algum tipo de prejuízo de mobilidade diante da infusão da neurotoxina.

Portanto, a lesão com 6-OHDA não alterou a atividade motora dos animais, o que significa que a degeneração dopaminérgica resultante da lesão foi insuficiente para produzir os sintomas motores da DP, resultado também observado em trabalhos anteriores (SANTIAGO et al, 2014). Outro trabalho mostrou que a infusão de 6 μ g/ μ L da neurotoxina na SNpc alterou a capacidade locomotora do animal no 1º dia após a lesão, ocorrendo recuperação da atividade motora nos períodos seguintes (SANTIAGO et al, 2010). Este déficit motor inicial pode ser atribuído à intensa neurotoxicidade no local de infusão, sendo amenizada por um efeito compensatório representado pelos mecanismos de plasticidade dos neurônios remanescentes (BJORKLUND et al, 1997; PERRY et al, 2005).

Diante do resultado observado no teste de campo aberto, descarta-se a existência de um prejuízo motor que interfira no desempenho dos animais nos demais testes comportamentais. Da mesma forma, também pode-se considerar que a suplementação com OP não apresentou efeito sobre a atividade motora dos ratos.

O teste de labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar se a lesão com 6-OHDA causou comportamento tipo ansioso e se a suplementação com ω -3 preveniria este tipo de comportamento. O objetivo do teste é induzir o chamado “conflito aproximação-esquiva”, em que o animal deseja explorar o novo ambiente, mas ao mesmo tempo, possui uma aversão natural a locais abertos (FILQUEIRAS et al, 2014). Por isso, o teste é utilizado como avaliação pré-clínica de drogas ansiolíticas, que teriam como efeito o aumento do tempo de exploração dos braços abertos (PELLOW; FILE, 1986).

Em animais com lesão na via nigroestriatal, espera-se que o animal desenvolva um comportamento tipo ansioso, caracterizado pela redução do tempo de permanência nos braços abertos (BRANCHI et al, 2008). Contudo, em nosso trabalho não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para este teste, ou seja, não houve uma maior preferência pelos braços fechados por parte dos animais lesados. Dessa forma, pode-se presumir que a lesão bilateral com 6 µg de 6-OHDA na SNpc não foi capaz de estabelecer um comportamento tipo ansioso nos ratos.

Contrariamente, outros trabalhos verificaram que a infusão da neurotoxina causa um efeito ansiogênico caracterizado pela redução da exploração dos braços abertos do labirinto (TADAIESKY, 2008; CHEN et al, 2011). O mesmo resultado foi obtido em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, o qual também verificou uma maior preferência por permanecer em ambientes fechados nos animais lesados pela 6-OHDA (FONTOURA, 2016).

A neurobiologia da ansiedade na DP é complexa e está relacionada, provavelmente, às alterações neuroquímicas decorrentes da doença, conseqüentes à depleção dopaminérgica (PREDIGER et al, 2012). Uma das hipóteses para o aumento da resposta ansiogênica decorrente da infusão da 6-OHDA pode ser relacionada à redução das aferências dopaminérgicas para o córtex pré-frontal. Em um estudo realizado com modelo animal de DP, verificou-se uma alteração nos níveis de monoaminas e nos metabólitos da DA associada ao comportamento tipo ansioso. Uma supressão de DA, DOPAC e 5-HT foi verificada no estriado já na primeira semana após a lesão, acompanhada de um significativo aumento de serotonina e noradrenalina no estriado. Nas 3 semanas seguintes, esse níveis mantiveram-se estáveis com exceção da 5-HT (TADAIESKY et al, 2008).

Assim, além da degeneração dopaminérgica, anormalidades de outras monoaminas cerebrais, como os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico parecem estar implicadas no desenvolvimento da ansiedade (PREDIGER et al, 2012; DELAVILLE et al, 2016). Os neurônios serotoninérgicos provenientes dos núcleos da rafe e os neurônios noradrenérgicos cujos corpos celulares originam-se do *locus ceruleus* inervam hipocampo, amígdala, hipotálamo e estruturas corticolímbicas envolvidas no controle do estado ansioso (DI GIOVANNI et al, 2016).

Estes sistemas monoaminérgicos apresentam importantes conexões funcionais formando uma rede complexa de inervação a partir de núcleos no tronco

encefálico. Os neurônios dopaminérgicos originados da SNpc que formam a via nigroestriatal projetam-se principalmente para o estriado dorsal (LEDONE; MERCURI, 2017) e uma pequena parte ao estriado ventral e córtex (BRICHTA; GREENGARD, 2014). O estriado ventral constitui uma parte do “sistema de recompensa” e modula a parte emocional do comportamento motor (BLASZCZYK, 2017). Um estudo apontou como possível causa para a manifestação do transtorno ansioso uma redução de transportadores de DA no estriado ventral (WEINTRAUB et al, 2004).

Outro aspecto apontado para o desenvolvimento de uma resposta ansiogênica refere-se a uma interrupção das aferências dopaminérgicas para a amígdala, estrutura subcortical que serve como uma interface entre os processamentos cognitivo e emocional, gerando uma resposta anormal para raiva e medo. A modulação do comportamento emocional ocorre por meio da interrelação entre estruturas subcortical mais relacionadas às emoções mais primitivas e estruturas corticais relacionadas ao planejamento e flexibilidade cognitiva. Isto sugere uma hipótese de falha na conexão entre estruturas corticais e subcortical por alterações neuroquímicas (TESSITORE et al, 2002).

Diante do nosso resultado, não foi possível observar uma resposta ansiogênica decorrente da lesão com 6-OHDA na SNpc, também não sendo possível observar um efeito benéfico da suplementação com ω -3 quanto à manifestação deste comportamento. Em relação a esta hipótese de um possível efeito ansiolítico para o ω -3, sabe-se que essa classe de ácidos graxos apresenta um importante efeito modulatório para o comportamento emocional (ROSS et al, 2016), sendo que recentes pesquisas já mostram um efeito ansiolítico do OP (CHEN; SU, 2012; MIZUNOYA, 2013; PÉREZ et al, 2013; JASARÉVIC et al, 2014).

Alguns estudos também reportam a influência da suplementação em relação aos níveis de neurotransmissores, como por exemplo, promovendo um aumento de nos níveis de neurotransmissores DA e 5-HT no córtex pré-frontal e estriado (CHALON et al, 1998).

Em um estudo que relacionou o estresse e o desenvolvimento do comportamento tipo ansioso, a suplementação com OP mostrou-se benéfica, reduzindo o tempo de permanência no braço fechado do labirinto em cruz elevado. Essa redução da resposta ansiogênica teve associação positiva com menores níveis de corticosterona quando comparados aos animais sem suplementação, sugerindo

uma atividade do ω -3 no controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (FERRAZ et al, 2011).

Outro sintoma presente nas fases iniciais da DP e que pode ser investigado no modelo animal da 6-OHDA é o déficit cognitivo. O déficit cognitivo na DP manifesta-se como prejuízos na atenção, memória de trabalho, disfunção executiva (GRATWICKE et al, 2015) e no aprendizado de memórias de procedimento (PACKARD; KNOWLTON, 2002).

Para avaliação deste componente, utilizamos o teste de memória de reconhecimento de objetos, o qual é baseado no comportamento natural dos ratos para explorar um novo objeto, em preferência a um objeto familiar, já explorado em uma primeira apresentação. Valores de tempo de exploração maiores que zero indicam animais explorando mais o objeto novo em relação ao objeto antigo. Já resultados próximos ou abaixo de zero indicam que não preferência ou uma exploração maior do objeto familiar (ENNACEUR; DELLACOUR, 1988).

Neste teste, de acordo com o índice de discriminação (ID), o grupo 6-OHDA/salina apresentou um ID significativamente menor se comparado aos demais grupos, indicando a existência de um prejuízo na memória de reconhecimento de curta duração em decorrência da lesão pela neurotoxina. Contudo, tal diferença não foi evidenciada em relação ao grupo 6-OHDA/OP, já que o mesmo foi estatisticamente diferente do grupo 6-OHDA/salina.

Diversos trabalhos apontam para um efeito neuroprotetor do ω -3 em relação à memória e aprendizado. Estudo de Ferraz e colaboradores (2011) descreve que a oferta de ω -3 na dieta dos animais preveniu a ocorrência de déficit de memória no labirinto aquático de Morris. Em relação à DP, no estudo realizado por Luchtmann e colaboradores (2012) a suplementação com ácidos graxos ω -3 melhorou o déficit na memória de procedimento nos animais lesados pelo MPTP.

O tratamento com o ω -3 pode levar a benefícios a memória e ao aprendizado por estimular a neurogênese, sinaptogênese e a desenvolvimento das funções neurais (GEORGIEFF et al, 2007). É bem descrito seu efeito benéfico para o neurodesenvolvimento, promovendo melhora da capacidade cognitiva e melhor desenvolvimento visual (CAO et al, 2009). Além disso, a ingestão de PUFA's ω -3 está associada a um menor risco no desenvolvimento de demências (CALON; COLE, 2007; JICHA; MARKERSBERRY, 2010).

No hipocampo, importante estrutura do cérebro no armazenamento e consolidação da memória, o DHA promove um aumento das sinapses glutamatérgicas e a plasticidade sináptica na região CA1, contribuindo na modulação de processos de memória e aprendizado (CAO et al, 2009).

Em relação à lesão, o efeito benéfico do ω -3 pode ser explicado pela prevenção da degeneração dopaminérgica, pela redução da neuroinflamação e pelo estímulo à liberação de fatores neurotróficos cerebrais (VINES et al, 2012; TRÉPAINER et al, 2016). Este efeito positivo da oferta de ω -3 na dieta pode ser verificado por uma maior incorporação de DHA nas membranas neuronais (MORI et al, 2017). Esta alta incorporação do DHA melhora a fluidez das membranas, sinalização celular, estimula a liberação de neurotrofinas, reduz o efeito deletério do estresse oxidativo e a peroxidação lipídica das membranas (DELATTRE et al, 2010).

Assim, os resultados obtidos no teste de memória de reconhecimento sugerem que a suplementação com ômega-3 possa ter prevenido a ocorrência de alterações de memória observadas no modelo animal decorrentes da lesão com a 6-OHDA. Em conjunto, tais resultados podem ser considerados como uma resposta neuroprotetora do ω -3 frente à lesão com 6-OHDA. Contudo, ressalta-se que não foi observado um efeito *per se* do ω -3, visto que não houve diferença entre os grupos SHAM/salina e SHAM/OP.

Dessa forma, hipotetiza-se que este baixo efeito da suplementação nos animais SHAM pode ser atribuído a uma menor neuroplasticidade observada no animal adulto. A neuroplasticidade refere-se a um conjunto de mecanismos (morfológicos, funcionais e comportamentais) capazes de modificar as funções ou estrutura do SN em resposta a influências ambientais. Entretanto, essa capacidade é menor com o avançar do desenvolvimento do sistema nervoso, limitando a influência dos estímulos externos (ALMEIDA; LYONS, 2017; KOLB et al, 2017). Outros estudos em modelos animais com suplementação perinatal e durante o período inicial de desenvolvimento neurológico mostram resultados mais eficientes da suplementação com ω -3 para a memória e sintomas depressivos (FERRAZ et al, 2011; DELATTRE et al, 2016).

Em um estudo anterior do nosso laboratório, a suplementação com OP durante as fases de gestação e lactação, foi capaz de atenuar os déficits cognitivos avaliados nos testes de reconhecimento social e reconhecimento de objetos. Entretanto, não foi observada diferença para o número de rotações contralaterais no

teste de comportamento rotatório, provocadas pela lesão unilateral com a 6-OHDA (POCHAPSKI, 2016). Estas evidências associadas aos resultados obtidos nesse estudo apontam que a ingestão do ω -3 durante o neurodesenvolvimento poderia ter um efeito mais robusto na prevenção das alterações comportamentais, embora limitado a uma lesão branda na via nigroestriatal, a qual mimetiza os estágios iniciais da DP.

Outros fatores relacionados à resposta à suplementação estão relacionados ao tempo de tratamento, bem como à dose e à forma de administração. Entre os estudos, há grande variação no tempo de tratamento (14 dias a 6 meses), o mesmo ocorrendo para a dose utilizada, também com diferentes proporções de EPA e DHA. Já para a forma de administração, os estudos dividem-se entre aqueles que realizaram a suplementação via oral de OP e os que realizaram a suplementação diretamente na ração dos animais (DELATTRE et al, 2010; MUNTANE et al, 2010; JI et al, 2012; MORI et al, 2017). Devido ao fato de o ω -3 ser um componente alimentar e à sua biotransformação no organismo, um período maior de suplementação em doses baixas pode ser uma alternativa eficaz para a prevenção de doenças (BOUSQUET et al, 2011), dado observado em estudos com seres humanos (GAO et al, 2007; DE LAU et al, 2005).

Em contrapartida, o resultado benéfico observado no grupo de animais lesados e suplementados (6-OHDA/OP) pode ser atribuído às repercussões positivas do ω -3 na prevenção ou minimização dos eventos desencadeantes da lesão celular, como na atenuação da neuroinflamação (MENG et al, 2010; MUNTANE et al, 2010; JI et al, 2012; LUCHTMANN et al, 2012; TIAN et al, 2015), regulando a apoptose (COSTA; CHECLER, 2011; CALON; COLE, 2007) e reduzindo os efeitos do estresse oxidativo (BAZAN, 2005).

De acordo com evidências de estudos anteriores, a lesão bilateral com 6 μ g de 6-OHDA na substância negra leva a um comportamento tipo depressivo, verificado a partir do 7º dia e mais significativo no 21º dia após a infusão da neurotoxina (SANTIAGO et al 2010; SANTIAGO et al, 2014).

Para avaliação do comportamento tipo depressivo, foram utilizados dois testes comportamentais: preferência à sacarose e natação forçada. O teste de preferência à sacarose é utilizado como medida pré-clínica para investigar a presença de anedonia. A anedonia é considerada um dos sintomas da depressão

maior e refere-se à perda de interesse por atividades anteriormente tidas como prazerosas (BURSTEIN et al, 2017).

Comparando-se os resultados obtidos no consumo de sacarose do grupo SHAM/salina e do grupo 6-OHDA/salina, pode-se dizer que a lesão bilateral com 6-OHDA na substância negra *pars compacta* causou um comportamento tipo depressivo, já que este grupo teve redução da preferência à sacarose se comparado aos grupos não lesados (SHAM/salina e SHAM/OP).

Quanto ao consumo total de líquidos, não houve diferença significativa entre os grupos, o que indica que o efeito da lesão no teste do consumo de sacarose foi devido à indução de anedonia, e não uma consequência de possível alteração motora dos animais ou da alteração na ingestão de líquidos, por aumento ou redução da sensação de sede (SKALISZ et al, 2002).

O outro teste utilizado para avaliar o comportamento tipo depressivo dos animais foi o teste de natação forçada. Este teste induz a uma situação de “desespero comportamental”, já que o animal é colocado em uma situação aversiva e inescapável. O teste de natação forçada foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficácia pré-clínica de drogas antidepressivas (PORSOLT et al, 1978).

No parâmetro tempo de imobilidade, observou-se que o grupo 6-OHDA/salina apresentou tempo de imobilidade significativamente maior se comparado aos grupos SHAM/salina, SHAM/OP e 6-OHDA/OP. Adicionalmente, o grupo 6-OHDA/salina teve um tempo de natação significativamente menor quando comparado aos demais grupos.

Estes resultados em conjunto com os resultados obtidos no teste de preferência à sacarose confirmam o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo ocasionado pela ação da neurotoxina, conforme verificado em outros estudos (SANTIAGO et al, 2015; FERRO et al, 2005).

A depressão é uma comorbidade frequente na DP, aparecendo em estágios precoces da doença, antecedendo em muitos anos a ocorrência dos sintomas motores da doença. Embora, a neurodegeneração dopaminérgica seja o principal marcador patológico, vários sistemas de neurotransmissores do tronco cerebral, regiões corticais e sistema límbico estão relacionados aos sintomas depressivos (BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA et al, 2012; FONTOURA et al, 2017). A degeneração da via mesocortical e mesolímbica está associada ao desenvolvimento

dos sintomas depressivos na DP com disfunção do circuito que integra córtex frontal, núcleos da base e tálamo (MARSH, 2013).

É descrito na literatura que o tratamento crônico com drogas antidepressivas da classe de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) estimulam a plasticidade morfológica e sináptica neuronal no hipocampo e córtex cerebral. A plasticidade dendrítica é promovida, em grande parte, por incremento do BDNF, um importante fator neurotrófico cerebral liberado nos terminais axônicos (ZHANG et al, 2017). Um aumento nos níveis de BDNF também é verificado mediante a suplementação com ω -3, ou seja, o ω -3 *per se* estimula uma forma de plasticidade neuronal semelhante ao efeito dos fármacos ISRS (DEACON et al, 2017).

Ainda, há certa correlação entre a liberação de 5-HT e expressão de BDNF, pois esta neurotrofina promove o desenvolvimento, sobrevivência e plasticidade de neurônios serotoninérgicos no desenvolvimento hipocampal e na vida adulta, podendo estar relacionado ao desenvolvimento de transtornos de humor (YU; CHEN et al, 2011).

Diante disso, estudos associam o ω -3 a um possível efeito antidepressivo, sugerindo como prevenção ou terapia adjuvante no tratamento de transtornos depressivos (MOCKING et al, 2016; DEACON et al, 2017). Um efeito benéfico no comportamento tipo depressivo foi descrito em modelos animais (CARABELLI et al, 2015; PUDELL et al, 2014). Uma redução dos sintomas depressivos após o aumento da ingestão de ω -3 também foi verificada em estudos clínicos (DA SILVA et al, 2008). Por outro lado, baixos níveis séricos de EPA e DHA foram encontrados em pacientes depressivos proporcionalmente à severidade dos sintomas (FEART et al, 2007) .

Estudo de Naliwaiko et al (2004) com ratos tratados com óleo de peixe na dose de 3g/kg/dia da concepção à idade adulta, também observaram uma redução no tempo de imobilidade, compatíveis com uma maior proporção dos níveis de EPA e DHA no córtex cerebral e hipocampo. Em um modelo de bulbectomia olfatória, a suplementação com PUFA's ω -3 reverteu os sintomas depressivos, aumentando os níveis de serotonina e a expressão de BDNF no hipocampo (PUDELL et al, 2014).

Diante dos resultados que apontam para um efeito neuroprotetor da lesão nigroestriatal, discutimos a hipótese de que o ω -3 poderia ter influência sobre o estresse oxidativo, melhorando a capacidade antioxidante da célula após a lesão, por meio da modulação do sistema antioxidante da GSH.

A GSH é a mais importante enzima antioxidante do encéfalo, atuando sozinha ou em conjunto com outras enzimas para remoção dos radicais livres (SMEYNE; SMEYNE et al, 2013). Estudos *post mortem* de indivíduos com DP revelam baixos níveis de GSH no cérebro, em especial na substância negra (SIAN et al, 1994).

De acordo com os dados apresentados, a análise da concentração de GSH, tanto no córtex quanto no estriado, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ou seja, não foi observada uma alteração na concentração de glutathione após a lesão pela neurotoxina. Também não foi verificada uma diferença entre os grupos suplementados, o que indicaria um efeito diferencial da suplementação com o OP. Ozsoy e colaboradores (2011) também não encontraram alterações na concentração da glutathione reduzida (GSH) em um modelo murino com MPTP. Contudo, no mesmo estudo foram encontradas diferenças nos níveis de peroxidação lipídica na SN. Em outro estudo com modelo de administração crônica de rotenona e suplementação com OP, os níveis de GSH também não diferiram entre os grupos no córtex e estriado, mas, tal diferença foi observada no cerebelo (MURALIDHARA, 2015).

Contrariamente, outras evidências da literatura indicam que o DHA possui uma importante propriedade antioxidante, por promover uma maior atividade da enzima glutathione redutase (HASHIMOTO et al, 2005), reduzir a lipoperoxidação e os radicais livres de oxigênio ou modulando as vias de apoptose (HASHIMOTO et al, 2002; YAVIN et al, 2002; HASHIMOTO et al, 2005).

Portanto, a partir da interpretação dos resultados obtidos nos testes comportamentais e bioquímicos é possível inferir que a suplementação com ácidos graxos ω -3 presentes no óleo de peixe ofereceu uma resposta neuroprotetora frente às alterações comportamentais causadas pela ação neurotóxica da 6-OHDA. Estudos futuros são necessários para investigar por quais mecanismos o OP atua prevenindo essas alterações comportamentais.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, verificamos que a lesão bilateral na SNpc induziu um comportamento tipo depressivo e alterações de memória nos animais, mas não induziu comportamento tipo ansioso. Também foi observado que a suplementação com ácidos graxos ω -3 foi capaz de prevenir essas alterações comportamentais. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação entre este efeito atenuador e um aumento da capacidade antioxidante neuronal pelos níveis de GSH ou entre a infusão de 6-OHDA e a quantificação neuronal. Assim, a administração de OP em ratos adultos oferece uma resposta possivelmente neuroprotetora contra a lesão, ainda que de forma mais branda do que em ratos mais jovens, mas tal efeito neuroprotetor ainda precisa ser confirmado.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; PAHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; et al. Depression in Parkinson disease: epidemiology, mechanisms and management. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 8, p. 35-47, 2012.
- ADLER, C. H. et al. Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. **Mov Disord**, v. 31, n. 2, p. 250–256, 2016.
- AHMAD, S. O. et al. Reduced numbers of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area of rats fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: a stereological study. **Neuroscience Letters**, v. 438, n. 3, p. 303-307, 2008.
- AHMADINEJAD, F. et al. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 51, 2017.
- ALDAKHEEL, A.; KALIA, L.V.; LANG, A.E. Pathogenesis: Targeted, Disease-Modifying Therapies in Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 11, n.6, p. 6-23, 2014.
- ALMEIDA, R.G.; LYONS, D.A. On Myelinated Axon Plasticity and Neuronal Circuit Formation and Function. **J Neurosci**. v. 18, n. 37, p. 1023-1034, 2017.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5**. 5^a ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.
- AMINIAN, K.S.G.; STRAFELLA, A.P. Affective disorders in Parkinson's Disease. **Curr Opin Neurol**. v. 26, n. 4, p. 339–344, 2013.
- ARBABI, L.; BAHARULDIN, M. T. H.; MOKLAS, M. A. M.; FAKURAZI, S.; MUHAMMAD, S. I. Antidepressant-like effects of omega-3 fatty acids in postpartum model of depression in rats. **Behavioural Brain Research**, p. 1-7, 2014.
- ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. **Journal of Immunology Research**, v. 16, 2016.
- ARTERBURN, L. M.; HALL, E. B.; OKEN, H. Distribution, interconversion and dose response of n3 fatty acids. **Am J Clin Nutr.**, v. 83, 2006.
- BAIK, J.H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. 152, 2013.
- BALDÍVIA, B. et al. Dementia in Parkinson's Disease: an Brazilian sample. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 69, n. 5, p. 733-738, 2011.
- BARONE, P.; ANTONINI, A.; COLOSIMO, C.; MARCONI, R.; MORGANTE, L.; AVARELLO, T.P. et al. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 24, n.11, p.1641–1649, 2009.
- BARROS, A. S. et al. Impact of the Chronic Omega-3 Fatty Acids Supplementation in

Hemiparkinsonism Model Induced by 6-Hydroxydopamine in Rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 120, n. 6, p. 523–531, 2017.

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.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's Disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, 2001.

BEAULIEU, J.M. et al. Dopamine receptors- IUPHAR: review 13. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 1-23, 2015.

BEKRIS, L.M.; MATA, I.; ZABETIAN, C.P. The Genetics of Parkinson Disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol**. v.23, n.4, p. 228–242, 2010.

BENDER, A. et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. **Nat Genet**, v. 38, p. 515-527, 2006.

BERARDELLI, A. et al. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v. 124, p. 2131-2146, 2001.

BEUCHAINE, T.P.; KLEIN, D.N.; CROWELL, S.E. et al. Multifinality in the development of personality disorders: A Biology x Sex x Environment interaction model of antisocial and borderline traits. **Dev Psychopathol**. v.21, n.3, p.735-770, 2009.

BJORKLUND, A.; ROSENBLAD, C.; WINKLER, C.; KIRIK, D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 4, p.186–200, 1997.

BLACK, H.S.; RHODES, L.E. Potential Benefits of Omega-3 Fatty Acids in Non-Melanoma Skin Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n.2, p.23, 2016.

BŁASZCZYK, J. W. Nigrostriatal interaction in the aging brain : new therapeutic target for Parkinson ' s disease, **Acta Neurobiol Exp**, n. 77, p. 106–112, 2017.

BOUSQUET, M. et al. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 4, p. 1213–1225, 2007.

BOUSQUET, M.; CALON, F.; CICCHETTI, F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 4, p. 453–463, 2011.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BRAAK, H. et al. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, p. 1404–1410, 2005.

- BRANCHI, I. et al. Non motor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **J. Neurosci**, p. 2050-2061, 2008.
- BRECKENRIDGE, C. B. et al. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking , Rural Living , Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS One**, p. 1–42, 2016.
- BRICHTA, L.; GREENGARD, P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson ' s disease : an update. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, p. 1-16, 2014.
- CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; GHIGLIERI, V.; DI FILIPPO, M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci**, v. 17, p. 1022-1030, 2014.
- CALDER, P. C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J.M.; et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **The British journal of nutrition**, v. 101 Suppl, p. S1–S45, 2009.
- CALDER, P. C. P. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592–599, 2012.
- 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, n. 5, p. 287–293, 2007.
- CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Postgrad Med**, v. 121, n. 6, p. 148–157, 2009.
- CAO, D.; KEVALA, K.; KIM, J.; JUN, S. B. LOVINGER, D.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **J Neurochem**, v. 111, n. 2, p. 510–521, 2009.
- CARABELLI, B. et al. The Antidepressant-Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5-HT_{1A} Post-synaptic Receptor. **Mol Neurobiol**. v. 52, n.1, p. 206-215, 2015.
- CASTRIOTO, A. et al. Emotional manifestations of PD: Neurobiological basis. **Movement Disorders**, v. 31, n. 8, p. 1103–1113, 2016.
- CHALON, S. et al. Dietary Fish Oil Affects Monoaminergic Neurotransmission and Behavior. **Physiol Res**. p. 2512–2519, 1998.
- CHEN, L. et al. Alterations of emotion, cognition and firing activity of the basolateral nucleus of the amygdala after partial bilateral lesions of the nigrostriatal pathway in rats. **Brain Res. Bull.**, p. 329-338, 2011.
- CHEN, H.F.; SU, H.M. Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. **J Nutr Biochem.**, v.23, n.3, p.299-305, 2012.
- CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R.E. Environmental toxins and

Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 30, n.9, p. 475-483.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.** Brasília, 2013.

CONSTANTINESCU, R. Update on the use of pramipexole in the treatment of Parkinson's disease. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.** v. 4, p. 337–352, 2008.

COSTA, A. et al. Free and cued recall memory in Parkinson's disease associated with amnesic mild cognitive impairment. **PLoS One**, v. 9, 2014.

COSTA, C.A.; 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.

DA CUNHA, C. et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research**, v. 189, n. 2, p. 364-372, jun. 2008.

DA SILVA, T.M. et al. Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J. Affect.**, 111, 351–359, 2008.

DEACON, G. et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 212223, 2017.

DELATTRE, A. M.; SZAWKA, R. E.; ANSELMO-FRANCI, J. A; et al. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neuroscience research**, v. 66, n. 3, p. 256–64, 2010.

DELATTRE, A.M.; CARABELLI, B.; MORI, M.A. et al. Maternal Omega-3 Supplement Improves Dopaminergic System in Pre- and Postnatal Inflammation-Induced Neurotoxicity in Parkinson's Disease Model. **Mol Neurobiol.**, v.54, n.3, p. 2090- 2106, 2016.

DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** v. 5, n.6, p. 525-535, 2003.

DELAVILLE, C. et al. Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 45, n. 2, p. 763–773, 2012.

D'ELISE, D.; VELOTTI, F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n.2, p.15, 2016.

DE FARIAS, C.C. et al. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging

biomarkers and new drug targets. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 66–71, 2016.

DE LAU, L.M.L. et al. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam Study. **Neurology**, v. 64, p. 2040–2045, 2005.

DE RIJK, M.C. et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. **Neurology**, v.54, n.11, 2000.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n.4, p.461- 491, 2013.

DI GIOVANNI, G. et al. Monoaminergic and histaminergic strategies and treatments in brain diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, 2016.

DODEL, R. C. et al. The Economic Impact of Parkinson ' s Disease An Estimation Based on a 3-Month Prospective Analysis. v. 14, n. 3, p. 299–312, 1998.

DORSEY, Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n.5, p.384-386, 2007.

DUNNING, C. J. R.; GEORGE, S.; BRUNDIN, P. What's to like about the prion-like hypothesis for the spreading of aggregated α -synuclein in Parkinson disease ? v. 7, n. 1, p. 92–97, 2013.

DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain : a review of the independent and shared effects of EPA , DPA and DHA. **Frontiers on Aging Neuroscience**, v. 7, p. 1–15, 2015.

EBADI, M.; SRINIVASAN, S.K.; BAXI, M.D. Oxidative Stress and antioxidant therapy in Parkinson's Disease. **Progress in Neurobiology**, v.48, p. 1-19, 1996.

EMILIEN,G.; MALOTEAUX,J. M.; GEURTS,M.; HOOGENBERG,K.; ANDCRAGG,S. Dopamine receptors–physiological understanding to therapeutic intervention potential. **Pharmacol.Ther.** v. 84, p.133–156, 1999.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Spatial vs. non-spatial working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1988.

EVANS, J. R. et al. The natural history of treated Parkinson's disease in an incident, community based cohort. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 82, n. 10, p. 1112–1118, 2011.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, p. 139–154, 2004.

FAHN, S. The History of Dopamine and Levodopa in the Treatment of Parkinson's Disease. **Mov. Disorders**, v. 23, 2008.

FAUL, F. et al. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, p. 175-191, 2007.

FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra in regional selectivity. **Brain**, n. 114, p. 2283-2301, 1991.

FEART, C. et al. Plasma eicosapentaenoic acid is inversely associated with severity of depressive symptomatology in the elderly: data from the Bordeaux sample of the Three-City Study. **Am J Clin Nutr**, n. 87, p. 1156-1162, 2007.

FERRAZ, A. C.; DELATTRE, A. M.; ALMENDRA, R. G.; et al. Chronic fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 1, p. 116–122, 2011.

FERRER, I. et al. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism : preclinical Parkinson disease. p. 821–839, 2011.

FERRO, M. M.; INES, M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 78–87, 2005.

FILQUEIRAS, G. B.; CARVALHO-NETTO, E. F.; ESTANISLAU, C. Aversion in the elevated plus-maze : Role of visual and tactile cues. **Behavioural Processes**, v. 107, p. 106–111, 2014.

FINDLEY, L.J.; WOOD, E.; LOWIN, J.; ROEDER, C. et al. The economic burden of advanced Parkinson's disease: an analysis of a UK patient dataset. **J Med Econ**, v.14, n.1, p. 130-139, 2011.

FONTOURA, J.L. **Efeitos de bloqueadores da recaptção de neurotransmissores monoaminérgicos nos sintomas não-motores da doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em ratos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

FONTOURA, J.L. et al. Depression in Parkinson's Disease: The Contribution from Animal Studies. **Parkinson's Disease**, 2017.

FRANCO-IBORRA, S.; VILA, M.; PERIER, C. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis : Where Are We at ? **The neurocientist**, v. 22, n.3, p. 266-277, 2015.

GAO, X. et al. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 86, p. 1486–1494, 2007.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. 100 years of Lewy Pathology. **Nat Rev Neurol.** v.9, n.1, p.13-24, 2013.

GOETZ, C.G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, n.1, 2011.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

- GOLDMAN, J.G.; POSTUMA, R. Premotor and non-motor features of Parkinson's disease. **Curr Opin Neurol.** v. 27, n.4, p. 434–441, August 2014.
- GRATWICKE, J.; JAHANSHAH, M.; FOLTYNIE, T. Parkinson's disease dementia: A neural networks perspective. **Brain**, v. 138, n. 6, p. 1454–1476, 2015.
- GROVER, S.; SOMAYA, M.; AVASTHI, A. Psychiatric Aspects of Parkinson's Disease. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v.6, n.1, p. 65-76, 2015.
- HAINING, R.L.; ACHAT-MENDES, C. Neuromelanin, one of the most overlooked molecules in modern medicine, is not a spectator. **Neural Regen Res.**, v.12, n.3, p. 372–375, 2017.
- HAMILTON, J. A.; BRUNALDI, K. A Model for Fatty Acid Transport into the Brain. **J Mol Neuroscience**, v. 33, p. 12–17, 2007.
- HANGANU, A. et al. Depressive symptoms in Parkinson's disease correlate with cortical atrophy over time. **Brain and Cognition**, v. 111, p. 127–133, 2017.
- HASHIMOTO, M. et al. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. **J. Neurochem.** , n. 81, p. 1084–1091, 2002.
- HASHIMOTO, M. et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid {beta}-infused rats, **J. Nutr.** n. 135, p. 549–555, 2005.
- HERRERA, A. et al. Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 702–711, 2017.
- HERRERO, M.T.; PAGONABARRAGA, J.; LINAZASORO, G. Neuroprotective role of dopamine agonists: Evidence from animal models and clinical studies. **The Neurologist**, v. 17, n. 6, p. S54–S66, 2011.
- HERNANDEZ-BALTAZAR, D. et al. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. **Neurología**, 2015.
- HIRTZ, D. et al. How common are the "common" neurologic disorders? **Neurology**, v. 68, n.5, p. 326-337, 2007.
- HOEHN, M.M; YAHR, M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. **Neurology**, v. 17, n. 5, p. 427–442, 1967.
- HORNYKIEWICZ, O. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. **Mov Disord**, v, 17, p. 501–508, 2002.
- HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **J Neurol.**, v. 257, p. 249–252, 2010.
- HU, X. et al. Abnormal Functional Connectivity of the Amygdala Is Associated With Depression in Parkinson's Disease. **Mov Disorders**, p. 1–7, 2014.

HUANG, C. W. et al. Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in ameliorating the obesity-induced metabolic syndrome in animal models and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, 2016.

INGELSSON, M. Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other lewy body disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. SEP, p. 1–10, 2016.

IRWIN, D.J. et al. Neuropathological and genetic correlates of survival and dementia onset in synucleinopathies: a retrospective analysis. **Lancet Neurol.** v.16, n.1, p. 55–65, 2017.

JAGMAG, S.A.; TRIPATHI, N.; SHUKIA, S.D.; SANKAR, M.; KHURANA, S. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v.19, n.9, 2016.

JASARÉVIC, E. et al. Dissociable effects of dorsal and ventral hippocampal DHA content on spatial learning and anxiety-like behavior. **Neurobiol Learn Mem**, v. 116, p. 59-68, 2014.

JI, A.; DIAO, H.; WANG, X. n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. **NeuroToxicology**, n. 33, p.780–788, 2012.

JICHA, G.A., MARKERSBERY, W.R. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. **Clin. Interv. Aging**, v. 5, p. 45–61, 2010.

JULIEN, C. et al. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients and parkinsonian monkeys. **Neurochem. Int.** n. 48, p. 404–414, 2006.

JUMP, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8755–8758, 2002.

KAKKAR, A. K.; DAHIYA, N. Management of Parkinson's disease: Current and future pharmacotherapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 74–81, 2015.

KASHMERE, J.; CAMICOLI, R.; MARTIN, W. Parkinsonian syndromes and differential diagnosis. **Curr Opin Neurol**, v. 15, p. 461-466, 2002.

KAUR, N.; MADAN, R.; SHARMA, A. Successful Use of Rasagiline in Combination with Two Antidepressants: A Case Report Innovations. **Clinical Neuroscience**, v.40, n.11, 2012.

KIM, H. Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 18661–18665, 2007.

KIM, J. S. et al. α -Synuclein in the colon and premotor markers of Parkinson disease in neurologically normal subjects. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 171–179, 2016.

KURNIK, M.; THOR, P. The non-motor complications in Parkinson's disease: what can we learn from animal models? **Folia Medica Cracoviensia**, v. 2, p. 69–84, 2015.

- LAWRENCE, B. J. et al. Activities of Daily Living , Depression and Quality of Life in Parkinson's Disease. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2014.
- LEDONNE, A.; MERCURI, N. B. Current Concepts on the Physiopathological Relevance of Dopaminergic Receptors. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 1–9, 2017.
- LEE, H. J.; HAN, J.; JANG, Y.; et al. Docosahexaenoic acid prevents paraquat-induced reactive oxygen species production in dopaminergic neurons via enhancement of glutathione homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 457, n. 1, p. 95–100, 2015.
- LESAGE, S.; BRICE, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Hum Mol Genet**, v.18, p. 48–59, 2009.
- LEVERENZ, J.B.; QUINN, J.F.; ZABETIAN, C.; ZHANG, J.; MONTINE, K.S.; MONTINE, T. Cognitive Impairment and Dementia in Patients with Parkinson Disease. **Curr Top Med Chem**. v. 9, n.10, p. 903–912, 2009.
- LI, J.Y. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 501–503, 2008.
- LINDQVIST, D.; KAUFMAN, E.; HANSONN, O. Non-Motor Symptoms in Patients with Parkinson's Disease: Correlations with Inflammatory Cytokines in Serum. **PLOS One**, v.7, n.10, p. 473-487, 2012.
- LIU, R. et al. Ambient Air Pollution Exposures and Risk of Parkinson Disease. **Envir Health Perspect**. v. 124, n. 11, p. 1759–1765, 2016.
- LIU, Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n.1, 2017.
- LONGHENA, F. et al. The Contribution of Synuclein Spreading to Parkinson's Disease Synaptopathy, **Neural Plasticity**, 2017.
- 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, n. 2, p. 386–396, 2012.
- MASSANO, J. Doença de Parkinson: Atualização Clínica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, s. 4, p. 827-834, 2011.
- MARSH, L. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. **Current Neurol Neuroscience**, v. 13, n. 12, 2016.
- MCCANN, H. et al. Neuropathology of a alpha-Synuclein Propagation and Braak Hypothesis Pathological Inclusions in Parkinson ' s Disease and Their Relationship to Other Cellular Changes. **Mov Disord**, v. 31, n. 2, p. 152–160, 2016.
- MENG, Q. et al. Ethyl-eicosapentaenoate modulates changes in neurochemistry and brain lipids induced by parkinsonian neurotoxin1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse

brain slices. **Eur J Pharmacol.**, v. 649, p. 127–134, 2010.

MILLER, D. B.; CALLAGHAN, J. P. O. Biomarkers of Parkinson's disease : Present and future. **Metabolism**, v. 64, p. 1–13, 2016.

MIZUNOYA, W. et al. Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. **Springerplus**, v.16, n. 2, 2013.

MOCKING, R.J.T. et al. Meta-analysis and meta-regression of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for major depressive disorder. **Transl Psychiatry**, v.15, 2016.

MOHAMAD, W.N.A.W.; DIN, N.C.; IBRAHIM, N. Cognitive Profiles in Parkinson's Disease and their Correlation with Dementia, Anxiety and Depression: A Preliminary Study. **Malays J Med Sci.**, p. 29-35, 2015.

MOLLENHAUER, B. et al. A user's guide for α -synuclein biomarker studies in biological fluids: Perianalytical considerations. **Movement Disorders**, v. 32, n. 8, p. 1117–1130, 2017.

MORI, M. A. et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. **Nutritional Neuroscience**, n. 21, p. 1–11, 2017.

MULERO, J.; ABELLÁN, J.; ZAFRILLA, P.; AMORES, D.; HERNÁNDEZ-SANCHEZ, P. Bioactive substances with preventive effect in cardiovascular diseases. **Nutr. Hosp.**, v.32, n.4, p. 1462-1467, 2015.

MUNTANE, G. et al. Modification of brain lipids but not phenotype in alpha-synucleinopathy transgenic mice by long-term dietary n-3 fatty acids. **Neurochem Int.**, v. 56, p. 318–328, 2010.

MUSLIMOVIC, D.; POST, B.; SPEELMAN, J.D.; SCHMAND, B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. **Neurology**, v. 65, p. 1239–45, 2005.

NALIWAIKO, K. et al. Effects of Fish Oil on the Central Nervous System: A New Potential Antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 91–99, 2004.

NOYCE, A. J. et al. Meta-Analysis of Early Nonmotor Features and Risk Factors for Parkinson Disease. **Ann Neurology**, v.72, n.6, p.893-901, 2012.

OBESO, J. A; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M. et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 10 Suppl, p. S8–S19, 2000.

OZSOY, O. et al. Neurochemistry International The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson ' s disease. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 5, p. 664–670, 2011.

PACKARD, M.G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the basal ganglia. **Annu Rev Neurosci**, v. 25, p. 563–593, 2002.

PALHAGEN, S.E. et al. HMPAO SPECT in Parkinson's disease (PD) with major depression (MD) before and after antidepressant treatment. **J Neurol**, p. 1510-1518, 2009.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 1817.

PAULSON, H.L.; STERN, B.M. Clinical Manifestations of Parkinson's Disease. In: WATTS, R.L.; KOLLER, W.C. **Movement Disorders Neurologic Principles and Practice**. New York: MacGraw, p. 233-246, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. Orlando: Academic Press, 1997.

PÊGO, J. M. et al. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. **The European journal of neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1503-16, 2008.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PÉREZ, M.A.; TERREROS, G.; DAGNINO-SUBIABRE, A. Long-term ω -3 fatty acid supplementation induces anti-stress effects and improves learning in rats. **Behav Brain Funct.**, v. 14, n. 9, 2013.

PERRY, J.C. et al. Intra-nigral MPTP lesion in rats: behavioral and autoradiography studies. **Exp Neurol**. v.195, p. 322–329, 2005.

PEZZOLI, G.; CEREDA, E.; PEZZOLI, G. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v.80, p. 2035-2041, 2013.

PINTO, S. et al. Dysarthria in individuals with Parkinson's disease: a protocol for a binational, cross-sectional, case-controlled study in French and European Portuguese (FraLusoPark). **BMJ Open**, v. 6, n. 11, 2016.

POCHAPSKI, J.A. **Avaliação do efeito comportamental e neuroprotetor do ômega-3 administrado durante o período pré-natal em um modelo animal da doença de Parkinson**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

POEWE, W.; MAHLKNECHT, P.; JANKOVIC, J. Emerging therapies for Parkinson's disease. **Current opinion in neurology**, v. 24, n. 4, p. 448-459, 2012.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, fev. 1978.

PREDIGER, R. D. S. et al. Anxiety in Parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 115–124, 2012.

PRICKAERTS, J.; VENDE, J. DE; HONIG, W.; STEINBUSCH, H. W. M.; BLOKLAND, A. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages

of object memory consolidation. **European Journal of Pharmacology**, v. 436, n. 1-2, p. 83–87, 2002.

PRINZ, M.; PRILLER, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin toneuropsychiatricdisease. **Nat. Rev. Neurosci.** n.15, p. 300–312, 2014.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 11 Suppl 1:S3-7, 2005.

PUDELL, C.; VICENTE, B. A.; DELATTRE, A. M.; et al. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. **The European journal of neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 266–274, 2014.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. et al. **Farmacologia.** 5^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

REMY, P. et al. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, p. 1314-1322, 2005.

RODRIGUEZ, M. et al. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, p. 1–7, 2014.

ROSS, S.M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Effects on Inflammation in Mood Disorders. **Holist Nurs Pract** , v. 29, n.4, p. 245–247, 2015.

ROSS, B.M.; MALIK.; I.; BABAY, S. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in an animal model of anxiety. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 114, p.17–20, 2016.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–1114, 2010.

SANTIAGO, R. M. et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 70–77, 2014.

SARKAR, S.; RAYMICK, J.; IMAM, S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. **Int. J. Mol. Sci.** v.17, n. 904, 2016.

SCHAPIRA, A. H. V. Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 26, n. 4, p. 395–400, 2013.

SCHEPERJANS, F.; AHO, V.; PEREIRA, P. et al. Gut Microbiota Are Related to Parkinson's Disease and Clinical Phenotype. **Mov. Disord.**, v. 30, n.3, p. 350-358, 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192-205, 1968.

SHOJI, Y. et al. Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: A 3-year longitudinal study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

SIAN, J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorder affecting basal ganglia. **Ann Neurol**, v.38, p. 348-355, 1994.

SIMOPOULOS, A P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 560S–569S, 1999.

SKALISZ, L. L. et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 879-883, 2002.

SLATTERY, D. S.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nat Protoc**, v. 7, p. 1009-1014, 2012.

SMEYNE, M.; JAY, R. Free Radical Biology and Medicine Glutathione metabolism and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, p. 1–13, 2013.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R.J. Glutathione metabolism and Parkinson disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 62, p. 13-25, 2013.

SONG, J.; KIM, J. Degeneration of Dopaminergic Neurons Due to Metabolic Alterations and Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, 2016.

SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839-840, 1997.

STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. *In*: GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STOCCHI, F.; OLANOW, C. W. Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **Movement disorders**, v.28, n. 1, p. 37, 2013.

SVENNINGSSON, P. et al. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: Diagnosis, biomarkers, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 8, p. 697–707, 2012.

TADAIESKY, M. T. et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830 - 840, 2008.

TANRIOVER, G. et al. The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of parkinson's disease. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 48, n. 3, p. 434–441, 2010.

TEIVE, H.A.G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arq Neuropsiquiatria**, n. 56, p.141-145, 1998.

TEIVE, H.A.G.; ZAVALA, J.A.A.; IWANOTO, F.M. et al. As contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 59, n.3, p-633-636, 2001.

TESSITORE, A.; HARIRI, A.R.; FERA, F.; SMITH, W.G.; CHASE, T.N.; HYDE, T.M.; WEINBERGER, D.R.; MATTAY, V.S. Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 9099-9103, 2002.

TIAN, Y. Resolvin D2 recovers neural injury by suppressing inflammatory mediators expression in lipopolysaccharide-induced parkinson's disease rat model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 460, p. 799–805.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n.1, , 2011.

TODA, K; HARADA, T. Prevalence, Classification and Etiology of in Parkinson's Disease: Association between Parkinson's Disease and Fibromyalgia or Chronic Widespread Pain. **Tohoku J Exp Med**, n. 222, p. 1-5, 2010.

TOORANG, J.; DJAZAYERI, A.; DJALAI, M. Effects of omega-3 fatty acids supplement on antioxidant enzymes activity in type 2 diabetic patients. **Iran J Public Health.**, v. 45, n.3, p. 340-345, 2016.

TRÉPANIÉ, M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation: An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 187–206, 2016.

TRITSCH, N. X.; SABATINI, B. L. Review Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 33–50, 2012.

UNTERBERGER, U. et al. Detection of disease-associated alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid: a feasibility study. **Clinical Neuropathology**, v. 33, n. 9, p. 329–334, 2014.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DER BRUG, M.P.; SINGLETOWN, A.; GASSER, T. Parkinson's Disease: from human genetics to clinical trials. **Parkinson's Disease**, v. 8, 2015.

VINES, A.; DELATTRE, A. M.; LIMA, M. M. S.; et al. The role of 5-HT 1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 184–191, 2012.

VISANJI, N. P. et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 1, n. 1, p. 2, 2013.

ZHANG, T. et al. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease. **Medicine**, v. 50, 2016a.

ZHANG, Y. et al. Intakes of fish and polyunsaturated fatty acids and mild-to-severe cognitive impairment risks : a dose-response meta-analysis of 21 cohort studies. **Am J Clin Nutr**, n. 2, p. 330–340, 2016b.

ZHANG, M. Q. et al. Neural Plasticity Is Involved in Physiological Sleep, Depressive Sleep Disturbances, and Antidepressant Treatments. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1–16, 2017.

WANG, S. H. et al. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 295-304, mai. 2009.

WEINTRAUB, D. et al. Effect of psychiatric and other nonmotor symptoms on disability in Parkinson's disease. **J. Am. Geriatr**, p. 784-788, 2004.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, S1-58, Suppl 1, 2011.

YAVIN, E.; BRAND, A.; GREEN, P. Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress. **Nutr. Neurosci.** n. 5, p. 149–157, 2002.

YU, H.;CHEN, Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica**, v.32, p. 3-11. 2011.

CARTA DE APROVAÇÃO**Processo CEUA – 041/2016**

Protocolo UEPG – 9514/2016

Título – *Projeto de pesquisa Efeitos da suplementação com ácidos graxos ômega-3 nos sintomas não motores em modelo animal da doença de Parkinson.*

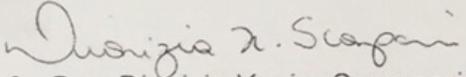
Interessado: Ana Paula Chuproski

Data de Entrada – 15/06/2016**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo –** 08/09/2016 a 08/09/2018**Considerações**

Prezado Professor Marcelo Machado Ferro e Mestranda Ana Paula Chuproski
Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de 50 (cinquenta) ratos isogênicos machos, de cento e oitenta dias de idade.

Ponta Grossa, 08 de setembro de 2016.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Dionizia Xavier Scarpini
COORDENADORA