



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, A DEGENERAÇÃO DENDRÍTICA E A AMNÉSIA RETRÓGRADA CAUSADOS POR ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA EM RATOS: INFLUÊNCIA DO REGIME DE TRATAMENTO

CRISTIANO CORREIA BACARIN

MARINGÁ
2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, A DEGENERAÇÃO DENDRÍTICA E A AMNÉSIA RETRÓGRADA CAUSADOS POR ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA EM RATOS: INFLUÊNCIA DO REGIME DE TRATAMENTO

CRISTIANO CORREIA BACARIN

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani – DFT/UEM

MARINGÁ
2016

CRISTIANO CORREIA BACARIN

EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, DEGENERAÇÃO DENDRÍTICA E AMNÉSIA RETRÓGRADA CAUSADA POR ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA EM RATOS: INFLUÊNCIA DO REGIME DE TRATAMENTO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____ / ____ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Nilton de Almeida Brito
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof^a. Dr^a. Sueli Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof^a. Dr^a. Juliana Vanessa Colombo Martins Perles
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e principalmente, aos meus pais, Anizio de Jesus Bacarin e Neura Terezinha Correia Bacarin por todo o amor, carinho, compreensão, respeito e apoio incondicional ao longo de toda a minha vida e nesses momentos difíceis que passei, pois, sem vossa ajuda e apoio eu não estaria realizando este sonho.

Ao meu irmão Rodrigo Bacarin que, mesmo estando longe, sempre me ajudou quando pode ao longo da vida e da faculdade custeando muitos de meus livros.

Ao meu amigo e companheiro de moradia, Rafael Augusto Moreira Martinelli, pelas horas de descontração, apoio nos momentos difíceis e por sempre me escutar, às vezes me dando razão e muitas vezes me criticando quando necessário e assim me ajudando com meus erros.

Ao professor Dr. Humberto Milani, meu orientador, os meus sinceros agradecimentos. Seu esforço, dedicação, paciência e apoio nos momentos difíceis, tanto pessoais quanto profissionais, tornou possível a realização deste trabalho. Muito Obrigado por tudo.

A professora Dra. Rubia M. M. W de Oliveira, por me ajudar com dicas e ensinamentos que me auxiliaram durante a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Lúcio Cardozo-Filho, Dr. Makoto Matsushita, Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi e Dr. Adelar Bracht pelos trabalhos em conjunto realizados com nosso laboratório, apoio e ensinamentos.

Aos meus amigos de laboratório: Lígia, Erika, Jacqueline, Marco, Jessica, Amanda e Leticia, que quando precisei me ajudaram nos ensinamentos e andamento dos experimentos, desde cirurgias até cuidar dos animais nos finais de semana, muito obrigado.

Aos técnicos, Marcos Alberto Trombelli e Solidalva Caruso de Oliveira, pelo apoio técnico, amizade e pelos cafezinhos que sempre me mantiveram acordado.

A secretária Francisca Helena Mesquita de Carvalho, por toda atenção, dedicação e trabalho exemplar.

E as tantas e tantas pessoas que já fizeram parte ou passaram pela minha vida. Não teria espaço aqui para nomear todos, mas são amigos, amigas, colegas etc. que ajudaram no meu desenvolvimento e nos mais variados tipos de problemas que tive em toda a vida. Muito obrigado, vocês me tornaram no que sou hoje!

Epígrafe

*His key to the locks on the chains he saw everywhere
But first he was stripped, and then he was stabbed
By faceless men, well fuckers... He still stands
And he still gives his love, he just gives it away
The love he recieves is the love that is saved
And sometimes is seen a strange spot in the sky
A human being that was given to fly*

(Eddie Vedder, Pearl Jam)

Cerva Trova

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Isquemia Cerebral.....	16
2.2. Estresse Oxidativo.....	20
2.3. Neuroplasticidade.....	23
2.4. Óleo de Peixe.....	27
3. OBJETIVO.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Animais.....	33
4.2. Delineamento Experimental.....	33
4.3. Análise Comportamental – Labirinto radial aversivo de oito braços.....	37
4.4. Isquemia Cerebral Global e Transitória.....	39
4.5. Tratamento Farmacológico.....	41
4.6. Análise Histológica.....	42
4.7. Avaliação do Estresse Oxidativo.....	43
4.8. Imunohistoquímica para MAP2.....	45
4.9. Perfil lipídico.....	47
4.10. Análise Estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Taxa de Mortalidade.....	50
5.2. Experimento I.....	50
5.3. Experimento II.....	53
5.4. Experimento III.....	56
5.5. Experimento IV.....	61
6. DISCUSSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Visão geral dos eventos bioquímicos ocorridos na I/R cerebral.....	18
FIGURA 2 – Decurso temporal da fisiopatologia da isquemia cerebral.....	19
FIGURA 3 – Sistemas oxidantes e antioxidantes endógenos.....	22
FIGURA 4 – Cones de crescimento avançando para alvo sináptico.....	25
FIGURA 5 – Esquema da síntese dos AGPI.....	28
FIGURA 6 – Biossíntese da neuroprotectina 1.....	30
FIGURA 7 – Delineamento temporal experimento I.....	34
FIGURA 8 – Delineamento temporal experimento II.....	35
FIGURA 9 – Delineamento temporal experimento III.....	36
FIGURA 10 – Desenho esquemático do labirinto radial aversivo.....	37
FIGURA 11 – Esquema representativo da cirurgia de indução à ICGT.....	40
FIGURA 12 – Desenho representativo das regiões cerebrais e sistema teste de arcos cicloides usados para quantificar a IR-MAP2.....	47
FIGURA 13 A-I – Efeitos do OP sobre o estresse oxidativo induzido por ICGT.....	51
FIGURA 14 – Efeito do OP sobre a perda de memória induzida por ICGT.....	52
FIGURA 15 A-C – Janela terapêutica do OP sobre a perda de memória induzida por ICGT.....	54 e 55
FIGURA 16 – Análise histológica e imagem representativa da neurodegeneração hipocampal.....	56
FIGURA 17 A-F – Decurso temporal e efeito do OP sobre a IR-MAP2.....	58
FIGURA 18 – Imagem ilustrativa (1000×) da IR-MAP2	59
FIGURA 19 – Imagem ilustrativa (50×) da IR-MAP2 no hipocampo.....	60
FIGURA 20 A e B – Efeito da ICGT e do tratamento com OP sobre o perfil lipídico cerebral....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição e concentração (% ou mg/cápsula) de ácidos graxos no óleo de peixe comercializado como Ômega-3 250 DHA e usado no presente estudo.....	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

4-VO = 4-vessel occlusion	IR-MAP2 = imunorreatividade da MAP2
AA = ácido araquidônico	Isq = isquemia
ABC = avidin-biotin complex	LOX = lipooxigenases
ACCs = artérias carótidas comuns	LRA = labirinto radial aversivo
ACM = artéria cerebral média	LTD = long-term depression
AGPI = ácido graxo poli-insaturado	LTE = leucotrienos
AL = ácido linoleico	LTP = long-term potentiation
AαL = ácido α-linolênico	TXA = tromboxanas
AMPA = α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	MAP2 = microtubule-associated protein type 2
ATP = adenosine triphosphate	NF-kB = nuclear factor kB
AVs = arterias vertebrais	NGF = nerve growth factor
BDNF = brain-derived neurotrophic factor	NMDA = N-Methyl-D-aspartate
BSA = bovine serum albumin	NO = óxido nítrico
CA = cornu ammonis	NOX = NADPH-oxidase
CAT = catalase	NPD1 = neuroprotectina D1
COX = ciclooxigenase	NT-3 = neurotrophin 3
DAB = 3,3,9-hidrocloro de diaminobenzidina	NT-4 = neurotrophin 4
DHA = ácido docosahexaenóico	O₂ = oxigênio
DNA = deoxyribonucleic acid	O₂^{•-} = ânion superóxido
EMAG = ésteres metílicos de ácidos graxos	ONOO- = peroxinitrito
EPA = ácido eicosapentaenóico	OH• = radical hidroxila
ERO = espécies reativas de oxigênio	OP = óleo de peixe
GAP-43 = growth-associated protein 43	PB = phosphate buffered
G6Pd = glucose-6-phosphate dehydrogenase	PBS = phosphate buffered saline
GDNF = glial cell line-derived neurotrophic factor	PFA = paraformaldeído
GSH = glutationa reduzida	PSD-95 = postsynaptic density 95
GSH-Px = glutationa peroxidase	R1 = regime 1
GSH-Rd = glutationa redutase	R2 = regime 2
GSSG = glutationa oxidada	R3 = regime 3
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio	RNA = ribonucleic acid
ICGT = isquemia cerebral global e transitória	SNC = sistema nervoso central
I/R = isquemia/reperfusão	SOD = superóxido dismutase
ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule 1	SYP = synaptophysin
IL-1β = interleucina-1β	TNF-α = tumoral necrosis factor α
iNOS = óxido nítrico sintase induzível	TRM = teste de retenção de memória
	VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1
	Vei = veículo

RESUMO

A neurodegeneração e o prejuízo cognitivo são as principais consequências da isquemia cerebral global e transitória (ICGT). O óleo de peixe (OP) constitui uma fonte alimentar rica em ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, principalmente o ácido docosahexaenóico (DHA), conhecido pela vasta atividade biológica e neuroprotetora. O objetivo desse trabalho foi investigar as alterações bioquímicas, morfológicas e comportamentais induzidas pela ICGT e o efeito do OP sobre essas alterações. No experimento 1, ratos foram tratados com OP (300 mg/kg DHA, 4 doses, 3 dias antes e logo após a ICGT) e submetidos à ICGT e após 24 horas de reperfusão o estresse oxidativo foi avaliado. Ainda, ratos foram treinados no labirinto radial aversivo (LRA), submetidos à ICGT e tratados com OP (com o mesmo regime de tratamento usado para avaliar o estresse oxidativo) para testar o efeito antiamnésico. No experimento 2, ratos foram treinados no LRA e submetidos à ICGT. O OP (300 mg/kg de DHA) foi administrado por 10 dias de acordo com os regimes de tratamento (R). R1 – início 4 horas após ICGT; R2 - início 8 horas após ICGT; e R3 - início 12 horas após ICGT. Os testes de retenção de memória foram realizados por 5 semanas após a ICGT. No experimento 3, ratos foram submetidos à ICGT e divididos em 5 grupos com relação ao tempo de isquemia/reperfusão (I/R). Após o tempo de I/R, os animais foram sacrificados para realização de imuno-histoquímica para a proteína associada aos microtúbulos 2 (MAP2). Posteriormente, ratos foram submetidos à ICGT, tratados com OP (300 mg/kg de DHA, R1 e R3 do experimento 2) e imuno-histoquímica para a MAP2 foi realizada com 14 e 28 dias de I/R. No experimento 4, ratos foram submetidos à ICGT e tratados com OP (R1, experimento 2) para a análise do perfil lipídico encefálico. O estresse oxidativo causado pela ICGT foi avaliado pela diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e da concentração de glutatona e o aumento na carbonilação de proteínas. O OP reverteu o estresse oxidativo ao nível do controle. O mesmo regime de tratamento que apresentou efeito antioxidante demonstrou também efeito antiamnésico leve (ou ausente). Na análise comportamental do experimento 2, o R1 de tratamento com o OP aboliu totalmente o prejuízo de memória induzida pela ICGT. Os R2 e R3 apresentaram menores efeitos antiamnésico. A ICGT causou degeneração dendrítica em 14 dias de I/R, bem visualizada por meio da baixa expressão da MAP2. Entretanto, em 28 dias de I/R foi observado aumento na expressão da MAP2 comparado com 14 dias de I/R. O OP apresentou efeito neuroprotetor dendrítico com R1. Por fim, a análise do perfil lipídico mostrou que a isquemia e o tratamento com OP interferiram no balanço de ácidos graxos do hipocampo, com aumento da concentração de DHA e EPA. O presente estudo fornece evidências de que os efeitos antioxidante e neuroprotetor sobre os dendritos do tratamento com o OP podem ter contribuído para o efeito antiamnésico de longa duração observado neste e em trabalhos anteriores realizados por nós.

Palavras-chave: Aprendizagem e memória, óleo de peixe, isquemia cerebral global e transitória, neuroproteção, antioxidante.

ABSTRACT

Neurodegeneration and cognitive impairment are the main consequences of the transient, global cerebral ischemia (TGCI). Fish oil (FO) is a rich food source of polyunsaturated fatty acids omega-3, mainly docosahexaenoic acid (DHA), known by the vast biological and neuroprotective activity. The aim of this study was to investigate the biochemical, morphological, and behavioral changes TGCI-induced and the FO effect on these changes. In experiment 1, rats were treated with FO (300 mg/kg DHA, 4 doses, 3 days before and immediately after TGCI), submitted to TGCI and after 24 hours of reperfusion the oxidative stress was evaluated. Furthermore, rats were trained in aversive radial maze (ARM), submitted to TGCI and treated with FO (with the same treatment regimen used for evaluate oxidative stress) for test the anti-amnesic effect. In experiment 2, rats were trained in ARM and submitted to TGCI. FO (300 mg/kg of DHA) was administered for 10 days according to the treatment regimens (R). R1 - beginning 4 hours after TGCI; R2 - beginning 8 hours after TGCI; and R3 - beginning 12 hours after TGCI. Retention memory tests were realized by 5 weeks after TGCI. In experiment 3, rats were submitted to TGCI and divided into 5 groups with relation to ischemia/reperfusion (I/R) time. After I/R time, the animals were sacrificed for performing of immunohistochemistry for microtubule-associated protein 2 (MAP2). Subsequently, rats were submitted to TGCI, treated with FO (300 mg/kg of DHA, R1 and R3 of the experiment 2), and immunohistochemistry for MA2 was performed at 14 and 28 days of I/R. In the experiment IV, rats were submitted to TGCI and treated with FO (R1, experiment 2) for analysis of brain lipid profile. TGCI-induced oxidative stress was evaluated by decreased antioxidant enzymes activity and concentration of glutathione and increased protein carbonylation. FO reversed oxidative stress to control level. The same treatment regimen that showed antioxidant effect also demonstrates slight anti-amnesic effect (or absent). In behavioral analysis of the experiment 2, R1 treatment with FO totally abolished the memory impairment TGCI-induced. R2 and R3 showed lower anti-amnesic effects. TGCI caused dendritic degeneration at 14 days of I/R, well visualized through low MAP2 expression. However, at 28 days of I/R was seen increase in the MAP2 expression compared to 14 days of I/R. FO increased MAP2 expression with R1. Finally, lipid profile analysis showed that ischemia and treatment with FO interfered in the fatty acid balance of the hippocampus, with increase in the concentration of DHA and EPA. This study provides evidence that antioxidant and neuroprotective on dendrites effects of the treatment with OP may contribute to the FO long-term anti-amnesic effect seen in this and previous work carried out by us.

Keywords: Learning and memory, fish oil, cerebral ischemia, neuroprotective, antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral global e transitória (ICGT) é um fenômeno que ocorre quando o fornecimento de sangue para o encéfalo inteiro, ou grande parte, é interrompido, resultando na privação de oxigênio (O_2) e glicose para o tecido, que pode provocar lesão cerebral permanente. A ICGT, por um período curto, resulta na neurodegeneração seletiva em áreas vulneráveis do cérebro, tais como a região CA1 do hipocampo (PULSINELLI, 1985; AKAI e YANAGIHARA, 1993). Os mecanismos subjacentes da perda neuronal na região CA1 devido a ICGT podem envolver excitotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação e apoptose (DIRNAGL et al., 1999; MADL e HOLZER, 2004). Em humanos, a ICGT é consequência imediata da parada cardíaca reversível, podendo ocorrer também devido a arritmias severas, choque hipotensivo ou mesmo depois de procedimentos de diagnóstico ou cirúrgico. Muitos pacientes de ICGT causada por parada cardíaca reversível experimentam prejuízo cognitivo, executivo, emocional, sensorial e motor, levando a limitações sociais e profissionais (LIM et al., 2004; ANDERSON E ARCINIEGAS, 2010). Há necessidade urgente de identificar substâncias seguras e eficazes para tratar o dano cerebral e as sequelas funcionais após isquemia, mas nenhum tratamento farmacológico tem se mostrado eficaz atualmente em seres humanos (SUTHERLAND et al., 2012).

Durante a fisiopatologia da isquemia cerebral, a isquemia seguida de reperfusão (I/R), em particular, é responsável por intensa geração de radicais livres, principalmente as espécies reativas de oxigênio (ERO) (NITA et al., 2001), que culminam em estresse oxidativo e efeitos deletérios durante a patogênese (CHAN, 2001). Após o período de isquemia cerebral, durante a reperfusão, a alta demanda tecidual de O_2 e glicose ocasiona alta produção de ERO como subproduto das reações energéticas (OLMEZ E OZYURT, 2012; DIRNAGL, 2012). A produção de ERO ocorre, também, no citoplasma, por meio da ação da NADPH oxidase (NOX), alteração da homeostase do Ca^{+2} , oxidação da xantina e hipoxantina pela xantina oxidase e reação entre óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para gerar o radical peroxinitrito (ONOO-) (NISHINO e TAMURA, 1991; BEETSCH et al., 1998). O estresse oxidativo implica no desequilíbrio da homeostase pro-oxidação/antioxidação na direção pro-oxidação causado pela geração exacerbada de ERO, como o $O_2^{\bullet-}$, radicais hidroxila (OH^{\bullet} , OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ONOO-, e/ou a remoção de substâncias antioxidantes endógenas, como a glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona redutase (GSH-Rd), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Fig. 3). O tecido acometido por estresse oxidativo pode sofrer dano difundido em componentes celulares tais como DNA, lipídeos e proteínas (CHAN, 2001; SUGAWARA e CHAN, 2003). O estresse oxidativo, juntamente com o aumento do Ca^{2+} intracelular, também pode causar abertura do poro de permeabilidade mitocondrial. Isto permite entrada de água e de solutos a partir do citoplasma resultando em inchaço e dano mitocondrial (CHAN, 2001; SUGAWARA e CHAN, 2003). O estresse oxidativo é um dos primeiros eventos fisiopatológicos na I/R, atingindo máximo em cerca de 48 horas, e importante fator subjacente na morte

neuronal por necrose (OLMEZ E OZYURT, 2012; DIRNAGL, 2012) (Fig. 1 e 2). Além da produção de ERO, eventos subsequentes contribuem para o aumento do estresse oxidativo como a ativação de vias de sinalização de transdução, produção de ERO secundários e reações de oxidação em cadeia de lipídeos, proteínas e DNA (SMALL et al., 1999; OLMEZ e OZYURT, 2012).

Após I/R, os neurônios podem morrer por apoptose/necrose ou sobreviver pela manutenção da homeostase celular/iônica (KASS e LIPTON, 1989; KOBAYASHI et al., 2003). Para compensar a perda neuronal e recuperar funções neurológicas após isquemia, os neurônios sobreviventes podem sofrer inúmeras modificações, como crescimento de neuritos e aumento dos terminais pré- e pós-sinápticos, aumentando sua funcionalidade (JUNG et al., 2004; ITO et al., 2006). Esse fenômeno de compensação após lesão, conhecido também como neuroplasticidade, ocorre por meio da formação e desenvolvimento de axônios, dendritos e espinhos dendríticos, aumento da expressão de proteínas sinápticas e formação de sinapses (Fig. 4) (JOURDAIN et al., 2002; JUNG et al., 2004; KOVALENKO et al., 2006). Na neuroplasticidade, a proteína associada aos microtúbulos tipo 2 (MAP2, sigla em inglês para “microtubule-associated protein type 2”) estabiliza os protofilamentos dos microtúbulos nos dendritos, proporcionando formação e desenvolvimento (AL-BASSAM et al., 2002). A MAP2 desempenha papel na estruturação dendrítica devido a sua compartimentalização no citoesqueleto de dendritos e em grande parte excluída de axônios (CCERES et al., 1989; HOROKAWA et al., 1996). Alguns estudos relataram aumento na expressão da MAP2 no córtex (POPA-WAGNER et al., 1999; BURY e JONES, 2002) e no hipocampo (BRIONES et al., 2006) de ratos após isquemia cerebral, podendo este aumento refletir um mecanismo compensatório após lesão.

O ácido docosahexaenóico (DHA, sigla em inglês para “docosahexaenoic acid”, 22:6 n-3) é um ácido graxo poli-insaturado (AGPI) ômega-3 essencial encontrado em grande concentração no óleo de peixes de águas frias e profundas, como a cavala, sardinha, salmão e truta (CONNOR et al., 2000). Após administração, o DHA livre é transportado pela corrente sanguínea e concentra-se nas membranas celulares no sistema nervoso, incorporado nos fosfolipídeos, onde pode ser mobilizado e atuar em processos cognitivos e neuroproteção (BAZAN, 2006; BAZAN, 2007). Em situações que causam lesão, como processo inflamatório e estresse oxidativo, o DHA é liberado a partir das membranas celulares e convertido a neuroprotectina D1 (NPD1) (Fig. 6), a qual apresenta efeitos anti-inflamatórios, inibe a expressão de genes pró-apoptóticos, promove sobrevivência celular e regeneração de neuritos (BAZAN et al., 2011; EADY et al., 2012). Estudos sobre os efeitos neurológicos do DHA mostraram redução do prejuízo cognitivo espacial e efeito neuroprotetor na região CA1 do hipocampo em modelo animal de isquemia cerebral global (OKADA et al., 1996) e melhora na função neurológica e redução do volume de infarto cortical e estriatal em modelo animal de isquemia cerebral focal (BELAYEV et al., 2004; BELAYEV et al., 2009). Efeito neuroprotetor similar a esses estudos foi encontrado utilizando o DHA e NPD1, o qual correlaciona redução do volume de infarto com a redução da resposta neuroinflamatória em modelo de isquemia cerebral focal

(EADY et al., 2012). Além disso, HONG et al. (2015) demonstraram que o DHA protege contra a quebra da barreira hematoencefálica induzido por isquemia.

Dessa forma, recentemente iniciamos estudos para investigar a eficácia do óleo de peixe (OP) em aliviar o prejuízo de memória e a neurodegeneração hipocampal em ratos submetidos a modelo de ICGT. O OP é a maior fonte natural do DHA e do ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3, sigla em inglês para “eicosapentaenoic acid”), os quais são AGPI ômega-3 e importantes princípios ativos nutricionais e/ou nutracêuticos. Em nossos estudos, o OP administrado diariamente por 32 dias, com início 3 dias antes da isquemia, preveniu a amnésia retrógrada causada pela ICGT de forma robusta e sustentada. Neste estudo, o efeito antiamnésico do OP foi mantido durante pelo menos 2 semanas após o fim do tratamento, o que sugere que o OP possui efeito prolongado. Curiosamente, o tratamento com OP falhou em proporcionar neuroproteção celular no hipocampo, indicando que o seu efeito sobre a recuperação da memória ocorre mesmo na presença de grave lesão neuronal nesta região cerebral (FERNANDES et al., 2006). Alguns dados contemporâneos reforçaram nossos resultados (PLAMONDON e ROBERGE, 2008). Nesse estudo, suplementação com OP reduziu o prejuízo de memória espacial, mas não a neurodegeneração na região CA1 do hipocampo após ICGT. Em um estudo seguinte, reduzindo o tempo de tratamento de 32 para 10 dias, com início da primeira dose 3 dias antes da isquemia, o OP ainda exerceu efeito antiamnésico robusto, sustentado durante pelo menos 5 semanas de testes de retenção de memória, e novamente ausência de neuroproteção (BACARIN et al., 2013). Entretanto, o efeito antiamnésico mediado pelo OP não foi evidente quando o tratamento foi iniciado 15 dias após a isquemia, mesmo o tratamento abrangendo os dias de testes retenção de memória (BACARIN et al., 2013). Devido a esses resultados, levantamos a hipótese de que o efeito do OP em preservar a memória ou facilitar a recuperação da memória após ICGT pode ser atribuído a ações "anti-isquêmicas" que ocorrem nas primeiras horas ou dias após a isquemia e não por estimulação de processos relacionados à memória adquirida em momentos tardios pós-isquemia. Entre outras possibilidades, presumimos que um possível efeito antioxidante mediado pelo tratamento com OP sobre o estresse oxidativo da I/R pode representar um mecanismo pelo qual o OP protege contra a perda de memória. Adicionalmente, pensamos que os efeitos anti-isquêmicos do OP, como por exemplo, inibição do estresse oxidativo, pode ter prevenido lesões em estruturas subcelulares, como os neuritos, e assim contribuído para o efeito antiamnésico encontrado.

Em continuação aos nossos estudos dos efeitos neurológicos do OP sobre os danos da ICGT, esse trabalho apresenta quatro experimentos, no qual investigamos: 1) o efeito do OP sobre o estresse oxidativo na fase inicial da I/R e a prevenção da perda de memória de longo prazo, usando regime de tratamento que abrange o período pré-isquemia; 2) o efeito do OP em prevenir a perda de memória de longo prazo quando o tratamento é iniciado no período pós-isquemia e a existência (ou não) de uma janela terapêutica; 3) o decurso temporal da expressão da MAP2 após ICGT e a influência do tratamento com OP; e 4) o perfil lipídico de encéfalos isquêmicos e não isquêmicos e a influência do

tratamento com o OP sobre o balanço dos ácidos graxos. Primeiramente, nossa hipótese foi que uma ação antioxidante mediada pelo OP administrado antes da isquemia e nas primeiras horas de reperfusão pode exercer ação anti-isquêmica e contribuir para o efeito antiamnésico após ICGT. O estresse oxidativo foi avaliado nas primeiras horas após a ICGT devido a formação de ERO ser um evento agudo dos primeiros dias de reperfusão (LEHOTSKY et al., 2004; SELAKOVIC et al., 2011). Além disso, testamos se o regime de tratamento com OP utilizado para investigar o efeito antioxidante seria suficiente para promover efeito antiamnésico robusto e sustentado. Continuando nosso estudo comportamental, avaliamos o efeito antiamnésico do OP com regimes de tratamento iniciado no período pós-isquemia, para mimetizar situações reais, onde é difícil prever um evento de isquemia cerebral. Em seguida, com relação a nossos dados da ausência de neuroproteção do OP, pensamos que o mecanismo de ação para o efeito antiamnésico do OP pode ser a prevenção da degeneração dos neuritos ou estimulação de ações neuroplásticas após ICGT nos neurônios sobreviventes. Estudos recentes reforçam nossa hipótese demonstrando que o DHA, principal componente do OP, estimulou o crescimento de neuritos em neurônios do hipocampo (CALDERON e KIM, 2004) e elevou os níveis de fatores neurotróficos e proteínas sinápticas após trauma cerebral (WU et al., 2011). Por fim, avaliamos o perfil lipídico encefálico para determinar se o tratamento com OP promove incorporação de ácidos graxos, principalmente o DHA e EPA. Este experimento se baseou em estudos que mostraram alterações nas concentrações de DHA e EPA no tecido encefálico após tratamento com OP (NALIWAIKO et al., 2004; DELATTRE et al., 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Isquemia Cerebral

As condições que desencadeiam isquemia cerebral são as maiores causadoras de morbidade e mortalidade no mundo (NIKONENKO et al., 2009; NEUMANN et al., 2013). Anóxia, oclusão trombótica ou embólica, cirurgias cardíacas, choque hipotensivo grave, colapso cardiocirculatório (como a parada cardíaca reversível), podem levar à condições de isquemia cerebral. Insuficiência cardíaca congestiva ou ainda disritmia cardíaca são também capazes de levar ao quadro de hipóxia/isquemia cerebral (GARCIA, 1992; GARCIA et al., 1993). As lesões isquêmicas no cérebro podem acarretar importantes disfunções neuropsicológicas, principalmente na esfera cognitiva de aprendizagem e memória e funções executivas (VOLPE et al., 1983; ZOLA-MORGAN et al., 1986; MOULAERT et al., 2010; MATEEN et al., 2011). Estudos *post mortem* sugeriram que prejuízos comportamentais, associados a danos no hipocampo, são fatores chave para a compreensão dos eventos pós-isquemia (ZOLA-MORGAN et al., 1986; BLUM et al., 2012).

A lesão isquêmica inicia-se pela ausência de nutrientes e O_2 no cérebro, devido à oclusão vascular, e resulta em alterações metabólicas e celulares ao longo de minutos a dias ou até meses após o termino da isquemia (Fig. 1 e 2). Tais alterações levam ao desenvolvimento de muitas das deficiências neurológicas observadas em pacientes pós-isquemia (MCINTOSH et al., 1996). No tocante ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas neuroprotetoras, apesar de intensos esforços, somente alguns tratamentos farmacológicos, como com uso de trombolíticos, parecem minimizar os prejuízos funcionais após isquemia cerebral (AURIEL E BORNSTEIN, 2010). Portanto, fica claro que são necessários estudos que objetivem identificar estratégias seguras e eficazes para o tratamento da doença isquêmica cerebral.

Os diferentes neurônios do sistema nervoso central (SNC) possuem diferentes vulnerabilidades à isquemia e podem apresentar, em até certo grau, tolerância em situações de isquemia subsequente (KIRINO, 2002). Os neurônios mais vulneráveis a isquemia morrem rapidamente por falência energética após a perda do aporte sanguíneo. Na fase inicial da isquemia, a falta de O_2 leva a depleção de ATP (sigla em inglês de “adenosine triphosphate”), que resulta em falência energética e consequente interrupção do funcionamento da bomba Na^+/K^+ -ATPase e, por sua vez, causa despolarização da membrana neuronal. Essa despolarização promove a abertura de canais de Ca^{+2} voltagem-dependente nos terminais pré-sinápticos. O influxo de Ca^{+2} promove a liberação de neurotransmissores, principalmente de glutamato pelos neurônios glutamatérgicos que ativam os receptores AMPA (sigla em inglês para “ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid”) e NMDA (sigla em inglês para “N-methyl-D-aspartate”) pós-sinápticos. Neste instante da isquemia, a morte neuronal é de natureza excitotóxica mediada pela ativação glutamatérgica, sobrecarga intracelular de ions Ca^{+2} , ativação de varias enzimas líticas (proteases, lipases e endonucleases) e

acidose (DIRNAGL et al., 1999; LEE et al., 2000) (Fig. 1 e 2). Após a isquemia, quando o fluxo sanguíneo cerebral retorna a níveis normais, a presença do O₂ leva à produção intra-neuronal e extra-neuronal de ERO, causando estresse oxidativo que afeta os neurônios por meio da oxidação de componentes lipídicos, proteicos, DNA e RNA, sendo que a ativação, por exemplo, da cicloxigenase-2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) aumentam os níveis de ERO (MATTSON et al., 2000; GRAHAM E HICKEY, 2003) (Fig. 1 e 2). A excitotoxicidade e o estresse oxidativo ocorrem nas primeiras horas a dias de I/R (Fig. 2). A morte neuronal tardia (dias a semanas após a isquemia, Fig. 2) ocorre devido a reações inflamatórias mediadas pelas citocinas, dentre as quais se destacam o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , sigla em inglês para “tumor necrosis factor alpha”) e interleucina 1 beta (IL-1 β) e moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, sigla em inglês para “intercellular adhesion molecule 1”) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM, sigla em inglês para “vascular cell adhesion molecule 1”) (IADECOLA E ALEXANDER, 2001). Esses mediadores pró-inflamatórios promovem o acúmulo de leucócitos, macrófagos e células microgliais ativadas na área isquêmica e na região de penumbra (área perisquêmica) (PANTONI et al., 1998; MABUCHI et al., 2000). Adicionalmente, células inflamatórias infiltrantes expressam iNOS e produzem grandes quantidades de óxido nítrico (NO) e subsequente formação de ONOO⁻, espécie reativa que causa lesão tecidual (WANG et al., 2007) (Fig. 1 e 2).

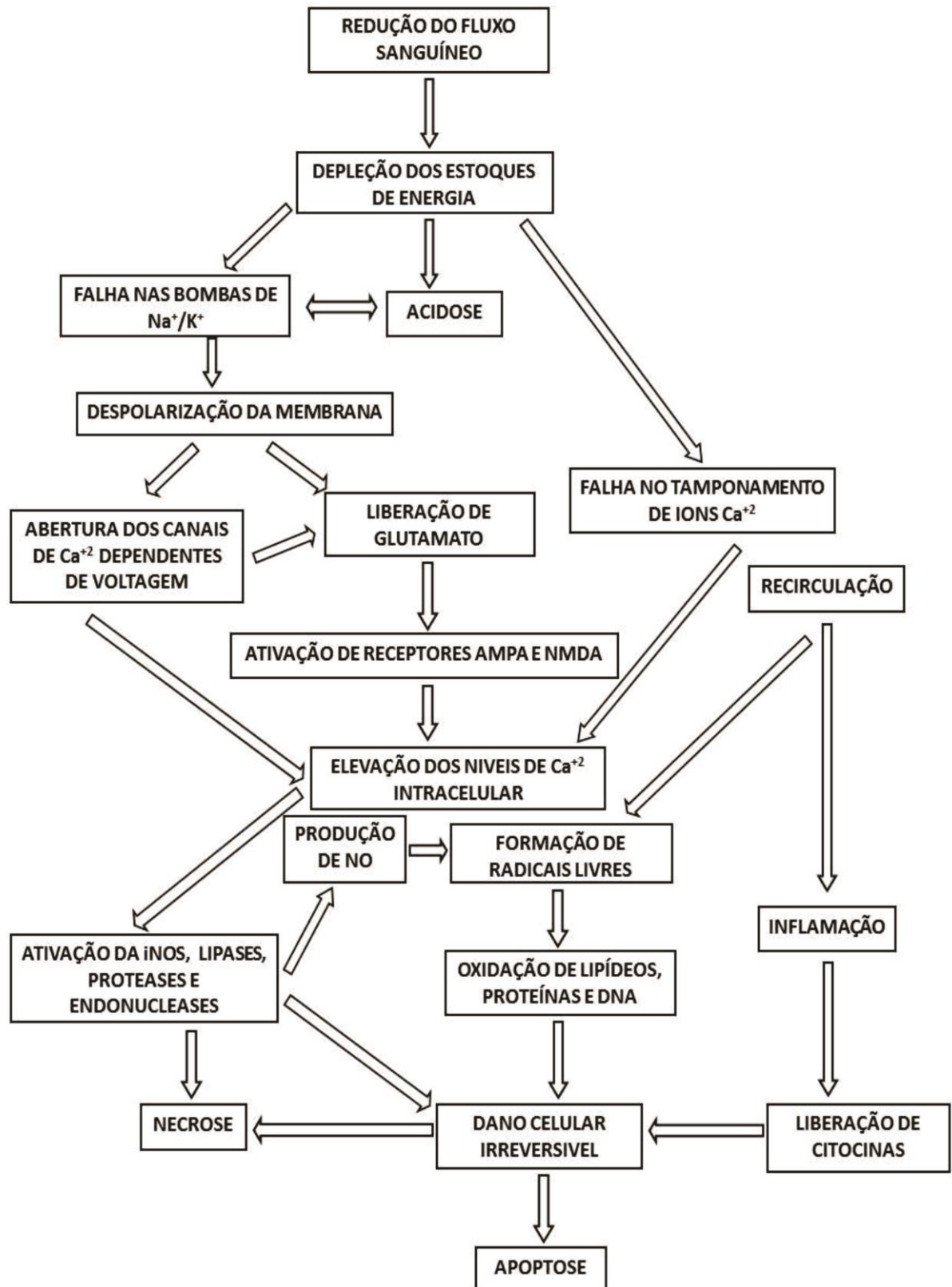


Fig. 1 – Visão geral dos eventos bioquímicos ocorridos na I/R cerebral (modificado de DE KEYSER et al., 1999).

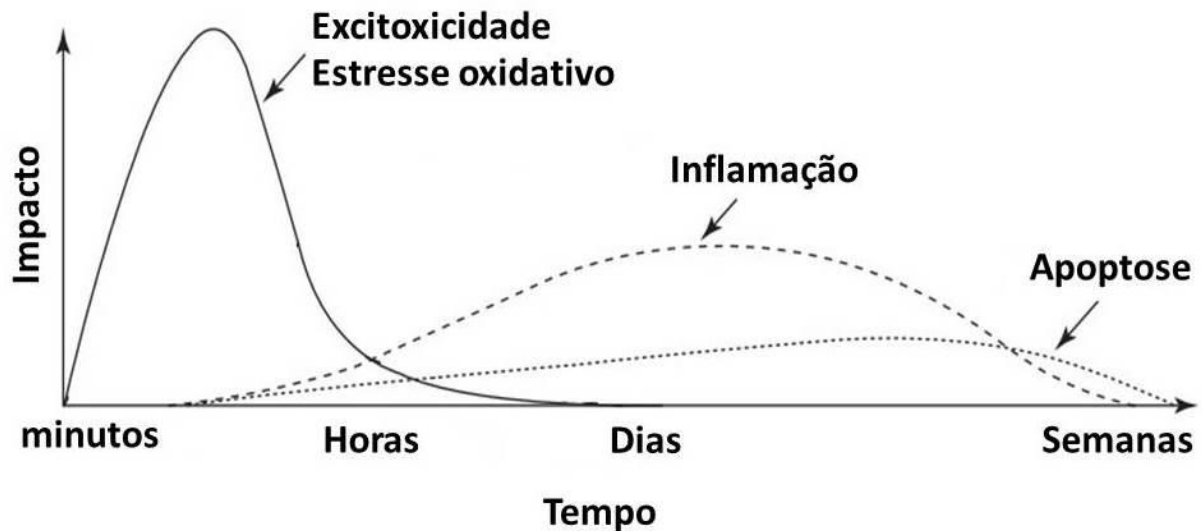


Fig. 2 - Representação esquemática do decurso temporal dos processos fisiopatológicos desencadeados pela isquemia cerebral (modificado de DIRNAGL et al., 1999).

A compreensão da fisiopatologia da lesão isquêmica é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Para isso, o uso de modelos animais de isquemia cerebral é amplamente descrito na literatura. Dois tipos principais de modelos experimentais *in vivo* têm sido usados com o objetivo de mimetizar as condições da isquemia cerebral: i) modelo de isquemia cerebral focal (modelo para acidente vascular encefálico) e ii) modelo de isquemia cerebral global (modelo para parada cardíaca reversível) (TRAYSTMAN, 2003).

A isquemia cerebral focal pode ser induzida experimentalmente por meio da oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM), o que resulta na interrupção do fluxo sanguíneo para o território suprido por aquela artéria e consequente aparecimento de infarto cerebral no corpo estriado e córtex cerebral. Este modelo tem sido extensivamente utilizado, pois mimetiza o que ocorre no acidente vascular encefálico trombótico ou embólico em humanos (TRAYSTMAN, 2003).

O modelo de isquemia cerebral global é caracterizado por oclusão permanente ou transitória das artérias carótidas comuns (ACC) e/ou das artérias vertebrais (AV). (PULSINELLI E BRIERLEY, 1979) (Fig. 11). Este modelo reproduz alguns aspectos neuropatológicos e comportamentais da parada cardíaca reversível, como por exemplo, neurodegeneração em estruturas como hipocampo, corpo estriado, córtex e tálamo, além de disfunções cognitivas características, tais como, prejuízo da aprendizagem e memória (TRAYSTMAN, 2003). Para diminuir a influência da circulação colateral no modelo de isquemia cerebral global, em 1979, Pulsinelli e Brierley desenvolveram o modelo de oclusão dos 4 vasos (4-VO, sigla em inglês para “4-vessel occlusion”) fornecendo um método mais consistente de ICGT. Classicamente, o modelo 4-VO é realizado em dois estágios. No primeiro estágio, clips traumáticos são colocados soltos ao redor de cada ACC e exteriorizados no pescoço do animal. Subsequentemente, as AV são eletrocauterizadas, via forâmem alar da primeira vértebra

cervical. No segundo estágio, as ACC são gentilmente exteriorizadas e então ocluídas temporariamente enquanto o animal está acordado, induzindo a isquemia cerebral.

A gravidade da lesão geralmente está relacionada à duração da isquemia, ou seja, o tempo de oclusão do fluxo sanguíneo. Após esse tempo as quantidades de O₂ e glicose voltam a atingir níveis dentro da normalidade no tecido cerebral. Entre os sinais mais característicos da neurodegeneração estão a perda de corpos celulares neuronais e dos contatos sinápticos. Normalmente se estuda estes sinais no hipocampo, considerando ser esta uma estrutura cerebral consistentemente envolvida nos processos de aprendizagem e memória. Além disto, o hipocampo é uma estrutura cerebral altamente vulnerável a eventos isquêmicos e, devido a suas características anatômicas de estrutura laminar, permite que medidas quali- e quantitativas sejam facilmente realizadas (FARKAS et al., 2007).

Após a indução da ICGT em ratos, estudos demonstraram que os neurônios do subcampo CA1 do hipocampo são particularmente sensíveis a neurodegeneração (KIRINO, 1982). A neurodegeneração hipocampal inicia-se nos primeiros minutos da isquemia e atinge o máximo em cerca de 7 dias pós-isquemia (PULSINELLI et al., 1982; NIKONENKO et al., 2009). No entanto, com o passar do tempo a neurodegeneração hipocampal parece regredir gradualmente. Cérebros de animais isquêmicos avaliados com 3 a 4 meses pós-isquemia apresentaram menor neurodegeneração no subcampo hipocampal CA1 do que os observados com 2 a 3 semanas pós-isquemia, sugerindo que novas células estariam repovoando a área afetada, por meio da neurogênese, o que contribuiria para a recuperação funcional (BENDEL et al., 2005).

Paralelamente às alterações neuro-histológicas, diversas alterações comportamentais podem ser observadas após a ICGT em animais experimentais. A magnitude e tipo de alteração parecem variar consideravelmente, dependendo do tipo de modelo comportamental, espécie animal usado e tempos de reperfusão avaliados (MILOT E PLAMONDON, 2009). Em ratos, prejuízos cognitivos são comumente observados após a ICGT. Tais prejuízos têm sido associados à morte neuronal no subcampo CA1 do hipocampo (BLOCK, 1999). Por exemplo, prejuízos de aprendizagem e memória perdurando por até 270 dias foram observados em ratos submetidos à ICGT (LANGDON et al., 2008).

2.2. Estresse Oxidativo

Os radicais livres são espécies moleculares que contêm um ou mais elétrons não emparelhados (elétron não compartilhado) na camada de valência e que são altamente reativos com outras moléculas, tais como lípidios e DNA, acoplando com seus elétrons individuais e causando oxidação dessas moléculas (DRÖGE, 2002).

Os radicais livres agem sobre as células alterando as características moleculares das membranas, promovendo mutações gênicas, desorganizando a homeostase celular e colaborando na formação de resíduos químicos. Apesar da existência de agentes e mecanismos antioxidantes

endógenos nas células, quando ocorre o excesso de formação de ERO o tecido sofre estresse oxidativo que pode conduzir a diversas disfunções orgânicas. No entanto, essa condição varia de acordo com o organismo, tipo celular e, até mesmo, entre células de um mesmo tecido, pela diversificação da capacidade antioxidante de cada célula (BERRA et al., 2006).

Os efeitos das espécies reativas são abrangentes, todavia três reações são relevantes para a lesão celular. A primeira é a peroxidação lipídica das membranas, que ocorre quando as ligações duplas em ácidos graxos insaturados são atacadas pelos radicais livres derivados do O_2 , particularmente o radical OH^\bullet . As interações lipídio-radical geram peróxidos instáveis e reativos que produzem uma reação em cadeia autocatalítica, resultando em lesão extensa das membranas, organelas e células. A segunda reação é a modificação oxidativa das proteínas, que acontece devido à ação dos radicais livres nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, formando ligações cruzadas proteína-proteína. E por último, são modificações no DNA por meio de reações que ocorrem com a timina do DNA nuclear e mitocondrial, produzindo quebras de filamento no DNA (COTRAN et al., 2000).

O $O_2^{\bullet-}$ é formado quando a molécula de O_2 adquire um elétron adicional, deixando a com um elétron não emparelhado (MILLER et al., 1990). Este processo é mediado por enzimas pró-oxidantes, tais como a fosfato de nicotina-adenina-dinucleótido (NADPH) oxidase e a xantina oxidase. O principal local para a produção de $O_2^{\bullet-}$ é na mitocôndria, organela celular responsável pela produção de ATP. Normalmente, os elétrons são transferidos através da cadeia de transporte mitocondrial de elétrons para a redução do O_2 à água, no entanto, cerca de 2% a 5% do fluxo de elétrons produz o $O_2^{\bullet-}$ (CHAN, 2001). Subsequente, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido em H_2O_2 , pela ação da enzima SOD ($O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$), que é ainda convertido a $H_2O + O_2$ pela CAT ou GSH-Px ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (CHAN, 2001). O $O_2^{\bullet-}$ também pode reagir com H_2O_2 e gerar OH^- (WEISS, 1951). O H_2O_2 também é produzido pela xantina-oxidase, oxidase de aminoácidos e NADPH oxidase (GRANGER, 1988; DUPUY et al., 1991). Na presença do ion cloreto, o H_2O_2 é convertido em ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl é altamente oxidativo e desempenha papel importante na eliminação de agentes patogênicos nas vias aéreas (KLEBANOFF, 2005). No entanto, o HOCl pode reagir com o DNA, induzir interações DNA-proteína, produzir produtos de oxidação de pirimidina e adicionar cloreto às bases do DNA (KULCHARYK e HEINECKE, 2001). O H_2O_2 é a espécie reativa mais duradoura, eletricamente neutra, capaz de passar através das membranas celulares e mais estável do que $O_2^{\bullet-}$, OH^\bullet e outros ERO. Portanto, o H_2O_2 pode persistir por mais tempo após a reperusão e produzir lesão neuronal (CHAN, 2001).

Por outro lado, OH^\bullet é uma forma neutra do ion hidroxila com elevada reatividade e meia-vida curta *in vivo* (PASTOR et al., 2000). O OH^\bullet não é produzido como um subproduto de reação enzimática conhecida, no entanto, é produzido a partir de H_2O_2 por meio da reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + Fe^{3+} + OH^\bullet$) e reação de Haber-Weiss ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^\bullet + HO^- + O_2$) ou por

peroxinitrito (ONOO) (BECKMAN et al., 1990; CHAN, 1996). Uma vez formado, o $\text{OH}\cdot$ reage instantaneamente com diversos componentes celulares, incluindo os ácidos graxos poli-insaturados da membrana. A reação inicial de $\text{OH}\cdot$ com ácidos graxos poli-insaturados produz o radical alquila, que por sua vez reage com O_2 para formar o radical peróxilo ($\text{ROO}\cdot$). O $\text{ROO}\cdot$ pode abstrair o hidrogênio do ácido graxo adjacente para produzir um hidroperóxido lipídico (ROOH), e assim propagar reação em cadeia de oxidação lipídica (BEAL, 1996). Outra forma de radical livre, o NO é formado pela oxidação enzimática da L-arginina em citrulina, pela NOS, e atua como um importante regulador da resposta vascular e sinalização neuronal, bem como na plasticidade sináptica (IADECOLA, 1997). Os efeitos oxidativos do NO ocorrem quando este reage com o $\text{O}_2\cdot^-$ produzindo ONOO $^-$, que é um forte radical oxidativo e provoca nitração de proteínas e peroxidação lipídica, levando à disfunção celular (BECKMAN et al., 1990; RADI et al., 1991).

A formação de radicais livres pelas células ocorre normalmente como produto de reações metabólicas, por exemplo, na respiração celular, porém o organismo possui sistemas de defesa antioxidante para auto proteção (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Existem duas linhas básicas de antioxidantes: 1) as enzimas antioxidantes, que correspondem às enzimas do sistema glutaciona, GSH-Px e GSH-Rd, a CAT e a SOD; e 2) os antioxidantes não enzimáticos, como certos tipos de vitaminas (ácido ascórbico e o tocoferol) e ainda componentes endógenos como a bilirrubina e a GSH. A enzima SOD parece ser específica para a dismutação do $\text{O}_2\cdot^-$, formando assim H_2O_2 . A CAT e a GSH-Px desempenham importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a formação de água (SCHNEIDER E OLIVEIRA, 2004). O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes é importante para a manutenção da integridade celular, pois a SOD, CAT e GSH-Px evitam o acúmulo de $\text{O}_2\cdot^-$ e H_2O_2 , reduzindo o dano celular (SCHNEIDER E OLIVEIRA, 2004) (Fig. 3).

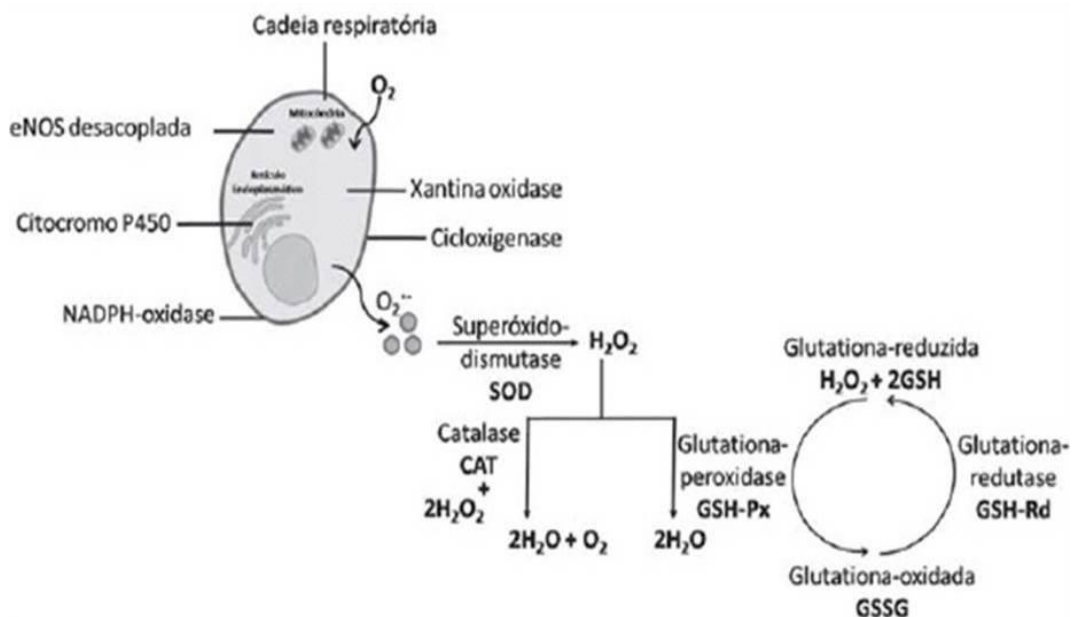


Fig. 3 – Sistemas oxidantes e antioxidantes endógenos. A figura mostra as vias metabólicas de formação e degradação dos radicais livres através da atuação das enzimas SOD, CAT, GSH-Px e GSH-Rd (modificado de FORTUÑO et al., 2005; RAY et al., 2005).

As consequências oxidativas causada por um desequilíbrio na geração de radicais livres e sistemas de defesa antioxidantes endógenos encaminha a célula a dois possíveis processos: adaptação ou morte. Entende-se por adaptação celular a capacidade da célula de se auto modificar fisiologicamente e morfológicamente quando expostas a algum evento lesivo. Se os limites da resposta adaptativa a um estímulo forem ultrapassados, ou então, quando a adaptação é impossível, advém uma série de eventos, denominada lesão celular, a qual é reversível até um limite, mas se o estímulo continuar ou for intenso a célula morre (COTRAN et al., 2000).

Os danos da ICGT são associados ao estresse oxidativo causado pela superprodução de ERO e outros radicais, que atuam no desenvolvimento da patogênese (KIM e at., 2009; JUNG et al., 2010). Durante o período de reperfusão, após isquemia cerebral, ocorre retorno do suprimento normal de O₂, que leva a produção excessiva de ERO, impossibilitando a atuação efetiva dos sistemas de defesa antioxidantes endógenos causando lesão e morte celular (NITA et al., 2001). A produção excessiva de ERO é seguida por disfunções de enzimas sensíveis à oxidação-redução, receptores de membrana e canais iônicos, danos no DNA, peroxidação de lipídeos da membrana e liberação do citocromo c das mitocôndrias, que ativam as caspases e aumentam a extensão da morte celular após I/R (VALKO et al., 2007). Embora a produção de radicais livres por meio da respiração celular (mitocondrial) a partir do O₂ seja fenômeno fisiológico normal, a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA e a reperfusão de O₂ na I/R resulta na formação excessiva de radicais livres pelas mitocôndrias (SENGPIEL et al., 1998; SIMS E ANDERSON, 2002). As mitocôndrias aumentam a taxa metabólica para elevar os níveis de ATP necessário para restaurar o potencial de membrana em repouso e expulsar a grande quantidade de Ca⁺² intracelular dos neurônios e assim evitar a morte celular. Nessa circunstância, o aumento nos níveis de ERO e a carbonilação de proteínas, um dos produtos da oxidação das proteínas, podem ser detectados nos períodos iniciais de I/R, em um intervalo de até 48 horas (CANDELARIO-JALIL et al., 2001). Embora as modificações oxidativas das proteínas sejam complexas e não bem definidas, carbonilação de proteína está bem caracterizada. A dosagem de grupos carbonil de proteínas fornece uma boa estimativa da extensão do dano oxidativo protéico associado a várias condições de estresse oxidativo (BARGAGLI et al., 2007; KOROLAINEN et al., 2007). A atividade antioxidante enzimática do tecido afetado pela I/R é particularmente importante para defesa primária endógena contra lesão pelos ERO, porém tornam-se insuficientes com o excesso da produção destes (Fig. 3). O estresse oxidativo participa também da formação da neuroinflamação e desenvolvimento de morte neuronal tardia.

2.3. Neuroplasticidade

Durante o processo evolutivo, o desenvolvimento de interações sociais e a relação com eventos ambientais foram possíveis graças à ação sinérgica de diferentes órgãos, coordenados pelo SNC. Esta ação ocorre por meio do fenômeno chamado plasticidade, de forma que, quando ocorre nos

neurônios, é chamada de neuroplasticidade. A neuroplasticidade pode ser definida como a capacidade cerebral de alterar morfológica e funcionalmente estruturas celulares em resposta a experiências, drogas, hormônios e lesões. Habilidades para aprender, recordar e esquecer também ocorrem em decorrência da neuroplasticidade, cuja função é de caráter adaptativo do organismo (BEAR, 2008). Existem três mecanismos capazes de alterar a atividade neural: 1) crescimento de neuritos (axônio e dendritos) e formação de novas ligações sinápticas ou perda das existentes, 2) modificação da resistência ou eficácia da transmissão sináptica nos terminais pré e pós-sinápticos por meio da indução de potenciação de longo prazo ou depressão de longo prazo (LTP ou LTD, sigla em inglês para “long-term potentiation e long-term depression”, respectivamente), e 3) aumento do número de neurônios em determinadas regiões por meio da neurogênese (CRUPI et al., 2013).

Algumas moléculas, denominadas fatores neurotróficos ou neurotrofinas, são fundamentais para os mecanismos de neuroplasticidade, dentre elas o fator de crescimento neural (NGF, sigla em inglês para “nerve growth factor”), fator neurotrófico derivado da linhagem de célula glial (GDNF, sigla em inglês para “glial cell line-derived neurotrophic factor”), neurotrofina 3 e 4 (NT-3 e NT-4) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, sigla em inglês para “brain-derived neurotrophic factor”) (SCHINDER E POO, 2000). Estudos mostraram que o BDNF exerce ações sobre a estrutura e função sináptica, tanto nos terminais pré-sinápticos quanto pós-sinápticos (LU, 2004). Foi relatado também, que a aplicação aguda de BDNF no hipocampo provocou modulação da transmissão sináptica, aumentando a despolarização por meio da liberação de glutamato dos terminais pré-sinápticos (JOVANOVIC et al., 2000). Os fatores neurotróficos são produzidos em grandes quantidades no cérebro, tanto pelos neurônios quanto pela glia, e podem afetar os neurônios regulando seu crescimento e diferenciação e a formação ou regeneração de conexões, proporcionando um padrão adequado de comunicação entre as células neurais, tanto no desenvolvimento normal quanto para compensação após lesão cerebral (SCHINDER E POO, 2000).

Dentre os tipos de neuroplasticidade, a plasticidade axônica ocorre facilmente devido a alta capacidade dos neurônios em formar novas e múltiplas conexões. Em até certo grau de lesão neuronal, as funções podem ser completamente recuperadas por meio do crescimento de novos axônios. O axônio em crescimento, denominado cone de crescimento axonal, deve atingir perfeitamente seu destino onde fará conexões com outras células neuronais. Isso ocorre graças às moléculas de orientação da matriz extracelular, além das neurotrofinas, que estimulam e orientam o alongamento do cone de crescimento (YU E BARGMANN, 2001). Estudos com cultura de células ganglionares da retina mostraram que o crescimento de axônios ocorre apenas na presença de fatores neurotróficos de crescimento. Além disso, níveis fisiológicos de atividade elétrica podem melhorar significativamente o crescimento axonal estimulado pelos fatores neurotróficos (GOLDBERG et al., 2002). Os cones de crescimento diferem entre si pelas moléculas que expressam em suas membranas, conhecidas como integrinas, sendo que a interação dessas moléculas de superfície com moléculas de orientação da

matriz extracelular determina a direção e a quantidade de crescimento. Desta forma, os sinais extracelulares podem ser atrativos ou repulsivos (Fig. 4) (BEAR, 2008). Os axônios param de alongar quando atingem seu destino e transformam seu cone de crescimento em um terminal pré-sináptico. Do mesmo modo, a função do neurônio também muda de crescimento axonal para crescimento e maturação sináptica (LIU, et al., 2011).

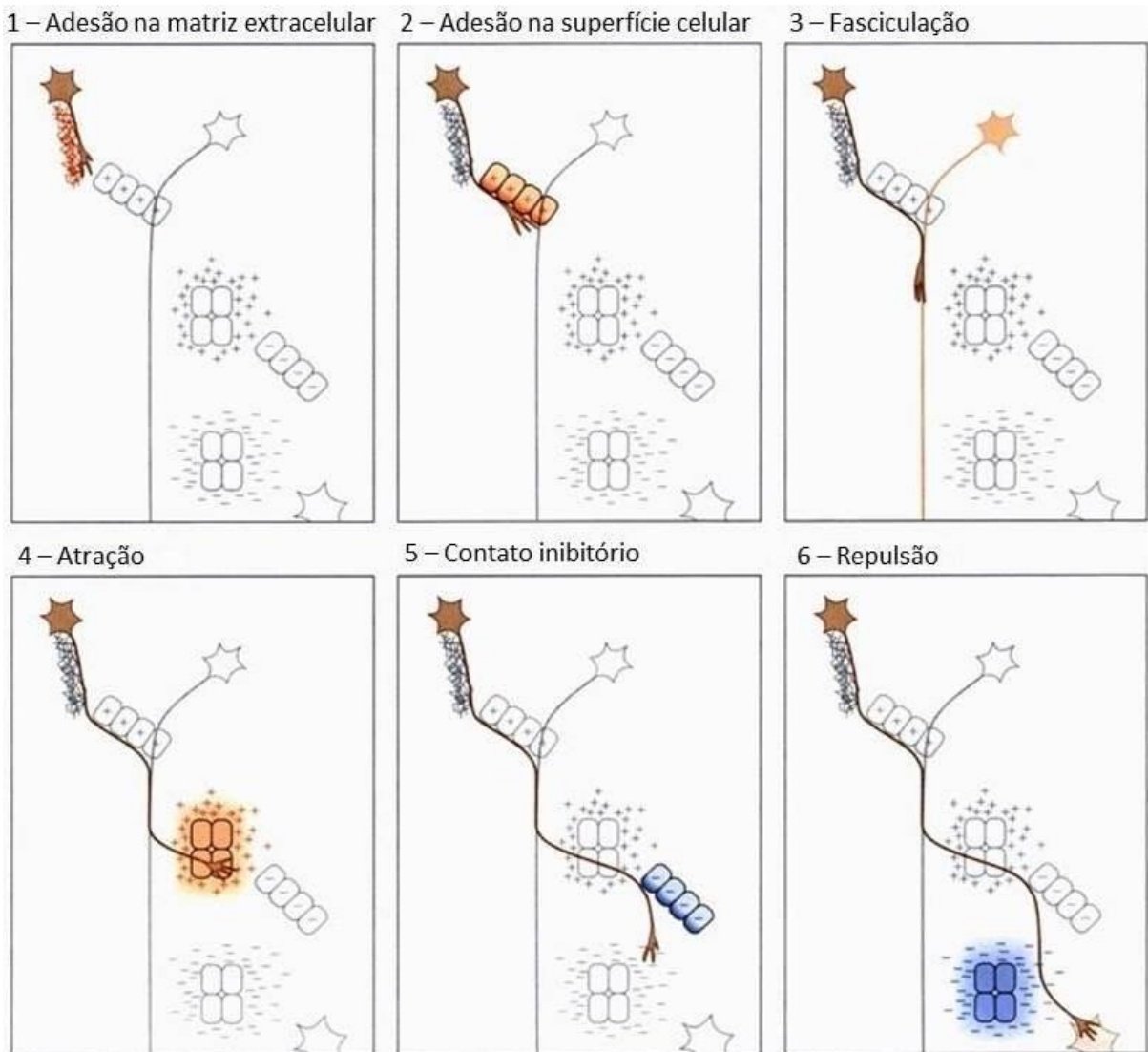


Fig. 4 - Cone de crescimento avançando para alvo sináptico. (1) Moléculas da matriz extracelular promovem o crescimento do axônio para direção do alvo sináptico. (2) Moléculas de adesão da superfície celular interagem com as integrinas do cone de crescimento aderindo e direcionando o crescimento axonal. (3) Fasciculação entre o axônio em crescimento e outro axônio pré-existente. (4) Moléculas atrativas da matriz extracelular atraem e direcionam o axônio em crescimento. (5) Moléculas de adesão da superfície celular interagem com as integrinas do cone de crescimento repelindo e direcionando o crescimento axonal. (6) Moléculas repulsivas da matriz extracelular repelem e direcionam o axônio em crescimento. Finalmente, após o contato com o alvo sináptico, o cone de crescimento para de alongar e forma um terminal pré-sináptico (modificado de KANDEL et al., 1991).

A plasticidade dendrítica é caracterizada por alterações no número de dendritos e no comprimento, disposição espacial e densidade dos espinhos dendríticos, ocorrendo principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento do indivíduo. O padrão dos espinhos dendríticos se modifica dinamicamente com a aprendizagem. No SNC a maioria dos terminais pós-sinápticos excitatórios

reside nos espinhos dendríticos. Um espinho maduro possui uma estrutura em forma de cogumelo que compreende uma pequena cabeça esférica ligada ao dendrito por meio de um fino pescoço (HARRIS et al., 1992). O pescoço limita a difusão de moléculas citoplasmáticas e da membrana dentro e fora da cabeça do espinho (BLOODGOOD E SABATINI, 2005; NOGUCHI et al., 2005). O aumento na concentração de Ca^{2+} nos espinhos inicia a transdução de sinal bioquímico que estimula à expressão de várias formas de plasticidade sináptica, incluindo a LTP e LTD (MALENKA E NICOLL, 1999). A LTP é causada pela combinação de vários processos pré e pós-sinápticos coordenados no tempo e no espaço, incluindo reorganização do citoesqueleto de actina, exocitose de endossomas e inserção de receptores glutamatérgicos AMPA nas sinapses (DERKACH et al., 2007). Já a LTD é caracterizada por ser o processo inverso da LTP, onde ocorre diminuição da neurotransmissão glutamatérgica e atrofia dos terminais pré e pós-sinápticos. No hipocampo foi visto que a neuroplasticidade sináptica nas vias colaterais de Schaffer está associada com a plasticidade morfológica dos espinhos dendritos, com exposição e desenvolvimento de espinhos durante a LTP (MATSUZAKI et al., 2004) e encolhimento durante a LTD (ZHOU et al., 2004).

Na isquemia cerebral, os eventos fisiopatológicos associados com a morte celular são seguidos por estimulação de ações neuroplásticas para compensação e recuperação de funções durante dias, semanas ou até meses após a isquemia (WIELOCH, 2006; CRAMER E RILEY, 2008). A maioria dos pacientes que sofreram isquemia cerebral apresentaram algum nível de amnésia, fraqueza motora e distúrbios sensoriais, os quais, no entanto, desenvolveram recuperação funcional ao longo do tempo (JOHANSSON, 2000; CRAMER E RILEY, 2008). Resultados de estudos com animais e seres humanos em situação de isquemia cerebral focal revelaram que a recuperação funcional após isquemia pode ser explicada pela neuroplasticidade e reorganização dos circuitos cerebrais (LEE E VAN DONKELAAR, 1995; STEINBERG E AUGUSTINE, 1997; JOHANSSON, 2000). Iniciando em algumas horas após a isquemia, rápidas mudanças são observadas sobre o crescimento axonal e no número e comprimento dos espinhos dendríticos. A perda de neurônios e neuritos é seguida por reestruturação sináptica nos espinhos dendríticos, sendo sua dinâmica importante para a recuperação funcional (CRAMER E RILEY, 2008). Os mecanismos da neuroplasticidade que fundamentam a recuperação funcional eficiente para compensar lesão devem incluir, portanto, a restauração de vias axônicas e/ou sinápticas, bem como o recrutamento de vias alternativas, e a formação de novas sinapses nos neurônios sobreviventes. Resultados de estudos recentes confirmam essa visão. Foi demonstrado, que ocorre rápida plasticidade morfológica de espinhos dendríticos e reorganização seguida por reconexão funcional de neurônios sobreviventes após vários meses de isquemia cerebral (BROWN et al., 2008; WINSHIP E MURPHY, 2008).

Dentre as diversas formas de avaliar a neuroplasticidade, tem destaque à investigação de proteínas que desempenham funções na estabilidade dos neuritos e/ou das sinapses. A MAP2 é uma proteína conhecida por desempenhar papel na estruturação dendrítica devido à sua

compartimentalização nos dendritos, estabilizando os microtúbulos, e em grande parte é excluída dos axônios (CCERES, 1986; HOROKAWA, 1996; AL-BASSAM, 2002). Evidências sugerem que a MAP2 pode ser um alvo importante de vias de sinalização intracelular e neurotrofinas na formação de dendritos (VAILLANT et al., 2002). Outras proteínas utilizadas para avaliação experimental da neuroplasticidade são a proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43, sigla em inglês para “growth associated protein 43”) e a sinaptofisina (SYP, sigla em inglês para “synaptophysin”). A GAP-43 é uma proteína específica do tecido nervoso sintetizada durante o crescimento axonal no desenvolvimento neuronal e regeneração (STROEMER et al., 1998). A SYP é uma proteína específica das membranas nas vesículas pré-sinápticas e é utilizada como um marcador de densidade do terminal pré-sináptico e de funcionalidade neural, com grande importância na neuromodulação hipocampal e plasticidade sináptica (MIYAZAWA et al., 1995).

A maior parte dos esforços para estimular a neuroplasticidade espontânea e recuperação funcional após isquemia cerebral está sendo orientada para estudos de: a) reabilitação controlada por ambiente enriquecido (BIERNASKIE et al., 2004; JOHANSSON, 2004; NYGREN E WIELOCH, 2005; BRIONES et al., 2006), b) estimulação farmacológica (BIEGON et al., 2004), c) estimulação transcraniana elétrica e magnética do cérebro (HUMMEL E COHEN, 2005) e, mais recentemente, d) terapia com células-tronco (KELLY et al., 2004; HAYASHI et al., 2006). As investigações orientadas nesse sentido proporcionaram resultados promissores, no entanto, ainda pouco se sabe como estimular a neuroplasticidade de forma eficiente após isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas.

2.4. Óleo de Peixe

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da série n-3, mais popularmente conhecidos como ômega-3, ou seja, os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3, sigla em inglês) e docosahexaenóico (DHA, 22:5 n-3, sigla em inglês) vêm despertando muito interesse pelas suas ações anti-inflamatórias e neuroprotetoras, em contraste com os derivados do ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6), da série n-6 (ômega-6), ou eicosanóides, com potentes atividades inflamatórias. A Figura 5 ilustra a síntese do AA, EPA e DHA no organismo dos mamíferos a partir dos seus precursores, o ácido linoléico (AL, 18:2 n-6) e ácido α -linolênico (A α L, 18:3 n-3), respectivamente. A conversão do AL para A α L só ocorre nos vegetais, dada a presença nestes da enzima Δ 15-dessaturase. Portanto, ambos os precursores (AL e A α L) são ácidos graxos essenciais, devendo ser introduzidos no organismo por meio da dieta, cujas proporções variam conforme a fonte (óleos vegetais de diferentes plantas, por exemplo, soja, girassol, milho, canola, linhaça, primola, castanhas, etc). A partir desses precursores, a síntese do AA, EPA e DHA ocorrem em animais e algas, mas não em plantas terrestres (INNIS, 2007).

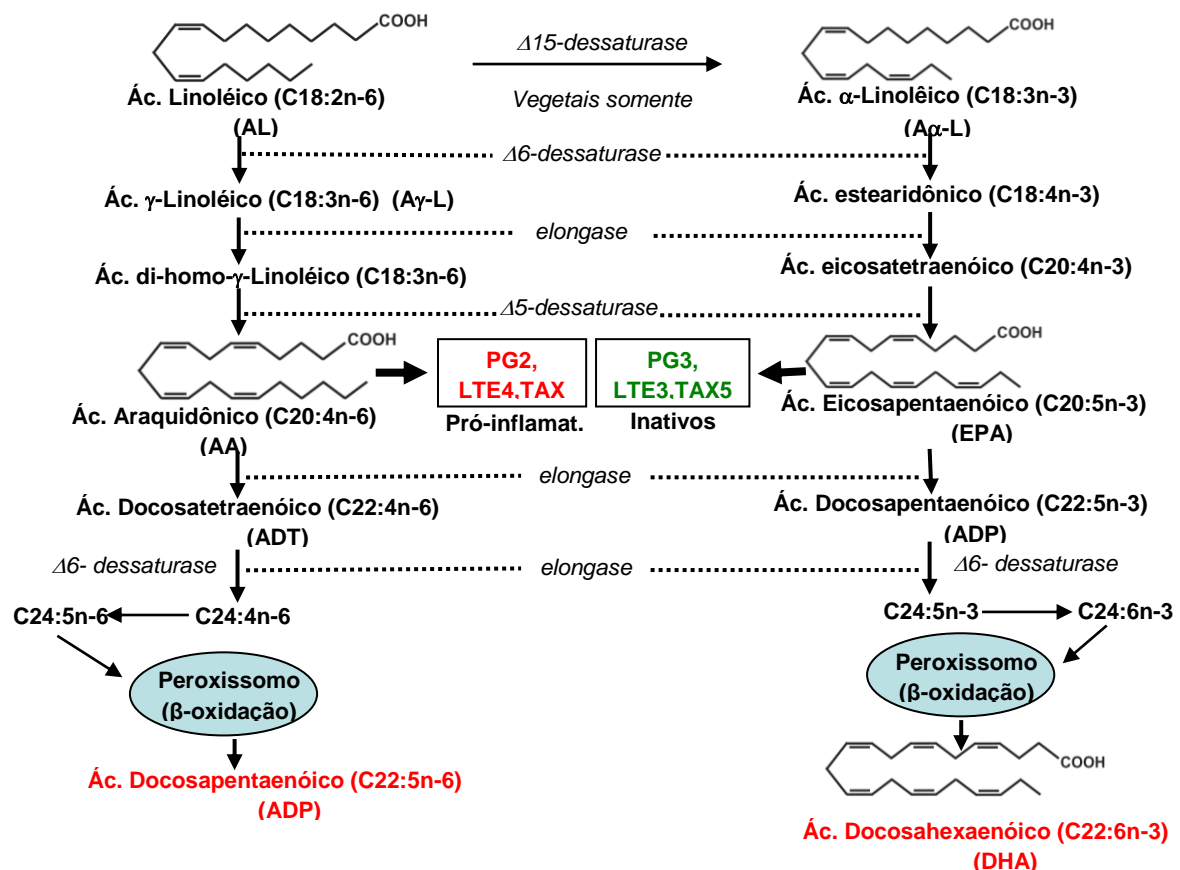


Fig. 5 – Esquema da síntese dos AGPI das séries n-6 (esquerda) e n-3 (direita), mediante a ação comum das enzimas Δ^5 -dessaturase, Δ^6 -dessaturase e elongases, passando pela formação intermediária dos eicosanóides prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Dada a ausência da Δ^4 -dessaturase nos mamíferos, o ácido docosatetraenóico (ADT, derivado do AA) e o ácido docosapentaenóico (ADP, derivado do EPA) são mais uma vez elongados e dessaturados antes de serem transferidos para os peroxissomos onde são β -oxidados dando origem aos respectivos produtos finais (ADP e DHA). A partir dos precursores vegetais (AL e A α L) todas as etapas de síntese antes da β -oxidação ocorrem no retículo endoplasmático (modificado de KIM, 2007). Em condições especiais, o DHA é convertido em docosatrienos, inclusive a neuroprotectina D1 (ver fig. 6).

É importante notar que ao longo das várias etapas de síntese (nos mamíferos) os AGPI ômega-6 e -3 são substratos das mesmas enzimas (Δ^5 -, Δ^6 -dessaturases e elongases), competindo entre si pela atividade das mesmas. Considerando que o teor de AGPI ômega -6 é maior nos vegetais (ou seus óleos) mais comumente consumidos na dieta humana (ex., soja), principalmente a partir da revolução industrial, não é surpresa que a dieta típica atual do ser humano contenha 20 vezes mais AGPI ômega-6 do que -3 (SIMOPOULOS, 2002). Isso tem implicação na saúde humana, pois, os AGPI ômega-6 dão origem aos eicosanóides com potentes ações inflamatórias, a exemplo do AA e seus derivados (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas) (DAS, 2006; DE FILIPPIS E SPERLING, 2006). Apesar da essencialidade do A α L, o EPA e o DHA podem ser obtidos mediante o consumo de certos peixes de água fria (ex., sardinha, salmão, anchova), os quais representam a fonte mais rica desses produtos finais da série ômega-3.

O DHA, em particular, é o AGPI mais abundante no cérebro e retina, ficando incorporado nos aminofosfolídeos de membrana, a partir de onde é mobilizado em determinadas condições para desempenhar importantes funções no desenvolvimento e manutenção física e funcional das células nervosas cerebrais e retinianas (LUKIW E BAZAN, 2008). A alta concentração de DHA incorporado nos fosfolídeos de membrana, principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, alcançando até 35% do total de ácidos graxos nas membranas sinápticas, é uma característica do cérebro nos mamíferos, em contraste à baixa concentração de DHA no plasma e fígado (onde é sintetizado) (INNIS, 2007). A incorporação do DHA no SNC ocorre ativamente durante o período de desenvolvimento do organismo, sendo proveniente do plasma após síntese no fígado a partir do A α L. Evidências indicam, contudo, que o DHA pode ser sintetizado localmente no cérebro. Entre as células neurais (neurônios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos), a capacidade para sintetizar o DHA no cérebro é restrita aos astrócitos. Embora os neurônios sejam o sítio de maior acúmulo de DHA, estes carecem das enzimas Δ 5- e Δ 6-dessaturases (KIM, 2007). O endotélio da microvasculatura cerebral é capaz de alongar e dessaturar ácidos graxos de pequena cadeia carbônica, porém, não possuem as etapas finais de desaturação necessárias para formar o EPA e DHA. Apesar da síntese local de DHA no cérebro (pelos astrócitos) e no endotélio da microvasculatura cerebral, não se sabe se essas fontes contribuem significativamente para o suprimento total de DHA às células nervosas. Apesar das enzimas Δ 5 e Δ 6-dessaturase terem sido identificadas e clonadas em mamíferos, estes carecem da Δ 4-dessaturase, responsável pela conversão direta (KIM, 2007).

Em condições basais, ambos AA e DHA encontram-se nas suas quase totalidades incorporados aos fosfolídeos de membrana. Em condições patológicas (ex., hipóxia/isquemia, epilepsia, traumatismos, infecções, etc.), o AA e DHA são liberados dos fosfolídeos da membrana mediante a ação da fosfolipase A2 (PLA2, sigla em inglês). Mediante a ação das ciclooxigenases (COX-1, -2, -3) e lipooxigenases (15-LOX, 5-LOX) o AA dará origem aos eicosanóides clássicos envolvidos na resposta inflamatória (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas). Por outro lado, o DHA pode ser convertido a 10, 17S-docosatrieno, também denominado neuroprotectina D1 (NPD1), mediante a ação de uma enzima semelhante a 15-LOX (BAZAN, 2005). A Figura 6 ilustra a provável via sintética para o NPD1 a partir do DHA incorporado na membrana plasmática, principalmente nas sinapses centrais e na retina.

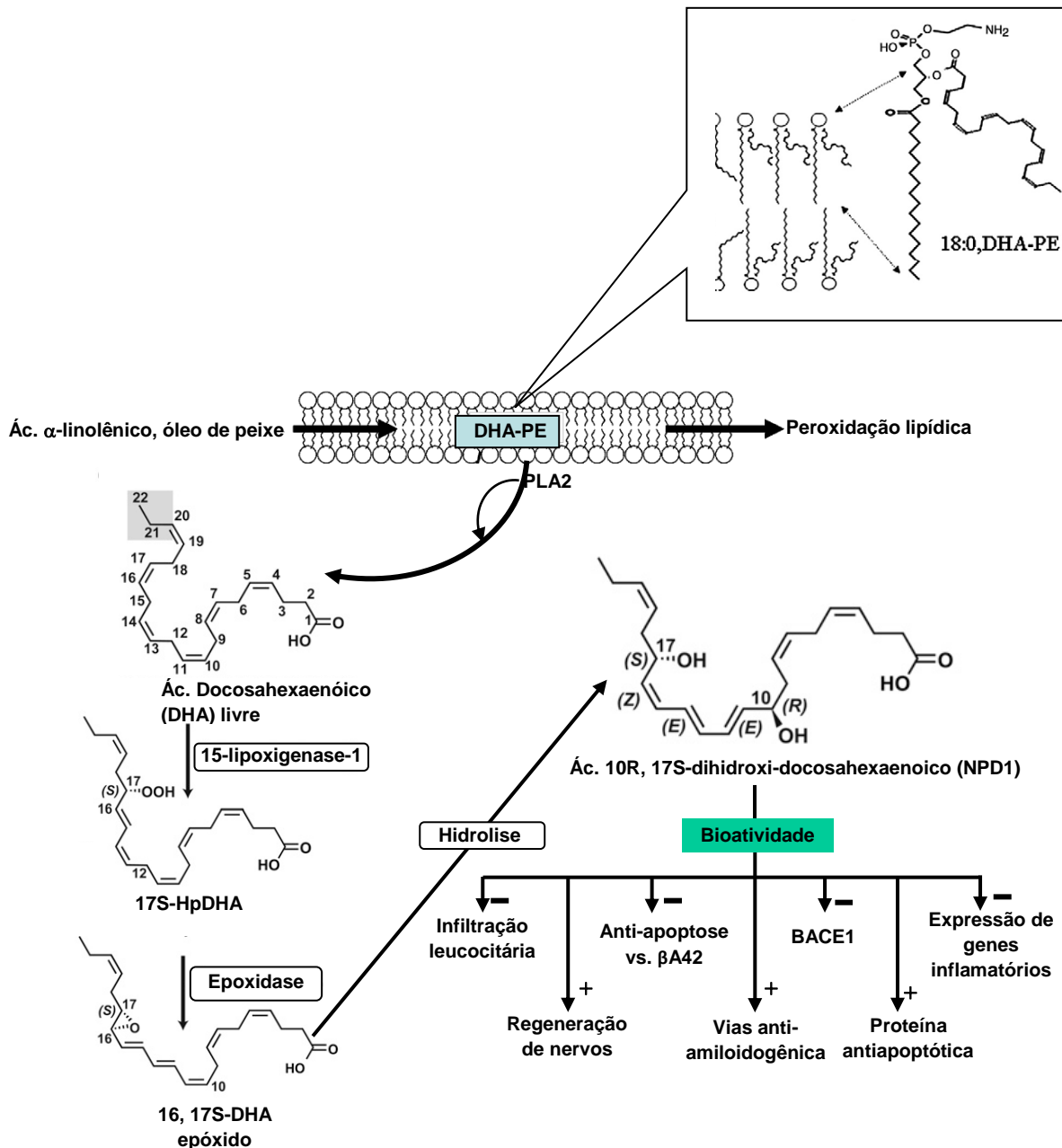


Fig. 6 – Biossíntese da neuroprotectina 1 (NPD1). Em condições basais, o DHA encontra-se na forma esterificada (DHA-PE) na posição *sn*-2 dos fosfolipídeos da membrana, em particular com a fosfatidiletanolamina (PE). Condições patológicas como isquemia, ataque epiléptico, trauma, ou infecção induzem a conversão de DHA esterificado em DHA livre mediante ação da PLA2. No passo seguinte, uma enzima semelhante a 15-LOX converte o DHA livre para (10,17S)-docosatrieno, também conhecido como NPD1 em virtude de suas propriedades neuroprotetoras (BAZAN, 2005; ZHANG E BAZAN 2010; SU 2010).

Evidências indicam que o DHA e EPA podem ser úteis no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento. Por indicação farmacológica ou nutracêutica (suplementos), a mistura de DHA e EPA é comercializada como preparações padronizadas do óleo extraído de certos peixes ou algas. Por exemplo, a Associação Americana do Coração recomenda o consumo diário de 1-3 g/dia de DHA para pacientes portadores de doenças crônicas do coração (DE FILIPPIS E SPERLING, 2006).

Em modelos animais de isquemia cerebral foi observado que o tratamento com DHA reduz os prejuízos cognitivos e neurodegenerativos da isquemia (OKADA et al., 1996; BLONDEAU et al., 2002; CAO et al., 2004). Um robusto efeito neuroprotetor foi observado após administração sistêmica de diferentes doses de DHA, com redução tanto do volume de infarto cerebral quanto do prejuízo neurológico (BELAYEV et al., 2009). Em outro estudo, a infusão intracerebroventricular de NPD1 durante os dois primeiros dias após isquemia cerebral focal em ratos inibiu a infiltração leucocitária na região peri-infarto e reduziu em cerca de 50% o tamanho do volume de infarto medido 48 horas após a isquemia (MARCHESELLI et al., 2003). Usando o OP como fonte de DHA outros estudos também demonstraram efeitos protetores sobre a neurodegeneração da isquemia. O tratamento prolongado com formulação padronizada de OP reduziu o grau de apoptose induzida pela isquemia cerebral em ratos (BASS et al., 2007). Ademais, o efeito antiapoptótico também foi demonstrado *in vitro* (ZHANG E BAZAN, 2010). A suplementação dietética com OP por 6 semanas tem se mostrado capaz de reduzir o volume de infarto cerebral após isquemia cerebral focal em ratos (CHOI-KWON et al., 2004). Quando avaliado os prejuízos cognitivos, ratos suplementados com OP e submetidos à ICGT apresentaram menor prejuízo de memória no labirinto radial aversivo (LRA) do que os animais isquêmicos sem a suplementação (PLAMONDON E ROBERGE, 2008). Em estudos realizados por nós, observamos, também, efeito antiamnésico após tratamento com OP (FERNANDES et al., 2008; BACARIN et al., 2013).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de caracterizar melhor os efeitos antiamnésico e anti-isquêmico do OP após ICGT no rato, no presente estudo foi proposto:

- a) Verificar se há efeito antioxidante do OP usando regime de tratamento que abrange o período pré-isquemia.
- b) Verificar se o regime de tratamento com OP utilizado para investigar o efeito antioxidante apresenta também efeito antiamnésico após ICGT.
- c) Investigar a existência (ou não) de uma janela terapêutica para o efeito antiamnésico do OP após ICGT.
- d) Avaliar a sobrevivência de neurônios do hipocampo coradas pelo método de NISSL.
- e) Determinar o decurso temporal da expressão da MAP2 em neurônios hipocampais e corticais de ratos submetidos à ICGT em vários períodos pós-isquemia.
- f) Após a determinação do decurso temporal da expressão da MAP2, avaliar a influência do OP sobre os efeitos da ICGT na expressão da MAP2.
- g) Determinar o perfil lipídico em encéfalos isquêmicos e não isquêmicos e a incorporação de DHA e EPA após tratamento com OP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 350 a 400 g, com aproximadamente 3 meses de idade. Durante os procedimentos experimentais os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 horas), temperatura controlada (22 ± 1 °C) suprimento de água e ração à vontade. Os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização de Animais”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Estadual de Maringá (157/2013).

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1. Experimento I: Avaliação do Estresse Oxidativo após ICGT e Efeito Antioxidante e Antiapoptótico do OP.

Um esquema representativo do protocolo para o experimento I é mostrado na Figura 7. O experimento I foi dividido em 2 partes. Na primeira parte, ratos receberam OP (300 mg/kg de DHA) ou veículo (azeite de oliva extra virgem 1 ml/kg) oralmente, uma vez por dia, durante 4 dias (dias -3 a 0) e foram submetidos a ICGT (dia 0). A quarta dose de OP foi administrada logo após o término da isquemia. Os ratos falso-operados (sham) receberam veículo como controle para o estresse relacionado à injeção intragástrica (gavagem). Dessa forma, os grupos formados foram: sham + veículo (sham/vei), isquemia + veículo (isq/vei) e isquemia + OP (isq/OP). Esse regime de tratamento foi definido com base nos resultados de estudos anteriores feitos por nós (FERNANDES et al., 2008; BACARIN et al., 2013). Vinte e quatro horas depois, os animais foram sacrificados e seus encéfalos totais foram processados para medição do estresse oxidativo. Foi investigado o encéfalo total, pois, alterações induzidas pela ICGT sobre os parâmetros antioxidantes endógenos são semelhantes em várias estruturas, incluindo o hipocampo, estriado e córtex cerebral (SELAKOVIC et al., 2011), que compreendem a maior parte do volume do encéfalo. Na segunda parte, ratos foram treinados durante 10 dias no LRA para a aquisição de memória (dias -12 a -3) e após 3 dias do término do treino os animais foram submetidos a ICGT ou falso-operado (sham) (dia 0). No último dia de treinamento os animais foram distribuídos aos seguintes grupos: sham + veículo (sham/vei), isquemia + veículo (isq/vei) e isquemia + OP (isq/OP). O OP (300 mg/kg de DHA) ou veículo (azeite de oliva extra virgem 1 ml/kg) foram administrados por via oral, uma vez por dia, durante 4 dias (dias -3 a 0), bem como na primeira parte do experimento I. Os testes de retenção de memória (TRM) começaram 14 dias após a ICGT e continuaram por 5 semanas, com um TRM por semana no LRA (dias 14, 21, 28, 35 e 42 de experimento).

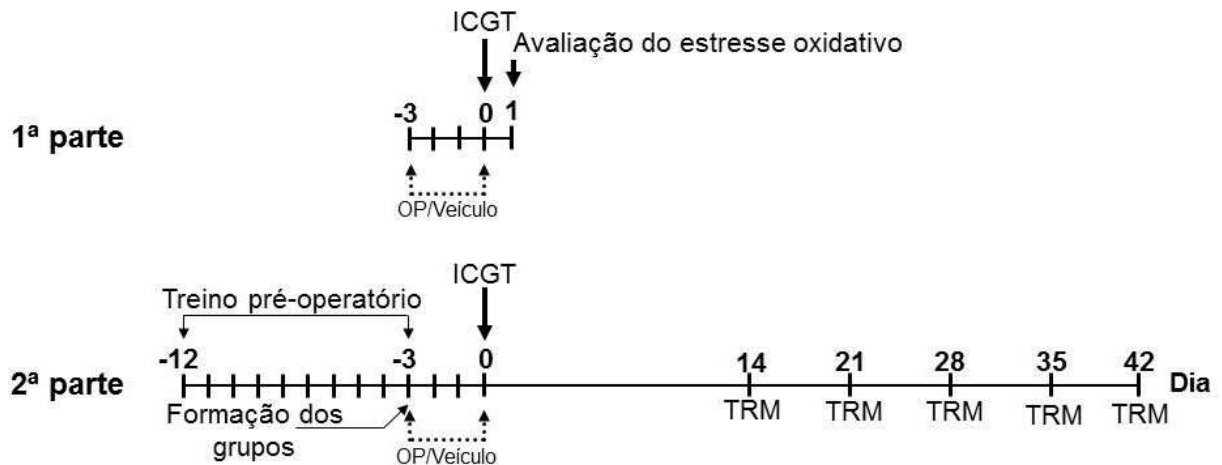


Fig. 7 – Esquema do protocolo experimental mostrando as duas partes do experimento, fases de treino pré-operatório, formação dos grupos experimentais, indução da ICGT, administração do OP ou veículo, testes de retenção de memória (TRM) e avaliação do estresse oxidativo. A linha contínua representa o período de tempo do experimento e a linha tracejada indica o período de administração do OP ou veículo.

4.2.2. Experimento II: Janela Terapêutica para o Efeito Antiamnésico do Tratamento com o OP.

A Figura 8 mostra a representação esquemática do protocolo experimental utilizado para o experimento II. Ratos foram treinados durante 10 dias no LRA para a aquisição de memória (dias -12 a -3) e após 3 dias do término do treino os animais foram submetidos a ICGT ou falso-operado (sham) (dia 0). No último dia de treinamento os animais foram distribuídos aos seguintes grupos: sham + veículo (sham/vei), isquemia + veículo (isq/vei) e isquemia + OP (isq/OP). O OP (300 mg/kg de DHA) ou veículo (azeite de oliva extra virgem 1 ml/kg) foram administrados por via oral, uma vez por dia, durante 10 dias (dias 0 a 9), aos respectivos grupos com início em diferentes tempos após a ICGT, obtendo 3 regimes (R) de tratamentos: R1 - tratamento iniciado 4 horas após ICGT (isq/vei e isq/OP R1), R2 - tratamento iniciado 8 horas após ICGT (isq/vei e isq/OP R2), e R3 - tratamento iniciado 12 horas após ICGT (isq/vei e isq/OP R3). O grupo sham/vei teve início de tratamento 4 horas após o procedimento cirúrgico. Estes diferentes grupos foram determinados para investigar a existência de janela terapêutica do tratamento com OP para o efeito antiamnésico. Os TRM começaram 14 dias após ICGT e continuaram por 5 semanas, com um TRM por semana no LRA (dias 14, 21, 28, 35 e 42 de experimento). Um a dois dias após o último teste, os animais foram sacrificados e seus encéfalos removidos para análise histológica.

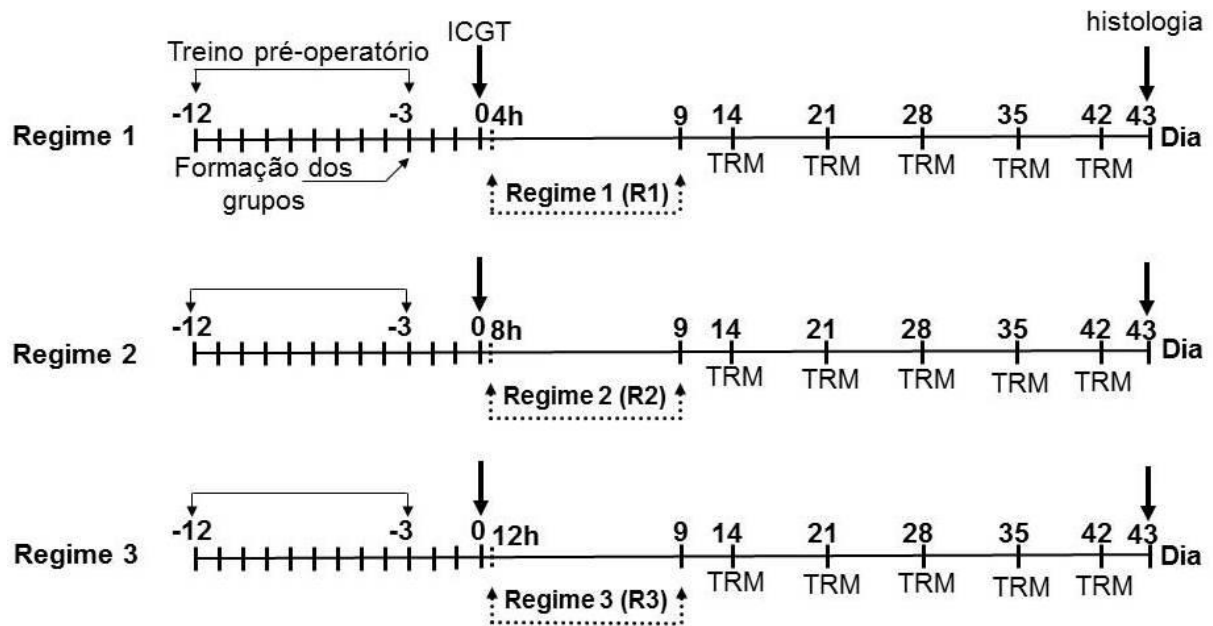


Fig. 8 - Esquema do protocolo experimental delineando os regimes de tratamento, fases de treino pré-operatório, formação dos grupos experimentais, indução da ICGT, administração do OP ou veículo, testes de retenção de memória (TRM) e a análise histológica. A linha contínua representa o período de tempo do experimento e a linha tracejada indica o período de administração do OP ou veículo.

4.2.3. Experimento III: Decurso Temporal da Expressão da MAP2 após ICGT e Efeito Neuroplástico do OP.

Um esquema representativo do protocolo para o experimento III é mostrado na Figura 9. O experimento III foi dividido em 2 partes. Na primeira parte, ratos foram submetidos à ICGT ou falso-operados (sham) (dia 0). Em seguida, os animais isquêmicos foram subdivididos em 4 grupos com relação ao tempo pós-isquemia determinado, formando 5 grupos experimentais: sham, 7 dias pós-isquemia, 14 dias pós-isquemia, 28 dias pós-isquemia e 35 dias pós-isquemia. Após o tempo de sobrevivência pós-isquemia de cada grupo, os animais foram sacrificados e os seus encéfalos removidos e processados para a imunorreatividade da MAP2 (IR-MAP2), a qual foi quantificada nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo e nas regiões retrosplenial (RS) e de associação parietal (PtA, sigla em inglês para “parietal association”) do córtex cerebral. Esta parte foi realizada para encontrar o decurso temporal do efeito da ICGT sobre a expressão da MAP2. Na segunda parte, ratos foram submetidos à ICGT e tratados com OP (300 mg/kg de DHA) ou veículo por via oral, uma vez por dia, durante 10 dias, utilizando os R1 e R3 de tratamento, como no experimento II, para tentarmos estabelecer uma possível relação entre efeito antiamnésico e neuroplasticidade dendrítica. Assim, os animais foram divididos em 7 grupos com relação à operação, tempo pós-isquemia e regime de tratamento: sham, 14 dias pós-isquemia (isq/vei, isq/OP R1 e isq/OP R3), 28 dias pós-isquemia (isq/vei, isq/OP R1 e isq/OP R3). Os tempos pós-isquemia utilizados para a segunda parte do experimento foram definidos de acordo com os resultados encontrados na primeira parte. Por último, após o tempo de sobrevivência pós-isquemia de cada grupo, os animais foram sacrificados e os seus

encéfalos removidos e processados para a IR-MAP2 e quantificados como na primeira parte do experimento.

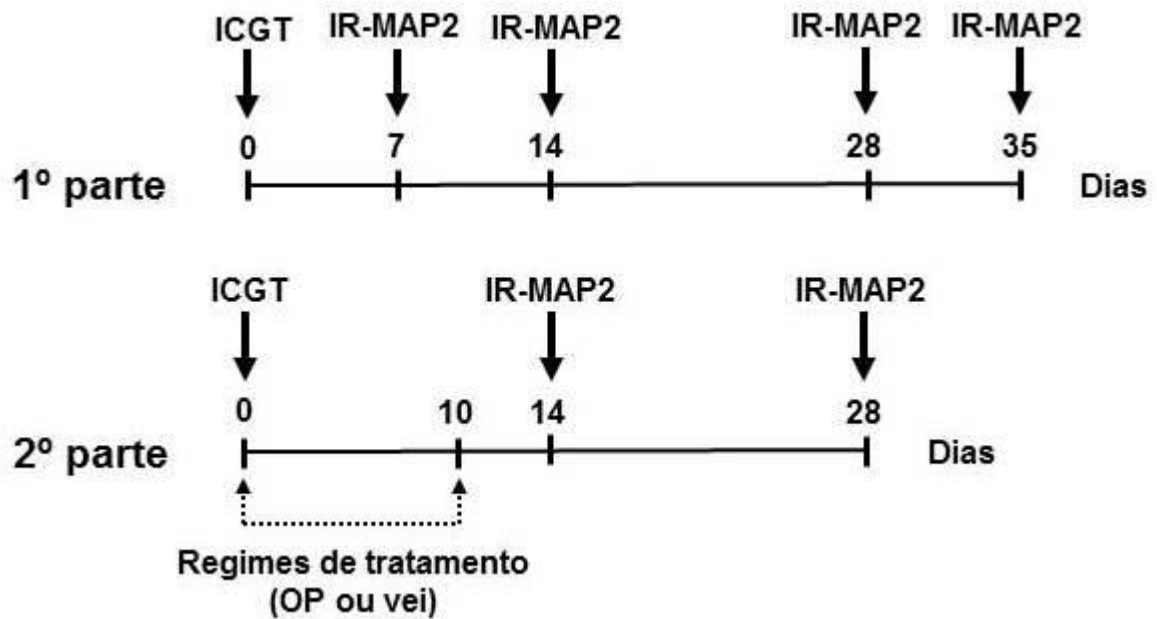


Fig. 9 – Esquema do protocolo experimental para a investigação da imunorreatividade da MAP2 (IR-MAP2) mostrando as duas partes do experimento, indução de ICGT, dias de sacrifício pós-isquemia e regime de tratamento com OP ou veículo. A linha contínua representa o período de tempo do experimento e a linha tracejada indica o período de administração do OP ou veículo.

4.2.4. Experimento IV: Quantificação do Perfil Lipídico Encefálico

Para o experimento IV, ratos foram submetidos à ICGT e receberam OP (300 mg/kg de DHA) ou veículo (azeite de oliva extra virgem 1 ml/kg), oralmente, com início 4 horas após a isquemia, uma vez por dia, durante 10 dias (regime 1, experimento II). Os ratos falso-operados (sham) receberam OP ou veículo, assim como os ratos submetidos à ICGT. Dessa forma os grupos formados foram: sham + veículo (sham/vei), sham + OP (sham/OP), isquemia + veículo (isq/vei) e isquemia + OP (isq/OP). Um dia após o término do tratamento, os animais foram sacrificados e seus encéfalos removidos e dissecados em córtex cerebral e hipocampo para extração e quantificação dos ácidos graxos. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa e os tempos de retenção da amostra foram comparados com os seguintes padrões: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 n-9), ácido vacênico (18:1 n-7), ácido linoléico (18:2 n-6), ácido α -linolênico (18:3 n-3), ácido eicosenóico (20:1 n-9), ácido araquidônico (20:4 n-6), ácido timodônico (20:5 n-3) e ácido cervônico (22:6 n-3).

4.3. Análise Comportamental – Labirinto radial aversivo (LRA) de oito braços

4.3.1. Descrição do LRA e do ambiente de teste

Para a análise do comportamento foi utilizado o LRA de 8 braços, desenvolvido originalmente no Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção/UEM (PAGANELLI et al., 2004) e posteriormente aperfeiçoado (NETO et al, 2005). A Figura 10 ilustra esquematicamente o LRA. O LRA funciona com base no comportamento natural do rato em se esquivar de um lugar amplamente aberto e iluminado para procurar um lugar estreito e escuro que lhe ofereça proteção.

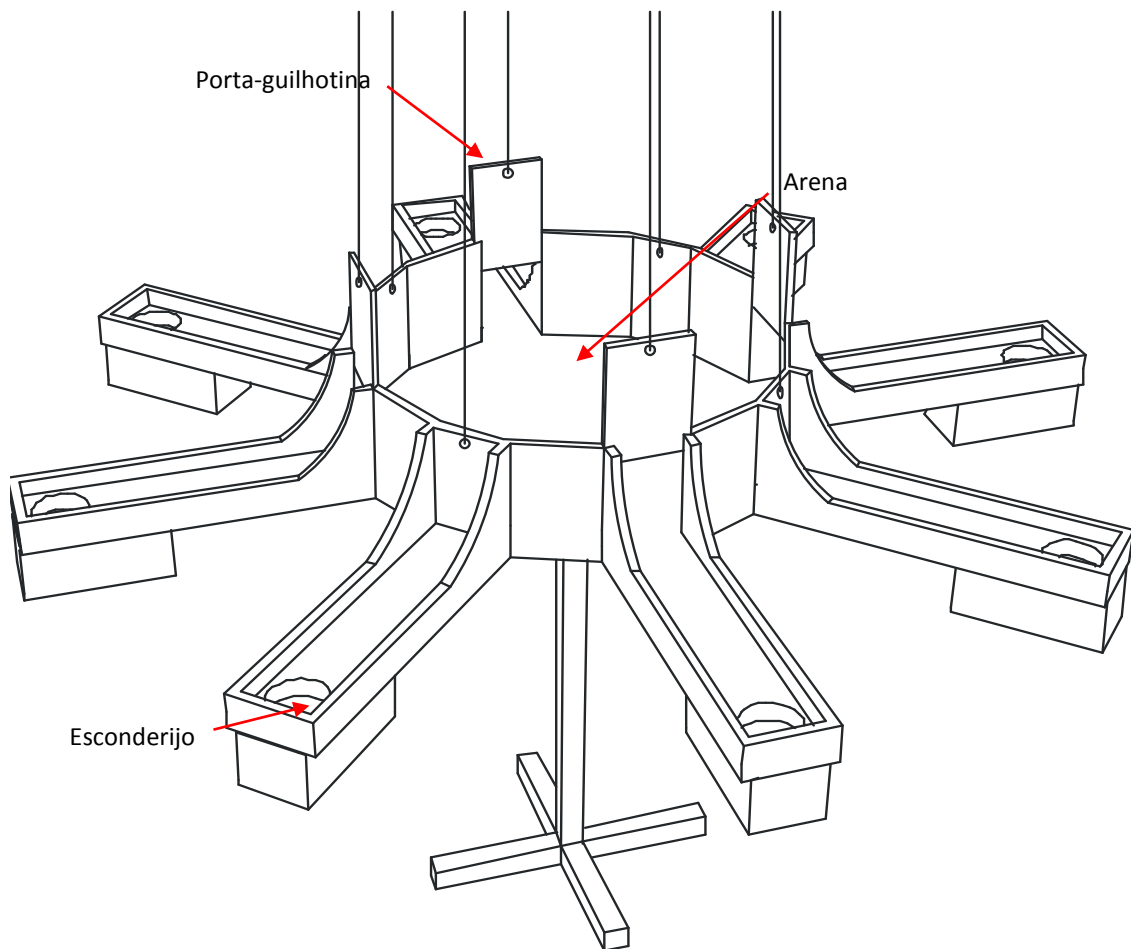


Fig. 10 – Desenho esquemático do labirinto radial aversivo (LRA) de oito braços (NETO et al., 2005).

Oito braços (55 x 15 cm) se estendem radialmente a partir dos lados alternados de uma arena poligonal (16 lados, 71 cm transversalmente). No final de cada braço há uma abertura circular (9 cm de diâmetro) que pode dar acesso a uma caixa de madeira (23 cm x 11 cm x 9,5 cm) com interior escuro, a qual funciona como um local de fuga (esconderijo ou zona de recompensa) em relação à superfície fortemente iluminada (aversivo para o animal). O esconderijo pode ser inserido ou removido como uma gaveta debaixo de cada abertura. Entretanto, dos oito braços existentes, somente um contém o esconderijo verdadeiro. Nos outros sete braços, os esconderijos são apenas uma imitação

externa (paredes) do esconderijo verdadeiro, porque não contém o fundo. Assim, o animal chega até o orifício e inspeciona o esconderijo, sem, contudo, adentrá-lo. Ao perceber a ausência de fundo, o animal retorna à arena central para continuar procurando pela possibilidade de fuga em outros braços. Aprender a localização espacial do verdadeiro esconderijo constitui a tarefa do LRA. Para evitar que o animal escorregue e venha a cair dos braços, uma parede de acrílico transparente (2,5 cm de altura) contorna as laterais de cada braço. A arena central é separada dos braços por portas do tipo guilhotina, também de acrílico transparente (19 cm de altura). O labirinto encontra-se elevado a 90 cm do solo podendo ser girado livremente sobre sua base de sustentação. Um sistema de roldanas e cordas permite que o experimentador efetue a abertura e fechamento das portas-guilhotina, controlando assim o confinamento do animal dentro da arena central antes de liberá-lo para explorar os braços. Diversos objetos tridimensionais (ex., cadeira, banquetas, caixas, câmera de vídeo) encontram-se no interior da sala e funcionam como pistas extralabirinto para guiar o animal a formar um suposto mapa visuo-espacial sobre a localização do esconderijo. Um pequeno ventilador localizado no solo e embaixo do esconderijo gera um ruído de fundo constante no ambiente de teste. Toda superfície externa do labirinto é iluminada por uma lâmpada (200 W) suspensa a cerca de 1 metro acima do labirinto. Uma câmera de vídeo encontra-se posicionada a 220 cm de distância e 130 cm acima do labirinto para registro do comportamento do animal e auxílio do experimentador na condução do experimento.

4.3.2. Treino para aquisição de memória no LRA

Inicialmente, os animais foram habituados ao ambiente de teste. Para tanto, cada animal foi colocado diretamente na arena central do labirinto e permitido a explorá-lo livremente, inclusive para encontrar e entrar no esconderijo. Se o esconderijo não fosse encontrado após um período de 4 minutos, o rato era induzido pelo experimentador a encontrar o braço contendo o esconderijo, sem, contudo, a influência direta do mesmo, sendo manipulado de tal forma que o animal encontrava o esconderijo por conta própria. Ao rato foi permitido permanecer no esconderijo por 1 minuto e então devolvido a sua gaiola. Durante a habituação, as pistas extralabirinto foram removidas (exceto a porta e a câmera de vídeo) e a posição espacial do esconderijo era aleatoriamente alterada entre um animal e outro, dentro da mesma sessão (dia) e entre as tentativas. Este procedimento de habituação foi repetido por 3 dias consecutivos. Subsequentemente, teve início a fase de treinamento ou aquisição, que se estendeu por um período de 10 dias consecutivos. Os animais foram treinados uma vez/dia (sessão), com 3 tentativas/sessão. Para efeito de treinamento, o rato era colocado na arena central e ali confinado por 30 segundos. Em seguida, as portas-guilhotina eram abertas, dando-lhe acesso aos braços para procurar pelo esconderijo, cuja existência já era conhecida desde a habituação. Após a entrada em um determinado braço, os demais eram fechados. Caso entrasse em um braço errado, ao retornar para a arena central o animal era novamente confinado por um período de 10 segundos, então novamente liberado, e assim sucessivamente até encontrar o esconderijo, ou se esgotar o tempo de 4 minutos. Ao encontrar o esconderijo, o animal era permitido ficar dentro dele por 30 segundos. Se o

animal não encontrasse o esconderijo dentro de 4 minutos, ele era induzido pelo experimentador a encontrar o braço contendo o esconderijo, sem, contudo, a influência direta do mesmo, sendo manipulado de tal forma que o animal encontrava o esconderijo por conta própria, assim como feito na habituação. Entre uma tentativa e outra, o labirinto era limpo do excesso de fezes e urina, e girado aleatoriamente em torno de seu eixo central. O esconderijo era então transferido para outro braço qualquer, porém, mantendo-se sua posição espacial constante. Após o rato ser colocado na arena central, não houve mais contato entre o experimentador e o animal. Imediatamente após o rato ser colocado no labirinto, todo o comportamento foi registrado em vídeo. O desempenho de aquisição é expresso pelas seguintes variáveis independentes: i) latência para encontrar o esconderijo, ii) número de erros de memória de referência, e iii) número de erros de memória operacional (ou trabalho). A memória de referência envolve a utilização de informações que permanecem constantes ao longo do tempo (sessões), por exemplo, a relação espacial entre uma determinada pista e o esconderijo (DUDCHENKO, 2004). Um erro de memória de referência foi registrado toda vez que o animal entrou em um braço errado pela primeira vez, durante uma tentativa. Em contraste, toda vez que o animal retornou a um braço errado já visitado previamente dentro de uma mesma tentativa, registrou-se um erro de memória operacional. A memória operacional envolve a utilização ou manuseio de informações que são úteis ou pertinentes para aquele curto momento em que o trabalho está sendo realizado (ex., lembrar-se que um determinado braço já foi visitado na presente tentativa) (DUDCHENKO, 2004).

4.3.3. Teste de retenção da memória após a ICGT

A Figura 8 ilustra o esquema do procedimento experimental envolvido na análise comportamental. No último dia de treinamento, os animais ainda intactos foram divididos nos seguintes grupos: sham, isq/vei e isq/OP (ver item 4.2.2., Experimento II). No dia 0 os animais foram submetidos à isquemia (ou ao procedimento “sham”). No dia 14 deu-se início aos testes de retenção para avaliação do grau de amnésia retrógrada (perda de memória da cognição adquirida durante a fase pré-isquemia). Os testes de retenção seguiram os mesmos procedimentos descritos para o treino e foram aplicados 1 vez/semana, durante 5 semanas.

4.4. *Isquemia Cerebral Global e Transitória (ICGT)*

Os animais foram submetidos à ICGT conforme o método 4-VO descrito originalmente por Pulsinelli e Brierley (1979) e empregado rotineiramente no Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção/UEM. Os animais foram anestesiados por inalação de uma mistura de O₂ e isoflurano liberada através de vaporizador universal a uma máscara adaptada ao nariz do rato. O fluxo de O₂ foi regulado para 2 L/min. Nessas condições, a concentração de isoflurano foi ajustada ao nível mínimo suficiente para induzir uma anestesia constante e uniforme. O grau de anestesia foi avaliado pela ausência de resposta ao pinçamento da cauda. Em seguida os animais foram fixados a uma base

estereotática e uma incisão de 2 cm na região dorsal da cervice expôs o forame alar da primeira vértebra cervical (bilateralmente). Usando a ponta do electrocautério introduzida no forame, as AV foram primeiramente rompidas e logo após electrocauterizadas bilateralmente (Fig. 11). Em seguida, uma segunda incisão foi feita na parte ventral do pescoço, onde os ramos comuns das ACC foram expostos e isolados dos tecidos adjacentes e do nervo vago por meio de um fio de seda, transpassado de modo a envolver ambas as ACCs (Fig. 11). As extremidades do fio foram exteriorizadas e presas ao dorso do animal com um ponto de sutura. As incisões foram fechadas com linha de algodão e os animais foram deixados sob a temperatura de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ para se recuperarem da anestesia. A Figura 11 ilustra os pontos de oclusão das AV e ACC para indução da ICGT.

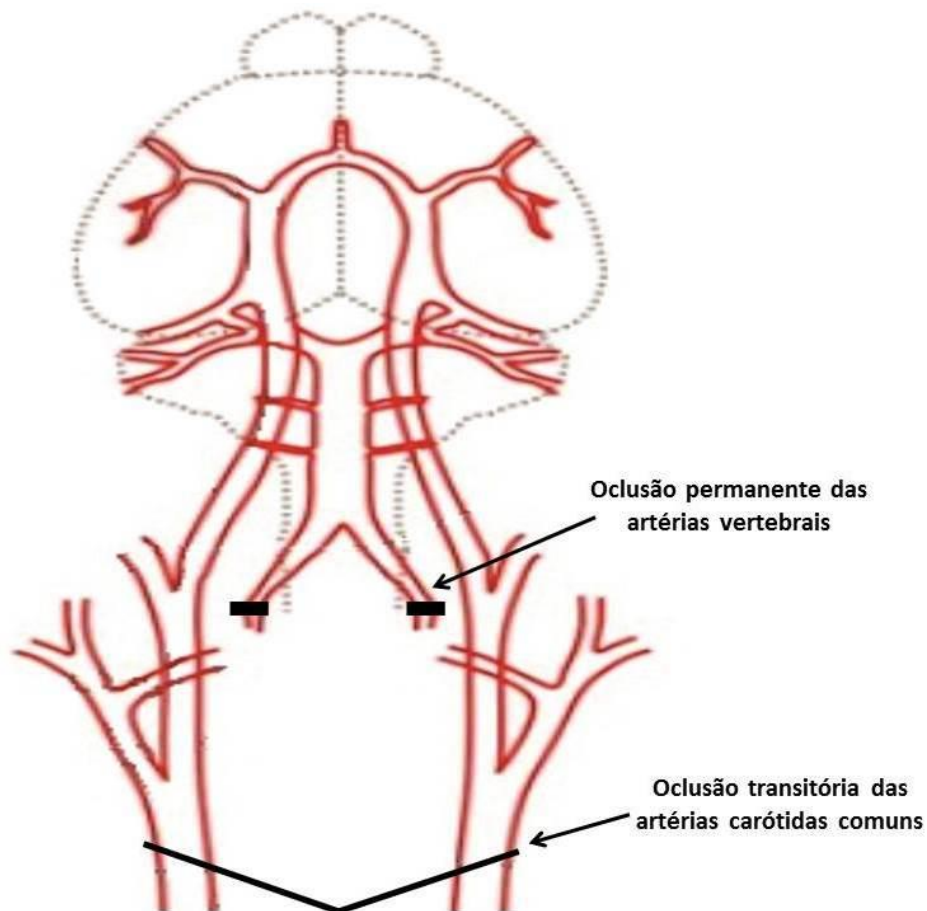


Fig. 11 – Esquema representativo de indução da ICGT. A oclusão das AV foi feita por electrocoagulação (flecha acima). As ACC foram isoladas e a oclusão foi transitória por 15 min. (flecha abaixo).

Duas a três horas após o término da cirurgia, os ratos foram submetidos à oclusão das ACC mediante tração dos fios de seda por um período de 15 minutos (duração da isquemia). Completado o período de oclusão, o fio de seda foi afrouxado e removido, permitindo a reperfusão cerebral, deduzida com base no recobro da cor avermelhada dos olhos do animal. Na ausência deste sinal o animal foi descartado sob a suspeita de não reperfusão (colabamento das artérias). Uma hora antes, durante e uma hora após a oclusão, os animais foram mantidos no interior de uma caixa de aquecimento, à temperatura de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Em modelos animais de isquemia cerebral, o controle da temperatura

cerebral é uma variável importante, pois a hipotermia (33 °C ou menos) reduz a extensão de lesão neuronal (BUSTO et al., 1989; GINSBERG et al., 1992). Além disso, a medição da temperatura retal não reflete necessariamente a temperatura cerebral, pois durante a isquemia desenvolve-se gradiente de temperatura entre o cérebro e o restante do corpo (BUSTO et al., 1987). Essa redução da temperatura cerebral induzida pela isquemia pode ser controlada mantendo-se o animal dentro de uma caixa de aquecimento, com temperatura ajustada em torno de 30 °C (SEIF EL NASR, et al., 1992). Esse método tem sido usado rotineiramente no Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção/UEM. Durante a oclusão, os sinais de perda do reflexo de endireitamento, midríase, estiramento tônico das patas e ausência de respostas à estimulação tátil são indicativos de uma isquemia efetiva. Animais com recobro do reflexo de endireitamento ou convulsão foram eliminados do experimento. Os animais controle para a isquemia (falso-operados ou sham) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto a oclusão das artérias vertebrais e carótidas.

4.5. Tratamento Farmacológico

O OP usado no estudo foi obtido diretamente no mercado de produtos farmacêuticos e/ou nutracêuticos. Escolhemos o produto Omega-3 DHA 250[®], (importado e manipulado pelo Laboratório Biotik do Brasil Ind. & Com. Ltda. e distribuído pela Naturalis – Alimentos Naturais) com base na sua alta e definida concentração de DHA. Segundo informação do fabricante, cada cápsula com 500 mg do produto contém 250 mg de DHA e 60 mg de EPA, além de 1 mg de vitamina E como antioxidante. A Tabela 1 mostra a composição detalhada e a quantidade de ácidos graxos presente no OP usado no presente estudo, conforme determinação realizada pelo Dr. Makoto Matsushita (Laboratório de Cromalimentos, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá). A análise por cromatografia gasosa identificou 305,0 mg de DHA e 73,35 mg de EPA por cápsula de Omega-3 DHA 250[®] (Tabela 1). Estes valores divergiram dos fornecidos pelo fabricante (ou seja, 250 mg de DHA e 50 mg de EPA). Dessa forma, os valores do fabricante foram considerados quando calculamos a dose utilizada no presente estudo.

Tabela 1 – Composição e concentração (% ou mg/cápsula) de ácidos graxos presente no OP comercializado como Omega-3 DHA 250[®] (Laboratório Biotik do Brasil Ind. & Com. Ltda. e distribuído pela Naturalis – Alimentos Naturais) e usado no presente estudo.

Notação	Nome Sistemático pela IUPAC	Nome Trivial	Abrev.	Cápsulas	
				%	mg/500 mg OP
14:0	Tetradecanoico	Ácido Mirístico	AM	0,31	1,55
16:0	Hexadecanoico	Ácido Palmítico	AP	3,25	16,25
16:1 n-7	<i>cis</i> -9-hexadecenoico	Ácido Palmitoléico	APO	0,73	3,65
18:0	Octadecanoico	Ácido Esteárico	AE	7,55	37,75
18:1 n-7	<i>cis</i> -11-octadecenoico	Ácido Vacênico	AV	1,36	6,80
18:2 n-6	<i>cis, cis</i> -9,12-ctadecadienoico	Ácido Linoléico	AL	0,84	4,20
18:3 n-3	all <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	Ácido α -linolênico	A α L	1,89	9,45
20:0	Eicosanoico	Ácido Araquídico	AA	0,05	0,25
20:2 n-6	<i>cis, cis</i> -11,14-eicosadienoico	-----	----	0,46	2,30
20:3 n-3	ácido all- <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	-----	AET	0,21	1,05
20:4 n-6	all <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido Araquidônico	AA	2,41	12,05
20:5 n-3	all <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido Timnodônico	EPA*	14,67	73,35
24:1 n-9	<i>cis</i> -15-tetracosenoico	Ácido Nervônico	AN	2,31	11,55
22:5 n-3	all <i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico	Ácido Clupanodônico	ADP-3	2,83	14,15
22:6 n-3	all <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido Cervônico	DHA*	60,99	305,0

*Abreviatura em inglês

O tratamento com OP foi realizado tomando por base a concentração de DHA presente em cada cápsula. Conforme a quantidade de OP a ser administrada, o volume de uma ou mais cápsulas (0,4 mL cada) foi diluída em óleo de oliva comercial para volume total de 2,5 mL de óleo/cápsula de OP. Assim, cada 2,5 mL da preparação do OP + óleo de oliva continha 250 mg de DHA e o volume de administração foi calculado para doses de 300 mg/kg de DHA por animal. Os animais tratados com o veículo o cálculo para o volume de administração foi o mesmo. As soluções foram administradas por via oral, com uma cânula de gavagem, sendo uma nova solução preparada a cada dia de tratamento. O horário de administração foi mantido em torno das 14 horas.

4.6. Análise Histológica

No dia seguinte ao término dos testes de retenção de memória os animais foram anestesiados profundamente com tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira - SP) e perfundidos transcárdicamente com solução salina 0,9 %, seguida pela solução fixativa de Bouin (ácido pícrico 750 mL; paraformaldeído 100 mL; ácido acético 50 mL; e água q.s.p. 1000 mL) (velocidade/tempo de perfusão: 22 mL/min, durante 3 e 5 min, respectivamente). Após a perfusão, os animais foram decapitados e suas cabeças imersas em gelo picado (1-2 °C) por 1 hora. Os encéfalos foram cuidadosamente removidos dos crânios retirando e descartando o cerebelo, o bulbo olfatório e o córtex pré-frontal, conservando-se assim o restante na mesma solução fixativa de Bouin por pelo menos 24 horas, mantidos a temperatura ambiente. Após processamento (desidratação e diafanização), os encéfalos foram emblocados em parafina (60 °C). Nove secções coronais com espessura de 7 μ m (micrótomo LEICA mod. RM2445) foram retirados de cada encéfalo (sendo que a cada três secções retiradas

descartavam-se 10 e retirava-se mais três) ao nível médio do hipocampo nas coordenadas -3,6 mm a -4,16 mm em relação ao bregma, de acordo com o Atlas Paxinos e Watson (1998). As secções foram coradas pelo método do cresil violeta (NISSL). Três secções foram escolhidas para contagem bilateral dos neurônios aparentemente normais, no estrato piramidal dos subcampos CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo. As células piramidais gigantes exibindo núcleo e nucléolo distintos, bem como um citoplasma basofílico foram consideradas como sendo neurônios viáveis (aumento de 40×). O número de neurônios viáveis contados é dado pela média dos valores obtidos nos três cortes coronais.

4.7. Avaliação do Estresse Oxidativo

4.7.1. Preparação do homogenato de encéfalo

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada em parceria com o Dr. Adelar Bracht e a Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi, do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá. Os encéfalos de ratos em jejum de 24 horas, previamente anestesiados, foram cirurgicamente removidos, clampeados em nitrogênio líquido e estocados a temperaturas inferiores a -150 °C. O homogenato 10 % (peso/volume) foi preparado usando tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4). Este foi utilizado para as seguintes avaliações do estado oxidativo de cérebro: glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG). Para as determinações da atividade enzimática (CAT, SOD, GSH-Px, GSH-Rd e G6Pd) e carbonilação de proteínas, foi utilizado o sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato a $10.000 \times g$ por 15 minutos. O conteúdo protéico do homogenato e do sobrenadante obtido após centrifugação foram determinados utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY et al., 1951).

4.7.2. Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).

Os níveis de GSH foram determinados por espectrofluorimetria (HISSIN E HILF, 1976). Aliquotas de 60 μL de homogenato foram adicionadas a 1,0 mL de um meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4). Após precipitação de proteínas com TCA 13 %, 100 μL do sobrenadante foi adicionado a 2,0 mL de um meio contendo NaH_2PO_4 0,1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0. 100 μL de o-ftalaldeído (1 mg/mL) foi adicionado e após 15 minutos à temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada em um espectrofluorímetro RF-5301 (Shimadzu) com comprimentos de onda de 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. A concentração de glutatona reduzida foi expressa como nmol de GSH por mg de proteína.

Para a determinação dos níveis de GSSG foi usado o método de espectrofluorimetria (HISSIN E HILF, 1976). Aliquotas de 100 μL de homogenato foram adicionadas a 1,0 mL de um meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4). Após precipitação de proteínas com 0,5 mL de TCA 13 %, a amostra foi centrifugada a $9.000 \times g$ por 3 minutos. O sobrenadante foi incubado com NEM (0,04 M) a temperatura ambiente por 25 minutos e em seguida alcalinizado com

NaOH (0,1 N). Na sequência, 100 µL dessa amostra foi adicionado a 2,0 mL de um meio contendo NaH_2PO_4 0,1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0, e por último foi adicionado 100 µL de o-ftalaldeído 1 mg/mL. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada em um espectrofluorímetro RF-5301 (Shimadzu) com comprimentos de onda de 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. A concentração de glutatona oxidada foi expressa como nmol de GSSG por mg de proteína.

4.7.3. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da enzima CAT foi avaliada pela decomposição enzimática do H_2O_2 medida diretamente por espectrofotometria a 240 nm (AEBI, 1974). Proteínas do sobrenadante do homogenato ($\approx 0,15$ mg/mL) foram adicionadas a uma solução tampão contendo Tris 50 mM, EDTA 0,25 mM e H_2O_2 30 mM (pH 8,0), e a queda da absorbância monitorada por um minuto a 25 °C. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar obtido a partir da curva de calibração de H_2O_2 e os valores expressos como µmol de H_2O_2 decomposto por minuto por mg de proteína.

A atividade da enzima SOD foi determinada pela capacidade desta enzima em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol em meio alcalino, que foi monitorado por espectrofotometria a 420 nm (MARKLUND E MARKLUND, 1974). Uma unidade de SOD é a quantidade de enzima capaz de promover 50 % de inibição do pirogalol. Proteínas do sobrenadante de homogenato ($\approx 0,35$ mg/mL) foram adicionados a uma solução tampão de Tris-HCl 0,2 M (pH 8,2) e EDTA 2 mM, contendo 1 mL de volume final. A reação foi iniciada pela adição de pirogalol 0,1 mM. A variação na absorbância devido a auto-oxidação do pirogalol foi acompanhada, a velocidade inicial extrapolada e a atividade expressa como U de SOD por mg de proteína. Cada U de SOD se refere à inibição em 50 % da oxidação do pirogalol, IC50.

A atividade da enzima GSH-Px foi determinada pelo decréscimo de absorbância de NADPH dependente do H_2O_2 a 340 nm a 25 °C (PAGLIA E VALENTINE, 1967). Proteínas do sobrenadante de homogenato ($\approx 0,4$ mg) foram adicionadas a uma solução contendo tampão fosfato de potássio 40 mM (pH 7,0), EDTA 0,5 mM, azida sódica (NaN_3) 1,0 mM, glutatona reduzida (GSH) 1,0 mM, NADPH 0,15 mM e 2 U da enzima glutatona redutase, em 1,5 mL de volume final. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 0,2 mM, e acompanhada por 90 segundos. A velocidade inicial foi extrapolada e a atividade calculada a partir do coeficiente de extinção molar de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa como nmol de NADPH por minuto por mg de proteína.

A atividade de GSH-Rd foi determinada como a diminuição na absorvância a 340 nm causada pela oxidação de NADPH (BERGMEYER, 1974). As aliquotas dos sobrenadantes gerados por centrifugação em $10.000 \times g$ do homogenato de cérebro foram adicionados a 1 ml de uma solução contendo 50 mM de tampão fosfato (pH 8,0), EDTA 2 mM, NADPH 0,15 mM e GSSG 0,5 mM a 25 °C. As taxas iniciais foram obtidos por extrapolação para o tempo zero, e a atividade foi calculada

como nmol por minuto por mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de NADPH ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6Pd) foi medida como a redução de NADP^+ na presença de glicose-6-fosfato (BERGMEYER, 1974). As aliquotas dos sobrenadantes gerados por centrifugação em $10.000 \times g$ do homogenato de cérebro foram adicionados a 1,5 ml de uma solução contendo tampão de trietanolamina 0,1 M (pH 7,6), MgCl_2 7 mM, NADP^+ 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato (1,0 mM) a 25 °C. O aumento de absorvância causada pela produção de NADPH foi monitorado durante 3 minutos. As taxas iniciais foram obtidas por extrapolação para o tempo zero e a atividade foi calculada como nmol por minuto por mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de NADPH ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.7.5. Carbonilação de proteínas

O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado pelo método do 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) (LEVINE et al., 1990). Amostras foram incubadas com 10 mM de DNPH em HCL (2 N) e mantidas à temperatura ambiente. Após 1 hora as proteínas complexadas a derivados hidrazona foram precipitadas com ácido tricloroacético, centrifugadas, e o pellet lavado 3 vezes com etanol:etilacetato (1:1) para remoção do excesso de DNPH. Antes de cada centrifugação o pellet foi levemente homogeneizado no vórtex e mantido 10 minutos com solução de lavagem. A proteína precipitada foi redissolvida em Guanidina HCl (6 M) e a absorvância da solução foi medida em 370 nm. O conteúdo de grupamentos carbonil foi calculado com base no coeficiente de extinção molar de $22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, e os resultados expressos em nmol de grupamentos carbonil por mg de proteína.

4.8. Imuno-histoquímica para MAP2

O método de secções “free-floating” foi usado para o procedimento de imuno-histoquímica (BRIONES et al., 2006). Os animais foram anestesiados com overdose de tiopental (Thiopentax®, Cristália, Itapira-SP, Brasil) para posterior perfusão transcardíaca com 30 mL de salina (0,9 %) seguida de 50 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4 % (pH=7,4) em tampão fosfato (PB) 0,2 M. Os encéfalos foram removidos, pós-fixados em solução de PFA 4 % em PB 0,2 M, por 2 h. Durante 72 horas, os encéfalos foram mantidos em solução de sacarose 30 % em tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M a 4 °C para crioproteção. Após congelamento adequado, mergulhando os encéfalos em isopentano, sob-refrigeração de nitrogênio líquido, estes foram seccionados em micrótomos criostato (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha). As secções coronais (40 μm), coletadas em 5 tubos eppendorf contendo solução anticongelante, correspondiam a coordenadas estereotáticas entre -2,30 a -4,30 mm posterior ao bregma, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998).

Para a IR-MAP2, as secções foram submetidas a sucessivas lavagens em PBS 0,1 M (pH 7,3). Em seguida, as secções foram tratadas com 0,3 % de peróxido de hidrogênio em PBS, para inativar a atividade da peroxidase endógena, lavadas com PBS 0,1 M (pH 7,3) e colocadas em solução de albumina de soro bovino (BSA) 3 % e Triton-X 0,1 %, durante 60 minutos para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *rabbit* anti-MAP2 (1:1500, Sigma, St. Louis, MO) em solução de PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 0,1 %, contendo 3 % de BSA e mantidas, *overnight*, sob agitação constante à temperatura ambiente. Após este período, as secções foram lavadas com PBS 0,1 M e, então, incubadas com os anticorpos secundários *goat* anti-*rabbit* (1:500, Santa Cruz Biotechnology), biotinizados, em uma solução idêntica à utilizada para o anticorpo primário, e mantidas sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 2 horas. Posteriormente, foram incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories) em PBS 0,1 M, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por mais 2 horas. A revelação foi realizada usando uma solução de 3,3,9-hidroclorato de diaminobenzidina 0,025 % (DAB; Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) e H₂O₂ 0,05 %, acrescida de solução de níquel 8 % em tampão Tris/HCl. Após estes procedimentos, as secções foram adequadamente lavadas em PBS 0,1 M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram cobertas com Permount® (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

4.8.1. Análise Quantitativa da Imunorreatividade da MAP2

Para quantificar a IR-MAP2 foi utilizado o método estereológico de densidade superficial (S_v), no qual um sistema de linhas de teste (grade de arcos ciclóides) foi sobreposto paralelamente às imagens microscópicas obtidas em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 100 × (Fig. 12). As intersecções entre as linhas de teste e os processos dendríticos MAP2-positivos foram contadas. A S_v dos processos dendríticos MAP2-positivos nos campos microscópicos foi calculada usando a fórmula: $S_v = 2(I/L)$; em que I é o número total de intersecções por campo microscópico e L é a soma do comprimento das linhas de teste no campo microscópico (160 μm = 10 μm da linha de teste × 16 linhas de teste) (BADDELEY et al. 1986). A S_v das regiões cerebrais quantificadas foi, então, obtida através da média das S_v dos campos microscópicos utilizados. A análise foi realizada no *stratum radiatum* do hipocampo nas regiões CA1 (20 campos microscópicos em 5 secções/animal) e CA3 (10 campos microscópicos em 5 secções/animal) e nas regiões RS (10 campos microscópicos em 5 secções/animal) e PtA (10 campos microscópicos em 5 secções/animal) do córtex cerebral, utilizando secções aleatórias. Em todas as amostras o eixo vertical das linhas de teste permaneceu alinhado paralelamente à orientação do eixo vertical da imagem microscópica e quaisquer corpos celulares MAP2-positivos foram excluídos da quantificação.

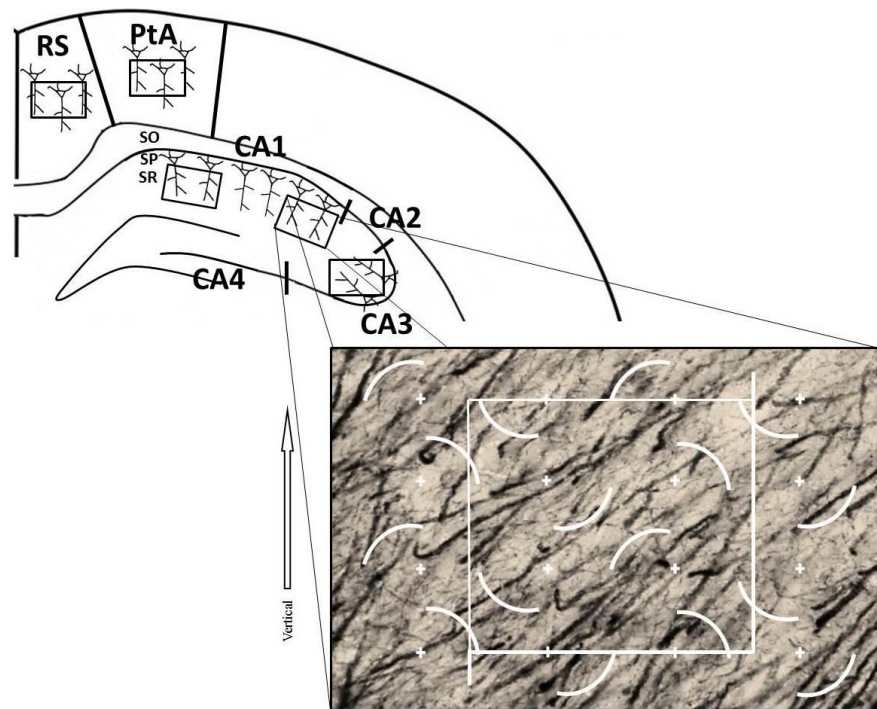


Fig. 12 – Desenho representativo mostrando as regiões cerebrais e os campos microscópicos utilizados para a quantificação da IR-MAP2. Em destaque o sistema teste de arcos ciclóides sobreposto paralelamente à imagem microscópica. A S_v foi estimada através da intersecção entre o arco ciclóide (branco) e os processos dendríticos MAP2-positivos (preto). Foi registrada uma intersecção quando um ou mais processos dendríticos MAP2-positivos intercepta qualquer parte de um arco cicloide. CA = cornu ammonis; RS = córtex retrosplenial; PtA = córtex de associação parietal; SO = stratum oriens; SP = stratum pyramidal; SR = stratum radiatum.

4.9. Perfil Lipídico

4.9.1. Preparação da Amostra

A análise do perfil lipídico foi realizada em parceria com o Dr. Lúcio Cardozo Filho e o Dr. Makoto Matsushita, do departamento de Engenharia Química e Departamento de Química, respectivamente, da Universidade Estadual de Maringá. Os ratos foram anestesiados profundamente (50 mg/kg, tiopental, intraperitoneal) e seus encéfalos foram cuidadosamente removidos e dissecados em córtex cerebral e hipocampo. Em seguida, cada região do cérebro foi imediatamente triturada e homogeneizada em 500 μ L de solução de PBS 0,01 M com EDTA pH 7,4 e congelada em nitrogênio líquido (-150 °C) para subsequente armazenamento a -80 °C. Por fim, o homogeneizado foi liofilizado e novamente armazenado a -80 °C para a extração de lipídeos totais.

4.9.2. Extração dos Lipídeos

A extração com fluido supercrítico foi realizada em uma unidade de escala laboratorial para todas as amostras (ZANQUI et al., 2015; DA SILVA et al., 2015). Os equipamentos utilizados consistem em reservatório de solvente, bomba de seringa (ISCO, modelo 500D) e dois banhos termostáticos - um (Julabo, modelo F25-Me) usado para arrefecer o fluido na bomba da seringa e o outro (Quimis, modelo Q214M2) para manter a temperatura do extrator no ponto de ajuste, e um

extrator de aço inoxidável com 2 cm³ de capacidade. As amostras totais secas foram condicionadas no interior do cilindro extrator e aquecidas a 80 °C utilizando um termorregulador (Tholz, modelo CTM-04E) e, em seguida, n-propano (Linde AG, Munique, Baviera, Alemanha) foi pressurizado até 80 bar a 40 °C. O extrato foi recolhido em recipiente eppendorf após 15 minutos de contacto entre o n-propano e as amostras a uma velocidade de fluxo de 1 mL por minuto, controlada por uma válvula de expansão (Autoclave Engineers). Na saída do extrator, o material retorna às condições ambientais de temperatura e pressão, levando a liberação instantânea de gás e precipitação do extrato.

4.9.3. Quantificação dos Ácidos Graxos

A primeira etapa para determinar o perfil de ácidos graxos foi converter os lípideos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG), de acordo com HARTMAN e LAGO, 1973. Os EMAG foram separados usando um cromatógrafo de gás CP-3380 (Varian, Santa Clara, Califórnia, EUA), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida CP 7420 seletiva para EMAG (100 m × 0,25 mm x 0,25 mm, cianopropil). O gás transportador foi hidrogênio a velocidade de fluxo de 1,4 mL por minuto, os gases da composição foram nitrogênio a 30 mL por minuto e ar sintético a 300 mL por minuto e o gás de chama foi hidrogênio a 30 mL por minuto; a amostra foi injetada numa razão de divisão de 1:100. A temperatura do injetor e do detector foi 235 °C. A temperatura da coluna foi mantida a 165°C durante 4 minutos, aumentada para 185 °C a 4°C por minuto e mantida durante 5 minutos e, em seguida, aumentou de 185°C a 225°C a 10 °C por minuto e mantida durante 10 minutos. Os tempos de retenção foram comparados com de ésteres metílicos padrões (Sigma, St Louis, MO, EUA). O conteúdo de ácidos graxos foi expresso em porcentagem.

4.10. Análise Estatística

O software SAS 9.3 foi usado. Os dados dos testes de comportamento não seguiram distribuição normal consistente entre os vários grupos ou variáveis. Os testes de homoscedasticidade e esfericidade de suposições não foram satisfeitos (teste de Mauchly). Portanto, foi examinado o modelo de covariância que os dados se encaixaram melhor, e o modelo de covariância “compound symmetric” não estruturada foi escolhido. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas (two-way ANOVA) foi realizada para quantificar o desempenho da memória entre os vários TRM, com o Grupo como o fator “entre indivíduos” e os Testes (TRM) como o fator “intra indivíduos”. Quando o desempenho da memória foi expresso como a latência total e número total de erros (somado nos vários TRM) o teste t de Student pareado foi utilizado para analisar comparações intra (antes e depois da isquemia) e o teste t de Student não pareado para comparações entre grupos. Para os resultados histológicos, bioquímicos e do perfil lipídico, foi encontrado homocedasticidade dos dados. Portanto, a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey’s para múltiplas comparações foi utilizado para analisar os resultados das análises bioquímicas, quantificação de neurônios e perfil lipídico. Para analisar a expressão da MAP2 one-way ANOVA seguida pelo teste de

Newman-Keuls para múltiplas comparações foi utilizado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Taxa de Mortalidade

Ao todo, 26,02 % dos ratos (64/246) foram perdidos durante os experimentos pelas seguintes razões: (i) ruptura acidental da artéria carótida após a oclusão (12/246, 4,88 %), (ii) o animal não perder o reflexo de endireitamento (10/234, 4,27 %), (iii) convulsões ou hemorragia pulmonar durante ou logo após a oclusão (17/224, 7,59 %), (iv) óbito nas primeiras horas ou dias de isquemia (20/207, 9,66 %) e (v) comportamento atípico (5/187, 2,67 %).

5.2. Experimento I

5.2.1. Estresse Oxidativo após ICGT e Efeito Antioxidante do OP

O estresse oxidativo induzido pela ICGT foi medido a partir de: (a) nível do antioxidante endógeno GSH, o seu produto oxidado GSSG, e a relação GSH/GSSG, (b) atividade das enzimas antioxidantes GSH-Rd, GSH-Px, G6Pd, CAT e SOD e (c) níveis de carbonilação de proteínas (Fig. 13 A-I). Em comparação com animais do grupo sham, a ICGT reduziu o nível de GSH (32,20 %; $F_{2,15} = 6,10$, $p < 0,05$) (Fig. 13 A), a relação GSH/GSSG (41,0 %; $F_{2,13} = 7,96$, $p < 0,05$) (Fig. 13 C), e a atividade da GSH-Px (30,66 %; $F_{2,15} = 8,68$, $p < 0,01$) (Fig. 13 F) e SOD (22,90 %; $F_{2,13} = 7,06$, $p < 0,05$) (Fig. 13 E). Inversamente, a ICGT aumentou os níveis de carbonilação de proteínas (58,16 %; $F_{2,14} = 5,60$, $p < 0,05$) (Fig. 13 I). A atividade da GSH-Rd, G6Pd e CAT mostrou uma tendência não significativa para diminuição (Fig. 13 D, G e H). Assim como os níveis de GSSG tenderam a aumentar (Fig. 13 B). Estes resultados indicam que a capacidade antioxidante do tecido cerebral foi diminuída após 24 horas de reperfusão. O tratamento com OP restaurou (ou preservou) a capacidade antioxidante cerebral. A significância estatística, no entanto, foi encontrada somente para os níveis de GSH, a relação GSH/GSSG, CAT, SOD e o nível de carbonilação de proteínas ($p < 0,05 - 0,001$ vs isq/vei).

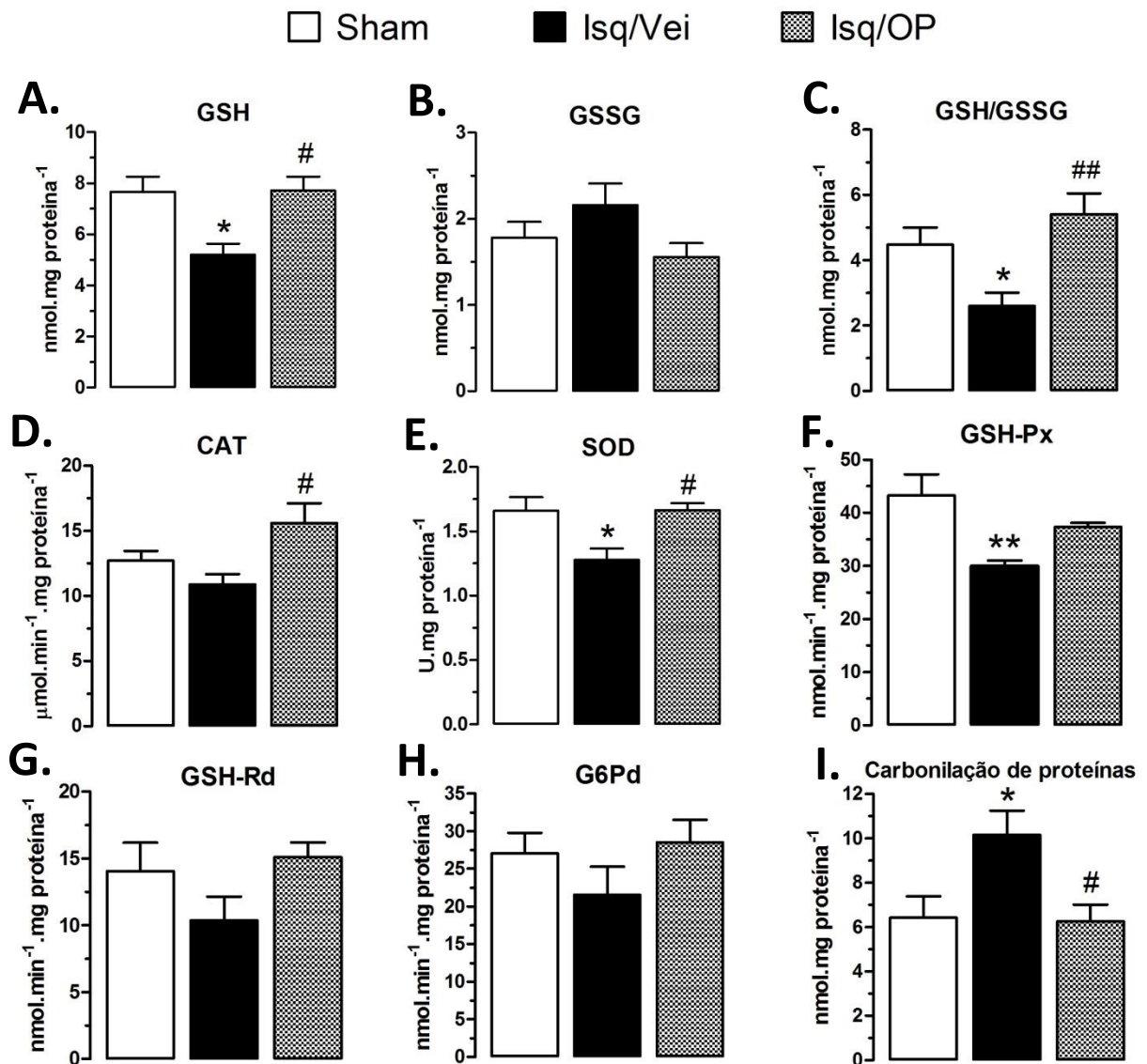


Fig. 13 A-I – Efeitos do tratamento com OP sobre o estresse oxidativo induzido por ICGT medido pelo (a) teor de glutatona reduzida (GSH) (A), glutatona oxidada (GSSG) (B) e a razão GSH/GSSG (C), (b) atividade das enzimas catalase (CAT) (D), superóxido dismutase (SOD) (E), glutatona peroxidase (GSH-Px) (F), glutatona redutase (GSH-Rd) (G) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6Pd) (H) e (c) teor de carbonilação de proteínas (I). Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ – 0,01 vs sham; # $p < 0,05$ vs isq/vei. Tamanho da amostra (n): sham = 5-6, isq/vei = 5-6 e isq/OP = 6-8.

5.2.2. Efeito antiamnésico do OP

A Figura 14 mostra o efeito do tratamento com OP no período pré-isquemia sobre a retenção de memória avaliada no LRA após ICGT. Os animais dos grupos isq/vei apresentaram maior tempo (ou seja, latência) para encontrar a zona de recompensa (caixa de meta), e cometeram mais erros de memória de referência e de memória de trabalho do que os animais do grupo sham, durante todos os dias de TRM (painéis acima: $F_{2,120} = 12,31 - 57,60$, $p < 0,0001$). O efeito amnésico da ICGT foi melhor visualizado quando a latência total e o número total de erros registrados antes e depois da ICGT (treino e TRM) foram comparados dentro de cada grupo (painéis abaixo). Esta análise revelou que os três parâmetros aumentaram consistentemente entre as fases pré e pós-cirúrgica no grupo isq/vei ($t_{77} =$

4,60 – 6,22, $p < 0,001 - 0,01$), mas permaneceram inalterados no grupo sham ($t_{77} = 0,13 - 1,58$, $p > 0,05$). O prejuízo de memória medido pelos três parâmetros foi levemente (ou ausente) reduzido pelo tratamento com OP ($p < 0,0001 - 0,05$, isq/OP vs isq/vei), comparado com o grupo isq/vei. O grupo isq/OP, ainda, exibiu maior latência e cometeu mais erros de memória de referência e operacional ($p < 0,01 - 0,05$, sham vs isq/OP) comparado com o grupo sham. Examinando o desempenho dos animais por meio da distribuição temporal da latência, número de erros de memória de referência e número de erros de memória de trabalho dos cinco TRM (painéis acima) ou com a latência total e número total de erros somados ao longo dos TRM (painéis abaixo), o grupo isq/OP apresentou aumento para os três parâmetros entre as fases pré e pós-cirúrgica ($p < 0,01 - 0,05$, pré vs pós).

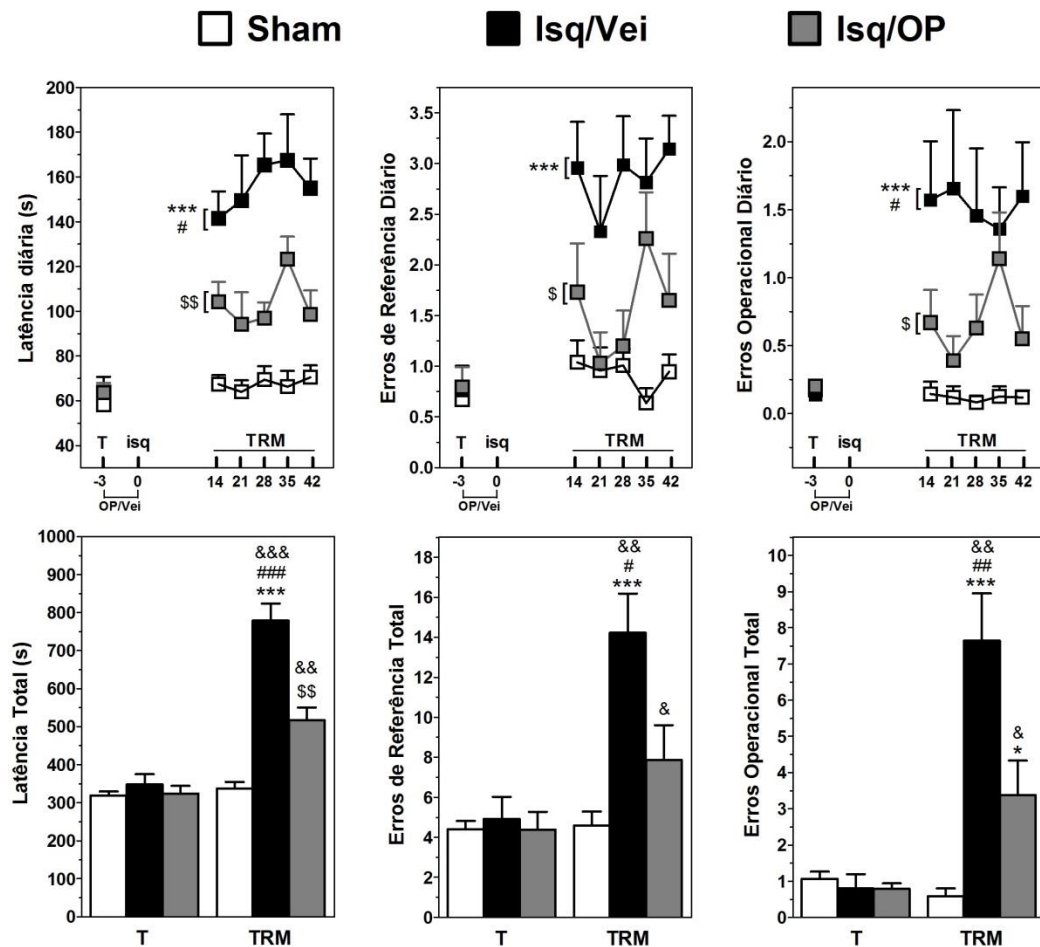
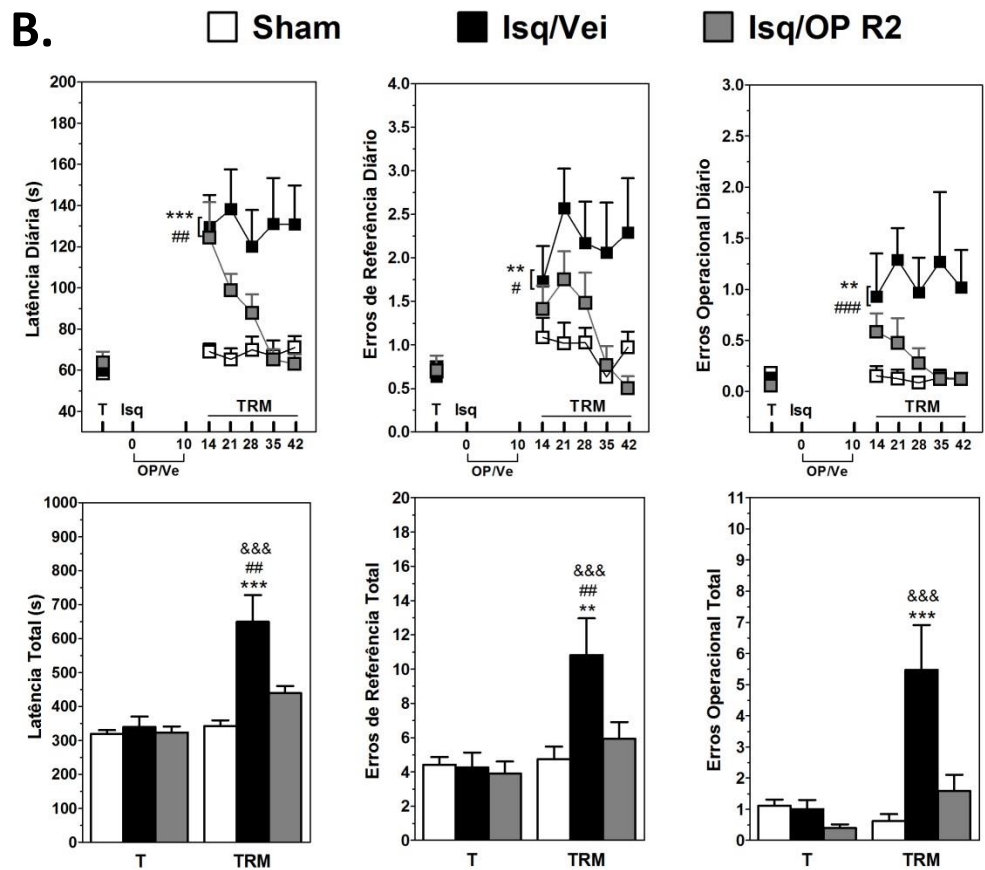
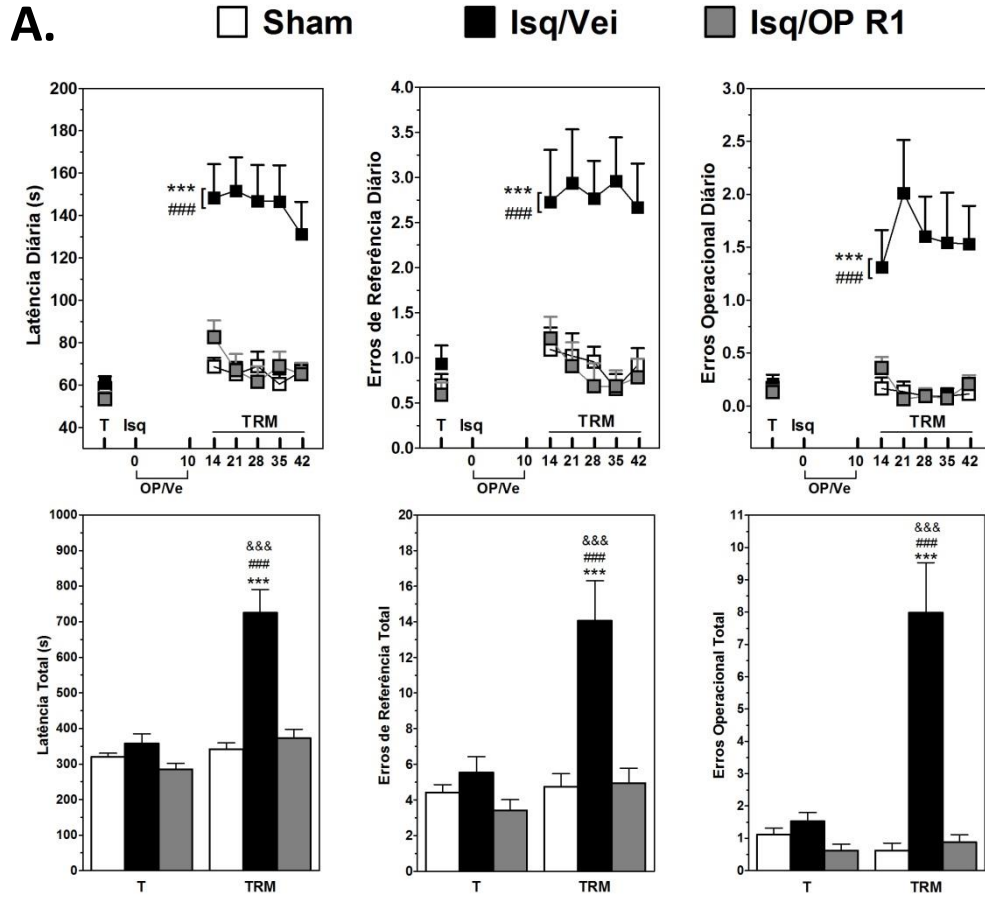


Fig. 14 - Efeito antiamnésico do tratamento com OP sobre a perda de memória induzida pela ICGT. Os ratos foram treinados (T) durante 10 dias e em seguida submetidos à cirurgia (ICGT ou sham, dia 0). Os testes de retenção de memória (TRM) ocorreram 14, 21, 28, 35, e 42 dias após a cirurgia. O OP foi administrado uma vez por dia, 3 dias antes e no dia da ICGT. (*Painéis acima*) Distribuição temporal do desempenho de memória, expresso como latência, número de erros de memória de referência e número de erros de memória operacional. (*Painéis abaixo*) Latência total e número total de erros somados ao longo dos vários TRM. * $p < 0,0001 - 0,05$ isq/vei vs sham; # $p < 0,0001 - 0,05$ isq/vei vs isq/OP; \$ $p < 0,0001 - 0,05$ sham vs isq/OP; & $p < 0,0001 - 0,05$ para comparações dentro do grupo entre o desempenho pré e pós-isquemia. Os dados são expressos como média \pm SEM do grupo. Tamanho da amostra (n): sham = 16, isq/vei = 7 e isq/OP = 10.

5.3. Experimento II

5.3.1. Janela Terapêutica para o Efeito Antiamnésico do OP

As Figuras 15 A, B e C mostram o efeito do tratamento com OP no período pós-isquemia sobre a retenção de memória avaliada no LRA após ICGT. Os animais dos 3 grupos isq/vei (referentes aos R1, R2 e R3 de tratamento) apresentaram maior tempo (ou seja, latência) para encontrar a zona de recompensa (caixa meta) e cometeram mais erros de memória de referência e de memória de trabalho do que os animais do grupo sham, de maneira muito semelhante entre eles (Fig. 15 A, B e C), durante todos os dias de TRM (painéis acima: $F_{1,225} = 6,36 - 32,55$, $p < 0,0001 - 0,0123$). O efeito amnésico da ICGT foi melhor visualizado quando a latência total e o número total de erros registados antes e depois da ICGT (treino e TRM) foram comparados dentro de cada grupo (painéis abaixo). Esta análise revelou que os três parâmetros aumentaram consistentemente entre as fases pré e pós-cirúrgica nos 3 grupos isq/vei ($t_{77} = -7,77 - -2,15$, $p < 0,0001 - 0,0346$), mas permaneceram inalterados no grupo sham ($t_{77} = -0,57 - 0,54$, $p = 0,5901 - 0,7999$). O prejuízo de memória medido pelos três parâmetros foi completamente reduzido pelo R1 ($F_{1,225} = 19,37 - 30,55$, $p < 0,0001$) (Fig. 15 A) e moderadamente reduzido pelo R2 ($F_{1,225} = 5,16 - 9,38$, $p < 0,0001 - 0,024$) (Fig. 15 B) de tratamento com OP quando comparados com os grupos isq/vei. Os animais do grupo R1 demonstraram, ainda, desempenho comportamental semelhante ao do grupo sham durante todos os TRM (R1: $F_{1,225} = 0,05 - 0,34$, $p = 0,5578 - 0,8217$; R2: $F_{1,225} = 0,32 - 2,56$, $p = 0,1108 - 0,5597$). Examinando o desempenho dos animais por meio da distribuição temporal de latência, número de erros de memória de referência e número de erros de memória de trabalho dos cinco TRM (painéis acima) ou com a latência total e número total de erros somados ao longo dos TRM (painéis abaixo), o tratamento com OP revelou efeito antiamnésico significativo entre as fases pré e pós-cirúrgica para todos os três parâmetros medidos nos grupos R1 ($t_{77} = -2,30 - -0,29$, $p = 0,0247 - 0,7697$) (Fig. 15 A) e R2 ($t_{77} = -3,69 - -1,48$, $p = 0,0004 - 0,1435$) (Fig. 15 B). No entanto, o efeito antiamnésico foi leve (ou ausente) no R3 de tratamento com OP, principalmente quando analisados os parâmetros latência (pré vs pós-cirurgia: $t_{77} = -7,19$, $p < 0,0001$) e número de erros de memória de referência (pré vs pós-cirurgia: $t_{77} = -4,05$, $p < 0,0001$) (Fig. 15 C). Quando comparado ao grupo sham, os animais do grupo R3 apresentaram maior latência e cometeram maior número de erros ($F_{1,225} = 5,00 - 8,06$, $p < 0,0049 - 0,0262$) (Fig. 15 C). Este resultado indica que a janela terapêutica para o tratamento com OP abrange um curto período pós-isquemia, ao qual ocorre prevenção mais eficiente da perda de memória retrógrada.



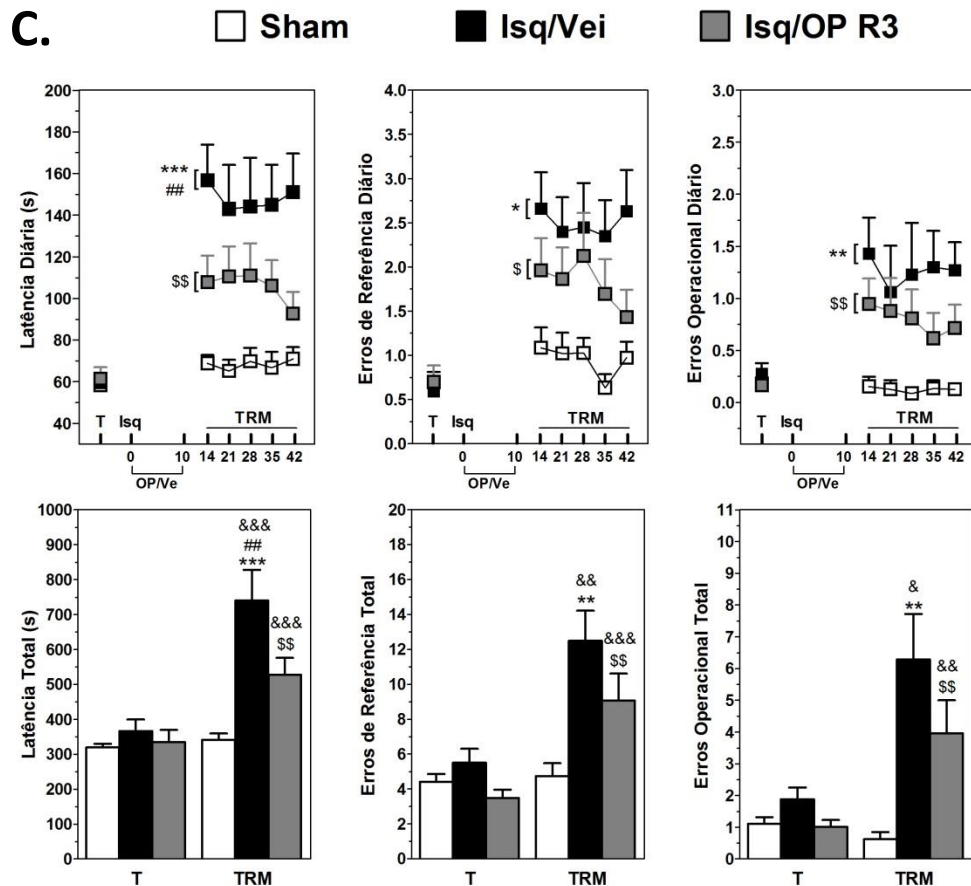


Fig. 15 A, B e C – Janela terapêutica do tratamento com OP sobre a perda de memória induzida pela ICGT. Os ratos foram treinados (T) durante 10 dias e em seguida submetidos à cirurgia (ICGT ou sham, dia 0). Os testes de retenção de memória (TRM) ocorreram 14, 21, 28, 35, e 42 dias após a cirurgia. O OP foi administrado uma vez por dia, de acordo com os R1 (A), R2 (B), e R3 (C). (*Painéis acima*) Distribuição temporal do desempenho de memória, expresso como latência, número de erros de memória de referência e número de erros de memória operacional. (*Painéis abaixo*) Latência total e número total de erros somados ao longo dos vários TRM. * $p < 0,0001 - 0,05$ isq/veí vs sham; # $p < 0,0001 - 0,05$ isq/veí vs isq/OP; \$ $p < 0,0001 - 0,05$ sham vs isq/OP; & $p < 0,0001 - 0,05$ para comparações dentro do grupo entre o desempenho pré e pós-isquemia. Os dados são expressos como média \pm SEM do grupo. Tamanho da amostra (n): sham = 15, R1 (isq/veí = 10, isq/OP = 16), R2 (isq/veí = 10, isq/OP = 13) e R3 (isq/veí = 10, isq/OP = 13).

5.3.2. Análise Histológica

A extensão da neurodegeneração induzida pela ICGT no hipocampo foi estimada pela contagem do número de neurônios piramidais que sobreviveram nas regiões CA1-CA4 (Fig. 16). Nos grupos isq/veí, a ICGT reduziu o número de neurônios viáveis em até 72,82 % ao longo do estrato piramidal CA1-CA4 ($F_{8,92} = 72,46$, $p < 0,0001$), em comparação com o grupo sham. Como esperado, a região CA1 do hipocampo foi a mais gravemente afetada pela ICGT, com até 81,78 % de morte celular. O efeito neurodegenerativo da ICGT não foi inibido pelo tratamento com OP em todos os regimes ($p < 0,0001$ vs sham), apresentando até 83,15 % de morte celular em comparação com o grupo sham.

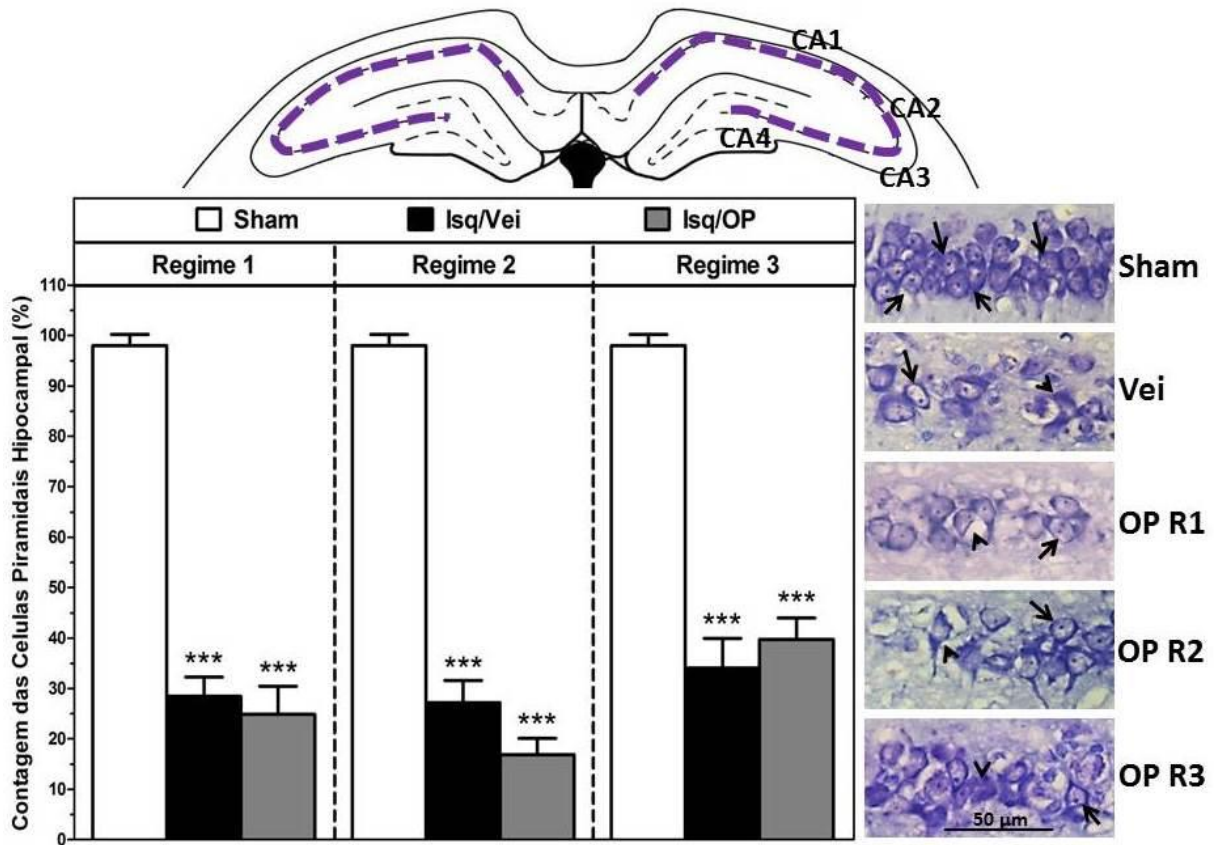


Fig. 16 – (Painel acima) Imagem representativa mostrando o hipocampo e as estruturas utilizadas para quantificar a neurodegeneração induzida pela ICGT. (Painel da esquerda) Número (%) de células piramidais aparentemente normais contadas ao longo do estrato piramidal do hipocampo CA1-CA4. (Painel da direita) Fotomicrografias representativas de alta ampliação (400 ×, barra de escala = 50 μm) de neurônios piramidais contados no estrato CA1 do hipocampo. As setas e cabeças de setas indicam neurônios de aparência normal e degenerados, respectivamente. Os dados são expressos como média ± SEM do grupo. *** $p < 0,0001$ vs sham. Tamanho da amostra (n): sham = 11, R1 (isq/vei = 10, isq/OP = 15), R2 (isq/vei = 10, isq/OP = 12) e R3 (isq/vei = 10, isq/OP = 11). CA = cornu ammonis.

5.4. Experimento III

5.4.1. Decurso Temporal da Expressão da MAP2 após ICGT

As figuras 17 A-F, 18 e 19 mostram os resultados encontrados no experimento III. Este experimento foi dividido em 2 partes. Na primeira parte, foi analisada a expressão da MAP2 em função do tempo pós-isquemia (Fig. 17 A-C). A ICGT provocou perda de MAP2 (isto é, menor IR-MAP2), a qual foi bem visualizada em 7 dias pós-isquemia e em 14 dias pós-isquemia (painéis da esquerda), com menor expressão da MAP2 em 14 dias que em 7 dias pós-isquemia para todas as regiões cerebrais quantificadas. As regiões RS e PtA do córtex cerebral apresentaram menor perda de MAP2 ($F_{4,22} = 4,85$, $p = 0,0059$; 7 dias pós-isquemia: 16,38 %, 14 dias pós-isquemia: 35,27 %) (Fig. 17 A) que as regiões CA1 ($F_{4,21} = 12,31$, $p < 0,0001$; 7 dias pós-isquemia: 26,14 %, 14 dias pós-isquemia: 51,18 %) (Fig. 17 B) e CA3 do hipocampo ($F_{4,22} = 14,07$, $p < 0,0001$; 7 dias pós-isquemia: 35,95 %, 14 dias pós-isquemia: 64,66 %) (Fig. 17 C). No entanto, os grupos de 28 e 35 dias pós-isquemia apresentaram maior expressão da MAP2 comparado com os grupos de 7 e 14 dias pós-

isquemia, em todas as regiões cerebrais analisadas, mas sem diferença estatística entre os grupos. Porém, o aumento na expressão da MAP2 encontrado nos grupos 28 e 35 dias pós-isquemia não demonstra recuperação completa da perda da MAP2 quando comparado com o grupo sham (córtex – 28 dias pós-isquemia: 13,62 %, 35 dias pós-isquemia: 26,23 %; hipocampo-CA1 – 28 dias pós-isquemia: 36,25 %, 35 dias pós-isquemia: 40,20 %; hipocampo-CA3 – 28 dias pós-isquemia: 31,33 %, 35 dias pós-isquemia: 35,07 %). Estes resultados foram utilizados para construir o decurso temporal da expressão da MAP2 após ICGT e assim analisar o efeito do tratamento com OP sobre estas alterações.

5.4.2. Efeito do OP sobre a Expressão da MAP2 após ICGT

O decurso temporal da expressão da MAP2 após ICGT e os R1 e R3 de tratamento com OP, investigados no experimento II, foram usados para executar a segunda parte do experimento III (Fig. 17 D-F). O tratamento com OP não foi capaz de exercer proteção completa sobre a perda de MAP2 induzida pela ICGT em ambos os regimes de tratamento e tempos pós-isquemia, quando comparado com o grupo sham ($p < 0,001-0,05$ vs sham), mas quando comparado com o grupo isq/vei o R1 de tratamento reduziu significativamente a perda de MAP2 em 14 dias pós-isquemia. Esse efeito protetor sobre os dendritos apareceu no hipocampo (Fig. 17 E e F), mas não nas regiões corticais (Fig. 17 D). Além disso, o efeito foi maior no CA3 ($F_{6,34} = 25,84$, $p < 0,0001$ isq/OP vs isq/vei) que no CA1 ($F_{6,34} = 29,06$, $p < 0,05$ isq/OP vs isq/vei). Em 28 dias pós-isquemia, o R1 de tratamento com OP também apresentou maior IR-MAP2 na região CA3 do hipocampo ($p < 0,05$ isq/OP vs isq/vei) (Fig. 17 F), quando comparados com o grupo isq/vei. No entanto, o R3 de tratamento com OP não exerceu proteção sobre a perda da MAP2 em ambos os tempos de reperfusão, quando comparado com os grupos isq/vei ($p > 0,05$). Por ultimo, comparações entre os regimes de tratamento mostraram que em R1 houve menor perda de MAP2 induzida pela ICGT que R3, com significância estatística para as regiões corticais ($F_{6,34} = 14,79$, I/R 14 dias: $p < 0,001$ OP R1 vs OP R3), CA1 (I/R 14 dias: $p < 0,0001$ OP R1 vs OP R3; I/R 28 dias: $p < 0,05$ OP R1 vs OP R3) e CA3 do hipocampo (I/R 14 dias: $p < 0,0001$ OP R1 vs OP R3; I/R 28 dias: $p < 0,0001$ OP R1 vs OP R3). Assim como no experimento II, o R1 apresentou melhor resposta na análise que R3, podendo a maior expressão da MAP2, e por sua vez da quantidade de dendritos, ser responsável pelo efeito antiamnésico.

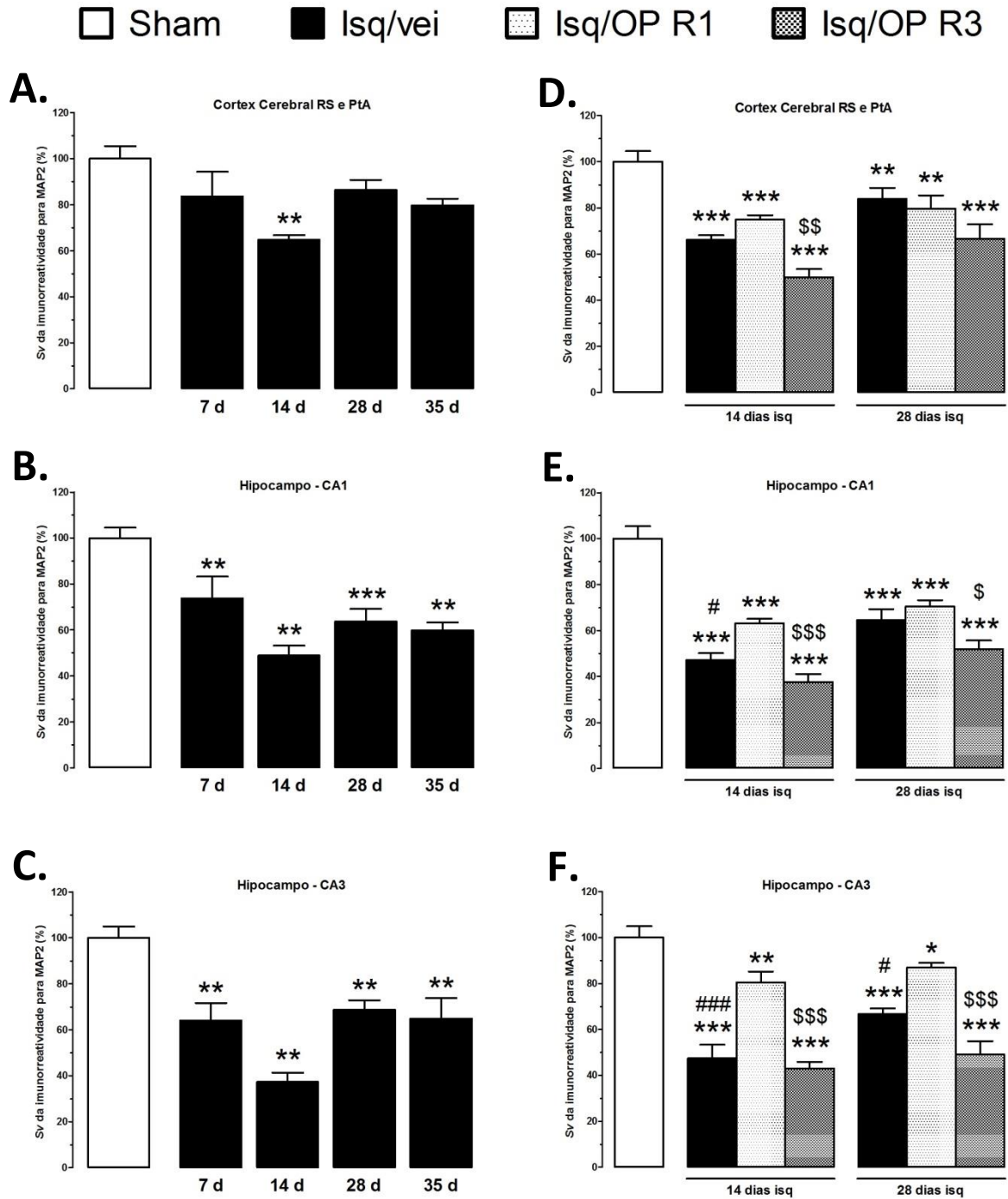


Fig. 17 A-F – Decurso temporal e efeito do tratamento com OP sobre a expressão da MAP2. (Painéis da esquerda) Densidade superficial (*Sv*) da IR-MAP2 em 7, 14, 28, 35 dias pós-isquemia. (Painéis da direita) Efeitos dos R1 e R3 de tratamento com OP sobre as alterações na IR-MAP2 induzida pela ICGT em 2 diferentes tempos pós-isquemia (14 dias e 28 dias). A análise estereológica foi feita por meio da densidade de superfície expressa em porcentagem da IR-MAP2 nas regiões RS e PtA do córtex cerebral (A e D), CA1 (B e E) e CA3 do hipocampo (C e F). Os valores são as médias \pm SEM. * $p < 0,0001 - 0,05$ vs sham; # $p < 0,0001 - 0,05$ isq/vei vs isq/OP R1; \$ $p < 0,0001 - 0,05$ isq/OP R1 vs isq/OP R3. Tamanho da amostra (n): sham = 7, 7 dias pós-isquemia = 5, 14 dias pós-isquemia (isq/vei = 6, isq/OP R1 = 6, isq/OP R3 = 6), 28 dias pós-isquemia (isq/vei = 6, isq/OP R1 = 5, isq/OP R3 = 5) e 35 dias pós-isquemia = 5.

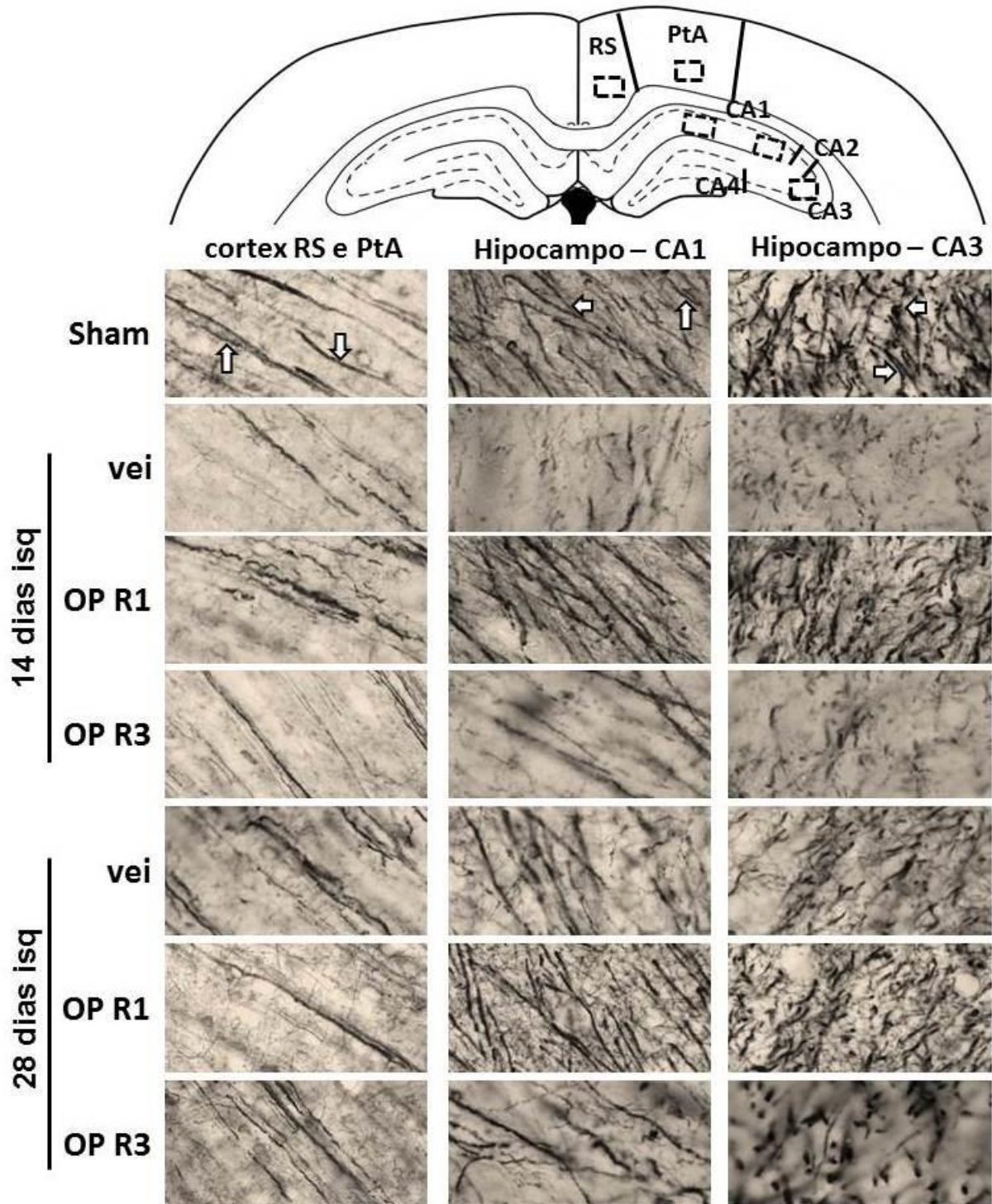


Fig. 18 – A imagem ilustra fotomicrografias das áreas cerebrais utilizadas para medições da densidade de superfície da expressão da MAP2. A análise estereológica da densidade superficial (S_v) foi feita em secções coronais obtidas no nível estereotático de -2,30 a -4,30 mm posterior ao bregma (PAXINOS e WATSON, 1998). (*Painel superior*) Diagrama representativo das regiões cerebrais utilizadas para a quantificação da IR-MAP2. (*Painel inferior*) Fotomicrografias representativas de alta ampliação (1000 \times) das regiões cerebrais e grupos de animais. As flexas brancas indicam os processos dendríticos visualizados pela IR-MAP2. CA = cornu ammonis; RS = córtex retrosplenial; PtA = córtex de associação parietal.

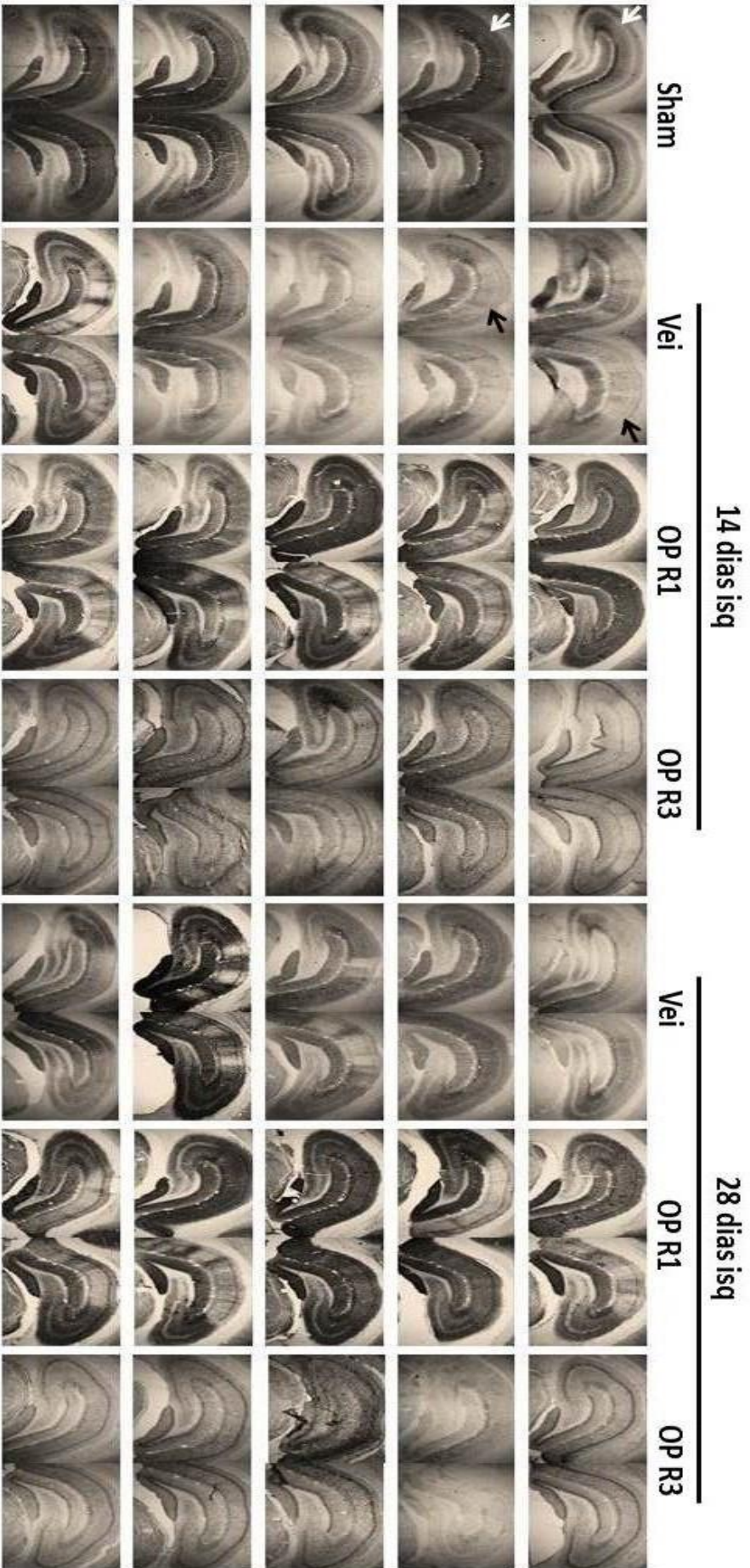


Fig. 19 – A imagem ilustra os hemisférios hipocampais utilizados para medições da densidade de superfície da expressão da MAP2. As fotomicrografias (50 ×) são de secções coronais obtidas no nível estereotáxico de -2,30 a -4,30 mm posterior em relação ao bregma (PAXINOS E WATSON, 1998). Na imagem cada grupo experimental é composto por 5 animais, que representam os hipocampos utilizados no experimento. Observe alterações na coloração do *stratum radiatum* do hipocampo. Regiões mais escuras indicam alta densidade de dentritos (flexa branca), enquanto as regiões mais claras indicam degeneração dendrítica (flexa preta).

5.5. Experimento IV

5.5.1. Análise do Perfil lipídico

A Figura 20 A e B apresenta os resultados encontrados no experimento IV. A análise do perfil lipídico indicou que os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1 n-9) são os de maiores concentrações no cortex cerebral e hipocampo, com porcentagens que variam de 13,03 a 35,09 % do total de ácido graxo em todos os grupos experimentais analisados. A análise mostrou também que o tratamento de 10 dias com OP não foi capaz de alterar o perfil lipídico dos animais do grupo sham/OP, quando comparado com o grupo sham/vei (Fig. 20 A e B). Em ambas as regiões cerebrais quantificadas, a ICGT causou mudança no balanço dos ácidos graxos com aumento na concentração do ácido vacênico (18:1 n-7) (cortex: $F_{3,23} = 9,022$, $p = 0,0004$; hipocampo: $F_{3,22} = 6,545$, $p = 0,0025$) e diminuição das concentrações dos ácidos linoléico (AL, 18:2 n-6) (cortex: $F_{3,23} = 13,51$, $p < 0,0001$; hipocampo: $F_{3,20} = 9,156$, $p = 0,0005$) e α -linolênico (A α L, 18:3 n-3) (cortex: $F_{3,23} = 22,40$, $p < 0,0001$; hipocampo: $F_{3,22} = 41,70$, $p < 0,0001$), quando comparados com os animais dos grupos sham/vei e OP, sem diferença entre os grupos isq/vei e OP (Fig. 20 A e B). Analisando o efeito do tratamento com OP sobre a concentração de EPA (20:5 n-3) ($F_{2,19} = 3,955$, $p = 0,0366$) e DHA (22:6 n-3) ($F_{2,18} = 17,35$, $p < 0,0001$) foi encontrada diferença entre os grupos apenas no hipocampo (Fig. 20 B). Os animais tratados com OP apresentaram aumento na concentração de EPA comparado com os grupos sham/vei ($p < 0,001$), sham/OP ($p < 0,05$) e isq/OP ($p < 0,05$) e aumento na concentração de DHA comparado com os grupos sham/vei ($p < 0,0001$), sham/OP (0,001) e isq/vei ($p < 0,0001$). Os percentuais dos demais ácidos graxos quantificados estão representados na Figura 20 A e B.

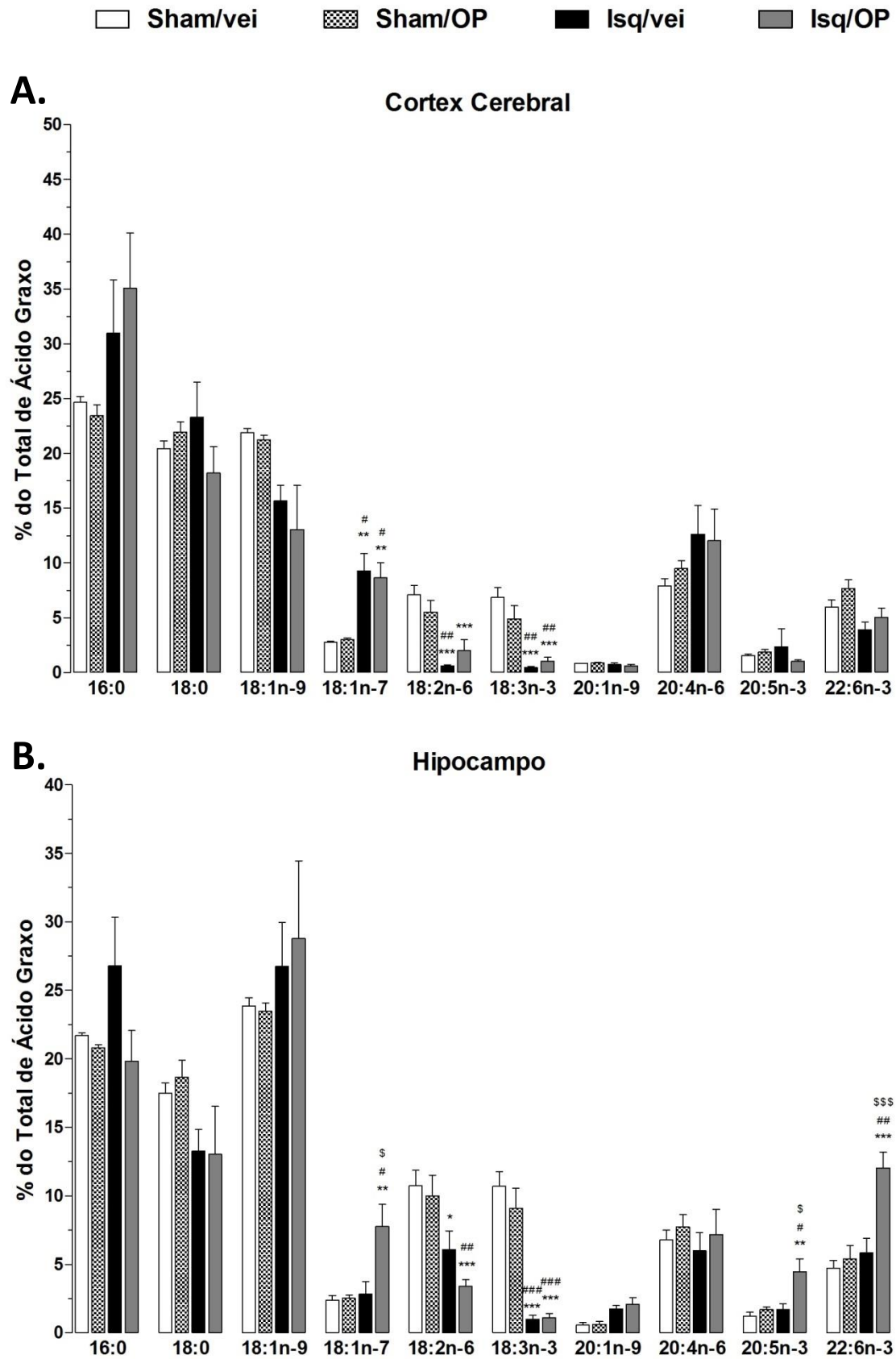


Fig. 20 A e B – Perfil lipídico e o efeito da ICGT e do tratamento com OP sobre a concentração de ácido graxo no tecido cerebral. Os animais foram tratados durante 10 dias com o OP e o perfil lipídico foi investigado no cortex cerebral (A) e hipocampo (B). Nos animais submetidos à ICGT o tratamento teve início 4 horas após a isquemia, assim como o R1 de tratamento do experimento II. As denominações numéricas dos ácidos graxos

indicam: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 n-9), ácido vacênico (18:1 n-7), ácido linoléico (18:2 n-6), ácido α -linolênico (18:3 n-3), ácido eicosenóico (20:1 n-9), ácido araquidônico (20:4 n-6), ácido timnodônico (20:5 n-3) e ácido cervônico (22:6 n-3). O resultado da análise foi expresso como porcentagem do total de ácido graxo. Os valores são as médias \pm SEM. *p < 0,0001 – 0,05 vs sham/vei; #p < 0,0001 – 0,05 vs sham/OP; \$p < 0,0001 – 0,05 isq/vei vs isq/OP. Tamanho da amostra (n): sham/vei = 8, sham/OP = 8, isq/vei = 8 e isq/OP = 8.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos o efeito do OP sobre os prejuízos bioquímicos, histológicos e comportamentais induzidos pela ICGT. Aqui o tratamento com OP por 3 dias antes e no dia da ICGT melhorou o estado oxidativo em 24 horas de reperfusão e evitou a amnésia retrógrada. O estudo demonstrou, também, que o OP impediu a amnésia retrógrada induzida pela ICGT quando o tratamento foi iniciado após o término da isquemia, confirmando e estendendo nossos dados anteriores. O tratamento com OP quando iniciado 4 horas após a ICGT e mantido por 10 dias mostrou efeito antiamnésico semelhante aos que encontramos anteriormente utilizando regimes de tratamento com início antes da isquemia. Além disso, o regime de tratamento utilizado no presente estudo preveniu a degeneração dendrítica e/ou estimulou a neuroplasticidade, visualizados em 14 e 28 dias pós-isquemia, e proporcionou incorporação de DHA e EPA nas membranas neuronais do hipocampo.

No experimento I, o estresse oxidativo induzido pela ICGT foi observado a partir da redução significativa do conteúdo/atividade de GSH, GSH-Px e SOD e da diminuição na razão GSH/GSSG, os quais foram coerentes com os dados relatados em modelo de ICGT em gerbils (SELAKOVIC et al., 2011). Complementar a depleção de antioxidantes endógenos, a ocorrência do estresse oxidativo foi confirmada pelo nível elevado de carbonilação de proteína, que indica a presença de proteínas oxidadas, um produto final estável de reações em que as ERO estão envolvidas (DALLE-DONNE et al., 2003). Consistente com os resultados apresentados, outros investigadores relataram aumento dos níveis de carbonilação de proteína (LEHOTSKY et al., 2004), peroxidação lipídica (LEHOTSKY et al., 2004; SELAKOVIC et al., 2011) e danos ao DNA (YABUKI E FUKUNAGA, 2013) na fase inicial de I/R. No presente estudo, o tratamento com o OP, iniciado 3 dias antes da isquemia, inibiu a progressão do estresse oxidativo, avaliado pela recuperação dos níveis de GSH (Fig. 13 A), aumento na relação GSH/GSSG (Fig. 13 C) e atividade da CAT (Fig. 13 D) e SOD (Fig. 13 E) e diminuição da carbonilação de proteínas (Fig. 13 I). O efeito antioxidante do OP observado foi consistente com outros achados que usaram OP ou seus componentes, EPA e DHA, em modelos animais de ICGT (CAO et al., 2004; OZEN et al., 2008), isquemia cerebral focal (UEDA et al., 2013) e lesão cerebral traumática (WU et al., 2004). Porém, é desconhecido se os constituintes DHA/EPA do OP atuam como sequestradores de radicais livres. Dados sugerem uma ação direta sequestrante de radicais devido à presença de duplas ligações carbono-carbono (C-C) presentes nas moléculas de AGPI, a qual é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas (SHAMI E MOREIRA, 2004). As ligações duplas C-C conjugadas dos AGPI permite a absorção da energia das ERO, canalizando-a através da longa cadeia de duplas ligações que se encontram em ressonância. Além disso, o DHA quando em exposição de ERO pode estimular a regulação de enzimas antioxidantes e aumentar a capacidade antioxidante celular (JAHANGIRI et al., 2006). Outro argumento, no entanto, é que a vitamina E (α -tocoferol) na formulação de OP poderia agir sinergicamente com o DHA/EPA sobre o estresse oxidativo induzido pela isquemia. Isto é improvável, contudo, tendo em vista a concentração muito

baixa de vitamina E no OP (1,0 mg/cápsula) e, portanto, uma dose muito baixa é administrada para os animais (1,2 mg/kg). De fato, o estresse oxidativo e os prejuízos neurológicos após isquemia cerebral focal não foram neutralizados com dose de 125 mg/kg de α -tocoferol (CHAUDHARY et al., 2003). Além disso, o tratamento com 140 mg/kg de α -tocoferol mais 100 mg/kg de ácido lipóico administrado duas vezes por dia durante 7 dias, também, não foi capaz de atenuar o estresse oxidativo induzido por isquemia cerebral (GARCIA-ESTRADA et al., 2003).

Na segunda parte do experimento I, investigamos o efeito antiamnésico do OP com o mesmo regime de tratamento usado para determinar o efeito antioxidante na primeira parte, o qual compreendeu o período pré-isquemia. Dessa forma, o objetivo foi verificar se o efeito antioxidante em 24 horas de reperfusão encontrado por nós seria suficiente para promover efeito antiamnésico robusto e sustentado por várias semanas após ICGT. Como esperado, a ICGT (15 min., 4-VO) causou perda da memória adquirida antes da isquemia no LRA, efeito que não foi recuperado pelos ratos até o final dos testes comportamentais. Esta sequela pode ser comparada à amnésia retrógrada normalmente observada em seres humanos que sobrevivem, por exemplo, à parada cardíaca reversível. O tratamento pré-isquemia com OP inibiu de forma leve a amnésia retrógrada induzida pela ICGT, pois, os animais desse grupo apresentaram desempenho comportamental melhor que os do grupo isq/vei, mas inferior aos do grupo sham, efeito que foi mantido por pelo menos 5 semanas de teste de retenção de memória (Fig. 14). Esse efeito antiamnésico leve do OP provavelmente não foi devido à estimulação da memória relacionada com a aquisição no LRA, porque o OP foi administrado por alguns dias antes da isquemia e o desempenho de memória avaliado de 2 a 7 semanas depois. Em vez disso, o presente dado sugere que a ação antioxidante do OP dentro das primeiras 24 horas de reperfusão, observado por nós, foi responsável, pelo menos parcialmente, pela manutenção da memória de longo prazo adquirida durante o treino pré-operatório. Porém, embora o regime de tratamento pré-isquemia tenha atenuado a amnésia retrógrada, tal efeito não foi tão consistente ao longo do tempo em comparação com tratamentos mais longos, composto por ambos os períodos pré- e pós-isquemia, como nos resultados obtidos em nossos trabalhos anteriores (isto é, 32 e 10 dias de tratamento) (FERNANDES et al., 2006; BACARIN et al., 2013). Quantitativamente, 10 dias de tratamento proporcionou menor prejuízo de memória do que 4 dias de tratamento.

Assim como na segunda parte do experimento I, no experimento II a ICGT (15 min., 4-VO) causou perda da memória adquirida antes da isquemia no LRA, efeito que não foi recuperado pelos ratos até o final dos testes comportamentais. Este experimento apresenta os resultados encontrados para o efeito antiamnésico utilizando 3 regimes de tratamento com OP (300 mg/kg de DHA), que diferenciaram-se pelo tempo de administração da primeira dose no período pós-isquemia (Fig. 8). Este estudo foi realizado para avaliar o efeito do OP quando o tratamento é iniciado após o término da ICGT e determinar o momento ideal em que o início do tratamento tem o melhor efeito protetor sobre a memória, sendo importante, também, para correlacionar o efeito antiamnésico e a possibilidade de

utilizar o OP (ou o DHA) na clínica, a qual normalmente é difícil prever a ocorrência de uma isquemia cerebral. Os presentes dados sugerem que o efeito antiamnésico do tratamento com o OP após a ICGT é robusto e sustentado, pois reproduziu muito bem nossos dados anteriores (FERNANDES et al., 2008; BACARIN et al., 2013) e está de acordo com dados obtidos por outros pesquisadores em condições de isquemia cerebral global e focal (PLAMONDON E ROBERGE, 2008; BELAYEV et al., 2009). Além disso, o presente estudo demonstrou, também, que tal efeito pode ser dependente do tempo de início do tratamento, em outras palavras, quanto mais tarde for iniciado o tratamento com o OP após isquemia menor a intensidade do efeito antiamnésico. Assim, o R1, que foi o tratamento iniciado após 4 horas de ICGT, apresentou o melhor efeito antiamnésico sustentado durante pelo menos 5 semanas de teste de retenção de memória, com desempenho comportamental do grupo isq/OP muito semelhante ao do grupo sham (Fig. 15 A). A eficácia do tratamento com o OP tornou-se menor quando o tratamento foi iniciado 8 e 12 horas após a ICGT, com aumento médio do prejuízo de memória do R2 (efeito antiamnésico moderado) (Fig. 15 B) para o R3 (efeito antiamnésico leve ou ausente) (Fig. 15 C) de tratamento, embora todos os regimes tenham sido conduzidos no mesmo período de tempo (10 dias). Isto indica que o efeito antiamnésico pode ser atribuído a ação do OP nas primeiras horas da I/R, como uma ação anti-isquêmica, e que existe janela terapêutica de até 4 horas para o tratamento após a isquemia. Esta ação anti-isquêmica do OP pode ser em decorrência da atividade antioxidante. A investigação do estresse oxidativo induzido em 24 horas de I/R e o efeito antioxidante do tratamento com o OP sobre alguns parâmetros oxidativos realizados nesse estudo reforçam nossa hipótese. Embora os regimes de tratamento entre os experimentos I e II sejam diferentes, provavelmente o OP exerceu efeito antioxidante durante as primeiras doses no experimento II. O efeito antioxidante do OP pode ter diminuído o grau e a progressão da lesão causada pelo estresse oxidativo e colaborado com o efeito antiamnésico visto várias semanas mais tarde, tanto no teste comportamental do experimento I quanto do experimento II. Os dados do experimento II, então, apoiam a hipótese do experimento I de que a ação antioxidante do OP sobre o estresse oxidativo nas primeiras horas de reperfusão pode ser responsável, ao menos parcialmente, pela manutenção da memória de longo prazo. No entanto, quando o tratamento tem início tardio no período pós-isquemia o estresse oxidativo pode causar danos de difícil recuperação, observado neste estudo pela perda de memória demonstrada pelos animais dos grupos de tratamento R2 e R3, indicando que para obter melhor efeito antiamnésico é necessário iniciar o tratamento no período pré-isquemia ou logo após a isquemia. Além disso, comparando os resultados comportamentais do experimento I e II observamos melhor efeito antiamnésico do regime terapêutico R1 do experimento II. Essa diferença de efeito provavelmente se deve ao tempo pós-isquemia prolongado de tratamento realizado no R1 (10 dias). Como relatado nesse trabalho, à isquemia cerebral compreende vários processos fisiopatológicos que atuam temporalmente por dias a semanas e culminam em lesão e morte neuronal, tais como o estresse oxidativo, o processo inflamatório e a indução de apoptose (Fig. 1 e 2). No presente estudo, o regime de tratamento do experimento I compreendeu o período relativo à lesão causada pelo estresse

oxidativo, mas não a lesão relativa aos processos fisiopatológicos subsequentes. Já o regime de tratamento do experimento II compreendeu além do período de estresse oxidativo, o período de inflamação e de morte neuronal tardia (apoptose), podendo o OP ter prevenido também a lesão relativa a esses processos e evitado em maior grau o mau funcionamento neuronal após ICGT. Sendo assim, o efeito antiamnésico do tratamento com OP após ICGT atinge o máximo com regime terapêutico iniciado no período pré-isquemia ou logo após a isquemia e que abrange longo período pós-isquemia.

A hipótese de que a ação antioxidante nas primeiras horas de I/R contribui, ao menos parcialmente, para o efeito antiamnésico final do OP avaliado algumas semanas após a ICGT é apoiada por outros estudos do nosso laboratório. A apocinina administrada em dose única 30 minutos antes da ICGT produziu efeito antiamnésico semelhante ao obtido com OP sob as mesmas condições de isquemia cerebrais e análise comportamental (ROMANINI et al., 2015). A apocinina é caracterizada como um potente inibidor da NOX, uma enzima que catalisa a redução do O_2 para ERO (CARBONE E CAMILLO TEIXEIRA, 2014), sendo possível que uma ação antioxidante tenha ocorrido nas primeiras horas de I/R e contribuído para o efeito antiamnésico da apocinina. Esta possibilidade é apoiada por outros estudos que utilizaram diferentes modelos animais de isquemia cerebral, em que os efeitos neuroprotetores e comportamentais/neurológicos da apocinina foram atribuídos à inibição da NOX (CARBONE E CAMILLO TEIXEIRA, 2014). Como a apocinina, o efeito antiamnésico do OP pode ser parcialmente atribuível à sua ação antioxidante dentro das primeiras horas após a I/R, mas não é possível deduzir se o OP também atua por meio da inibição da NOX, semelhante a apocinina. No entanto, os níveis da proteína NOX4 foram encontrados reduzidos após tratamento com OP em modelo de estresse oxidativo vascular induzido por ovariectomia (GORTAN CAPPELLARI et al., 2013). Outros sugerem que o OP estimula a modulação negativa da expressão/atividade da NOX como mecanismo de ação (BALAKUMAR E TANEJA, 2012). Juntamente com esses dados, o presente achado sugere relação entre ação antioxidante nas primeiras horas de I/R e o efeito antiamnésico de longa duração do OP. Reforçando mais essa hipótese, estudos mostraram que o estresse oxidativo interrompe processos neuronais que estão envolvidos na formação e manutenção da memória. Por exemplo, o crescimento de neuritos e a formação de sinapses foram reduzidos em culturas de células ganglionares, da raiz dorsal da medula espinhal de ratos, privadas de soro e estressada por ferro, um efeito que foi invertido pela deferoxamina, que marcadamente impediu a geração de radicais $OH\cdot$ (NOWICKI et al., 2009). Em outro estudo, quando neurônios corticais de ratos foram expostos a um meio contendo dopamina, na ausência do antioxidante glutatona, uma redução significativa do número de processos neuronais (por exemplo, espinhos dendríticos) foi observada, efeito que foi atribuído à ação nociva das ERO gerada pela dopamina (GRIMA et al., 2003). O estresse oxidativo também perturbou o mecanismo pré-sináptico para a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas motoras que foram expostas as ERO (GINIATULLIN et al., 2006). Além disso, a atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática foi perdida quando as

membranas sinápticas foram brevemente expostas ao estresse oxidativo gerado por radicais $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ou $ONOO^-$ (ZAIDI E MICHAELIS, 1999). Coletivamente, esses estudos indicam que o estresse oxidativo perturba a resposta neuronal e/ou alterações neuroplásticas que podem colaborar para a recuperação funcional (ou preservação) após dano cerebral. Supondo que o OP neutralizou os efeitos nocivos do estresse oxidativo nesses processos neuronais, isso poderia explicar como a ação antioxidante mediada pelo OP nas primeiras horas de I/R pode se traduzir em um efeito antiapoptótico após ICGT.

Ainda no experimento II, o tratamento com o OP não foi capaz de evitar a neurodegeneração induzida pela ICGT, mostrando ausência de proteção sobre os neurônios piramidais do hipocampo no mesmo padrão dos nossos estudos anteriores (Fig. 16) (FERNANDES et al., 2008; BACARIN et al., 2013). Nossos estudos anteriores e os resultados presentes indicam que a ausência de neuroproteção celular também é um resultado consistente do tratamento com OP. No entanto, esses resultados contrastam com outros relatos na literatura (OKADA et al., 1996; LAURITZEN et al., 2000; CAO et al., 2004; BAS et al., 2007; OKABE et al., 2011). Embora exista essa divergência de resultados entre os estudos, duas variáveis metodológicas poderiam explicar a falta de neuroproteção pelo OP no presente estudo, em comparação com os resultados mencionados acima. A primeira variável refere-se à influência da provável hipotermia cerebral que ocorre nos modelos de isquemia. Reduzir a temperatura do cérebro em 2 °C durante a isquemia ou logo após a reperfusão é suficiente para proporcionar neuroproteção (BUSTO et al., 1987). Assim, em nossos experimentos os ratos são mantidos em uma caixa quente (30 °C) durante a isquemia e durante 1 hora pós-isquemia de acordo com as recomendações de Seif el Nasr et al. (SEIF EL NASR et al., 1992). De fato, em um estudo do nosso laboratório foi observada variação na neurodegeneração do hipocampo de 70 % para 25 % quando a caixa quente não foi usada (BENETOLI et al., 2007). Outra variável que pode explicar a falta de neuroproteção do OP nos nossos estudos refere-se à duração do tempo de sobrevivência do animal após a isquemia. O tempo de sobrevivência para análise da neuroproteção é importante nos modelos de isquemia cerebral, porque se sabe que os neurônios do hipocampo apresentam atraso de cerca de 4 dias após a isquemia para atingir o pico de morte (KIRINO, 1982). Em nossos estudos, os ratos sobreviveram por até 43 dias após a ICGT. A sustentabilidade da sobrevivência neuronal induzida por drogas é uma questão importante no campo da neuroproteção após lesão cerebral, e o controle da hipotermia cerebral e o uso de períodos pós-isquemia estendidos são altamente recomendados quando se avalia o potencial neuroprotetor de drogas (CORBETT E NURSE, 1998). Nos estudos citados acima, tanto o controle da temperatura e o período pós-isquemia prolongado para avaliação da neuroproteção não ocorreram. O efeito antiapoptótico na ausência de neuroproteção do OP fez pensarmos que o tratamento pode estar compreendendo aspectos subcelulares, como a proteção de neuritos e sinapses dos neurônios sobreviventes e/ou estimulação dos processos de neuroplasticidade induzido pela isquemia.

Se assim for, então uma questão que se coloca é como a interrupção do estresse oxidativo durante a I/R pode ser traduzida na preservação da memória de longo prazo pelo OP, apesar da falta de neuroproteção celular? Uma vez que os animais aprenderam a tarefa antes da isquemia, a memória adquirida (ou seja, memória retrógrada) deve assentar sobre o estado funcional das estruturas existentes (por exemplo, sinapses) nos neurônios sobreviventes após os danos isquêmicos. Os neurônios que sobrevivem a um evento isquêmico podem responder com alterações ultraestruturais, incluindo a reestruturação dendrítica, sinaptogênese e processos de promoção de crescimento, que por sua vez, podem promover a recuperação funcional, mesmo na ausência de qualquer efeito neuroprotetor celular (GARCIA-CHAVEZ et al., 2008). Estes autores observaram, por exemplo, que a isquemia cerebral global (15 min., 4-VO) prejudicou a citoarquitetura dos dendritos no córtex pré-frontal, reduzindo o comprimento dos dendritos, o número de bifurcações dendríticas e a densidade dos espinhos. Tais alterações ultraestruturais foram prevenidas pela melatonina, um efeito que foi acompanhado por melhor desempenho de aprendizagem/memória na tarefa do labirinto radial. A isquemia global (BRIONES et al., 2006) e a hipoperfusão cerebral crônica (ZHU et al., 2011) também reduziram a expressão da MAP2, SYP e CREB e causou prejuízos na indução de LTP, os quais são indicadores de neuroplasticidade dendrítica e sináptica. No primeiro estudo citado acima, ratos isquêmicos (12 min., 4-VO) habituados em um ambiente enriquecido apresentaram aumento na expressão da MAP2 no *estratum radiatum* dos subcampos CA2 e CA3 do hipocampo, um efeito que se correlacionou positivamente com a recuperação da aprendizagem/memória avaliada na tarefa do labirinto aquático de Morris, apesar da presença de grave perda celular na região CA1 (BRIONES et al., 2006). Esses dois últimos estudos sugerem que a neuroplasticidade relacionada à MAP2, SYP, LTP e CREB no hipocampo servem como um mecanismo eficaz através do qual a recuperação (ou preservação) da aprendizagem/memória poderia ocorrer após isquemia cerebral, apesar da neurodegeneração. Estes dados são semelhantes aos nossos resultados, os quais foram encontrados dissociados entre a recuperação da aprendizagem/memória, em uma tarefa espacial, após isquemia cerebral e a presença de lesões no hipocampo.

De acordo com os dados apresentados acima, o experimento III foi realizado para tentarmos compreender o mecanismo do efeito antiamnésico do tratamento com OP, mesmo na presença de intensa neurodegeneração no hipocampo. Assim, foi investigada a densidade dendrítica por meio da quantificação da expressão da MAP2 nos neurônios sobreviventes após a ICGT. Apesar dos animais dos grupos tratados com OP e veículo tenham apresentado a mesma quantidade celular hipocampal, diferenças na densidade de dendritos poderia explicar o efeito antiamnésico encontrado nos grupos tratados com OP. Primeiramente, construímos um decurso temporal do efeito da ICGT sobre a expressão da MAP2. Dessa forma, encontramos diminuição da expressão da MAP2 em 7 dias pós-isquemia, a qual mostrou progressão com maior diminuição em 14 dias pós-isquemia nas regiões RS e PtA do córtex e CA1 e CA3 do hipocampo (Fig. 17, A-C). Esses dados sugerem que danos isquêmicos

continuam ocorrendo sobre os dendritos em até 14 dias pós-isquemia. Além do estresse oxidativo, que ocorre nas primeiras horas a dias de I/R, a inflamação também é responsável por desencadear lesão devido à alta produção de agentes pró-inflamatórios desde as primeiras horas a até 1-2 semanas pós-isquemia (BARONE e FEUERSTEIN, 1999). No grupo submetido a 28 dias pós-isquemia encontramos menor redução da expressão da MAP2, que permaneceu sustentado quando analisamos o grupo de 35 dias pós-isquemia, em todas as regiões analisadas (Fig. 17, A-C). Estudos demonstraram níveis elevados de alguns fatores neurotróficos, como BDNF e NT-3, que perduraram de 3 a 14 dias após isquemia cerebral, sugerindo a ocorrência de processos neuroplásticos de regeneração mediada por essas moléculas nesse intervalo de tempo (SIST et al., 2014). Nossos achados estão de acordo com outros estudos que mostraram diminuição da expressão da MAP2 em algumas horas ou dias após a isquemia cerebral (GEDDES et al, 1994; AKULIN E DAHLSTROM, 2003) e aumento da expressão da MAP2 em algumas semanas após a isquemia cerebral (BRIONES et al., 2006). Com estes resultados concluímos que a diminuição da expressão da MAP2 poucos dias após isquemia cerebral pode refletir o grau de degeneração dendrítica, enquanto o aumento da expressão da MAP2 algumas semanas após isquemia cerebral pode refletir o grau de neuroplasticidade dendrítica.

Com o decurso temporal da expressão da MAP2 após a ICGT, analisamos o efeito do tratamento com OP em 14 e 28 dias pós-isquemia. Os R1 e R3 (experimento II) foram usados para medir a influência do OP na expressão da MAP2 e para tentarmos correlacionar com o efeito antiamnésico encontrado para esses regimes de tratamentos. A expressão da MAP2 estava aumentada no grupo R1 de tratamento após 14 dias de ICGT em todas as regiões do cérebro analisadas e após 28 dias de ICGT na região CA3 do hipocampo, o que pode indicar preservação dos dendritos e estimulação dos mecanismos de neuroplasticidade, respectivamente, quando comparados com os animais dos grupos isq/vei, mas com diferença para os animais do grupo sham, demonstrando uma recuperação incompleta (Fig. 17, D-F). No entanto, o grupo R3 de tratamento não apresentou efeito sobre a expressão da MAP2 em quaisquer regiões cerebrais e tempos analisados (Fig. 17, D-F). Estes resultados evidenciam que o tempo de início do tratamento com OP é importante para prevenir a perda de dendritos induzida pela ICGT, e que quando o tratamento tem início tardio este efeito aparece menor ou nulo, sendo essa observação aplicável, também, ao efeito antiamnésico avaliado no experimento II. Alguns estudos mostraram correlação entre aumento da expressão da MAP2 e melhora do desempenho cognitivo em modelos de isquemia cerebral (BRIONES et al., 2006) e de envelhecimento (MA et al., 2014). Assim como nestes estudos, o aumento na expressão da MAP2 encontrado por nós pode estar correlacionado com o efeito antiamnésico do OP neste e nos estudos anteriores. A prevenção da perda de dendritos e, conseqüentemente, perda de memória com OP pode ter ocorrido devido aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do tratamento com OP, ou o DHA, amplamente descritos na literatura. O efeito antioxidante do OP foi investigado nesse trabalho e reforça nossa hipótese. Adicionalmente, outros pesquisadores demonstraram, também, efeito

antioxidante para os tratamentos com o OP ou DHA, com redução na formação do estresse oxidativo por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da quantidade de GSH; e diminuição da carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica em modelos de isquemia cerebral global (CAO et al., 2004) e focal (OZEN et al., 2008) e modelo de lesão cerebral traumática (WU et al., 2004). Outro efeito do OP ou DHA que pode ter inibido a perda de dendritos induzida pela ICGT é a prevenção da neuroinflamação pela diminuição dos níveis de fator nuclear kB (NF-kB), inibição da secreção de citocina, bloqueio da síntese de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos e modulação da migração de leucócitos (DAS, 2006; FAROOQUI et al., 2007). Além de demonstrar efeitos preventivos sobre a degeneração dendrítica, o tratamento com OP pode ter estimulado processos de neuroplasticidade. Estudos demonstraram que o tratamento com OP ou DHA promove aumento dos fosfolípidos de membrana (por incorporação do DHA nas membranas dos neurônios), induz o crescimento de neuritos e melhora o desenvolvimento da LTP no hipocampo (FUJITA et al., 2001; CHOI-KWON et al., 2004; CALDERON e KIM, 2004). Em neurônios do hipocampo de ratos foi demonstrado que o DHA estimulou a sinaptogênese, atividade sináptica, expressão de sinapsina-1 e receptores de glutamato AMPA subunidade GluR1, GluR2 e NMDA subunidades NR1, NR2A, NR2B (CAO et al., 2009). A suplementação com DHA em gerbils mostrou aumento nos níveis de proteínas sinápticas no hipocampo, incluindo as proteínas pré-sinápticas sinapsina-1 e sintaxina-3, a proteína da densidade pós-sináptica-95 (PSD-95, sigla em inglês para “postsynaptic density protein type 95”) e a proteína F-actina do citoesqueleto (CANSEV et al., 2008). Em outro estudo, utilizando ratos adultos transgênicos fat-1, com níveis elevados de DHA endógeno, em comparação com ratos do tipo selvagem, a expressão de genes sinápticos, incluindo aqueles que codificam a sinapsina-1, GAP-43, PSD-95, GluR1 e a proteína F-actina do citoesqueleto, no hipocampo estavam com a regulação aumentada e o desempenho da aprendizagem e memória no labirinto aquático melhorado (HE et al., 2009). A indução do crescimento de neuritos, o aumento na expressão de proteínas sinápticas e na sinaptogênese sugerem um papel importante do DHA na promoção da formação de novas sinapses ativas e recuperação após a lesão.

Por fim, o experimento IV foi realizado para compreendermos o efeito da isquemia e do tratamento com OP sobre o balanço de ácidos graxos no córtex cerebral e hipocampo. A I/R afeta a concentração e o balanço de vários ácidos graxos, principalmente por meio da liberação de AGPI livres (não esterificados) da membrana e lipoperoxidação durante o estresse oxidativo (BAZAN et al., 2003). No nosso estudo, a ICGT causou alterações no perfil lipídico com diminuição da concentração do AL (18:2 n-6) e AaL (18:3 n-3) em ambas as estruturas analisadas (Fig. 20 A e B). Porém, nenhuma alteração foi encontrada na concentração do ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) e DHA (22:6 n-3), os quais são formados a partir dos AL e AaL, respectivamente, e são importantes mediadores inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente. Como já mencionado neste trabalho, a isquemia cerebral é caracterizada pela formação de intenso processo inflamatório (IADECOLA E

ALEXANDER, 2001), sendo imprescindível a mobilização de substâncias endógenas pró-inflamatória, como o AA, e anti-inflamatória, como o DHA, durante a patogênese. Nesse sentido era de esperar que a ICGT fosse diminuir a concentração de AA e DHA. No entanto, estudos apontam que o sistema nervoso tem capacidade incomum para preservar a concentração de ácidos graxos altamente poli-insaturados, ou seja, com muitas duplas ligações C-C, na membrana neuronal dentro da faixa fisiológica, como em situações de dieta pobre desses ácidos graxos (NEURINGER et al., 1986). Assim, a diminuição das concentrações do AL e A α L pode ser explicada pela conversão destes em AA e DHA, respectivamente, para manter a homeostase desses ácidos graxos altamente poli-insaturados na membrana neuronal, os quais foram mobilizados durante a fisiopatologia da isquemia. A análise do perfil lipídico mostrou, também, que o tratamento com OP durante 10 dias não alterou a concentração dos ácidos graxos nos animais não isquêmicos tratados (sham/OP) quando comparado com os animais não tratados (sham/vei) (Fig. 20 A e B). Esta ausência de alteração no perfil lipídico, ou seja, falta de incorporação dos ácidos graxos provenientes do tratamento com OP, é contraditória a alguns estudos que apresentaram aumento nas concentrações de DHA e EPA em animais intactos após tratamento com OP (NALIWAIKO et al., 2004; DELATTRE et al., 2010). Porém, nesses estudos foram utilizados tempos prolongados de tratamento com suplementação de OP por 70 dias. No nosso estudo, o tempo curto de 10 dias de tratamento pode explicar a ausência da incorporação de DHA e EPA, que contrasta com os resultados de outros pesquisadores. Quando analisamos os animais isquêmicos e tratados com OP, observamos ausência de alterações na concentração dos ácidos graxos no cortex cerebral, comparado com os animais isquêmicos e não tratados. No entanto, quando analisamos o hipocampo encontramos que o tratamento com OP aumentou a concentração de DHA e EPA nessa região (Fig. 20 B). Essa incorporação pode ter ocorrido em virtude das características do hipocampo frente a eventos isquêmicos. Devido à alta suscetibilidade de morte neuronal nessa região (PULSINELLI, 1985; AKAI e YANAGIHARA, 1993), intensa neuroplasticidade hipocampal pode ocorrer após isquemia (JUNG et al., 2004; ITO et al., 2006), como aumento de axônios e dendritos nos neurônios sobreviventes e neurogênese. A formação e desenvolvimento de neuritos requer a formação de novas membranas plasmáticas com incorporação de ácidos graxos e outros componentes. De acordo com Scott e Bazan (1989), o DHA é um dos principais componentes das membranas sinaptossômicas, vesículas sinápticas e cones de crescimento e desempenha importante papel nas membranas neuronais em formação ou regeneração. Dessa forma, o tratamento com OP pode ter fornecido importantes ácidos graxos para formação ou regeneração de membranas após a lesão da ICGT, e assim explicar o aumento na concentração de DHA e EPA no hipocampo. Ainda, como já mencionado nesse trabalho, o tratamento com OP ou DHA também estimula ações neuroplásticas, como crescimento de neuritos e aumento na expressão de varias proteínas sinápticas, em neurônios do hipocampo (CALDERON e KIM, 2004; CANSEV et al., 2008). Neste trabalho o DHA proveniente do tratamento com OP pode ter estimulado ações neuroplásticas e sua própria incorporação nas membranas do hipocampo. Essa hipótese pode ser correlacionada com os resultados apresentados no

experimento III desse trabalho. Os dendritos que foram preservados e/ou recuperados, visualizados pela IR-MAP2, nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo nos animais tratados com OP podem ter incorporado DHA e EPA nas membranas lesadas ou em formação durante os processos de compensação após lesão, o que também explicaria o efeito antiamnésico. Além disso, outro importante evento de neuroplasticidade que ocorre no hipocampo é a neurogênese no giro dentado. Vários estudos apresentaram aumento da neurogênese hipocampal como efeito da isquemia em modelos animais (NAKATOMI et al., 2002; SOARES et al., 2013). Assim, da mesma maneira que o tratamento com OP pode ter fornecido ácidos graxos como substrato para a formação de novos neuritos nos neurônios sobreviventes, pode também ter fornecido ácidos graxos para formação de membrana plasmática dos novos neurônios em formação e desenvolvimento.

Em conclusão, o presente estudo fornece evidências de que a ação antioxidante durante as primeiras horas de I/R pode representar um mecanismo anti-isquêmico, que contribui para o efeito antiamnésico de longa duração do OP observado nas condições experimentais de ICGT. Além disso, estes dados em conjunto com nossos dados anteriores, mostraram que o tratamento com OP possui efeito antiamnésico robusto, sustentado e reprodutível quando administrado a ratos submetidos à ICGT e testados no LRA. Mais importante, o efeito antiamnésico foi obtido com tratamento de curta duração (10 dias) e iniciado após a indução da ICGT, demonstrando possuir uma janela terapêutica de cerca de 4 horas. Concluímos também que, mesmo o tratamento com OP não demonstrar neuroproteção celular no hipocampo, a prevenção da degeneração dendrítica e/ou estimulação da neuroplasticidade nos neurônios sobreviventes após a ICGT parece ser um dos mecanismos pelos quais os animais tratados com OP não apresentaram perda de memória avaliada no LRA. Dessa forma, o tratamento com OP pode estar agindo como antiamnésico por proteção dos neuritos e/ou estimulação de efeitos neuroplásticos. Ainda, o aumento dos dendritos encontrado nos animais isquêmicos e tratados com o OP pode estar correlacionado com a incorporação DHA e EPA no hipocampo após 10 dias de tratamento. Assim, o OP pode ter exercido efeito antiamnésico por vários mecanismos (efeito pleiotrópico), incluindo efeito antioxidante, anti-inflamatório, neuroplástico e incorporação de ácidos graxos essenciais nas membranas neuronais. Devido às propriedades pleiotrópicas do OP (BALAKUMAR E TANEJA, 2012), estudos futuros devem investigar a participação de outros mecanismos (por exemplo, anti-inflamatórios, neurotróficos, etc.) e da funcionalidade dos neuritos que se mostraram preservados e/ou recuperados neste estudo, para tentar obter melhor correlação entre os efeitos histológicos e comportamentais do tratamento com OP.

REFERÊNCIAS

AEBI H. Catalase. In: Bergmeyer HU, Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd edn; New York: Academic Press. 1974; pp. 673-677.

AKAI F, YANAGIHARA T. Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res* 1993; 603:87-95.

AKULIN VA and DAHLSTROM A. Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. *Neurochem Res*. 2003; 28:373-378.

AL-BASSAM J, OZER RS, SAFER D, HALPAIN S, MILLIGAN RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer edges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol*. 2002; 157:1187-96.

ANDERSON CA and ARCINIEGAS DB. Cognitive sequelae of hypoxicischemic brain injury: a review. *NeuroRehabilitation*. 2010; 26(1): 47-63.

AURIEL E, BORNSTEIN NM. Neuroprotection in acute ischemic stroke-current status. *J Cell Mol Med*. 2010; 4(9):2200-2202.

BACARIN CC, MORI MA, FERREIRA EDF, VALERIO ROMANINI C, WEFFORT DE OLIVEIRA RM, MILANI H. Fish oil provides robust and sustained memory recovery after cerebral ischemia: influence of treatment regimen. *Physiol Behav*. 2013; 119: 61-71.

BADDELEY AJ, GUNDERSEN HJ, CRUZ-ORVIE LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc*. 1986; 142(3):259-276.

BALAKUMAR P, TANEJA G. Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Rad Biol Med*. 2012; 53(2):271-279.

BARGAGLI E, PENZA F, VAGAGGINI C, MAGI B, PERARI MG, ROTTOLI P. Analysis of carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Lung*. 2007; 185:139-144.

BARONE FC and FEUERSTEIN GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19(8):819-834.

BAS O, SONGUR A, SAHIN O, MOLLAOGLU H, OZEN OA, YAMAN M, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem Int*. 2007; 50:548-54.

BAZAN NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res*. 2003; 44:2221-2233.

BAZAN NG. Lipid signaling in neuronal plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol*. 2005; 32(1): 89-103.

BAZAN NG. The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26:901-13.

BAZAN NG. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10:136-41.

BAZAN NG, MUSTO AE, KNOTT EJ. Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Mol Neurobiol*. 2011; 44:216-22.

BEAL MF. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6:661-6.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. Fundamentos. In: *Neurociência: Desvendando o Sistema Nervoso*. Ed: Artmed. Porto Alegre. 2008, 3º ed.

BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1620-4.

BEETSCH JW, PARK TS, DUGAN LL, SHAH AR, GIDDAY JM. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res* 1998;786:89-95.

BELAYEV L, MARCHESELLI VL, KHOUTOROVA L, et al. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke.* 2005; 36(1):118-123.

BELAYEV L, KHOUTOROVA L, ATKINS KD, et al. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2009; 40(9):3121-3126.

BENDEL O, BUETERS T, VON EULER M, OGREN SO, SANDIN J, VON EULER G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2005; 25:1586-1595.

BENETOLI A, DUTRA AM, PAGANELLI RA, SENDA DM, FRANZIN S, MILANI H. Tacrolimus (FK506) reduces hippocampal damage but fails to prevent learning and memory deficits after transient, global cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 88:28-38.

BERGMEYER HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974; pp. 1205-1214.

BERRA CM, MENCK CFM, MASCIO P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova, São Paulo.* 2006; 29(6):1340-1344.

BIEGON A, FRY PA, PADEN CM, et al. Dynamic changes in *N*-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:5117-5122.

BIERNASKIE J, CHERNENKO G, CORBETT D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2004; 24:1245-1254.

BLOCK F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog. Neurobiol.* 1999; 58:279-295.

BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience.* 2002; 109:231-241.

BLOODGOOD BL and SABATINI BL. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science.* 2005; 310:866-869.

BLUM S, LUCHSINGER JA, MANLY JJ, SCHUPF N, STERN Y, BROWN TR, et al. Memory after silent stroke: hippocampus and infarcts both matter. *Neurology*. 2012; 78(1):38-46.

BRIONES TL, WOODS J, WADOWSKA M, ROGOZINSKA M. Amelioration of cognitive impairment and changes in microtubule-associated protein 2 after transient global cerebral ischemia are influenced by complex environment experience. *Behav Brain Res*. 2006; 168(2):261-271.

BROWN CE, WONG C, MURPHY TH. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke*. 2008; 39:1286-1291.

BURY SD and JONES TA. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the “unaffected” forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex. *J Neurosci*. 2002; 22:8597-8606.

BUSTO R, DIETRICH WD, GLOBUS MY, VALDÉS I, SCHEINBERG P, GINSBERG MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987; 7:729-738.

BUSTO R, DIETRICH DW, GLOBUS MY-T, GINSBERG MD. The importance of brain temperature in cerebral ischemia injury. *Stroke*. 1989; 20(8):113-114.

CALDERON F and KIM HY. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem*. 2004; 90:979-988.

CANDELARIO-JALIL E, MHADU NH, AL-DALAIN SM, MARTINEZ G, LEON OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Res*. 2001; 41:233-241.

CANSEV M, WURTMAN RJ, SAKAMOTO T, ULUS IH. Oral administration of circulating precursors for membrane phosphatides can promote the synthesis of new brain synapses. *Alzheimers Dement*. 2008; 4(1):153-168.

CAO DH, XU JF, XUE RH, ZHENG WF, LIU ZL. Protective effect of chronic ethyl docosahexaenoate administration on brain injury in ischemic gerbils. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004; 79(4): 651-659.

CAO D, KEVALA K, KIM J, MOON HS, JUN SB, LOVINGER D, KIM HY. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem*. 2009; 111(2):510-521.

CARBONE F, CAMILLO TEIXEIRA P, BRAUNERSREUTHER V, MACH F, VUILLEUMIER N, MONTECUCCO F. Pathophysiology and treatments of oxidative injury in ischemic stroke: focus on the phagocytic NADPH oxidase 2. *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23(5):460-489.

CCERES A, BANKER G, BINDER L. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*. 1986; 6:714-22.

CHAN PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27:1124-9.

CHAN PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21:2-14.

CHAUDHARY G, SINHA K, GUPTA YK. Protective effect of exogenous administration of alpha-tocopherol in middle cerebral artery occlusion model of cerebral ischemia in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003; 17(6):703-707.

CHOI-KWON S, PARK KA, LEE HJ, PARK MS, LEE JH, JEON SE, et al. Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Dev Brain Res.* 2004; 152:11-18.

CONNOR WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2000; 7:171-5.

CORBETT D, NURSE S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol.* 1998; 54:531-548.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. In: Robbins: patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; p.1-26.

CRAMER SC and RILEY JD. Neuroplasticity and brain repair after stroke. *Curr Opin Neurol.* 2008; 21:76-82.

CRUPI R, MARINO A, CUZZOCREA S. n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem.* 2013; 20(24):2953-2963.

DA SILVA CM, ZANQUI AB, GOHARA AK, DE SOUZA, ALOÍSIO HP, CARDOZO-FILHO L, VISENTAINER JV, ROVIGATTI C, LUCAS U, BITTENCOURT PRS, SILVA EA, MATSUSHITA M. Compressed n-propane extraction of lipids and bioactive compounds from *Perilla* (*Perilla frutescens*). *The Journal of Supercritical Fluids.* 2015; 102:1-8.

DALLE-DONNE I, ROSSI R, GIUSTARINI D, MILZANI A, COLOMBO R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1-2):23-38.

DAS UN. Essential fatty acids: a review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006; 7:467-482.

DE FILIPPIS AP, SPERLING LS. Understanding omega-3's. *Am Heart J.* 2006; 151:564-570.

DE KEYSER J, SULTER G, LUITEN PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 1999; 22:535-540.

DELATTRE AM, KISS A, SZAWKA RE, ANSELMO-FRANCI JA, BAGATINI PB, XAVIER LL, RIGON P, ACHAVAL M, IAGHER F, DE DAVID C, MARRONI NA, FERRAZ AC. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 2010; 66(3):256-64.

DERKACH VA, et al. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8:101-113.

DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22:391-397.

DIRNAGL U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1268:212-5.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.

DUDCHENKO, PA. Na overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2004; 28(7):699-709.

DUPUY C, VIRION A, OHAYON R, KANIEWSKI J, DÈME D, POMMIER J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem.* 1991; 266:3739-43.

EADY TN, BELAYEV L, KHOUTOROVA L, ATKINS KD, ZHANG C, BAZAN NG. Docosahexaenoic acid signaling modulates cell survival in experimental ischemic stroke penumbra and initiates long-term repair in young and aged rats. *PLoS One*. 2012; 7(10).

FARKAS E, LUITEN PG, BARI F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007; 54(1):162-180.

FAROOQUI AA, HORROCKS LA, FAROOQUI T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 2007; 101:577-599.

FERNANDES JS, MORI MA, EKUNI R, OLIVEIRA RM, MILANI H. Longterm treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia. *Nutr Res*. 2008; 28(11):798-808.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo*. 1997; 43(1):61-68.

FORTUÑO A, SAN JOSÉ G, MORENO MU, DÍEZ J, ZALBA G. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol*. 2005; 90(4):457-462.

FUJITA S, IKEGAYA Y, NISHIKAWA M, NISHIYAMA N, MATSUKI N. Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*. 2001; 132(7):1417-1422.

GARCIA JH. The evolution of brain infarcts. A review. *J. Neuropathol Exp Neurol*. 1992; 51(4):387-393.

GARCIA JH, YOSHIDA Y, CHEN H, LI Y, ZHANG ZG, LIAN J, CHEN S, CHOPP M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*. 1993; 142(2):623-635.

GARCIA-ESTRADA J, GONZALEZ-PEREZ O, GONZALEZ-CASTANEDA RE, et al. An alpha-lipoic acid-vitamin E mixture reduces post-embolism lipid peroxidation, cerebral infarction, and neurological deficit in rats. *Neurosci Res*. 2003; 47(2):219-224.

GARCIA-CHAVEZ D, GONZALEZ-BURGOS I, LETECHIPIA-VALLEJO G, LOPEZ-LOEZA E, MORALI G, CERVANTES M. Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment in rats. *Neurosci Lett*. 2008; 48(1):148-52.

GEDDES JW, SCHWAB C, CRADDOCK SD, WILSON JL, PETTIGREW LC. Alteration in tau immunostaining in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol*. 1994; 14:554-564.

GINIATULLIN AR, DARIOS F, SHAKIRZYANOVA A, DAVLETOV B, GINIATULLIN R. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J Neurochem*. 2006; 98(6):1789-1797.

GINSBERG MD, STERNAU LL, GLOBUS MY-T, DIETRICH DW, BUSTO R. Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovascular and brain metabolismo reviews*. 1992; 4:189-225.

GOLDBERG JL, ESPINOSA JS, XU Y, DAVIDSON N, KOVACS GT, BARRES BA. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*. 2002; 33:689-702.

GORTAN CAPPELLARI G, LOSURDO P, MAZZUCCO S, et al. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(1):371-379.

GOVINDARAJAN A, KELLEHER RJ, TONEGAWA S. A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006; 7:575-583.

GRAHAM SH and HICKEY RW. Cyclooxygenases in central nervous system. A special role of cyclooxygenase 2 in neuronal cell death. *Arch Neurol*. 2003; 60:628-630.

GRANGER DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988; 255(6 Pt 2):H1269-75.

GRIMA G, BENZ B, PARPURA V, CUENOD M, DO KQ. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003; 62(3):213-24.

GURSOY-OZDEMIR Y, CAN A, DALKARA T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004; 35:1449-1453.

HARRIS KM, et al. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 1992; 12:2685-2705.

HARTMAN L and LAGO RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract*. 1973, 22:475-476.

HAYASHI J, TAKAGI Y, FUKUDA H, et al. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26:906-914.

HE C, QU X, CUI L, WANG J, KANG JX. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(27):11370-11375.

HISSIN PJ and HILF R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1):214-226.

HONG SH, KHOUTOROVA L, BAZAN NG, BELAYEV L. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. *Exp Transl Stroke Med*. 2015; 7(1):3.

HOROKAWA N, FUNAKOSHI T, SATO-HURADA R, KANAI Y. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Biol*. 1996; 132:667-679.

HUMMEL F and COHEN LG. Improvement of motor function with noninvasive cortical stimulation in a patient with chronic stroke. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005; 19:14-19.

IADECOLA C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9.

IADECOLA C and ALEXANDER M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 2001; 14:89-94.

INNIS SM. Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. *J Nutr*. 2007; 137:855-859.

ITO U, KUROIWA T, NAGASAO J, KAWAKAMI E, OYANAGI K. Temporal profiles of axon terminals, synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex: ultrastructure of neuronal remodeling. *Stroke*. 2006; 37(8):2134-2139.

JAHANGIRI A, LEIFERT WR, KIND KL, MCMURCHIE EJ. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca^{2+} dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:1592-1602.

JOHANSSON BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke*. 2000; 31:223-230.

JOHANSSON BB. Brain plasticity in health and disease. *Keio J Med*. 2004; 53:231-246.

JOURDAIN P, NIKONENKO I, ALBERI S, MULLER D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*. 2002; 22(8):3108-3116.

JOVANOVIĆ JN, CZERNIK AJ, FIENBERG AA, GREENGARD P, SIHRA TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci*. 2000; 3(4):323-329.

JUNG YJ, PARK SJ, PARK JS, LEE KE. Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin. *Brain Res*. 2004; 996(1): 47-54.

JUNG JE, KIM GS, CHEN H, MAIER CM, NARASIMHAN P, SONG YS, NIIZUMA K, KATSU M, OKAMI N, YOSHIOKA H, SAKATA H, GOEDERS CE, CHAN PH. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol*. 2010; 41:172-9.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. The guidance of axons to their targets. In: *Principles of neural Science*. Ed.: McGraw-Hill. New York. 1991, 4^o ed., p. 11087-1114

KASS IS, LIPTON P. Protection of hippocampal slices from Young rats against anoxic transmission damage is due to better maintenance of ATP. *J Physiol*. 1989; 413:1-11.

KELLY S, BLISS TM, SHAH AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:11839-11844.

KIM H-Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells the *J. Biol Chem*. 2007; 282(26):18661-18665.

KIM GS, JUNG JE, NIIZUMA K, CHAN PH. CK2 is a novel negative regulator of NADPH oxidase and a neuroprotectant in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2009; 29:14779-89.

KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research*. 1982; 239:57-69.

KIRINO T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22(11):1283-1296.

KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005; 77:598-625.

KOBAYASHI T, KURODA S, TADA M, et al. Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Res*. 2003; 960(1-2):62-70.

KOROLAINEN MA, NYMAN TA, NYSSÖNEN P, HARTIKAINEN ES, PIRTILÄ T. Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease. *Clin Chem*. 2007; 53:657-665.

KOVALENKO T, OSADCHENKO I, NIKONENKO A, et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*. 2006; 16(10):814-825.

KULCHARYK PA, HEINECKE JW. Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry*. 2001; 40:3648-56.

LANGDON KD, GRANTER-BUTTON S, CORBETT D. Persistent behaviour impairments and neuroinflammation following global ischemia in the rat. *Eur J of Neurosci*. 2008; 28:2310-2318.

LAURITZEN I, BLONDEAU N, HEURTEAUX C, WIDMANN C, ROMEY G, LAZDUNSKI M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J*. 2000; 19:1784-1793.

LEE RG and VAN DONKELAAR P. Mechanisms underlying functional recovery following stroke. *Can J Neurol Sci*. 1995; 22:257-263.

LEE JM, et al. Brain tissue response to ischemia. *J Clin Invest*. 2000; 106:723-731.

LEHOTSKY J, MURIN R, STRAPKOVA A, URIKOVA A, TATARKOVA Z, KAPLAN P. Time course of ischemia/reperfusion-induced oxidative modification of neural proteins in rat forebrain. *Gen Physiol Biophys*. 2004; 23(4):401-415.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*. 1990; 186:464-478.

LEWEN A, MATZ P, CHAN PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*. 2000; 17:871-890.

LIM C, ALEXANDER MP, LAFLECHE G, SCHNYER DM, VERFAELLIE M. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology*. 2004; 63(10):1774-1778.

LIU K, TEDESCHI A, PARK KK, HE Z. Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2011; 34:131-152.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-275.

LU B. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog Brain Res*. 2004; 146:137-150.

LUKIW WJ AND BAZAN NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr*. 2008; 138(12):2510-2514.

MA QL, ZUO X, YANG F, UBEDA OJ, GANT DJ, ALAVERDYAN M, KIOSEA NC, NAZARI S, CHEN PP, NOTHIAS F, CHAN P, TENG E, FRAUTSCHY SA, COLE GM. Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging. *J Neurosci*. 2014; 34(21):7124-7136.

MABUCHI T, et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2000; 31:1735-1743.

MADL C and HOLZER M. Brain Function after Resuscitation from Cardiac Arrest. *Curr Opin Crit Care*. 2004; 10:213-217.

MALENKA RC and NICOLL RA. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science*. 1999; 285:1870-1874.

MARCHESELLI VL, HONG S, LUKIW WJ, TIAN XH, GRONERT K, MUSTO A, HARDY M, GIMENEZ JM, CHIANG N, SERHAN CN, BAZAN NG. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*. 2003; 278(44):43807-48817.

MARKLUND S and MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974; 47(3): 469-74.

MATSUZAKI M, et al. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004; 429:761-766.

MATEEN FJ, JOSEPHS KA, TRENERRY MR, FELMLEE-DEVINE MD, WEAVER AL, CARONE M, et al. Long-term cognitive outcomes following out-of-hospital cardiac arrest: a population-based study. *Neurology*. 2011; 77(15):1438-1445.

MCINTOSH TK, SMITH DH, MEANEY DF, KOTAPKA MJ, GENNARELLI TA, GRAHAM DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab Invest*. 1996; 74(2):315-342.

MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8:95-108.

MILOT MR and PLAMONDON H. Time-dependent effects of global ischemia on anxiety, locomotion, and habituation in rats. *Behav Brain Res*. 2009; 200:173-180.

MIYAZAWA T, SATO K, OBATA K. A synaptic vesicle-associated protein (SVP-38) as an early indicator of delayed neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995; 15:462-466.

MOULAERT VR, WACHELDER EM, VERBUNT JA, WADE DT, VAN HEUGTEN CM. Determinants of quality of life in survivors of cardiac arrest. *J Rehabil Med*. 2010; 42(6):553-558.

NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S, HATANO O, KAWAHARA N, TAMURA A, KIRINO T, NAKAFUKU M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 2002; 110(4):429-441.

NALIWAIKO K, ARAÚJO RL, DA FONSECA RV, CASTILHO JC, ANDREATINI R, BELLISSIMO MI, OLIVEIRA BH, MARTINS EF, CURI R, FERNANDES LC, FERRAZ AC. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? *Nutr Neurosci*. 2004; 7(2):91-9.

NETO CJ, PAGANELLI RA, BENETOLI A, LIMA KC, MILANI H. Permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion as a model of chronic and progressive brain hypoperfusion in rats: a neurohistological and behavioral analysis. *Behav Brain Res*. 2005; 160(2):312-322.

NEUMANN JT, COHAN CH, DAVE KR, WRIGHT CB, PEREZ-PINZON MA. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets*. 2013; 14(1):20-35.

NEURINGER M, CONNOR WE, LIN DS, BARSTAD L, LUCK S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:4021-4025.

NIKONENKO AG, RADENOVIC L, ANDJUS PR, SKIBO GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292(12):1914-1921.

NISHINO T and TAMURA I. The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 309A:327-33.

NITA DA, NITA V, SPULBER S, MOLDOVAN M, POPA DP, ZAGREAN AM, ZAGREAN L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med.* 2001; 5:163-170.

NOGUCHI J, et al. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron.* 2005; 46:609-622.

NOWICKI M, KOSACKA J, SPANEL-BOROWSKI K, BORLAK J. Deferoxamine-induced neurite outgrowth and synapse formation in postnatal rat dorsal root ganglion (DRG) cell cultures. *Eur J Cell Biol.* 2009; 88(10):551-562.

NYGREN J, WIELOCH T. Enriched environment enhances recovery of motor function after focal ischemia in mice, and downregulates the transcription factor NGFI-A. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25:1625-1633.

OKABE N, NAKAMURA T, TOYOSHIMA T, MIYAMOTO O, LU F, ITANO T. Eicosapentaenoic acid prevents memory impairment after ischemia by inhibiting inflammatory response and oxidative damage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2011; 20:188-195.

OKADA M, AMAMOTO T, TOMONAGA M, KAWACHI A, YAZAWA K, MINE K, FUJIWARA M. The chronic administration of docosahexanoic acid reduces the spatial cognitive deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience.* 1996; 71(1):17-25.

OZEN OA, COSAR M, SAHIN O, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurol Sci.* 2008; 29(3):147-152.

OLMEZ I and OZYURT H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int.* 2012; 60(2):208-212.

OZEN OA, COSAR M, SAHIN O, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurol Sci.* 2008; 29(3):147-152.

PAGANELLI RA, BENETOLI A, LIMA KCM, FAVERO-FILHO LA, MILANI H. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. *Journal of Neuroscience Methods.* 2004; 132:9-18.

PAGLIA DE and VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1):158-169.

PANTONI L, et al. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia. Experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:503-513.

PASTOR N, WEINSTEIN H, JAMISON E, BRENOWITZ M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000; 304:55-68.

PAXINOS G and WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 4a ed. Editora Academic Press. San Diego, California, USA. 1998.

PLAMONDON H and ROBERGE MC. Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats. *Physiol Behav.* 2008; 95(3):492-500.

POPA-WAGNER A, SCHRODER E, SCHMOLL H, WALKER LC, KESSLER C. Upregulation of MAP1B and MAP2 in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. *J Cereb Blood Flow Metabol.* 1999; 19:425-434.

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979; 10(3):267-272.

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11:491-498.

PULSINELLI WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res* 1985;63:29-37.

RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 288:481-7.

RAY R, SHAH AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond).* 2005; 109(3):217-226.

ROMANINI CV, FERREIRA EDF, SOARES LM, SANTIAGO AN, MILANI H, OLIVEIRA RMW. 4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone-mediated long-lasting memory recovery, hippocampal neuroprotection, and reduction of glial cells activation after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res.* 2015; 93(8):1240-1249.

SCHINDER AF and POO M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2000; 23(12):639-645.

SCHNEIDER CD and OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2004; 10(4):308-313.

SCOTT BL, BAZAN NG. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:2903-2907.

SEIF EL NASR M, NUGLISH J, KRIEGLSTEIN J. Prevention of ischemia-induced cerebral hypothermia by controlling the environmental temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1992; 27:23-26.

SELAKOVIC V, KORENIC A, RADENOVIC L. Spatial and temporal patterns of oxidative stress in the brain of gerbils submitted to different duration of global cerebral ischemia. *Int J Dev Neurosci.* 2011; 29(6):645-654.

SENGPIEL B, PREIS E, KRIEGLSTEIN J, PREHN JHM. NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10:1903-1910.

SHAMI NJIE and MOREIRA EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17:227-236.

SIESJÖ BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg.* 1992; 77:337-354.

SIMOPOULOS AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56:365-379

SIMS NR and ANDERSON MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int.* 2002; 40:511-526.

SMALL DL, MORLEY P, BUCHAN AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis.* 1999; 42(3):185-207.

SIST B, FOUAD K, WINSHIP IR. Plasticity beyond peri-infarct cortex: spinal up regulation of structural plasticity, neurotrophins, and inflammatory cytokines during recovery from cortical stroke. *Exp Neurol*. 2014; 252:47-56.

SOARES LM, SCHIAVON AP, MILANI H, DE OLIVEIRA RM. Cognitive impairment and persistent anxiety-related responses following bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Behavioural Brain Research*. 2013; 249:28-37.

SUGAWARA T and CHAN PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5:597-607.

STEINBERG BA and AUGUSTINE JR. Behavioral, anatomical, and physiological aspects of recovery of motor function following stroke. *Brain Res Brain Res Ver*. 1997; 25:125-132.

STROEMER RP, KENT TA, HULSEBOSCH CE. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*. 1998; 29:2381-2395.

SU HM. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem*. 2010; 21:364-373.

SUTHERLAND BA, MINNERUP J, BALAMI JS, ARBA F, BUCHAN AM, KLEINSCHNITZ C. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke*. 2012; 7(5):407-418.

TRAYSTMAN RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *Ilar J*. 2003; 44(2):85-95.

UEDA M, INABA T, NITO C, KAMIYA N, KATAYAMA Y. Therapeutic impact of eicosapentaenoic acid on ischemic brain damage following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2013; 1519:95-104.

VAILLANT AR, ZANASSI P, WALSH GS, AUMOMT A, ALONSO A, MILLER FD. Signalling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*. 2002; 34:985-98.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39:44-84.

VILA N, CASTILLO J, DÁVALOS A, CHAMORRO A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 2000; 31:2325-2329.

VOLPE BT and HIRST W. The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury. *Arch Neurol*. 1983; 40:436-440.

WANG Q, et al. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007; 84:53-68.

WEISS J. The reaction between hydrogen peroxide and iron salts. *Experientia*. 1951; 7:135-6.

WIELOCH T and NIKOLICH K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*. 2006; 16:258-264.

WINSHIP IR and MURPHY TH. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J Neurosci*. 2008; 28:6592-6606.

WU A, YING Z, GOMEZ-PINILLA F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2004; 21(10):1457-1467.

WU A, et al. The salutary effects of DHA dietary supplementation on cognition, neuroplasticity, and membrane homeostasis after brain trauma. *J Neurotrauma*. 2011; 28:2113-2122.

YABUKI Y and FUKUNAGA K. Oral administration of glutathione improves memory deficits following transient brain ischemia by reducing brain oxidative stress. *Neuroscience*. 2013; 250:394-407.

YU TW and BARGMANN CI. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci*. 2001; 4:1169-1176.

ZAIDI A and MICHAELIS ML. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(7-8):810-821.

ZANQUI AB, DE MORAIS DR, DA SILVA CM, SANTOS JM, GOMES STM, VISENTAINER JV, EBERLIN MN, CARDOZO-FILHO L, MATSUSHITA M. Subcritical extraction of flaxseed oil with n-propane: Composition and purity. *Food Chemistry*. 2015; 188:452-458.

ZHANG C and BAZAN NG. Lipid-Mediated Cell Signaling Protects against Injury and neurodegeneration. *J Nutr*. 2010; 140:858-863.

ZHOU Q, et al. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 2004; 44:749-775.

ZHU H, ZHANG J, SUN H, ZHANG L, LIU H, ZENG X, et al. An enriched environment reverses the synaptic plasticity deficit induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Neurosci Lett*. 2011; 502:71-75.

ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 1986; 6:2950-2967.