

| Dados do Projeto de Pesquisa | |
|---|--|
| Título do Projeto de Pesquisa: | Avaliações neuroquímicas e comportamentais de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 durante a gestação e lactação |
| Grande área/área segundo o CNPq (https://goo.gl/JB3tAs): | Ciências Biológicas/Farmacologia. |
| Grupo de Pesquisa vinculado ao projeto: | Neurociências e Neuroproteção |
| Linha de pesquisa do grupo de pesquisa vinculado ao projeto: | Ação neuroprotetora de produtos naturais e plantas medicinais/componentes bioativos |
| Categoria do projeto: | () projeto em andamento, já cadastrado na PRPI () projeto não iniciado, mas aprovado previamente (X) projeto novo, ainda não avaliado |
| Palavras-chave: | Ômega 3, isquemia cerebral, neuroinflamação, estresse oxidativo. |

1. INTRODUÇÃO

A asfixia fetal é definida como condição caracterizada por acidose metabólica ou mista (metabólico-respiratória) com pH menor do que 7, podendo estar associada sequelas neurológicas neonatais, tais como convulsões, coma, hipotonia ou falência de múltiplos órgãos (CUNHA *et al.*, 2004). Dentre as diversas entidades mórbidas encontradas no período perinatal, a asfixia ocupa lugar de destaque por sua potencial influência no futuro desempenho neuropsicomotor do recém-nascido (RN) (SOUZA, 2003 apud DIOS, 2001). O grau de asfixia perinatal reflete a qualidade da assistência prestada a gestante durante o período pré-natal e durante o parto, além dos cuidados imediatos prestados ao RN (SOUZA, 2003).

A asfixia perinatal afeta 2 a 4 recém-nascidos em cada 1.000 nascidos vivos, com incidência maior em prematuros. Dos recém-nascidos afetados, 20% a 50% podem apresentar encefalopatia hipóxico-isquêmica; dos sobreviventes, cerca de 25% evoluem com sequelas neurológicas permanentes, com ou sem retardo mental, distúrbios do aprendizado, desordens convulsivas e paralisia cerebral (HERRMANN, 2004). O Brasil convive com elevada taxa de mortalidade e morbidade perinatal. Ao contrário dos países desenvolvidos, onde a principal causa isolada de morte no período neonatal são as malformações congênitas (SOUZA, 2003). No Brasil a maioria dos óbitos perinatais são determinados pelas condições da gestante, características da assistência ao parto e ao recém-nascido. Entre as principais causas de óbitos associados às condições maternas e do RN estão: a prematuridade, o baixo peso ao nascer, as afecções respiratórias do recém-nascido e a asfixia intrauterina e intraparto (SOUZA, 2003).

A mortalidade e a morbidade perinatal e sequelas de longa data não têm sido

somente relacionadas com o risco materno como idade, afecção materna, fumo e *status* socioeconômico, mas também com fatores de risco obstétricos, como fatores relacionados ao manejo do trabalho de parto e anormalidades fetais como as malformações e crescimento intrauterino restrito. A asfixia no nascimento é um evento perinatal, que em casos mais graves leva ao aumento de risco de morte ou sequelas permanentes (MILSOM et al., 2002).

Como determinantes distais mais importantes, listam-se os fatores socioeconômicos, que através da mediação de fatores intermediários, aumentam o risco de prematuridade. Como fatores intermediários, listam-se: fatores biológicos maternos, história reprodutiva, hábitos maternos, doenças maternas, assistência pré e perinatal (FONSECA, 2004). Na maioria dos estudos, alguns fatores maternos mostraram-se associados à mortalidade fetal e neonatal, como idade elevada, presença de morbidade materna e história reprodutiva desfavorável, principalmente a ocorrência de natimorto prévio. Fatores proximais como sexo do recém-nascido, peso ao nascer, idade gestacional e baixo Apgar foram corroborados para mortalidade neonatal. Pré-natal inadequado, baixa renda e baixa escolaridade mostraram-se como fatores de risco para mortalidade tanto fetal como neonatal, embora alguns estudos apontassem valores não significativos (FONSECA, 2004).

Diversos mecanismos estariam envolvidos na produção de lesões cerebrais após isquemia e reperfusão. Dentre esse processos, destacam-se as lesões causadas por metabólitos de ácidos graxos livres, por metabólitos das purinas, por formação de óxido nítrico e por ação de leucócitos. O estudo de drogas antioxidantes e de bloqueadores de radicais livres é importante para compreensão das diversas reações bioquímicas e dos possíveis caminhos seguidos por esses metabólitos no desencadeamento das lesões. Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do oxigênio para o tecido acometido, levando à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP) (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

No entanto, o consumo do estoque de ATP continuaria e seria degradado a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, a adenosina, inosina e hipoxantina. A falta de energia celular causaria a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) e, devido à falência da bomba, passaria a haver maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ para fora da célula, com consequente edema da célula e de suas organelas. Concomitantemente, estaria ocorrendo influxo de Ca^{++} e de cloreto para o meio intracelular. Esse acúmulo de Ca^{++} no citosol provocaria a ativação da protease calpaína, que, por sua vez, promoveria a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (XO). Diferentemente da XD, a XO necessita de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina. Na fase da isquemia, ocorre acúmulo dessas duas substâncias. Com a reperfusão, a hipoxantina seria, então, oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto a formação do ânion superóxido (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

A função e integridade das células são mantidas no sistema nervoso central (SNC) por complexas redes de sinalização intra e intercelular conduzidos por moduladores tais como atividade sináptica, neurotrofinas, e programação gênica. A organização

molecular e as funções das membranas celulares são cruciais na sinalização celular. O ácido docosahexaenóico (DHA) é o principal ácido graxo ômega-3, está concentrado na membrana fosfolipídica do SNC. Períodos prolongados de privação alimentar são necessários para diminuir o conteúdo de DHA no tecido, o qual resulta em limitações funcionais. Estas alterações são restauradas através da realimentação seletiva de ácidos graxos ômega-3. O DHA está implicado no funcionamento do cérebro e da retina, envelhecimento, doenças neurológicas, psiquiátricas e/ou comportamentais. A descoberta de D1 neuroprotectin (NPD1), o primeiro bioativo identificado derivado do DHA, tem permitido fundamentais questões a serem abordadas diretamente sobre a biologia dos ácidos graxos de ômega-3 e os mecanismos de ação do DHA em modelos experimentais de acidente vascular cerebral e neurodegeneração (DAR-YU et al., 2007; BAZAN, 2009).

Os lipídios das membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados, especialmente o ácido docosahexaenóico (C_{22:6}). Os ácidos graxos poliinsaturados são extremamente susceptíveis à peroxidação lipídica, a qual resulta no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH). Estes podem ser degradados na presença de íons de ferro ou cobre gerando radicais alcóxila (LO) e peróxila (LOO). Os radicais LO e LOO podem danificar proteínas de membrana e também atacar outras moléculas de lipídio, propagando a peroxidação lipídica. Os produtos finais da decomposição de LOOH são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como dialdeído malônico (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) e trans, trans-2,4-decadialenal (DDE). O dano oxidativo a lipídios pode ser definido como deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados ou ácidos graxos poliinsaturados (BARBOSA et al., 2006).

O estudo de substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias tem despertado interesse de pesquisadores para o tratamento do estresse oxidativo e da neuroinflamação presente em várias patologias do Sistema Nervoso Central (SNC), como em doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, epilepsias) e isquemia cerebral. A neuroinflamação desempenha um papel importante na patogênese da asfixia perinatal, caracterizada pela infiltração de vários tipos celulares inflamatórios e produção de mediadores pró-inflamatórios. A asfixia perinatal contribui com a alta taxa de morte neonatal, evidenciando a necessidade de intervenções eficazes, tanto na assistência a mulher quanto a criança, no período perinatal. Considerando seu enorme custo socioeconômico e tratamentos ainda insuficientes, evidencia-se que a asfixia perinatal é um paradigma latente na saúde pública. Logo, a busca por terapias bem sucedidas são objetos de estudos experimentais em modelos animais e estudos clínicos.

Muitas das substâncias que exibem propriedades anti-inflamatórias apresentam um potencial neuroprotetor e podem exercer efeitos benéficos sobre as doenças cerebrais, como a isquemia cerebral. Estudos anteriores evidenciaram o potencial neuroprotetor do ômega-3 em ratos machos adultos submetidos ao modelo isquemia/reperfusão cerebral (NOBRE et al., 2013). Nesse interim, este projeto objetiva avaliar a atuação do ômega-3 em um modelo de isquemia/reperfusão em animais recém-nascidos, sendo uma das formas de investigar as condições fisiopatológicas no sistema nervoso central decorrente da asfixia perinatal. A isquemia cerebral em recém-nascidos carece ainda de opções terapêuticas e tem difícil manejo nas unidades neonatais.

Essa pesquisa justifica-se pela necessidade do desenvolvimento de mecanismos e ferramentas complementares ao cuidado gestacional que possivelmente ofereçam potencial preventivo e assistencialista na neuroproteção neonatal. Nesse sentido, apresentar-se-ia como uma intervenção econômica, viável e segura que contribui para a melhora dos desfechos neurológicos das crianças recém-nascidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações neuroquímicas e comportamentais de filhotes submetidos à isquemia/reperfusão cerebral de ratas tratadas com ômega-3 (ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico) durante a gestação e lactação.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar alterações comportamentais dos filhotes submetidos ou não a isquemia cerebral através dos testes do campo aberto (atividade locomotora) e nado forçado (depressão);
- Avaliar morfológicamente as áreas de infarto cerebral coradas com 2,3,5-cloreto trifêniltetrazólio (TTC).
- Determinar os níveis estriatais de monoaminas: dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA);
- Determinar a concentração de Nitrito e TBARS no corpo estriado e hipocampo dos filhotes submetidos ou não a isquemia cerebral;

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

O protocolo experimental será encaminhado a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina do Cariri / Universidade Federal do Ceará. Todos os esforços serão feitos para minimizar o sofrimento dos animais segundo critérios da Internacional Ethical Guidelines. (CIOMS/OMS, 1985). Para a realização do estudo, serão utilizados ratos Wistar (adultos e filhotes, machos e fêmeas) provenientes do Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina do Cariri – BIOEXA/FAMED. Os animais serão aclimatados no Laboratório de Pesquisa em Neurociências e Neuroproteção - LAPENN, mantidos em temperatura ambiente controlada (21 a 23°C), alternância do ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. As fêmeas (180 a 200 g) serão acasaladas na proporção de 3 fêmeas para 1 macho (200 a 220 g), as quais serão separadas dos machos após o quinto dia de acasalamento, ficando cada uma em caixas separadas. As fêmeas serão submetidas ao tratamento diário com ômega-3 por gavagem nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia e os grupos controles com veículo (água destilada+tween80, 0,1mL/100g, vo) durante todo o período gestação e lactação. Seus filhotes (machos e fêmeas) serão submetidos à isquemia cerebral global transitória por oclusão da artéria carótida comum esquerda por 15 minutos seguida de reperfusão no curso do 14º dia pós-natal.

3.2 Drogas

3.2.1 Ômega-3 (ácido docosahexaenóico – DHA e ácido eicosapentaenóico – EPA)

Nesse estudo será utilizada a droga ProepaGesta (Aché Laboratórios Farmacêuticos SA, Brasil) como a fonte dos ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA). Cinco cápsulas de ProepaGesta serão utilizadas na preparação de uma solução mãe na concentração de 21,19mg/mL (5.000 mg/236 mL). O tween 80 (concentração menor que 0,5% da solução preparada) será utilizado como emulsionante para solubilizar o ômega-3 em água destilada. Os animais serão tratados por via oral (v.o.) com ômega-3 nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia. Os animais controles receberão o veículo, contido de água destilada acrescido de twenn 80 (0,1mL/100g) por via oral.

3.2.2 Anestésicos

Cloridrato de ketamina: (Dopalen - Laboratório Ceva, apresentação 1g/10mL) será administrado na dose 25 mg/kg (intraperitoneal).

3.3 Protocolo Experimental

Os animais serão divididos em seis grupos:

FO: Ratas (n=2) não tratadas para filhotes (n=8) falso-operados.

ISQ: Ratas (n=2) não tratadas para filhotes (n=8) isquemiados.

FO+Ômega-3/5mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) FO

FO+ Ômega-3/10mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) FO

ISQ+Ômega-3/5mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/5mg/kg para filhotes (n=8) isquemiados

ISQ+Ômega-3/10mg: Ratas (n=2) tratadas com Ômega-3/10mg/kg para filhotes (n=8) isquemiados

As mães serão submetidas ao tratamento diário de ômega-3 por gavagem nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia e os grupos controles com veículo (água destilada+tween80, 0,1mL/100g, vo), no período gestação que compreende 21 dias e durante a lactação, por mais 21 dias. No 14º dia pós-natal seus filhotes serão submetidos à cirurgia para isquemia cerebral e serão mantidos com suas mães mais 7 dias, período da investigação dos testes comportamentais e neuroquímicos (Figura 1).

Figura 1. Protocolo Experimental



Assim, os filhotes machos e fêmeas (16-18g) no 14º dia de vida serão submetidos à isquemia cerebral global transitória por oclusão unilateral da artéria carótida comum esquerda, por um período de 15 minutos, seguida de perfusão. Os animais serão previamente anestesiados com cloridrato de ketamina na dose de 25mg/kg (0,01ml/100g, i.p.), em seguida será realizada antissepsia e tricotomia no local da incisão. A carótida comum esquerda será identificada e clampeada com pinça buldogue por 15 minutos. Após esse tempo, o clamp será retirado para perfusão e realização da sutura. O grupo falso-operado será submetido ao mesmo procedimento, exceto a oclusão da carótida comum esquerda. Durante e após o procedimento cirúrgico os animais serão aquecidos com foco infravermelho. Depois da recuperação anestésica (2 horas) os animais serão devolvidos as gaiolas das mães para aleitamento. No sétimo dia de tratamento, após 1 hora da última administração de ômega-3 às ratas mães, os filhotes serão avaliados quanto à atividade exploratória (campo aberto) e nado forçado (modelo de depressão). Após os testes comportamentais os animais serão eutanasiados por decapitação em guilhotina (Harvard, USA) e o corpo estriado e hipocampo serão dissecados sob gelo para preparação de homogenatos e determinação de monoaminas e metabólitos em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e dosagem de nitrito e TBARS. Um animal de cada grupo será aleatoriamente escolhido e seu cérebro retirado para coloração por 2,3,5-cloreto trifeniltetrazólio (TTC).

3.4 Testes comportamentais

3.4.1 Teste do Campo Aberto ou “Open Field”

O teste de campo aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora, défices motores e ansiedade. A atividade locomotora é medida através da determinação da distância percorrida (número de cruzamentos) e comportamentos estereotipados (rearing e grooming). O teste é sensível à disfunção motora, bem como a danos dos 7 gânglios da base e do hipocampo. Durante o teste se avalia a capacidade exploratória do animal, durante 5 min, em uma arena. A arena é construída em madeira com dimensões igual a 30 x 30 cm e possui 15 cm de altura, com piso dividido em 9 quadrados iguais. Os animais serão avaliados no sétimo dia de tratamento pós-isquemia cerebral. Após uma hora do último tratamento, os ratos serão colocados na arena com as quatro patas no centro do campo aberto e o seu comportamento será observado por 5 minutos. Os parâmetros comportamentais observados neste teste serão: número de cruzamentos (NC), número de rearing (NR) e número de grooming (NG) (Figura 2).

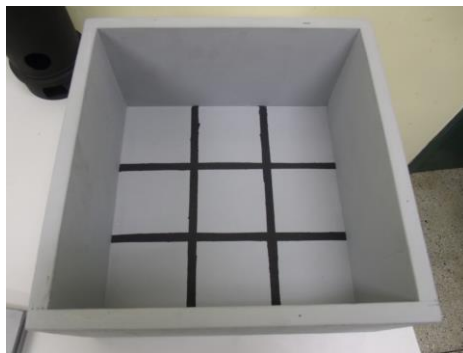


Figura 2. Aparato do Campo Aberto ou “Open Field”.
Fonte: LAPENN/FAMED/UFCA.

3.4.2 Teste do Nado Forçado

Esse teste é comumente usado na avaliação da efetividade de agentes antidepressivos, pelo aumento da atividade natatória do animal. O teste será realizado colocando o animal no tanque cilíndrico de acrílico, com 10 cm de diâmetro (base) e 30 cm de altura preenchido com água até uma altura de 15 cm, e contado o tempo de imobilidade por cinco minutos.

3.5 Testes bioquímicos

3.5.1 Determinação dos Níveis de Monoaminas e Metabólitos

Os animais serão decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA) e, em seguida, os encéfalos serão retirados e colocados sobre papel alumínio sobre gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral será liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação para divulsionar o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado será rebatido para os lados, expondo o corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) que será deslocado e retirado. O estriado dos animais será então utilizado para preparar os homogenatos a 10% em ácido perclórico (HClO₄). O estriado será sonificado em 0,1 M HClO₄, durante 30 s, centrifugados a 4°C durante 15 min a 15.000 rpm, e os sobrenadantes serão filtrados (0,2 µm, Millipore). Vinte microlitros de amostra serão então injetados na coluna (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm) do HPLC (Shimadzu, modelo LCD-6A com detecção eletroquímica) em fluxo de 0,6 mL/min. A fase móvel será preparada com 0,163 M de ácido cítrico, pH 3,0, contendo 0,02 mM de EDTA com 0,69 mM de ácido octanossulfônico sódico (SOS), acetonitrila a 4% v/v e tetra-hidrofurano 1,7% v/v. As monoaminas serão eletroquimicamente detectadas, utilizando um detector amperométrico (Shimadzu, Japão), por oxidação de um eletrodo de carbono vítreo a 0,85 V em relação ao eletrodo de referência de Ag-AgCl. As suas concentrações serão determinadas por comparação com as médias dos padrões injetados na coluna do HPLC no dia da experiência, e os valores expressos como ng/mg de tecido.

3.5.2 Determinação das concentrações de nitrito

O reagente de Griess revela a presença de nitrito nas amostras analisadas por reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 560 nm. Serão utilizados 400 µL do reagente de Griess e 400 µL do sobrenadante do homogenato a 10% do tecido (estriado e hipocampo) em solução tamponada de fosfato (PBS) ou salina. Para o branco será utilizado 400 µL do reagente de Griess e 400 µL de PBS. A leitura da absorbância será feita em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em nM. A equação da reta será usada para a determinação da concentração de cada amostra, considerando a leitura da absorbância (y) plotada contra a concentração de nitrito (x).

3.5.3 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de lipoperoxidação será medido através da determinação das concentrações de TBARS, conforme o método de Draper e Hadley (1990). Serão utilizados os seguintes reagentes: Ácido tiobarbitúrico 0,6%, Ácido tricloroacético 10%, Tampão de cloreto de potássio (KCl) 1,15% para preparo dos homogenatos. Serão preparados homogenatos das áreas a 10% (p/v) em KCl 1,15%, retirado um volume de 950 µL do homogenato, colocado em um tubo de ensaio e adicionado 200 µL da solução

de ácido tiobarbitúrico e 200µL da solução de ácido tricloroacético 10%. Em seguida, após agitação da mistura, essa será colocada em banho-maria (95-100°C). Após 15 minutos, os tubos serão resfriados em banho de gelo até voltar à temperatura ambiente. Os próximos passos serão centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos, retirar alíquotas de 100µL, colocar nos poços em placa de Elisa e medir a absorbância no Elisa com um comprimento de onda de 540nm. Os resultados serão expressos em micromol (µmol) de malonildialdeído (MDA) por g de tecido.

3.6 Técnica de coloração por 2,3,5-cloreto trifeniltetrazólio (TTC)

Uma solução de Solução de PBS (Phosphate-Buffered Saline, 1X) será previamente preparada usando: 0,144 g/L de fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄, P.M.: 136,09), 9,00 g/L de cloreto de sódio (NaCl, P.M.: 58,44), 0,795 g/L de fosfato de sódio di-básico anidro (Na₂HPO₄, P.M.: 141,96) para um pH Final igual a 7,4 ± 0,1. A solução de TTC (2% em peso) deverá ser preparada com PBS a 37°C imediatamente antes da sua utilização. Como o TTC é sensível à luz, as soluções devem ser mascaradas com papel alumínio. Após anestesia com cloridrato de ketamina na dose 25 mg/kg (ip), será realizada a eutanásia por decapitação e os encéfalos dos animais rapidamente removidos e refrigerados a -86 °C (Ultrafreezer, INDEL, modelo IULTT9D) por 4 min para endurecer levemente o tecido com objetivo de facilitar o corte em fatias. Com o auxílio de uma matriz para corte de cérebro de rato (Rodent Brain Matrix Harvard Apparatus, USA), os encéfalos serão seccionados no plano coronal em três a quatro fatias de 2mm de espessura, do bulbo olfatório para o cerebelo. As fatias serão colocadas numa placa de Petri de vidro contendo uma camada superficial de 2% de corante TTC, e lamelas de vidro molhadas com a solução TTC serão colocadas em cima de cada fatia para garantir uma coloração uniforme, deixando as superfícies superior e inferior da seção em contato com o corante. As placas serão cobertas com folha de alumínio para evitar a exposição à luz e incubadas a 37°C durante 30 minutos em ambiente escuro, seguido de fixação por imersão em solução de formaldeído 4% tamponada (pH 7,4) durante 24 horas. As fatias do cérebro serão mantidas planas na placa de Petri durante esse tempo para evitar distorções. As seções coradas serão fotografadas dentro após 1 dia e as imagens analisadas através do software Image J. Nas populações celulares que mantêm o transporte de elétrons mitocondrial o TTC apresenta coloração avermelhada e nas áreas afetadas não ocorre coloração. Os resultados serão apresentados como densidade óptica da área.

3.7 Análise Estatística:

A análise de distribuição normal dos dados será realizada para eleição do teste estatístico para análise dos resultados para constatação de hipóteses. Para comparações múltiplas será utilizada ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

4. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS, TECNOLÓGICAS OU DE INOVAÇÃO DO PROJETO.

Há um comprometimento mundial para reduzir a mortalidade de crianças abaixo de cinco anos. No mundo, essas mortes predominam no período neonatal, com destaque para três causas: prematuridade, asfixia perinatal e infecções neonatais. A asfixia em recém-nascidos a termo afeta 1-2/1.000 nascidos vivos, resultando no desenvolvimento

encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), encefalopatia neonatal ou acidente vascular cerebral perinatal com consequências devastadoras como paralisia cerebral, comprometimento cognitivo, atraso no desenvolvimento motor e sensorial e epilepsia.

Modelos animais demonstraram que com o avanço da gestação, o cérebro se torna mais vulnerável à hipóxia-isquemia, em parte devido à sua alta demanda metabólica. Frente à isquemia, as células sofrem com o metabolismo oxidativo cerebral comprometido, apresentam inchaço e acúmulo extracelular de aminoácidos excitatórios e uma recuperação transitória antes de um período de falha de energia secundária. Nas horas subsequentes para dias, os mecanismos prejudiciais da fase secundária levam à morte celular neuronal. A restauração do fluxo sanguíneo cerebral pós-isquemia impede o comprometimento adicional generalizado, mas, ao mesmo tempo, pode levar à lesão de reperfusão. A reação inflamatória é responsável por uma das muitas características envolvidas no dano da reperfusão pós-isquemia.

A busca de terapias bem sucedidas ainda é objeto de estudos clínicos e experimentais. Estudos recentes mostram que os ácidos graxos ômega-3 podem exibir propriedades neuroprotetoras e podem exercer efeitos benéficos sobre a isquemia cerebral e outras doenças cerebrais em modelos com ratos adultos. O ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) são ácidos graxos essenciais ômega-3 que servem como substratos de energia e dos componentes integrais da membrana celular, assim desempenham papéis cruciais na manutenção da função neurológica normal. Paralelamente, o ácido eicosapentaenóico (EPA) tem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias.

Com bases nesses dados, acreditamos no potencial neuroprotetor do ômega-3 frente à isquemia cerebral neonatal, podendo se revelar como um componente antioxidante e anti-inflamatório de ação central, contribuindo com a prevenção e tratamento da lesão cerebral em cérebros imaturos.

5. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO

| Atividades | 2019 | | | | | | | 2020 | | | | |
|---|------|---|---|---|----|----|----|------|---|---|---|---|
| | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Revisão/atualização de literatura | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Procriação e tratamento dos animais | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| Cuidados gerais com os animais | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Cirurgia de isquemia/reperfusão na prole | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Testes comportamentais | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Determinação dos níveis de monoaminas | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Estresse oxidativo: concentrações de nitrito | | | X | X | X | X | X | | | | | |
| Estresse oxidativo: TBARS | | | X | X | X | X | X | | | | | |
| Coloração por TTC | | | | | | | | X | X | X | | |
| Análise estatística e elaboração de resumo para apresentação em congresso | | | | | | | | | | | X | |
| Produção de artigo científico | | | | | | | | | | | X | X |
| Relatório final | | | | | | | | | | | | X |

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, LF; DE MEDEIROS, MHG; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quimica Nova*, v. 29, n. 6, p. 1352-1360. 2006.
- BAZAN, NG. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. v. 81, n. 2-3, p. 205–211, 2009.
- DAR-YU, Y; HUNG-CHUAN, P; YU-JU, Y; CHUN-CHIANG, W; YU-HAN, C; SHIH-YUN, C; SZU-YIN, L; SU-LAN, L; SHUE-LING, R; CHING-WEN, W; MING-CHIH, C; AN-NA, C; CHUN-JUNG, C. Detrimental effects of post-treatment with fatty acids on brain injury in ischemic rats. *NeuroToxicology*. v.28, p. 1220–1229. 2007.
- CUNHA, A. A. et al. Fatores Associados à Asfixia Perinatal. **Rev. Bras.Ginecol. Obstet.**, v.26, n. 10, p.799-805, 2004.
- FONSECA, S. C.; COUTINHO, E. S. F. Pesquisa sobre a Mortalidade Perinatal no Brasil: Revisão da Metodologia e dos Resultados. **Cad. Saúde Pública**. s.20, n.1, p.s7-s19. 2004
- HERRMANN, D.M.M.L.; GOMES, S.V.C., Asfixia Perinatal. In: ALVES, J.G.B.; FERREIRA, O. S.; MAGGI, R. S. **Pediatria**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 240-245. 2004.
- MILSOM, I. et al. Influence of Maternal, Obstetric and Fetal Risk Factors on The Prevalence of Birth Asphyxia at Term in a Swedish Urban Population. **Acta Obstet. Gynecol Scand**. n.81, p. 909-917. 2002.
- NOBRE, Maria Elizabeth Pereira et al. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.422-433, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2013.02.011>.
- SOUZA, F. M., **Fatores associados à asfixia perinatal no Brasil**: estudo populacional com base no Sistema de Informações de Nascidos Vivos. 166 f. Tese (Doutorado em saúde da criança e da mulher). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2003.
- TARDINI, DMS; YOSHIDA, WB. Brain injury due to ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery. *J Vascular Brasil*. v. 2, n. 2, p. 119-28. 2003.