

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BIOQUÍMICA

EFEITO DA OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR
DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE PARÂMETROS ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON NA VIA
NIGROESTRIATAL

ALINE BITTENCOURT

ORIENTADOR: Prof. Dr. DANIEL PENS GELAIN

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BIOQUÍMICA

EFEITO DA OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR
DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE PARÂMETROS ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON NA VIA
NIGROESTRIATAL

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas
– Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial a obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica

ALINE BITTENCOURT

ORIENTADOR: Prof. Dr. DANIEL PENS GELAIN

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Bittencourt, Aline

Efeito da obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica sobre parâmetros associados à Doença de Parkinson na via nigrostriatal / Aline Bittencourt. -- 2017.

61 f.

Orientador: Daniel Pens Gelain.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Obesidade. 3. Neuroinflamação. 4. Doença de Parkinson. 5. Tirosina Hidroxilase. I. Pens Gelain, Daniel , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e por compreender minha ausência em momentos importantes.

Aos todos os colegas do laboratório 32, em especial ao Pedro, Amanda Juciano, Rafael e Luana, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Roberto pela fundamental ajuda nos testes de comportamento.

Ao meu orientador Daniel Pens Gelain, pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

Aos funcionários do departamento de bioquímica pela incansável dedicação e competência, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos órgãos de fomento que forneceram suporte para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

PARTE I	6
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBESIDADE E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	13
1.2 OBESIDADE E NEUROINFLAMAÇÃO	14
1.3 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON	15
1.4 DOENÇA DE PARKINSON, OBESIDADE E INTERVENÇÕES DIETÉTICAS	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
PARTE II	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS	29
4.1 A DIETA HIPERLIPÍDICA INDUZIU OBESIDADE, INTOLERÂNCIA À GLICOSE, RESISTÊNCIA À INSULINA E AUMENTO DO ESTADO INFLAMATÓRIO	29
4.2 A OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS PROTEICOS DE TIROSINA HIDROXILASE E SINAPTOFISINA NA VIA NIGROSTRIATAL	32
4.3 A IMUNOHISTOQUÍMICA INDICOU NEURODEGENERAÇÃO E ATIVAÇÃO DA MICROGLIA EM RESPOSTA A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA	34
4.4 NITRAÇÃO DE TIROSINA E DEPLEÇÃO DO CONTEÚDO DE TIOL LIVRE NA VIA NIGROSTRIATAL EM RESPOSTA À DIETA HIPERLIPÍDICA	35
4.5 A DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU A PIORA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO, MAS NÃO AFETOU A MEMÓRIA E COORDENAÇÃO MOTORA	37
PARTE III	42
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9. ANEXOS	59
ANEXO 1. LISTA DE FIGURAS	59
ANEXO 2. Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA-UFRGS.	61

Parte I

RESUMO

A obesidade e a resistência à insulina induzidas por dieta têm sido associadas ao aumento da morte de neurônios dopaminérgicos e depleção da dopamina (DA) nigroestriatal em modelo animal da Doença de Parkinson (DP), sugerindo uma maior vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos em resposta a perturbações metabólicas. No entanto, ainda não há evidências consistentes que demonstrem uma associação linear entre a obesidade e a morte de neurônios dopaminérgicos e os mecanismos subjacentes que podem estar contribuindo para o desenvolvimento da DP. Para avaliar se a obesidade promove neurodegeneração dopaminérgica e/ou alterações nos parâmetros relacionados com a progressão da DP, ratos Wistar machos receberam uma dieta padrão ou uma dieta rica em gordura (HFD) durante vinte e cinco semanas e a substantia nigra, estriado e a área tegmental ventral foram isolados e submetidos a análises bioquímicas. Em conformidade com a ingestão calórica, os ratos HFD apresentaram aumento da massa gorda e peso corporal total associados à intolerância à glicose e resistência à insulina. A obesidade induzida por dieta diminuiu os níveis de tirosina hidroxilase (TH) indicando perda de neurônios dopaminérgicos e também promoveu alterações no imunoconteúdo de sinaptofisina relacionadas com a inflamação periférica e central indicadas pelo aumento de TNF- α e IL1 β bem como estresse oxidativo/nitrosativo com aumento da nitração de tirosina e oxidação de grupos sulfidril. Nenhuma diferença foi detectada para o imunoconteúdo de α -syn e p-Tau entre os grupos. Além disso, níveis reduzidos de TH foram confirmados na análise de imunofluorescência, bem como morte neuronal e ativação de microglia indicados pela diminuição de NeuN e aumento de Iba1 sem haver

alterações para GFAP. Adicionalmente, foram identificadas piora da atividade locomotora, mobilidade e evidências apontando para um comportamento do tipo ansiolítico nas tarefas de campo aberto e claro / escuro. Não houve alterações na coordenação motora e memória. Juntos, estes dados sugerem que a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica de fato promove a morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal independentemente de α -syn e fosforilação da Tau. O aumento da morte neuronal pode ser atribuído à inflamação cerebral e estresse oxidativo / nitrosativo induzido pela obesidade, o que possivelmente levou às alterações comportamentais observadas neste estudo.

ABSTRACT

Diet-induced obesity and insulin resistance has been associated to increased dopaminergic neurodegeneration and nigrostriatal dopamine (DA) depletion in animal model of Parkinson's Disease (PD), suggesting an enhanced vulnerability of dopaminergic neurons in response to metabolic perturbation. However, there is still no consistent evidence demonstrating a linear association between obesity and dopaminergic neurons death and the underlying mechanisms that can be contributing to the development of PD. In order to evaluate whether obesity promotes dopaminergic neurodegeneration and / or changes in parameters related to PD progression, male Wistar rats were fed with standard chow or high-fat diet (HFD) for twenty five weeks and the brain substantia nigra, striatum and ventral tegmental area were isolated before undergoing biochemical analyzes. In accordance with energy intake, the HFD rats showed increased fat mass and total body weight associated to glucose intolerance and insulin resistance. Diet-induced obesity decreases tyrosine hydroxylase (TH) levels indicating dopaminergic neurons loss and also promoted changes in the synaptophysin immunocontent related to peripheral and brain inflammation with increased TNF- α and IL1 β , as well oxidative/nitrosative stress with increased tyrosine nitration and oxidation of sulfhydryl groups. No difference was detected for α -syn and p-Tau immunocontent between groups. Moreover, decreased levels of TH were confirmed in the immunofluorescence analysis, as well neuronal death and microglia activation with NeuN and Iba1 without changes for GFAP. In addition, impairment of locomotor activity, mobility and evidences pointing for an anxiolytic-like behavior were identified in the open-field and light/dark tasks.

There were no changes in the motor coordination and memory. Together, these data suggest that diet-induced obesity indeed promotes dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal pathway independent of α -syn and phosphorylation of Tau. The increased neuronal death can be attributed to the brain inflammation and oxidative/nitrosative stress induced by obesity, which would likely lead to behavioral changes observed in this study.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP - Doença de Parkinson

DA - Dopamina

TH - Tirosina Hidroxilase

α -syn - Alfa sinucleína

Tau - Proteína estabilizadora de microtúbulos tau

HFD - Dieta hiperlipídica (do inglês, high-fat diet)

SD - Dieta padrão (do inglês, standard diet)

TNF- α - Fator de necrose tumoral

IL-1 β - Interleucina 1 β

LCR - Líquido cefalorraquidiano

SN - *substantia nigra*

VTA - Área tegmental ventral

ST - Estriado

IP-GTT - Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

IP-ITT - Teste de tolerância à insulina intraperitoneal

AUC - Área sobre a curva

HOMA-IR - Modelo homeostático de avaliação da resistência à insulina

SH - Grupo sulfidril

SNC - Sistema nervoso central

RIPA - Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

PBS - Tampão salina-fosfato

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

BSA - Albumina sérica bovina

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sódio

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Atualmente, estima-se que a obesidade afeta cerca de 13% da população mundial e é considerada um importante fator de risco para complicações de saúde, incluindo resistência à insulina e diabetes tipo 2. As principais causas relacionadas com a epidemia de obesidade são o estilo de vida sedentário e principalmente o aumento no consumo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados e açúcares, um comportamento alimentar adaptado à uma sociedade urbanizada e industrializada provocando um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético e que vem apresentando consequências cada vez mais graves para a saúde da população. A obesidade é definida como uma condição inflamatória crônica que envolve deposição excessiva de tecido adiposo, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e fatores de crescimento que vem sendo associados a patologias relacionadas a idade como as doenças neurodegenerativas (1). Apesar de grande parte dessas doenças surgir em idosos, a demência descrita como quadro de natureza progressiva caracterizada pela deterioração das capacidades cognitivas e que geralmente é acompanhada de transtornos neurológicos, não é considerada um aspecto normal do envelhecimento. Entretanto, o número de pessoas com demência vem crescendo alarmantemente de acordo com os últimos dados epidemiológicos onde 47,5 milhões de pessoas são afetadas e existem cerca de 7,7 milhões de novos casos a cada ano, levando-nos a acreditar que existem outros fatores contribuindo para o desenvolvimento e até mesmo para o início precoce das

doenças neurodegenerativas (OMS, abril de 2016). A obesidade foi recentemente descrita como elemento sinérgico do envelhecimento para danos cerebrais relacionado com o declínio das funções cognitivas e também é conhecida por aumentar o risco de transtornos neurológicos como apneia do sono, ansiedade, depressão, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (2-4). Além disso, indivíduos com sobrepeso ou obesos apresentam alterações na morfologia do cérebro, com reduções no volume cerebral e atrofia em regiões específicas (5, 6).

1.2 OBESIDADE E NEUROINFLAMAÇÃO

Embora existam diferentes hipóteses para o risco aumentado na obesidade, todas elas convergem para um papel importante da neuroinflamação e possível vulnerabilidade do cérebro, especialmente da barreira hematoencefálica a insultos subsequentes (7). Sabe-se que o tecido adiposo exerce papel chave para o desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau devido a uma elevada produção de marcadores inflamatórios (8). Contudo, os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 assim como de fatores de crescimento também são encontrados elevados no cérebro de animais submetidos a dieta hiperlipídica (2). Esse acúmulo de citocinas e mediadores inflamatórios vem sendo descrito em muitas complicações neurológicas associadas ao processo neurodegenerativo os quais apresentam correlação com prejuízos em mecanismos relacionados a memória e aprendizagem (9). A hiperglicemia encontrada em pessoas obesas é responsável pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que por sua vez, estão associadas a diversas doenças neurológicas

(10). Em geral, as evidências sugerem que as comorbidades associadas a obesidade contribuem de forma significativa para o déficit cognitivo e para acelerar o processo de desenvolvimento de demência (11).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa de maior gravidade e prevalência entre a população idosa, caracterizada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* e redução da síntese e propagação da dopamina (DA) em outras regiões da via nigroestriatal, como estriado e área tegmental ventral (12). Clinicamente, a DP é identificada por irregularidades no comportamento motor representado por uma elevada produção de tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural associadas à deficiência de dopamina, assim como sintomas não motores como ansiedade, comprometimento cognitivo e depressão (13). O início e progressão da DP é dependente de eventos celulares como falhas nas maquinarias de degradação proteica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, defeitos de autofagia mitocondrial (mitofagia) e do acúmulo contínuo de uma proteína pré-sináptica envolvida na regulação da liberação de neurotransmissores denominada alfa-sinucleína (α -Syn), principal constituinte dos corpos de Lewy (14-17). Na maioria dos casos, as manifestações clínicas só aparecem quando há uma perda significativa de neurônios na *substantia nigra pars compacta*, cerca de 50-70% e aproximadamente 80% da dopamina do estriado é esgotada (18-20). A queda da dopamina é responsável pelas deficiências motoras observadas durante o desenvolvimento da DP, sendo a dopamina um neurotransmissor essencial no

controle motor. A extensa degeneração e atrofia dos neurônios dopaminérgicos ocorre em outros tipos de células nervosas e de regiões do cérebro com o avanço da DP. As regiões afetadas incluem o hipocampo, tálamo e neocórtex. Essa neurodegeneração adicional leva a sintomas não motores que incluem insônia, depressão, psicose e transtorno cognitivo (21, 22). Os sintomas não motores pioram ao longo do tempo e estima-se que 80% dos pacientes com DP com comprometimento cognitivo leve desenvolvem demência (23, 24). Diversos fatores ambientais foram associados ao surgimento dos sintomas da DP, incluindo insultos vasculares cerebrais, estresse oxidativo, neurolépticos, exposição a metais pesados e pesticidas (25).

1.4 DOENÇA DE PARKINSON, OBESIDADE E INTERVENÇÕES DIETÉTICAS

Estudos epidemiológicos e clínicos sugerem uma importante associação entre a ingestão dietética, elevado índice de massa corporal, deposição de gordura e diabetes tipo 2 como fatores de risco para o desenvolvimento da DP, muito embora os resultados permaneçam inconclusivos (26-31). A obesidade e a resistência à insulina induzidas por dieta têm sido implicadas na depleção de dopamina (DA) nigroestriatal em modelo animal de DP, sugerindo uma maior vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos ao ataque de toxinas em resposta a perturbações metabólicas (32). Corroborando com os níveis diminuídos de DA, estudos mostram que o receptor D2 de dopamina estriatal também encontra-se diminuído em indivíduos obesos possivelmente resultante de transtornos alimentares (33). De fato, animais com pré-disposição a obesidade apresentam prejuízo no sistema dopaminérgico (34). Os

mecanismos responsáveis pelo processo neurodegenerativo ainda não estão claros, contudo a neuroinflamação mediada pela ativação da microglia, o estresse oxidativo, o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e fatores inflamatórios tem atraído bastante atenção na patogênese da DP (35-38). A proliferação de células da microglia e aumento da sinalização inflamatória dá início à morte precoce de neurônios dopaminérgicos nas regiões do eixo nigroestriatal seguida por diminuição da expressão de tirosina hidroxilase (TH), uma enzima limitante para formação de L-DOPA e biossíntese de dopamina (36). A expressão e ativação da TH são encontradas diminuídas na *substantia nigra* de pacientes com PD avaliados após a morte e tem sido diretamente associada a diminuição nos níveis de DA nessa região (39). Trabalhos apontam para um papel importante do estresse oxidativo / nitrosativo na inativação da TH (40). Interações entre TH e a α -Syn também estão descritas e relacionadas com o comprometimento da neurotransmissão dopaminérgica (41, 42). A agregação de α -Syn representa um dos mecanismos mais importantes em doenças neurodegenerativas, incluindo a DP, embora seu papel preciso no processo patogênico seja pouco compreendido (17). Os efeitos da α -Syn estão associados com a ativação da microglia após a hiperfosforilação da Tau, uma proteína de ligação de microtúbulos que se acumula em distúrbios neurodegenerativos resultando na formação de emaranhados neurofibrilares, agregados hidrofóbicos insolúveis potencialmente neurotóxicos que comprometem a integridade dos neurônios e o transporte axonal (43). Interessantemente, a obesidade tem sido considerada relevante para a progressão de patologias relacionadas à proteína Tau e contribui para o surgimento precoce de neurodegeneração em animais transgênicos para α -Syn

e um tempo de vida reduzido (44, 45). No entanto, ainda não há evidências consistentes que demonstrem uma associação entre a obesidade e danos neuronais que, por sua vez, pode colaborar no processo de desenvolvimento da DP.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A proposta do presente estudo teve por objetivo investigar o efeito da obesidade e resistência à insulina sobre parâmetros relacionados à doença de Parkinson na via nigroestriatal de ratos submetidos a uma dieta de alto teor de gordura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre alterações em parâmetros metabólicos de intolerância à glicose e resistência à insulina em ratos.
- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no plasma e cérebro de ratos.
- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre o imunocconteúdo de sinaptofisina, tirosina hidroxilase, alfa-sinucleína e p-Tau na via nigroestriatal de ratos.

- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os níveis dos grupos sulfidril e nitrotirosina na via nigroestriatal de ratos.

- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a imunofluorescência de GFAP, Iba1, NeuN e TH na *substantia nigra* de ratos.

- verificar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre parâmetros comportamentais de locomoção, mobilidade, ansiedade, memória e coordenação motora de ratos.

Parte II

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Noventa e seis ratos Wistar machos de 28 dias (90-110 g) provenientes do Instituto de Ciências Básicas de Cuidados com Animais UFRGS foram mantidos em caixas coletivas (quatro por caixa), em sala de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 h e água da torneira ad libitum. Os animais foram distribuídos randomicamente em dois grupos alimentares: o grupo controle (CTRL) que recebeu uma dieta padrão (10% de energia da gordura) ou grupo que recebeu uma dieta rica em gordura (HFD do inglês *high-fat diet*, 43% de energia a partir de gordura) preparadas no laboratório de acordo com a composição de estudo anterior ([46](#)) durante um período de 25 semanas. A ingestão alimentar foi avaliada semanalmente e a intolerância à glicose e resistência à insulina foram avaliadas no final da intervenção dietética. Os ratos foram submetidos a testes de comportamento uma semana antes da morte e o líquido cefalorraquidiano (LCR) foi extraído e congelado para análise posterior. Imediatamente após a morte dos animais, as amostras de plasma foram coletadas e a *substantia nigra* (SN), área tegmental ventral (VTA) e estriado (ST) foram extraídos, pesadas e mantidos em nitrogênio líquido para determinar os níveis de proteínas específicas por Western Blot e medidas de estresse oxidativo ou fixados com paraformaldeído 4% e separado em fatias para realizar a detecção de proteínas específicas por imunofluorescência. As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) foram medidas no fígado, tecido adiposo, cérebro e plasma para avaliar o perfil inflamatório. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de

Animais de Laboratório (NIH publicação número 80-23 revisto em 1996) e foram realizados de acordo com as determinações do Conselho Brasileiro para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas de Ciências de Cuidados e Experimentação Animal (CEUA-UFRGS número 29493).

3.2 COLETA DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Após 21 semanas de intervenção dietética, os ratos em jejum foram anestesiados com inalação de isoflurano (Forane®, Abbott SA, Buenos Aires, 3% de fluxo de oxigênio 0,5 L / min) utilizando um vaporizador calibrado e em seguida colocados em um aparelho estereotáxico. O LCR foi coletado (100 µL) perfurando diretamente a cisterna magna com uma seringa de insulina (Begg, May et al., 2015). As amostras foram centrifugadas (16 000 g a 4° C durante 10 min) e armazenadas a -80° C para análise posterior.

3.3 IP-GTT, IP-ITT E INSULINA EM JEJUM

Para determinar os efeitos da HFD sobre a resistência à insulina, realizou-se o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IP-GTT) e o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (IP-ITT) com 12h de jejum após 21 semanas de dieta. Para estabelecer valores basais de glicose, amostras de sangue foram coletadas por punctura da veia da cauda. Para o IP-GTT foram colhidas amostras de sangue a 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração

de glicose (1 g / kg i.p.). Para o IP-ITT foram colhidas amostras de sangue a 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de insulina regular humana (Novolin® R Novo Nordisk - 2IU / kg i.p.). A área incremental sob a curva (AUC) foi calculada em relação aos valores basais. Para a medição de insulina, as amostras de plasma e de LCR de ratos em jejum foram separadas e mantidas a -80° C para análise posterior por ELISA (kit Mercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA). A avaliação do modelo homeostático da resistência à insulina (HOMA-IR), uma equação que estima a sensibilidade à insulina foi calculada de acordo com a fórmula: glicose em jejum (mmol/L) x insulina em jejum (mU/L) / 22,5 (47).

3.4 TNF- α , IL-1 β E NÍVEIS DE NITROTIROSINA

Para avaliar a resposta inflamatória induzida pela obesidade, mediu-se TNF- α e IL-1 β no fígado, tecido adiposo retroperitoneal, estriado (BRAIN) e plasma por ELISA indireta (48). Para os danos nitrosativos os níveis de nitrotirosina cerebral foram medidos nas amostras de SN, VTA e ST. Uma porção dos tecidos foram homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) e colocados em placas de ELISA (100 ug por poço) por 24 h de incubação a 4° C. Após lavar três vezes com solução salina tamponada com Tween-Tris (TTBS, Tris-HCl 100 mM, NaCl a 0,9% e Tween-20 a 0,1%, pH 7,5), adicionaram-se 200 μ L de anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou Anti-nitrotirosina (1: 1000) em cada poço contendo as amostras as quais foram incubadas durante 3 horas à temperatura ambiente agitando a 50 rpm. A placa foi lavada e incubada

com anticorpo secundário ligado a peroxidase de IgG de coelho (1: 2000) durante 1 h. A reação foi iniciada com 200 µL de solução de substrato (kit de detecção espectrofotométrica de ELISA TMB) e foi interrompida após 15 minutos com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 12 M. A placa foi lida a 450 nm.

3.5 ANÁLISE DE WESTERN BLOT

A imunodeteção de proteínas foi realizada por análise de Western Blot. As amostras de SN, VTA e ST (~100 mg) foram homogeneizadas em tampão RIPA 1x (150 mM de cloreto de sódio, 1,0% de NP-40 ou Triton X-100, 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 50 mM de Tris, contendo inibidores de protease e fosfatase (100 mM de PMSF, 1 mM de ortovanadato de sódio). A concentração de proteína de cada tecido extraído foi estimada pelo método de Bradford (49) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA - Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, SDS a 1% (p / v), glicerol a 10% (v / v) a pH 6,8) e quantidades iguais de proteína (40 µg/well) foram fracionadas e submetidos a SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida a 12% ou 15% (50), e em seguida transferidos para membranas de nitrocelulose (célula de transferência semi-seca Trans-blot SD, BioRad). As membranas foram bloqueadas com leite a 5% e incubadas durante a noite a 4° C com anticorpos primários (anti-sinaptofisina, anti-tirosina hidroxilase, anti-fosfo-Tau, anti-Tau, anti- α -sinucleína, anti-b-actina 1: 1000) e lavadas com TTBS três vezes. Incubou-se anticorpo secundário ligado a peroxidase anti-coelho ou anti-IgG de camundongo (1: 2000) durante 1 h à temperatura ambiente. A imunorreatividade foi detectada por

quimioluminescência melhorada utilizando o kit Supersignal West Pico Chemiluminescent da Thermo Scientific (Luminol / Enhancer e Stable Peroxide Buffer). A área da faixa traçada foi normalizada para a densidade de fundo e expressa como o produto da densidade de banda e área que foi quantificada por Image J. Software.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Ratos Wistar machos (4 por grupo) foram anestesiados utilizando injeção de ketamina/xilazina intraperitoneal (75 e 10 mg/kg, respectivamente) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com 40 ml de solução salina a 0.9% e 40 ml de paraformaldeído a 4% em PBS 0.1 M e em seguida a aorta descendente foi clampeada. Após a perfusão os cérebros inteiros foram removidos, pós fixados na mesma solução de fixação por 4 h em temperatura ambiente e crioprotégidos por imersão de solução de sacarose a 15% e 30% em PBS a 4° C. Os cérebros foram então congelados por imersão em isopentano arrefecido com CO₂ e armazenados em -80° C para análises posteriores. Prepararam-se fatias cortadas em série (50 µm) da substância nigra obtidas a partir de tecido cerebral fixado e congelado. As fatias foram incubadas durante duas noites com anticorpo policlonal (coelho), policlonal de tirosina hidroxilase, anti-Iba1 (molécula 1 de adaptador de ligação de cálcio ionizado, marcador de microglia), (cabra), anti- GFAP (proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito), (coelho), e/ou clones anti-NeuN clone A60 (núcleo neuronal marcador neuronal), (rato), cada um diluído (1: 1000) em solução de PBS-Triton (0,1 M PBS pH 7,4, 0,3% Triton X-100, 2% BSA). Os

controles negativos foram realizados omitindo os anticorpos primários. Após lavagem várias vezes com tampão PBS pH 7,4, as fatias de tecido foram incubadas com Alexa 488 anti-coelho e Alexa 568 anti-rato (1: 500) durante 1 h à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas com um microscópio FV-1000 confocal da Olympus IX-81 e analisadas no software Olympus Fluoview.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRIL

O estado oxidativo dos grupos tiol foi avaliado por quantificação de grupos sulfidril (SH) reduzidos totais em amostras de SN, VTA e ST (51). Para a medição do conteúdo total de SH, a alíquota de amostra (60 µg por poço) foi diluída em tampão PBS pH 7,4 e ácido 5,50-ditionitrobi-2-nitrobenzóico (10 mM). Após 60 min de incubação, a placa foi lida a 412 nm.

3.8 TESTES DE COMPORTAMENTO

Teste de Campo Aberto. A locomoção espontânea, a atividade exploratória e o perfil de ansiedade foram avaliados simultaneamente em um teste de campo aberto (52). Os animais foram colocados no centro do aparelho constituído por um campo aberto retangular preto (50 cm³) e deixados a explorar livremente a área durante 10 min. O experimento foi realizado em 2 ensaios: treinamento e sessão de teste separados por 24 h. A distância total percorrida, a distância percorrida na zona central, o tempo total imóvel, os episódios imóveis e o número de levantamentos (sobre as patas traseiras sem as patas pressionadas contra a parede da arena) foram registados para cada

animal utilizando o software *video-tracking* ANY-Maze. Foi realizada a correlação entre a distância total percorrida x peso corporal ou imunoconteúdo de tirosina hidroxilase de cada animal.

Teste claro / escuro. Para analisar o perfil de ansiedade, realizou-se a teste claro/escuro. O aparelho de teste claro/escuro consiste de uma caixa de acrílico retangular contendo dois compartimentos separados. Um compartimento possui paredes pretas e um piso preto (sem iluminação) com um tamanho de 21 x 35 x 41 cm (altura x comprimento x largura). O outro possui paredes brancas e um piso branco, com um tamanho de 21 x 45 x 41 cm (altura x comprimento x largura, iluminado por uma lâmpada de 100 W colocada a 45 cm acima do centro da caixa). Uma abertura de 8 x 5 cm (altura x comprimento) une ambos os compartimentos. Cada rato foi colocado no compartimento de luz voltado para fora da abertura e deixado a explorar a caixa durante 5 min. O número de transições entre compartimentos, o tempo no compartimento claro e o comportamento de avaliação de risco (R.A.B, número de vezes que o focinho e duas patas dianteiras estenderam-se para a caixa clara) foram analisados pelo software ANY-Maze.

Reconhecimento de objetos. O teste de reconhecimento de objetos foi realizada no mesmo aparelho do teste de campo aberto e conduzida como anteriormente descrito (53). Durante as sessões de amostragem, os ratos foram colocados no aparelho experimental na presença de dois objetos idênticos (A, A ') para explorar durante 10 min. Depois disso, os ratos foram devolvidos à sua caixa doméstica durante 24 h com água e alimentos fornecidos ad libitum. No dia seguinte, a sessão de teste foi realizada substituindo um dos objetos conhecidos por um novo objeto (B). O tempo de

exploração total (T) de cada objeto foi registrado. A razão de discriminação foi calculada de acordo com a fórmula: $(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}}) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$.

Rotarod. Alterações na coordenação motora foram avaliados por meio de um aparelho *rotarod* constituído por uma haste estriada que fornece uma boa aderência (diâmetro: 3 cm), separada em quatro compartimentos (largura: 8,5 cm) e localizada a 27,2 cm acima da grade do piso. Os animais foram treinados durante 2 dias (8 RPM durante 120 s) até que demonstraram a capacidade de permanecer no fuso durante 60 s e em seguida submetidos a um teste com aceleração (4-40 rpm durante 300 s) (Madeo, Schirizzi et al., 2014). O tempo em que cada rato permaneceu no sobre a haste foi registrado.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste *t Student* de duas vias. Para a comparação de múltiplas medidas, aplicou-se ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. A relação entre o peso corporal total e a distância total percorrida ou o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase foram analisadas pela correlação de Pearson. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ calculado no software GraphPad Prisma para Windows versão 7.01.

4. RESULTADOS

4.1 A DIETA HIPERLIPÍDICA INDUZIU OBESIDADE, INTOLERÂNCIA À GLICOSE, RESISTÊNCIA À INSULINA E AUMENTO DO ESTADO INFLAMATÓRIO.

Para avaliar o efeito da dieta rica em gordura na composição corporal, medimos o ganho de peso corporal dos ratos semanalmente. As diferenças no ganho de peso corporal entre os grupos podem ser observadas à partir da 13 semana de dieta (Fig. 1C, $p < 0,001$). Vinte e cinco semanas de dieta com alto teor de gordura resultaram em um aumento de 19,2% no peso corporal total dos ratos do grupo HFD quando comparados ao grupo CTRL que recebeu uma dieta padrão (Fig. 1C, $p < 0,0311$). Este aumento do peso corporal foi associado a uma maior ingestão energética (kJ) decorrente da dieta, embora a ingestão de alimentos em gramas tenha sido menor (Fig. 1A-B, $p < 0,0349$). Além disso, alterações na massa de tecidos foram encontradas nos ratos HFD-obesos com um aumento no percentual de gordura corporal do tecido adiposo retroperitoneal ($306 \pm 191\%$), epididimal ($105 \pm 22\%$), tecido adiposo marrom ($161 \pm 87\%$) e fígado ($32 \pm 11\%$, Fig. 1D-E) quando comparado ao grupo CTRL, possivelmente devido a um aumento na deposição de gordura neste tecido (fígado graxo), confirmando a resposta esperada da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferenças significativas de massa muscular e cerebral entre os grupos (Fig. 1D). Além disso, avaliaram-se os efeitos da obesidade sobre a intolerância à glicose e resistência à insulina detectada pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IP-GTT), teste de tolerância à insulina intraperitoneal (IP-ITT), glicemia de jejum e insulina plasmática no final da intervenção dietética. Como esperado, a dieta

hiperlipídica resultou em níveis elevados de glicose em jejum e insulina, bem como do HOMA-IR (Fig. 1F-H, $p < 0,01$). Por outro lado, a mesma dieta mostrou ser incapaz de induzir alterações nos níveis de insulina no LCR diante da nossa incapacidade de detectar insulina nestas amostras. Observou-se hiperglicemia nos ratos HFD-obesos 30 minutos após a administração da solução de glicose no IP-GTT, que por sua vez permaneceu significativamente elevado até 60 minutos e retornou aos níveis basais após 120 minutos. Nenhuma alteração foi encontrada nos níveis de glicose do grupo CTRL (Fig. 1I, $p < 0,01$). De forma semelhante, os níveis de glicose permaneceram elevados nos ratos HFD-obesos após a administração de insulina em todos os pontos de tempo avaliados no IP-ITT (Fig. 1, $p < 0,01$), demonstrando que a dieta induziu acentuadamente a lesão do receptor de insulina. Além disso, a área sob a curva de ambos os testes aumentou significativamente nos ratos obesos em comparação ao grupo CTRL (Fig. F-G, $p < 0,05$). Também avaliamos a resposta inflamatória da dieta por ELISA. Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram significativamente mais elevados nos tecidos adiposos branco retroperitoneal, fígado, ST e plasma dos ratos HFD-obesos em relação ao grupo CTRL (Fig. 2A-B, $p < 0,05$). Estes resultados indicaram um efeito pró-inflamatório sistêmico da obesidade e bem como um aumento do estado inflamatório no cérebro desses animais representados pela amostra de estriado.

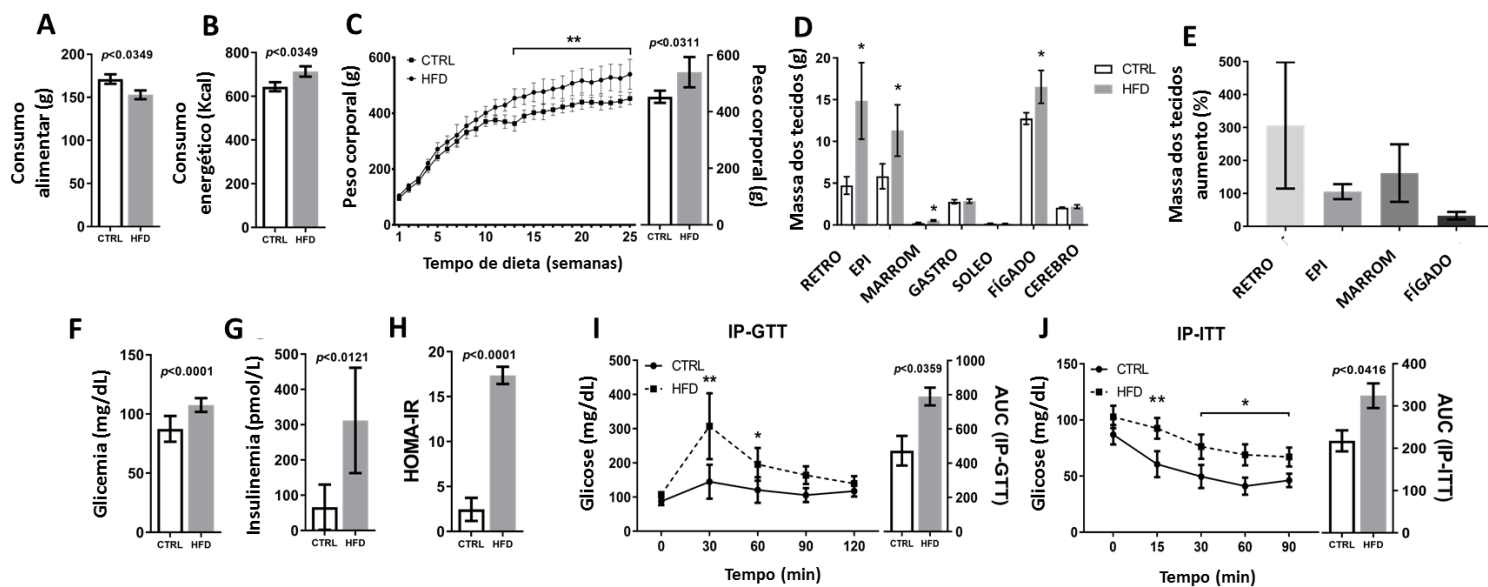


Figura 1. Parâmetros metabólicos da obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica. A) consumo alimentar total B) consumo energético total C) Ganho de peso corporal semanal e peso corporal total D) massa corporal dos tecidos adiposo branco retroperitoneal, adiposo branco epidídimo, adiposo marrom, músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, fígado e cérebro E) aumento de massa dos tecidos em % F) concentração de glicose em jejum (mg / dL) G) concentração de insulina em jejum (pmol / L) e H) HOMA-IR I) teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IP-GTT) e área sob a curva entre 0 min E 120 min J) teste de tolerância à insulina intraperitoneal (IP-ITT) e área sob a curva entre 0 min e 90 min de ratos submetidos a 25 semanas de dieta rica em gordura (HFD) em relação ao controle (CTRL). Os dados estão expressos em média \pm DP (n = 10 / grupo). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs grupo CTRL. As diferenças estatísticas para múltiplas medidas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey. Para comparações intergrupo, os valores de p foram obtidos aplicando o teste *t Student* de duas vias ($p < 0,05$).

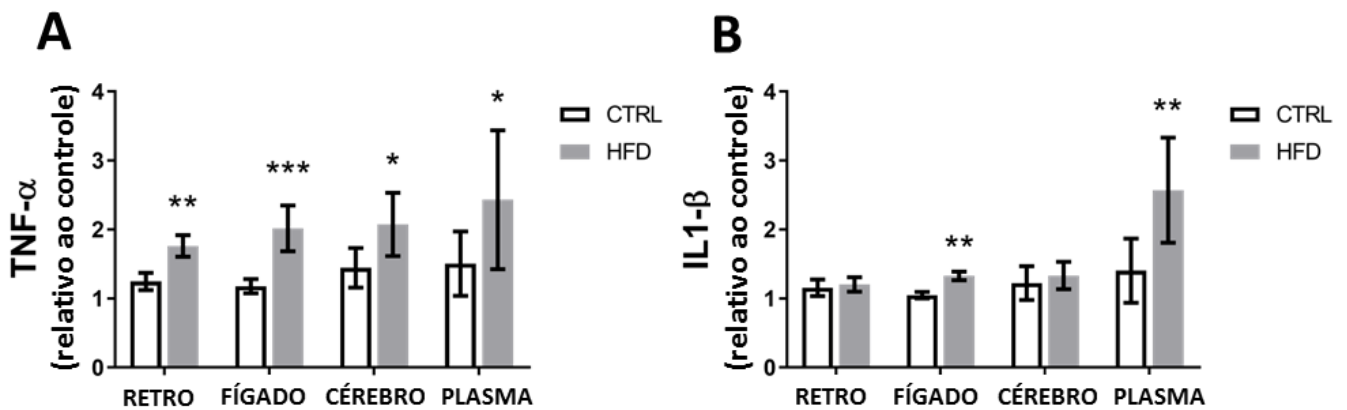


Figura 2. A dieta hiperlipídica induziu aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Análise dos níveis das citocinas A) TNF- α e B) IL-1 β no tecido adiposo branco retroperitoneal, fígado, estriado (CÉREBRO) e plasma de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD). Os dados estão expressos em média \pm DP (n = 10 / grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs grupo controle (CTRL). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey (p < 0,05).

4.2 A OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS PROTEICOS DE TIROSINA HIDROXILASE E SINAPTOFISINA NA VIA NIGROSTRIATAL.

Para determinar se a obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura afeta a expressão de parâmetros clássicos da doença de Parkinson no eixo nigroestriatal e área tegmental ventral, os níveis de sinaptofisina, tirosina hidroxilase, p-Tau, Tau total e α -sinucleína foram medidos por *immunoblotting*. A tirosina hidroxilase é uma enzima essencial para a síntese de dopamina e também tem sido utilizada como principal indicador de morte de neurônios

dopaminérgicos (54). O conteúdo proteico de tirosina hidroxilase foi marcadamente reduzido nas amostras de SN, VTA e ST dos ratos HFD-obesos quando comparado ao grupo CTRL (Fig. 3A, E, I, $p < 0,05$), sugerindo que houve uma neurodegeneração dopaminérgica significativa induzida pela obesidade. Surpreendentemente, houve um aumento no imunocntéudo de sinaptofisina na SN e VTA dos ratos HFD-obesos (Fig. 3B; F, J, $p < 0,05$), indicando uma possível reorganização sináptica nestas regiões específicas. Não foram encontradas diferenças no conteúdo proteico de Tau total, p-Tau e de α -sinucleína (Fig. 3C-D, G-H, K-L).

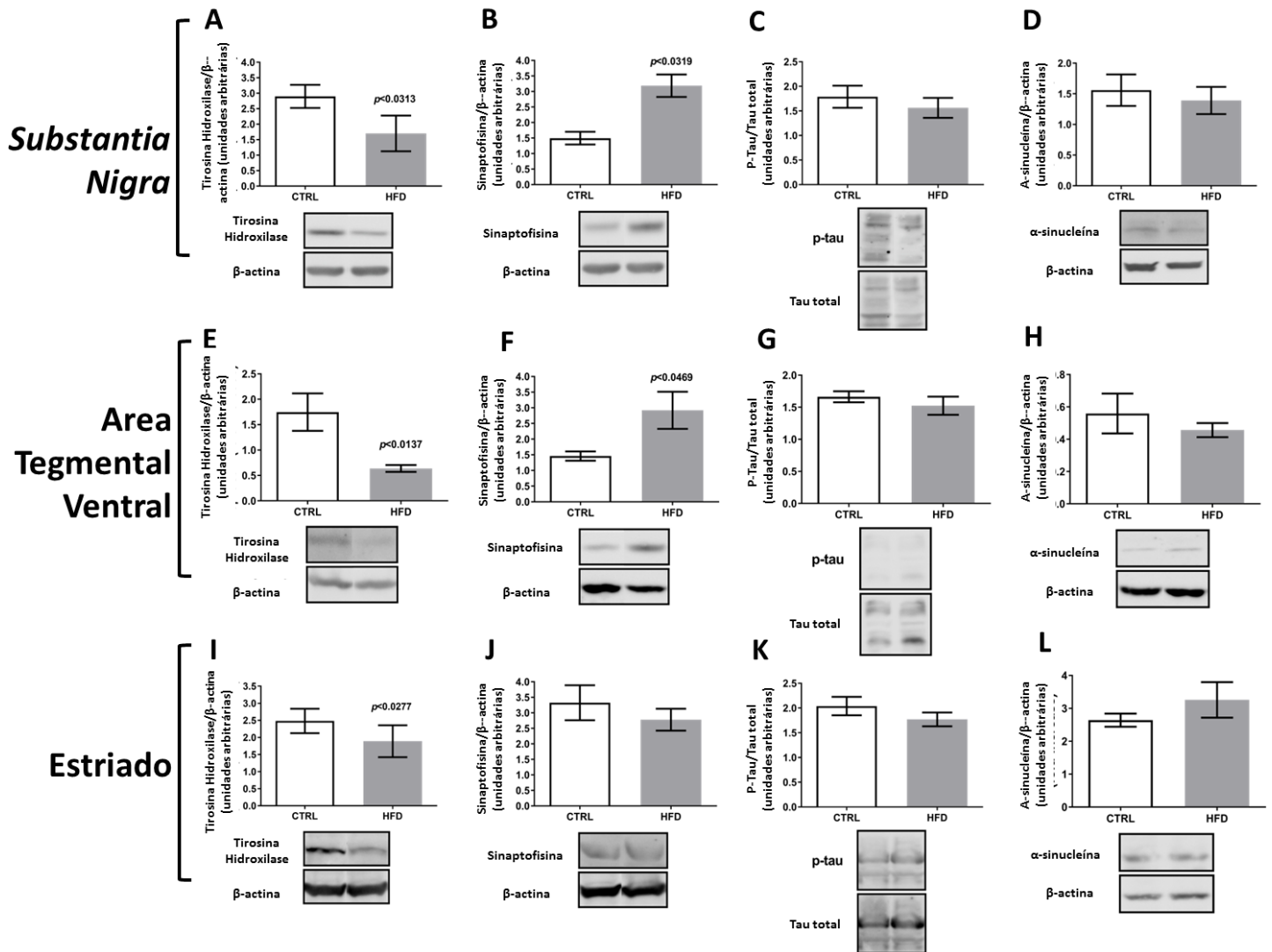


Figura 3. A obesidade induzida por dieta promoveu alterações no conteúdo proteico de tirosina hidroxilase e sinaptofisina na via nigrostriatal. Detecção por *immunoblotting* do conteúdo proteico de tirosina hidroxilase, sinaptofisina, p-Tau e α -sinucleína na *substantia nigra* (A-D) área tegmental ventral (E-H) e (I-L) de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD) vs grupo de controle (CTRL). Os dados estão expressos em média \pm EPM (n = 7 / grupo). Os valores de p foram obtidos aplicando o teste *t Student* de duas vias ($p < 0,05$).

4.3 A IMUNOHISTOQUÍMICA INDICOU NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA E ATIVAÇÃO DA MICROGLIA EM RESPOSTA A DIETA HIPERLIPÍDICA.

Para investigar se a obesidade promove neurodegeneração, morte de neurônios dopaminérgicos, astrogliose e / ou alterações na atividade de células microgliais, realizamos análise de imunofluorescência em fatias de amostras de SN obtidas por cortes de cérebros congelados de ratos submetidos a uma dieta rica em gordura. Inicialmente examinamos o estado de astrogliose e ativação de microglia utilizando anticorpos de GFAP e Iba1, respectivamente. Os resultados apontaram para um aumento na imunofluorescência de Iba1 nas fatias de SN de 3 dos 4 ratos HFD-obesos avaliados até o presente momento e nenhuma diferença foi obtida entre os grupos para GFAP (Figura 4). Em seguida, avaliamos a morte neuronal e a morte dos neurônios dopaminérgicos utilizando anticorpos de NeuN e TH. Não foram observadas diferenças para NeuN entre os grupos embora tenha sido detectada uma evidente diminuição da expressão de TH nas fatias de SN dos 4 ratos HFD-obesos avaliados até o presente momento quando comparados ao grupo CTRL (Fig. 4), corroborando com os resultados da análise por WB (Fig. 3A).

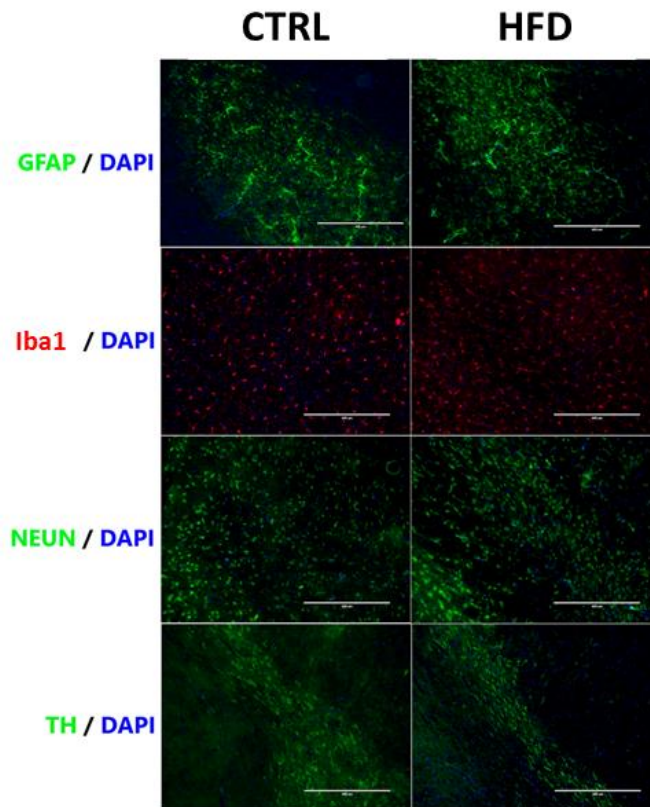


Figura 4. A imunohistoquímica indicou neurodegeneração dopaminérgica e ativação da microglia em resposta à dieta hiperlipídica. O painel obtido por microscopia confocal indica morte de neurônios dopaminérgicos sem diferenças na detecção de morte neuronal total bem como para ativação da microglia na ausência de astrogliose indicada por coloração com TH, NeuN, Iba1 e GFAP (respectivamente) na *substantia nigra* de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD) vs grupo de controle (CTRL). Imagens representativas de 4 animais. (Ampliação do painel em 10X).

4.4 NITRAÇÃO DE TIROSINA E DEPLEÇÃO DO CONTEÚDO DE TIOL LIVRE NA VIA NIGROSTRIATAL EM RESPOSTA À DIETA HIPERLIPÍDICA.

Os parâmetros dos danos nitrosativos e oxidativos foram quantificados nas amostras de SN, VTA e ST dos ratos HFD-obesos. Os níveis de

nitrotirosina foram maiores no VTA e ST dos ratos obesos (Fig. 5A, $p < 0,05$). Além disso, a dieta rica em gordura resultou em uma diminuição dos grupos tiol livres no eixo nigroestriatal, mas não foi detectada nenhuma alteração na amostra de VTA ($p < 0,05$), demonstrando que a obesidade induz um aumento da nitração de tirosina e oxidação do sulfidril que conduzem à formação de ligações dissulfureto seguida de uma depleção do teor de tiol livre, que por sua vez pode estar diretamente ligado aos níveis reduzidos de tirosina hidroxilase presentes no cérebro de ratos HFD-obesos.

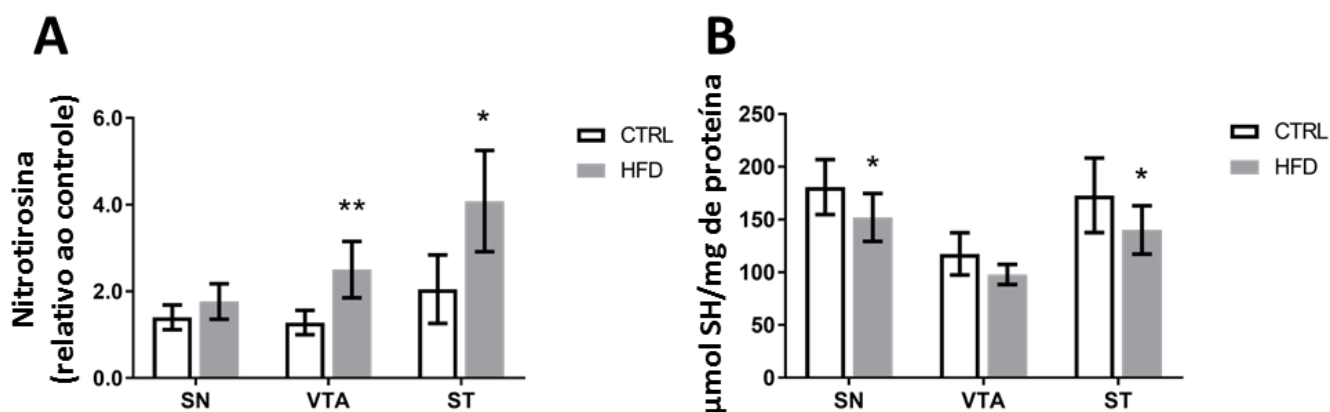


Figura 5. Nitração de tirosina e depleção do conteúdo tiol livre na via nigrostriatal em resposta à dieta hiperlipídica. Detecção de A) nitrotirosina e B) grupos livres de tiol (sulfidril, SH) quantificação na *substantia nigra* (SN), área tegmental ventral (VTA) e estriado (ST) de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD). Os dados estão expressos em média \pm DP ($n = 10$ / grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs grupo controle (CTRL). As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

4.5 A DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVEU A PIORA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO, MAS NÃO AFETOU A MEMÓRIA E COORDENAÇÃO MOTORA.

Para identificar possíveis alterações na atividade locomotora e padrão de comportamento associado à perda de tirosina hidroxilase, foram realizados alguns testes comportamentais. A obesidade induzida pela dieta hiperlipídica produziu um efeito negativo na distância total percorrida no treinamento em campo aberto melhor observada nos três primeiros minutos, sem apresentar diferenças no teste em campo aberto (Fig. 6C, $p < 0,05$). Cada minuto de distância percorrida em campo aberto foi apresentado (Fig. 6A-B, $p < 0,05$). Não houve diferença na distância percorrida na zona central entre os grupos e, portanto, nenhuma caracterização do comportamento ansioso neste teste (Fig. 6G). Corroborando com os resultados de diminuição da locomoção espontânea, o número de episódios imóveis e o tempo total imóvel foi maior assim como número de levantamentos que foi significativamente menor nos ratos HFD-obesos quando comparado ao grupo CTRL (Fig. 6E-F, $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças na correlação entre a distância total percorrida no treinamento em campo aberto com o peso corporal, demonstrando que a diminuição da locomoção total e da mobilidade não pode ser associada ao aumento do peso corporal dos ratos obesos (Fig. 6I). Em contraponto, houve uma correlação significativa entre a diminuição da distância total percorrida no treinamento em campo aberto com baixos níveis de tirosina hidroxilase nos ratos HFD-obesos (Fig. 6J, $p < 0,0212$; $r = 0,6291$), confirmando a associação efetiva entre obesidade e neurodegeneração dopaminérgica. Os resultados encontrados no teste claro / escuro mostraram efeito tipo ansioso da

dieta rica em gordura, apresentado por um número diminuído de transições entre os compartimentos, tempo que o animal permaneceu no compartimento claro e comportamento de avaliação de risco dos ratos HFD-obesos (Fig. 7A-C, $p < 0,05$). No entanto, estes resultados podem ter sido influenciados pela diminuição na mobilidade destes animais observada na tarefa em campo aberto. No teste de reconhecimento de objetos não se verificou prejuízo da memória nos ratos obesos. Na sessão de teste, não houve diferença significativa no tempo gasto entre objeto familiar e objeto novo (Fig. 8A-B).

Para testar a coordenação motora, os ratos foram treinados em *rotarod* durante 2 dias consecutivos. Observou-se diferenças no tempo permanecido na haste de rotação nos ratos HFD-obesos em relação ao grupo CTRL durante a primeira exposição dos animais (dados não registrados). No entanto, ambos os grupos melhoraram a sua capacidade de permanecer sobre a haste rotativa em função do número de ensaios e, devido a isto, a velocidade de aprendizagem motora foi semelhante entre os grupos no teste (Figura 8C).

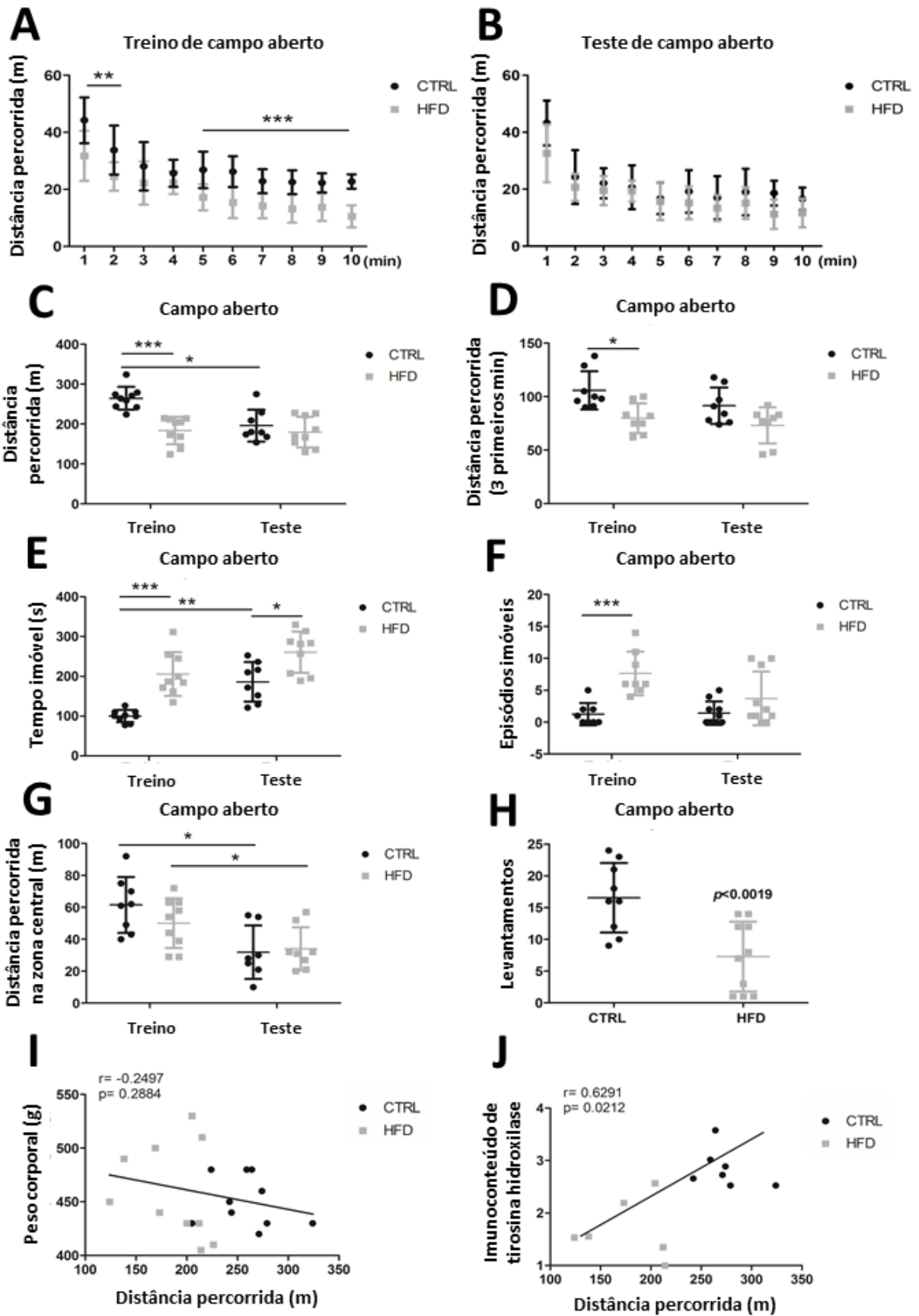


Figura 6. A dieta hiperlipídica promoveu a piora da atividade locomotora. A) minuto a minuto da distância percorrida do treino de campo aberto B) minuto a minuto da distância percorrida do teste de campo aberto C) total de distância percorrida D) distância percorrida nos 3 primeiros E) tempo imóvel F) número de episódios imóveis G) distância percorrida na zona central H) número de levantamentos I) correlação linear entre a distância percorrida total no treino de campo aberto e o peso corporal J) correlação linear entre a distância percorrida total no treino de campo aberto e o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD). Os dados estão expressos em média \pm DP (n = 10 / grupo). *p< 0.05; **p< 0.01; ***p<0.001 vs grupo controle (CTRL). As diferenças estatísticas para múltiplas medidas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey. Para comparações intergrupo, os valores de p foram obtidos aplicando o teste *t Student* de duas vias (p <0,05).

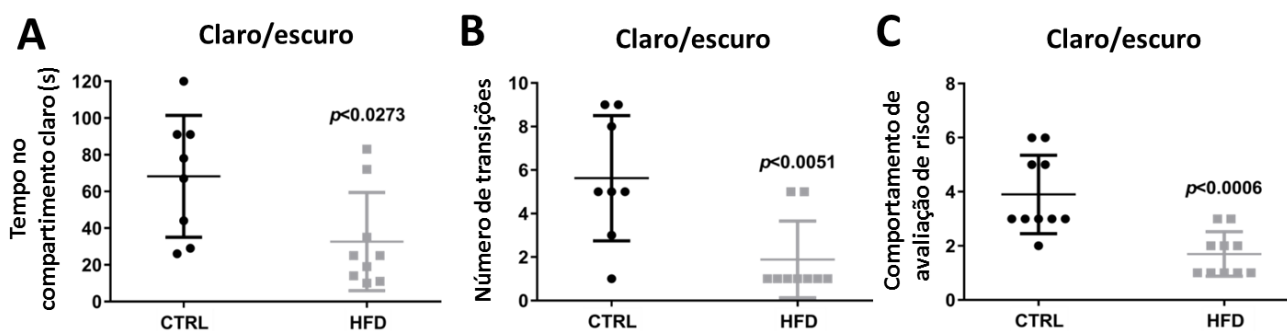


Figura 7. A dieta hiperlipídica provocou alterações no comportamento tipo ansioso. A) tempo permanecido no compartimento claro B) número de transições entre os compartimentos claro/escuro e C) comportamento de avaliação de risco no teste claro/escuro de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD) vs grupo controle (CTRL). Os dados estão expressos em média \pm DP (n = 10 / grupo). Os valores de p foram obtidos aplicando o teste *t Student* de duas vias (p <0,05).

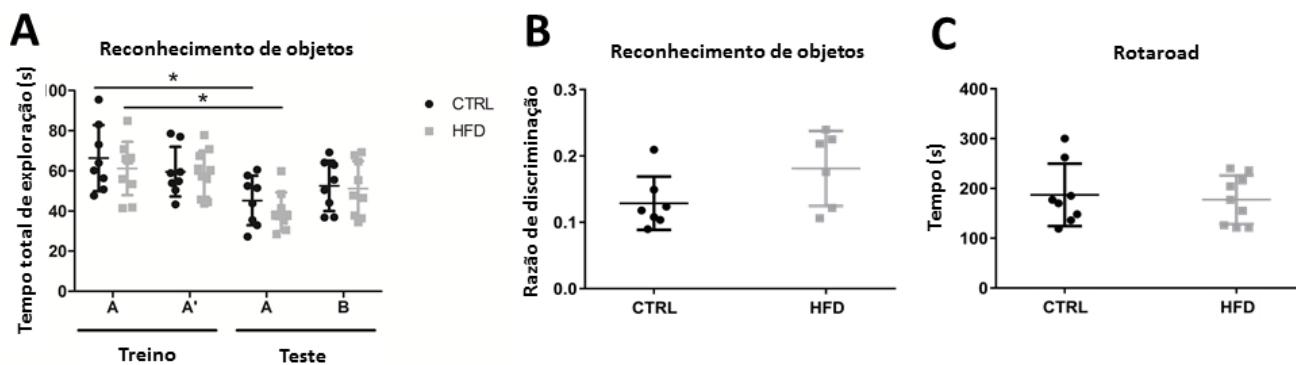


Figura 8. A dieta hiperlipídica não afetou a memória e coordenação motora. A) tempo total de exploração na sessão de treino com objetos idênticos e na sessão de teste com um objeto familiar e um objeto novo B) razão de discriminação da sessão de teste do reconhecimento de objetos e C) teste de *rotarod* após 2 dias de treino de ratos submetidos a 25 semanas de dieta hiperlipídica (HFD). Os dados estão expressos em média \pm DP ($n = 10$ / grupo). * $p < 0.05$ vs grupo controle (CTRL). As diferenças estatísticas para múltiplas medidas foram determinadas por ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Parte III

5. DISCUSSÃO

A disfunção metabólica induzida pela obesidade vem sendo relacionada com o aumento da incidência de demência, comprometimento das funções cognitivas e alterações morfológicas que podem levar à morte neuronal (2, 5). Como muitas dessas alterações são semelhantes às encontradas em pessoas idosas, a obesidade tem sido estabelecida na literatura científica como um fator acelerador do processo de envelhecimento e, portanto, poderia contribuir para o início precoce de doenças neurodegenerativas como a DP através de mecanismos ainda não esclarecidos. Sabe-se que a agregação intraneuronal de α -syn na forma de corpos de Lewy, a neurodegeneração dopaminérgica e consequente deficiência de TH representam a principal característica patológica da DP. No presente estudo, fornecemos evidências de que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz a morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal independentemente de alterações no conteúdo proteico de α -syn, que por sua vez, pode atuar em conjunto com a proteína Tau no processo neurodegenerativo (43, 55). Os níveis reduzidos de TH encontrados em nosso estudo foram particularmente atribuídos a uma maior sinalização inflamatória e estresse oxidativo / nitrosativo no cérebro dos animais obesos, e vem de acordo com dados publicados anteriormente, os quais apontam para a ativação da microglia, inflamação cerebral e estresse oxidativo como as principais causas da neurodegeneração dopaminérgica em modelo animal de PD (36, 56). Além disso, déficits cognitivos associados à obesidade têm sido atribuídos a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e reatividade da microglia (2). Apesar de observamos níveis aumentados de TNF- α e maior imunofluorescência na maior parte das

amostras dos ratos obesos para Iba1, não conseguimos detectar alterações de GFAP na *substantia nigra* nesses animais, indicando que há uma tendência para o aumento na ativação da microglia ocorrendo na ausência de astrogliose. Entretanto, o dado mais inesperado do nosso trabalho foi o aumento na expressão de sinaptofisina como efeito da obesidade, o qual se opõe a achados anteriores que mostram uma redução da plasticidade sináptica em resposta à dieta rica em gordura (57-59). Para nosso entendimento, esse resultado poderia estar indicando uma possível reorganização sináptica do cérebro como mecanismo compensatório para manter os níveis normais de dopamina após a perda de neurônios dopaminérgicos.

Estudos que buscam identificar se a obesidade representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, especialmente a DP, mostram a obesidade induzida por dieta como uma condição agravante à perda de neurônios dopaminérgicos e consequente diminuição nos níveis de dopamina nigral (32, 60). No entanto, este é o primeiro estudo que mostra a redução dos neurônios dopaminérgicos como uma consequência direta da obesidade e alterações metabólicas provenientes da dieta, sem utilizar intervenções com neurotoxinas. Acreditamos que a diminuição dos níveis de TH pode ser claramente observada em nosso trabalho devido ao maior tempo de administração da dieta rica em gordura (25 semanas) quando comparado aos demais estudos, uma vez que a grande maioria opta por um tempo menor. A restrição calórica proporciona um efeito neuroprotetor na DP através de mecanismos envolvendo mediadores metabólicos e também atenua a patologia da doença de Alzheimer associada à melhora do declínio cognitivo relacionado a idade (61, 62). De fato, dietas alternativas, níveis elevados de colesterol e

alterações metabólicas subjacentes tornam-se um fator de risco prognóstico para DP (63-65). As alterações no metabolismo da glicose e nas concentrações de insulina parecem estar intimamente relacionadas com os danos do sistema nervoso central (SNC), em que a hiperinsulinemia crônica e a resistência à insulina vêm sendo associadas ao comprometimento da memória, diminuição dos níveis de neurotransmissores e desenvolvimento de demência (66). Embora se saiba que a insulina pode atuar em diferentes locais do SNC, não encontramos insulina no LCR de nossos animais, possivelmente porque não houve aumento significativo que pudesse ser detectado, sugerindo que a morte dos neurônios dopaminérgicos e as alterações sinápticas observadas na via nigrostriatal são derivadas da neuroinflamação, resistência à insulina, intolerância à glicose e inflamação sistêmica de baixo grau claramente observada nos ratos obesos. Apesar de mostrarmos que as alterações metabólicas induzidas pela obesidade têm causado efeitos lineares para a neuroinflamação e neurodegeneração, as mudanças na dieta têm sido mais recentemente estudadas como uma condição intensificadora de doenças neurodegenerativas causadas pela exposição contínua a fatores ambientais tais como os pesticidas (67). Nesse sentido, a inflamação sistêmica de baixo grau, as mudanças nos mediadores inflamatórios que atuam como sensores de desregulação metabólica sistêmica para o cérebro e consequente estabelecimento de neuroinflamação podem estar atuando como uma chave para desencadear doenças relacionadas à idade, considerando que as comorbidades causadas pela obesidade estão vinculadas ao processo de envelhecimento celular (68).

Embora o nosso estudo tenha como foco a neurodegeneração induzida pela dieta, nossos resultados apontam para consequências mais amplas da obesidade nos padrões de comportamento. A HFD provocou efeitos negativos na locomoção espontânea e mobilidade sem apresentar correlação com o aumento do peso corporal dos ratos obesos. Por outro lado, houve uma correlação significativa entre a redução da atividade locomotora e os baixos níveis de tirosina hidroxilase, demonstrando assim uma ligação notável entre as alterações comportamentais e morte dos neurônios dopaminérgicos. Acreditamos, porém, que esta diminuição da mobilidade pode ter contribuído para os resultados positivos para aumento do comportamento tipo ansioso observado nos ratos obesos devido à dependência de deslocamento na tarefa claro / escuro. Surpreendentemente, não foi possível detectar alterações na coordenação motora embora tenha sido verificado redução no número de levantamentos, locomoção total e mobilidade. Durante os 2 dias consecutivos de adaptação ao teste de *rotarod* observamos que os ratos obesos caíram mais vezes do aparelho quando comparados ao grupo da dieta padrão. No entanto, ambos os grupos aprenderam similarmente à velocidade de deslocamento exigida pelo teste, levando-nos a concluir que esse tempo de adaptação pode ter afetado o resultado do teste considerando os diferentes protocolos descritos para realizá-lo (69-71). Nenhum comprometimento da memória também foi um dado inesperado e que vem em oposição a relatos de trabalhos anteriores que apontam pra prejuízos da memória em resposta a obesidade (72, 73). Não acreditamos que mais avaliações de memória sejam necessárias, pois o reconhecimento de objetos é um teste efetivo de memória independente do hipocampo (72).

Em resumo, neste estudo demonstramos que a obesidade induzida por dieta rica em gordura e disfunção metabólica induzem neurodegeneração via neuroinflamação e estresse oxidativo / nitrosativo (Figura 9). Pesquisas adicionais são necessárias para descobrir mecanismos mais profundos capazes de explicar os resultados encontrados em nosso estudo e assim definir o verdadeiro papel da obesidade, resistência à insulina e sinalização metabólica em doenças neurodegenerativas. Novas abordagens terapêuticas que visem combater a neuroinflamação parecem ter implicações importantes para prevenir o desenvolvimento da DP em pessoas obesas, especialmente aquelas com predisposição genética ou exposição a riscos ambientais.

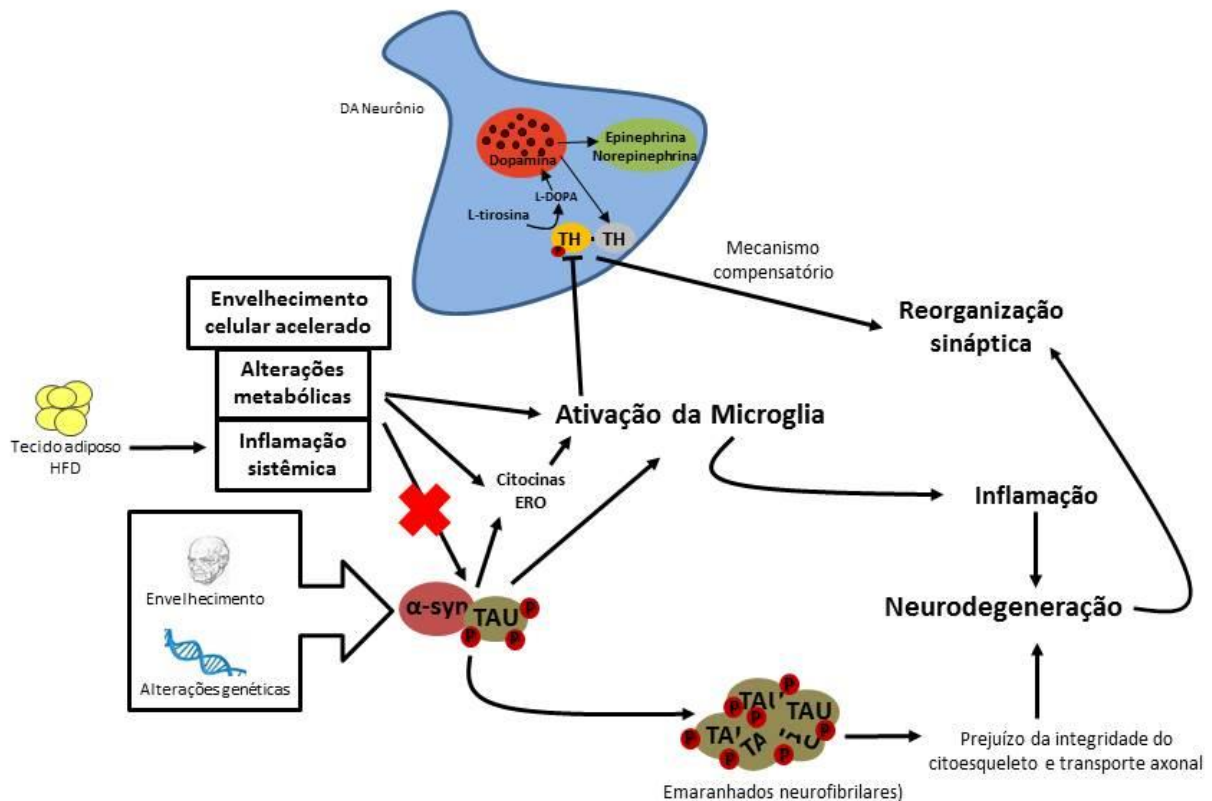


Figura 9. Efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a neuroinflamação e neurodegeneração.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados na presente dissertação, podemos concluir que:

a) A obesidade induzida por dieta hiperlipídica provoca alterações em parâmetros metabólicos tais como intolerância à glicose e resistência à insulina bem como inflamação sistêmica induzidos pelo aumento de deposição de gordura.

b) A obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove ativação da microglia na *substantia nigra*, inflamação e estresse oxidativo / nitrosativo na via nigrostriatal de ratos.

c) A obesidade induzida por dieta hiperlipídica provoca neurodegeneração dopaminérgica e alterações na organização sináptica na via nigrostriatal de ratos.

d) A obesidade induzida por dieta hiperlipídica provoca alterações em padrões de comportamento tais como a queda da atividade locomotora, na mobilidade total e alterações no comportamento tipo ansioso associados a perda de neurônios dopaminérgicos, no entanto não é traz prejuízos para a memória e coordenação motora.

7. PERSPECTIVAS

Nosso estudo foi o primeiro a apresentar uma relação linear entre a obesidade e alterações metabólicas com a neurodegeneração dopaminérgica, entretanto pesquisas mais aprofundadas se fazem necessárias para explorar os mecanismos subjacentes capazes de esclarecer os efeitos observados aqui. Para tanto, criou-se perspectivas para a realização de novas avaliações, incluindo:

a) aumentar o número de animais avaliados na imunofluorescência para confirmar os resultados obtidos até o momento.

b) os níveis de dopamina e receptores dopaminérgicos na via nigrostriatal dos ratos HFD-obesos.

c) a fosforilação da tirosina hidroxilase na via nigrostriatal dos ratos HFD-obesos.

d) os efeitos de tratamentos utilizando anti-inflamatórios e anti-oxidantes na neurodegeneração dopaminérgica dos ratos HFD-obesos.

e) os efeitos de fatores agravantes à neuroinflamação dos ratos HFD-obesos tal como o LPS, que por sua vez poderia conduzir a alterações em parâmetros característicos da DP como a α -sinucleína e p-Tau.

f) uma curva de tempo da neurodegeneração dopaminérgica provocada pela dieta hiperlipídica, buscando esclarecer em que momento esse efeito é iniciado e se de fato o mesmo ocorre após a neuroinflamação e estresse oxidativo / nitrosativo cerebral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spielman LJ, Little JP, Klegeris A. Inflammation and insulin/IGF-1 resistance as the possible link between obesity and neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology*. 2014 Aug 15;273(1-2):8-21. PubMed PMID: 24969117.
2. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of neuroimmunology*. 2010 Feb 26;219(1-2):25-32. PubMed PMID: 20004026. Pubmed Central PMCID: 2823983.
3. Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Mitschelen M, Koller A, et al. Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2014 Oct;69(10):1212-26. PubMed PMID: 24269929. Pubmed Central PMCID: 4172034.
4. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):7036-41. PubMed PMID: 20231468. Pubmed Central PMCID: 2872449.
5. Pannacciulli N, Del Parigi A, Chen K, Le DS, Reiman EM, Tataranni PA. Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. *NeuroImage*. 2006 Jul 15;31(4):1419-25. PubMed PMID: 16545583.
6. Dobbins M, Beiser A, Hoffmann U, Decarli C, O'Donnell CJ, Massaro JM, et al. Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. *Annals of neurology*. 2010 Aug;68(2):136-44. PubMed PMID: 20695006. Pubmed Central PMCID: 2933649.

7. Takeda S, Sato N, Morishita R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:171. PubMed PMID: 25120476. Pubmed Central PMCID: 4114193.
8. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Feb;83(2):461S-5S. PubMed PMID: 16470013.
9. Gemma C, Bickford PC. Interleukin-1beta and caspase-1: players in the regulation of age-related cognitive dysfunction. *Reviews in the neurosciences*. 2007;18(2):137-48. PubMed PMID: 17593876.
10. Freeman LR, Keller JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochimica et biophysica acta*. 2012 May;1822(5):822-9. PubMed PMID: 22206999. Pubmed Central PMCID: 3412391.
11. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. *Current opinion in psychiatry*. 2007 Jul;20(4):380-5. PubMed PMID: 17551353.
12. German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Annals of neurology*. 1989 Oct;26(4):507-14. PubMed PMID: 2817827.
13. Garlovsky JK, Overton PG, Simpson J. Psychological Predictors of Anxiety and Depression in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Journal of clinical psychology*. 2016 Oct;72(10):979-98. PubMed PMID: 27062284.
14. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S-8. PubMed PMID: 12666096.
15. Halliday GM, Stevens CH. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011 Jan;26(1):6-17. PubMed PMID: 21322014.

16. Vives-Bauza C, Przedborski S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine*. 2011 Mar;17(3):158-65. PubMed PMID: 21146459.
17. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):2047-52. PubMed PMID: 12576551. Pubmed Central PMCID: 149956.
18. Hornykiewicz O, Kish SJ. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Advances in neurology*. 1987;45:19-34. PubMed PMID: 2881444.
19. Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England journal of medicine*. 1988 Apr 07;318(14):876-80. PubMed PMID: 3352672.
20. Orth M, Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochemistry international*. 2002 May;40(6):533-41. PubMed PMID: 11850110.
21. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211. PubMed PMID: 12498954.
22. Weintraub D, Doshi J, Koka D, Davatzikos C, Siderowf AD, Duda JE, et al. Neurodegeneration across stages of cognitive decline in Parkinson disease. *Archives of neurology*. 2011 Dec;68(12):1562-8. PubMed PMID: 22159053. Pubmed Central PMCID: 3290902.
23. Janvin CC, Larsen JP, Aarsland D, Hugdahl K. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2006 Sep;21(9):1343-9. PubMed PMID: 16721732.

24. Buter TC, van den Hout A, Matthews FE, Larsen JP, Brayne C, Aarsland D. Dementia and survival in Parkinson disease: a 12-year population study. *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13):1017-22. PubMed PMID: 18362281.

25. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*. 2000 Dec;3(12):1301-6. PubMed PMID: 11100151.

26. Saaksjarvi K, Knekt P, Mannisto S, Lyytinen J, Heliovaara M. Prospective study on the components of metabolic syndrome and the incidence of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2015 Oct;21(10):1148-55. PubMed PMID: 26228080.

27. Palacios N, Gao X, McCullough ML, Jacobs EJ, Patel AV, Mayo T, et al. Obesity, diabetes, and risk of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011 Oct;26(12):2253-9. PubMed PMID: 21739472. Pubmed Central PMCID: 3627531.

28. Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care*. 2007 Apr;30(4):842-7. PubMed PMID: 17251276.

29. Driver JA, Smith A, Buring JE, Gaziano JM, Kurth T, Logroscino G. Prospective cohort study of type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care*. 2008 Oct;31(10):2003-5. PubMed PMID: 18599528. Pubmed Central PMCID: 2551644.

30. Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Willett WC, Ascherio A. Diet and Parkinson's disease: a potential role of dairy products in men. *Annals of neurology*. 2002 Dec;52(6):793-801. PubMed PMID: 12447934.

31. Abbott RD, Ross GW, White LR, Nelson JS, Masaki KH, Tanner CM, et al. Midlife adiposity and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2002 Oct 8;59(7):1051-7. PubMed PMID: 12370461.

32. Morris JK, Bomhoff GL, Stanford JA, Geiger PC. Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated

by a high-fat diet. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2010 Oct;299(4):R1082-90. PubMed PMID: 20702796. Pubmed Central PMCID: 2957375.

33. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, et al. Brain dopamine and obesity. Lancet. 2001 Feb 3;357(9253):354-7. PubMed PMID: 11210998.

34. Geiger BM, Behr GG, Frank LE, Caldera-Siu AD, Beinfeld MC, Kokkotou EG, et al. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008 Aug;22(8):2740-6. PubMed PMID: 18477764. Pubmed Central PMCID: 2728544.

35. Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. British journal of pharmacology. 2007 Apr;150(8):963-76. PubMed PMID: 17339843. Pubmed Central PMCID: 2013918.

36. Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Journal of neurochemistry. 2009 Aug;110(3):966-75. PubMed PMID: 19549006.

37. Bolner A, Micciolo R, Bosello O, Nordera GP. A Panel of Oxidative Stress Markers in Parkinson's Disease. Clinical laboratory. 2016;62(1-2):105-12. PubMed PMID: 27012039.

38. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. Neuroscience letters. 1995 Dec 29;202(1-2):17-20. PubMed PMID: 8787820.

39. Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, et al. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. Annals of neurology. 1995 Sep;38(3):379-88. PubMed PMID: 7668823.

40. Blanchard-Fillion B, Souza JM, Friel T, Jiang GC, Vrana K, Sharov V, et al. Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2001 Dec 07;276(49):46017-23. PubMed PMID: 11590168.
41. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002 Apr 15;22(8):3090-9. PubMed PMID: 11943812.
42. Gao N, Li YH, Li X, Yu S, Fu GL, Chen B. Effect of alpha-synuclein on the promoter activity of tyrosine hydroxylase gene. *Neuroscience bulletin*. 2007 Jan;23(1):53-7. PubMed PMID: 17592526.
43. Erro Aguirre ME, Zelaya MV, Sanchez Ruiz de Gordo J, Tunon MT, Lanciego JL. Midbrain catecholaminergic neurons co-express alpha-synuclein and tau in progressive supranuclear palsy. *Frontiers in neuroanatomy*. 2015;9:25. PubMed PMID: 25814937. Pubmed Central PMCID: 4356077.
44. Koga S, Kojima A, Ishikawa C, Kuwabara S, Arai K, Yoshiyama Y. Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression. *Neurobiology of disease*. 2014 Nov;71:180-92. PubMed PMID: 25132556.
45. Rotermund C, Truckenmuller FM, Schell H, Kahle PJ. Diet-induced obesity accelerates the onset of terminal phenotypes in alpha-synuclein transgenic mice. *Journal of neurochemistry*. 2014 Dec;131(6):848-58. PubMed PMID: 24995537.
46. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 2010 Dec;23(2):270-99. PubMed PMID: 20977819.
47. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat

diet in Wistar rats. Archives of endocrinology and metabolism. 2016 Apr;60(2):138-42. PubMed PMID: 27191048.

48. Gasparotto J, Senger MR, Kunzler A, Degrossoli A, de Simone SG, Bortolin RC, et al. Increased tau phosphorylation and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in the brain of mice infected with *Leishmania amazonensis*. Brain, behavior, and immunity. 2015 Jan;43:37-45. PubMed PMID: 25014011.

49. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976 May 7;72:248-54. PubMed PMID: 942051.

50. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. PubMed PMID: 5432063.

51. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics. 1959 May;82(1):70-7. PubMed PMID: 13650640.

52. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. Psychological bulletin. 1976 May;83(3):482-504. PubMed PMID: 17582919.

53. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioural brain research. 1988 Nov 1;31(1):47-59. PubMed PMID: 3228475.

54. Zhang LJ, Xue YQ, Yang C, Yang WH, Chen L, Zhang QJ, et al. Human albumin prevents 6-hydroxydopamine-induced loss of tyrosine hydroxylase in in vitro and in vivo. PloS one. 2012;7(7):e41226. PubMed PMID: 22815976. Pubmed Central PMCID: 3398951.

55. Wills J, Credle J, Haggerty T, Lee JH, Oaks AW, Sidhu A. Tauopathic changes in the striatum of A53T alpha-synuclein mutant mouse model of Parkinson's disease. PloS one. 2011 Mar 21;6(3):e17953. PubMed PMID: 21445308. Pubmed Central PMCID: 3061878.

56. Chung YC, Kim SR, Jin BK. Paroxetine prevents loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. *Journal of immunology*. 2010 Jul 15;185(2):1230-7. PubMed PMID: 20566832.

57. Calvo-Ochoa E, Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014 Jun;34(6):1001-8. PubMed PMID: 24667917. Pubmed Central PMCID: 4050245.

58. Cai M, Wang H, Li JJ, Zhang YL, Xin L, Li F, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. *Brain, behavior, and immunity*. 2016 Oct;57:347-59. PubMed PMID: 27189035.

59. Lennox R, Moffett RC, Porter DW, Irwin N, Gault VA, Flatt PR. Effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout and a high-fat diet on cognitive function and hippocampal gene expression in mice. *Molecular medicine reports*. 2015 Jul;12(1):1544-8. PubMed PMID: 25760229.

60. Bousquet M, St-Amour I, Vandal M, Julien P, Cicchetti F, Calon F. High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiology of disease*. 2012 Jan;45(1):529-38. PubMed PMID: 21971528.

61. Bayliss JA, Lemus MB, Stark R, Santos VV, Thompson A, Rees DJ, et al. Ghrelin-AMPK Signaling Mediates the Neuroprotective Effects of Calorie Restriction in Parkinson's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016 Mar 09;36(10):3049-63. PubMed PMID: 26961958. Pubmed Central PMCID: 4783502.

62. Dhurandhar EJ, Allison DB, van Groen T, Kadish I. Hunger in the absence of caloric restriction improves cognition and attenuates Alzheimer's

disease pathology in a mouse model. *PLoS one*. 2013;8(4):e60437. PubMed PMID: 23565247. Pubmed Central PMCID: 3614512.

63. Paul R, Choudhury A, Borah A. Cholesterol - A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. *Neurochemistry international*. 2015 Nov;90:125-33. PubMed PMID: 26232622.

64. Alcalay RN, Gu Y, Mejia-Santana H, Cote L, Marder KS, Scarmeas N. The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012 May;27(6):771-4. PubMed PMID: 22314772. Pubmed Central PMCID: 3349773.

65. Stafstrom CE, Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:59. PubMed PMID: 22509165. Pubmed Central PMCID: 3321471.

66. Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *The Lancet Neurology*. 2004 Mar;3(3):169-78. PubMed PMID: 14980532.

67. Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, Chen H, Richardson G, Barber MR, et al. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2014 Jan;20(1):82-7. PubMed PMID: 24120951. Pubmed Central PMCID: 3936597.

68. Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667-84. PubMed PMID: 20701600. Pubmed Central PMCID: 2941545.

69. Madeo G, Schirinzi T, Martella G, Latagliata EC, Puglisi F, Shen J, et al. PINK1 heterozygous mutations induce subtle alterations in dopamine-dependent synaptic plasticity. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2014 Jan;29(1):41-53. PubMed PMID: 24167038. Pubmed Central PMCID: 4022284.

70. Rial D, Castro AA, Machado N, Garcao P, Goncalves FQ, Silva HB, et al. Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. *PloS one*. 2014;9(12):e114216. PubMed PMID: 25486126. Pubmed Central PMCID: 4259468.

71. Park J, Lim CS, Seo H, Park CA, Zhuo M, Kaang BK, et al. Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Molecular pain*. 2015 May 17;11:28. PubMed PMID: 25981600. Pubmed Central PMCID: 4448854.

72. Gainey SJ, Kwakwa KA, Bray JK, Pillote MM, Tir VL, Towers AE, et al. Short-Term High-Fat Diet (HFD) Induced Anxiety-Like Behaviors and Cognitive Impairment Are Improved with Treatment by Glyburide. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2016;10:156. PubMed PMID: 27563288. Pubmed Central PMCID: 4980396.

73. Knight EM, Martins IV, Gumusgoz S, Allan SM, Lawrence CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiology of aging*. 2014 Aug;35(8):1821-32. PubMed PMID: 24630364. Pubmed Central PMCID: 4024197.

9. ANEXOS

ANEXO 1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parâmetros metabólicos da obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica.

Figura 2. A dieta hiperlipídica induziu aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 3. A obesidade promoveu alterações no conteúdo proteico de tirosina hidroxilase e sinaptofisina na via nigrostriatal.

Figura 4. A imunohistoquímica indicou neurodegeneração dopaminérgica e ativação da microglia em resposta à dieta hiperlipídica.

Figura 5. Nitração de tirosina e depleção do conteúdo tiol livre na via nigrostriatal em resposta à dieta hiperlipídica.

Figura 6. A dieta hiperlipídica promoveu a piora da atividade locomotora.

Figura 7. A dieta hiperlipídica provocou alterações no comportamento tipo ansioso.

Figura 8. A dieta hiperlipídica não afetou a memória e coordenação motora.

Figura 9. Efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a neuroinflamação e neurodegeneração.

ANEXO 2. Carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA-UFRGS.



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29493

Título: EFEITO DA RESISTENCIA A INSULINA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPIDICA E OBESIDADE SOBRE PARAMETROS ASSOCIADOS A DOENÇA DE PARKINSON EM REGIOES DO SNC

Vigência: 16/08/2015 à 16/08/2017

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DANIEL PENS GELAIN - coordenador desde 16/08/2015
Rafael Calixto Bortolin - Aluno de Doutorado desde 16/08/2015
ALINE BITTENCOURT - Aluno de Mestrado desde 16/08/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 13/07/2015 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 180 ratos machos Wistar (Rattus norvegicus, var. Albinus), adultos (4-5 meses), com peso médio de 150 g, provenientes da colônia de reprodução do biotério do Departamento de Bioquímica/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 28 de Julho de 2015

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética