



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NAIANA DA ROSA

**O EFEITO TERAPÊUTICO DO COMPOSTO BIOATIVO 6-SHOGAOL EM
MODELOS ANIMAIS EXPOSTOS À ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

NAIANA DA ROSA

**O EFEITO TERAPÊUTICO DO COMPOSTO BIOATIVO 6-SHOGAOL EM
MODELOS ANIMAIS EXPOSTOS À ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde como requisito para a obtenção
do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabrícia Petronilho, Dra.

Coorientadora: Profa. Jucélia Jeremias Fortunato, Dra.

Tubarão

2019

Rosa, Naiana da, 1987-
R69 O efeito terapêutico do composto bioativo 6-shogaol em
modelos animais expostos à ativação imune materna por
lipopolissacarídeo: estudo pré-clínico / Naiana da Rosa ; -- 2019.
96 f. il. color. ; 30 cm.

Orientadora : Profa. Dra. Fabrícia Petronilho.
Coorientadora : Profa. Dra. Jucélia Jeremias Fortunato.
Tese (doutorado)–Universidade do Sul de Santa
Catarina, Tubarão, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Endotoxinas. 2. Animais de laboratório - Comportamento.
3. Memória. 4. Sistema nervoso - doenças. 5. Compostos
bioativos. 6. Mieloperoxidase. I. Petronilho, Fabrícia. II.
Fortunato, Jucélia Jeremias. III. Universidade do Sul de Santa
Catarina – Doutorado em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.8



UNISUL
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

O efeito terapêutico do composto bioativo 6-shogaol em modelos animais expostos à ativação imune materna por lipopolissacarídeo: estudo pré-clínico.

NAIANA DA ROSA
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 26 de novembro de 2019.

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (orientador)

Doutora Amanda Della Giustina (avaliador externo – IESGF)

Doutora Amanda Valnier Steckert (avaliador externo – UFSC)

Doutora Simony Davet Muller (avaliador interno – UNISUL)

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (avaliador interno – PPGCS)

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

- Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – Sede - Reitoria – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621-3000
- Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-272 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1000
- Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279-1242

Em especial ao meu companheiro e meu amor, me incentivou para não desistir, foi paciente, esteve ao meu lado em todos os momentos e acreditou que eu fosse capaz.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Jucélia Jeremias Fortunato, que me estimulou a continuar na pesquisa, pela orientação, ensinamentos, dedicação, muito obrigada pelo carinho e amizade.

À Prof^a Dr^a. Fabrícia Petronilho, por me acolher no meio do caminho, com toda atenção, paciência, amor, muito obrigada pelo carinho, amizade, enfim, pela parceria.

Ao apoio para realização desse trabalho, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Alves Reis e ao Laboratório de Imunofarmacologia - IOC - Fundação Oswaldo (FIOCRUZ), pela realização das análises neuroquímicas e por me receber de braços abertos, pelo ensinamento e tempo dedicado.

Aos Professores do PPGCS da UNISUL, pelo auxílio e pelos conhecimentos repassados.

Aos professores que atuaram como membros das bancas em que o projeto de pesquisa foi apresentado e qualificado, pelas boas arguições e pelos direcionamentos propostos.

As colaboradoras da UNISUL, responsáveis pela secretária do PPGCS pela atenção com os alunos, dedicação.

Aos meus colegas e parceiros de experimentos por toda a colaboração e dedicação, vocês contribuíram para que meu sonho se tornar-se realidade.

A Fabiana Durante de Medeiros, que tive um imenso prazer de conhecer no doutorado e que me auxiliou muito, pessoa que sempre pude contar.

A minha família que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, que me deram carinho, amor e sempre acreditaram em mim, amo vocês.

A todas as pessoas não mencionadas, mais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E por fim, a uma pessoa muito importante em minha vida, Daniel Arent Wensing, que cuida de mim e me faz muito feliz, o meu eterno namorado, muito obrigada por partilhar comigo os grandes momentos de nossas vidas.

A todos vocês, muito obrigada!

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.” (Friedrich Nietzsche)

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito do 6-shogaol, composto bioativo do gengibre, com propriedade neuroprotetora, anti-inflamatória e antioxidante, sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos, em um modelo pré-clínico baseado em uma infecção bacteriana pré-natal a partir da ativação imune materna por lipopolissacarídeo (LPS).

Metodologia: Doze ratas *Wistar* prenhes, receberam 100 µg/Kg de LPS ou salina no dia gestacional (DG) 9.5. Participaram do estudo as proles de machos, nos dias pós-natal (DPN) 30 e 55 respectivamente, foram suplementados com 6-shogaol ou salina, por gavagem (10mg/Kg/dia), por 5 dias. No DPN 35 e 60 os animais realizaram testes comportamentais: *grooming*, *crossing*, *rearing* e memória. No DPN 37 e 62, ocorreu a morte, em seguida a dissecação do hipocampo para as análises bioquímicas da cinase regulada por sinal extracelular 1 / 2 (ERK 1 / 2), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), enolase (NSE), dano em lipídeos e proteínas e atividade da mieloperoxidase (MPO).

Resultado: A exposição pré-natal ao LPS aumentou significativamente os episódios de *grooming* e *crossing* em DPN 37 e 62, reduziu episódios de *rearing* em DPN 37. Piorou a memória de curta duração (MCD) em DPN 37 e a memória de longa duração (MLD) em PND 62. Diminuiu níveis de ERK e BDNF em DPN 37 e 62, aumentou níveis de NSE e dano em lipídeos no DPN 37 e dano em proteínas no DPN 62. A administração de 6-shogaol reverteu parâmetros comportamentais, melhorou a MCD e MLD, em DPN 37 e 62. Aumentou níveis de ERK e BDNF em DPN 37 e 62, reduziu dano em lipídeos em DPN 37 e atividade da MPO em DPN 62.

Conclusão: O 6-shogaol reverteu parâmetros comportamentais e bioquímicos na prole de machos exposta ao LPS em período pré-natal, atuando como componente terapêutico contra os distúrbios neurológicos associados a ativação imune-materna em modelo animal de autismo.

Descritores: Lipopolissacarídeos. Comportamento. Memória. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo. 6-shogaol. Mieloperoxidase.

ABSTRACT

Objective: To study the effect of 6-shogaol, a bioactive ginger compound with neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidant properties, on behavioral and biochemical parameters in a preclinical model based on prenatal bacterial infection from maternal immune activation by lipopolysaccharide (LPS).

Methodology: Twelve pregnant *Wistar* rats received 100 µg/kg of LPS or saline on gestational day (GD) 9.5. Male offspring participated in the study, on the postnatal days (PND) 30 and 55 respectively, they were supplemented with 6-shogaol or saline by gavage (10mg/kg/day) for 5 days. In PND 35 and 60 the animals performed behavioral tests: *grooming*, *crossing*, *rearing* and memory. In PND 37 and 62, death followed by hippocampal dissection for biochemical analyzes of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), enolase (NSE), lipid and protein damage and myeloperoxidase (MPO) activity.

Result: Prenatal exposure to LPS significantly increased *grooming* and *crossing* episodes in PND 37 and 62, reduced *rearing* episodes in PND 37. Short-term memory (STM) at PND 37 and long-term memory (LTM) at PND 62 worsened. Decreased ERK and BDNF levels in PND 37 and 62, increased levels of NSE and lipid damage in PND 37 and protein damage in PND 62. Administration of 6-shogaol reversed behavioral parameters, improved STM and LTM, in PND 37 and 62. Increased ERK and BDNF levels in PND 37 and 62, reduced lipid damage in PND 37 and MPO activity in PND 62.

Conclusion: 6-shogaol reversed behavioral and biochemical parameters in male offspring exposed to prenatal LPS, acting as a therapeutic component against neurological disorders associated with maternal immune activation in an animal model of autism.

Keywords: Lipopolysaccharides. Behavior. Memory. Brain Derived Neurotrophic Factor. 6-shogaol. Myeloperoxidase.

LISTAS

Lista de abreviaturas

3-NT	3-nitrotirosina
ADDM	Monitoramento das deficiências do autismo e desenvolvimento (do inglês, <i>Autism and Developmental Disabilities Monitoring</i>)
AMA	Associação de Amigos dos Autistas
ANOVA	Análise de Variância
APA	Associação Americana de Psiquiatria (do inglês, <i>American Psychiatric Association</i>)
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
Bax	Proteína X Associada à Bcl-2 (do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína 2 de Linfoma da Célula B (do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
CaMK	Calmudolina Cinase
CaMKII	Proteína Cinase Dependente de Cálcio/Calmudolina tipo 2 (do inglês, <i>Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	Proteína Ligante ao Elemento de Resposta ao AMPc (do inglês, <i>cAMP Response Element-Binding</i>)
DAG	Diaglycerol
DBCA	Diretriz Brasileira para Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
DG	Dia Gestacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPN	Dia Pós-Natal
DSM	Manual Diagnóstico Estático de Transtornos Mentais
EPM	Erro Padrão da Média
ERK 1 / 2	Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 / 2

ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FCEE	Fundação Catarinense de Educação Especial
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Linhagem de Célula Glial (do inglês, <i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>)
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina-1 β
i-NOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzível
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Ip	Intraperitoneal
IP3	Trifosfato de Inositol (do inglês, <i>Inositol Triphosphate</i>)
JNK	Cinase N-Terminal de c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCD	Memória de curta duração
MeCP2	Proteína de Ligação a CpG Metilado 2 (do inglês, <i>Methyl-CpG-Binding Protein 2</i>)
MEK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno / Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares (do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular SignalRegulated Kinase</i>)
MIA	Morte Indolor Assistida
MLD	Memória de longa duração
MPO	Atividade da enzima mieloperoxidase
NeuroImet	Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos
NF-kB	Fator Nuclear kappa B (do inglês <i>Nuclear Factor-kappa B</i>)
NGF	Fator de Crescimento Neural (do inglês, <i>Nerve Growth Factor</i>)
NSE	Enolase Específica do Neurônio

NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
NT-6	Neurotrofina-6
p75 NTR	Receptor de Neurotrofina p75 (do inglês, <i>p75 Neurotrophin Receptor</i>)
PLC- γ	Fosfolipase\C- γ (do inglês, <i>Phospholipase C, Gamma</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinase (do inglês, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PVDF	Membrana de Difluoreto de Polinilideno
SDS	Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Dodecil-Sulfato de Sódio em gel Poliacrilamida
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TID	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>)
Trk	Receptores Tirosina Cinase
TrkA	Receptores Tirosina Cinase Tipo A
TrkB	Receptores Tirosina Cinase Tipo B
TrkC	Receptores Tirosina Cinase Tipo C
TTBS	Tris Tween-20
TMB	Tetrametilbenzidina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNISUL	Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de figuras

Figura 1 - Representação da planta herbácea (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>)	22
Figura 2 - Representação simplificada da conversão dos gingerols em outras formas homólogas.....	24
Figura 3 - Estrutura química de um dos principais compostos bioativos do gengibre - 6-shogaol.....	26
Figura 4 - Tipos de Trk e suas distintas afinidades para as neurotrofinas.....	31
Figura 5 - Visão geral do BDNF a sinalização através de receptores de TrkB...	33

Figura 6 - Diagrama esquemático da visão geral do efeito anti-apoptose do 6-shogaol contra o estresse oxidativo induzido por H ₂ O ₂	34
Figura 7 - Síntese das etapas do delineamento do estudo.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1.1 Nutracêutico	18
1.1.1.1 Fitoquímicos	20
1.1.2 Gengibre	22
1.1.2.1 Compostos Bioativos	25
1.1.2.1.1 6-Shogaol	25
1.1.3 Memória	28
1.1.4 Hipocampo	29
1.1.5 Fatores Neurotróficos	30
1.1.5.1 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	31
1.1.6 Biomarcadores Encefálicos	35
1.1.6.1 Enolase Específica do Neurônio (NSE)	35
1.1.7 Estresse Oxidativo	36
1.1.8 Neuroinflamação	39
1.1.9 Transtornos Neurológicos e Ativação Imune Materna	40
1.1.10 Transtornos do Espectro Autista	41
2. OBJETIVOS	46
2.1 OBJETIVO GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
2.2.1 Etapa 1 – Análise comportamental	46
2.2.2 Etapa 2 – Análise bioquímica	46
3. MÉTODOS	47
3.1 TIPO DE ESTUDO	47
3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	47
3.3 ANIMAIS	48
3.3.1 Animais experimentais	48
3.3.2 Acasalamento	49
3.3.3 Modelo animal por exposição pré-natal ao LPS	49
3.3.4 Padronização da Ninhada	50
3.3.5 Medida do Peso Corporal	50

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	50
3.5 ENSAIOS / TESTES / TÉCNICAS	55
3.5.1 Testes comportamentais	55
3.5.1.1 Teste de habituação ao campo aberto (<i>Open Field</i>)	55
3.5.1.2 Esquiva inibitória	56
3.5.2 Análises Bioquímicas	57
3.5.2.1 Quantificação nos níveis de ERK	57
3.5.2.2 Quantificação dos níveis de BDNF e NSE	58
3.5.2.3 Quantificação dos níveis de dano oxidativo a lipídios e a proteínas	58
3.5.2.4 Atividade da enzima MPO	59
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	59
3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	59
4 ARTIGO	61
6-shogaol bioactive compound improves behavior and memory in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides	61
O nutracêutico 6-shogaol exerce fator neuroprotetor em modelo animal de autismo por ativação imune materna.....	64
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	89
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética	89
ANEXO B – Produção científica publicada 2016-2019	90

1.INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade se vem buscando através dos alimentos e das plantas, uma fonte de vida saudável e um instrumento para prevenção e tratamento de doenças^{1,2}. As plantas medicinais são consideradas a fonte mais antiga da farmacoterapia utilizada pela humanidade². Diversas culturas foram responsáveis pelo surgimento de grande parcela de tratamentos tradicionais da medicina¹. Pesquisas vem sendo realizadas em busca de novas informações ou melhores entendimentos dos mecanismos de atuação dessas plantas medicinais e seus benefícios^{1,3,4}.

O progresso científico e técnico tem melhorado a produção dos tratamentos à base de plantas, através de estudos realizados, apresentando uma excelente aceitação do público em geral dos países desenvolvidos^{5,6}. Juntamente com as pesquisas e utilização das plantas medicinais como prevenção ou tratamento de doenças, surgiu o termo nutracêutico, que resulta da combinação da “nutrição” e “farmacêutica”, tomando espaço no meio científico, termo esse cunhado pelo Doutor Stephen L. DeFelice (Fundador e Presidente da Fundação para Inovação em Medicina, New Jersey, Estados Unidos da América - EUA) em 1989⁷.

O termo nutracêutico foi definido pela Associação Europeia de Nutracêutico como: produtos nutricionais com efeitos relevantes para saúde que não contém substâncias sintéticas ou compostos químicos formulados para indicação específica, que compõe de nutrientes (em partes sob forma concentradas)⁸. Dentro da categoria nutracêutico, são considerados os componentes fitoquímicos expostos nos alimentos, assim como em plantas medicinais, como o gengibre^{9,10}. Estudos com fitoquímicos estão cada vez mais sendo realizados, pois têm-se verificado grandes potenciais nesses compostos na prevenção ou tratamentos de doenças crônicas¹¹, cardiovasculares¹², cânceres¹³, obesidades¹⁴, diabetes¹⁵, assim como disfunções neurológicas¹⁶.

O ser humano é exposto a diversos fatores ambientais a todo momento, um dos principais é a alimentação, sendo que a qualidade e o padrão alimentar são de suma importância, não apenas pelo seu valor nutricional, mas também pela capacidade de seus nutrientes e compostos bioativos¹⁷. Existem inúmeros compostos naturais encontrados em frutas, cereais, vegetais e especiarias como no

gingibre, os quais apresentam atividades antioxidantes e anti-inflamatórias¹⁸. Entre os compostos com atividades antioxidantes naturais mais importantes estão os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico^{19,20}.

O rizoma do *Zingiber Officinale Roscoe*, conhecido popularmente como gengibre, apresenta compostos fenólicos e alcaloides em sua composição, expressando efeitos benéficos em tratamento de doenças neurológicas²¹. Esse nutracêutico já vem sendo estudado a um extenso período, porém, devido a sua longa história, utilização e cultivo em muitas regiões, se perdeu a informação precisa de sua origem, contudo historicamente é um vegetal nativo asiático¹⁰.

O gengibre é uma planta aromática, utilizada frequentemente como tempero para culinária e também na medicina²², em dietas com propriedades antidiabéticas, redutor dos níveis de colesterol no sangue e fígado, pressão arterial e ação gastro protetora^{21,22}. Também conhecido por seu valor nutracêutico, possui uma variedade de compostos bioativos, incluindo entre eles: gingerols, paradols e shogaols^{21,23}.

Entre os diferentes componentes formadores da sua estrutura, o 6-shogaol, composto derivado do shogaols, é um dos principais componentes ativos do gengibre^{24,25}. Estudos vem destacando sua ação anti-inflamatória, antitumoral²⁴, antioxidante, bactericida, antiviral, antipirética²⁶, analgésica, antitussígeno²¹, e efeitos hipotensivos, no entanto a estrutura só apresenta essas propriedades quando desidratado ou cozido e na sua forma completa com casca, tornando-se dessa forma seus compostos bioativos²¹.

No encéfalo o composto bioativo 6-shogaol, em estudo *in vitro* apresentou propriedade anti-apoptótica em células neuronais induzidas por espécies reativas de oxigênio (EROs), protegeu os astrócitos de danos oxidativos através da regulação dos níveis dos fatores neurotróficos^{27,28}. Entre eles o fator de crescimento neural (NGF, do inglês *nerve growth factor*), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*) e fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*), podendo esses proporcionar interações neurônio-glia, tendo uma última instância efeito benéfico contra danos oxidativo do encéfalo^{27,28}.

Entre as propriedades benéficas do 6-shogaol, evidencia-se também propriedades farmacológicas em diversas doenças do sistema nervoso central

(SNC), tais como: isquemia cerebral²⁴, doença de Alzheimer²⁹ e doença de Parkinson³⁰. Em estudos anteriores, mostrou atuação neuroprotetora através da diminuição da ativação microglial exacerbada, um elemento-chave da neuroinflamação característico em diversos transtornos do SNC^{24,31}.

A neuroinflamação presente em fases do neurodesenvolvimento, imunológico e neuroimune pode acarretar acometimentos no âmbito neurológico, sendo ocasionado por fatores ambientais, podendo esses sofrer alterações devido: à natureza do insulto, à época e sua duração³². Infecções maternas em períodos pré-natal tem sido considerada potenciais indutores de modificações estruturais e funcionais do desenvolvimento do SNC em longo prazo³².

Entre as doenças neurológicas que afetam SNC em período pré-natal do feto, o transtorno do espectro autista (TEA) tem sido bastante pesquisado por ser um transtorno descrito de forma relativamente recente, há mais ou menos 60 anos³³. Esse teve um aumento na prevalência nos últimos anos, um dos motivos podendo ser pela mudança no critério de diagnóstico³³. Ainda não há nenhum exame específico para detectar o transtorno^{33,34,35}. O diagnóstico é realizado clinicamente, porém estudos identificaram que o TEA possa estar relacionado a uma alteração no desenvolvimento do SNC decorrente de um processo neuroinflamatório³³⁻³⁶.

O TEA compreende diferentes transtornos do desenvolvimento neurológico, que podem se manifestar em conjunto ou isoladamente, incluindo desde sintomas mais leves até os mais severos^{37,38}. Na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) publicado em 2013, essas condições neurológicas foram agrupadas sob o termo denominado “guarda-chuva” visando cobrir uma variedade de sinais/sintomas ou de comportamentos heterogêneos^{37,39}.

Várias regiões encefálicas estão envolvidas na gênese do TEA, incluindo o sistema límbico entre eles hipocampo, amígdala, áreas pré-frontais e cerebelo^{40,41}. As anormalidades podem ser alteradas no período pré-natal, notadamente nas regiões encefálicas que se desenvolvem tardiamente na neurogênese, sendo assim, essas regiões envolvidas no TEA propendem a desenvolver-se lentamente e são mais vulneráveis a transtornos^{41,42}.

As manifestações clínicas são bastante heterogêneas, tornando os tratamentos, na maioria das vezes, incompletos ou ineficazes⁴³. As buscas por novas alternativas terapêuticas têm sido estudadas para descobrir um melhor tratamento que visa reduzir os sintomas nucleares deste transtorno, entre elas a

inclusão de nutracêutico tem apresentado resultados positivos e melhorado a qualidade de vida de indivíduos portadores do TEA⁴⁴.

Considerando que o TEA esteja relacionado a uma alteração no desenvolvimento do SNC decorrente de um processo neuroinflamatório³⁶. É possível que a administração de uma suplementação como 6-shogaol, um composto bioativo do gengibre, que vem sendo estudado para doenças neurológicas, devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, tenha uma atenuação na produção das EROS^{27,28}.

Assim como, espera-se um aumento no BDNF protegendo os neurônios, atuando também na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e exibindo efeitos neuroprotetores através de sua ação antioxidante²⁸. Podendo reverter condições neuroquímicas e comportamentais associadas a um modelo pré-clínico de autismo baseado em uma infecção bacteriana pré-natal a partir da exposição ao lipopolissacarídeo (LPS)^{28,36}.

Sendo assim, esse trabalho se justifica pela contribuição que trará na elucidação dos efeitos e mecanismos do 6-shogaol, composto bioativo presente no gengibre, em parâmetros inflamatórios e neuroquímicos em um modelo pré-clínico de autismo. Podendo contribuir como um novo método terapêutico nutracêutico para o tratamento do TEA, aliando-se para o progresso das condições clínicas apresentadas por pacientes com autismo e, conseqüentemente, a melhoria na qualidade de vida desses pacientes e seus familiares.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Nutracêutico

Nutracêutico é um termo que surgiu da combinação das palavras “nutrição” e “farmacêutico”, criado em 1989 pelo Doutor Stephen L. DeFelice, fundador e presidente da Fundação de Inovação em Medicina dos EUA⁷. Define-se nutracêutico, “produtos extraídos ou purificados de organismos vegetais, animais ou marinhos, que possuem efeitos benéficos comprovados farmacologicamente, com valor nutritivo, compostos esses por moléculas biologicamente ativas, também conhecidas como compostos bioativos”⁴⁵.

Os compostos bioativos presentes nos nutracêuticos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, sua natureza química ou fonte alimentar, podendo ser encontrados principalmente nas classes de polissacarídeos, peptídeos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e fitoquímicos^{46,47}. São cerca de 60 grupos de compostos bioativos já identificados, sendo que dentro da categoria nutracêutico há mais de 1000 compostos⁷.

Quando adicionados em outros alimentos torna estes fortificados, “funcionais” ou ainda suplementos dietéticos, fornecendo assim benefícios fisiológicos para saúde, seja na prevenção através da suplementação, quanto na melhoria da saúde ou tratamento de doenças, agregando mais valor aos alimentos⁴⁸. Alimentos com propriedades medicinais nutracêuticos já estabelecidas na sua composição, podem ser assim consumidas, concentradas ou extraídas e elaboradas em comprimidos, cápsulas, géis, granulados, pós ou soluções⁴⁸.

A inclusão desses alimentos ou suplementos que contém compostos bioativos em quantidades corretamente especificadas para o seu fim, têm-se mostrado eficazes e não tóxicos, proporcionando benefícios à saúde clinicamente comprovados e documentados para prevenção ou tratamento de doenças crônicas⁴⁹. Os compostos bioativos presentes nos nutracêuticos, têm demonstrado um alto potencial nutricional, efeitos terapêuticos e seguros, em comparação aos compostos sintéticos⁵⁰. Uma alternativa para prevenção e tratamento de doenças neurológicas, aperfeiçoando o funcionamento do sistema nervoso, potencializando a liberação de neurotransmissores, preservando a memória e a capacidade cognitiva⁵⁰.

Evidências quanto ao uso dos nutracêuticos tem demonstrado crescimento na procura e utilização para prevenção, manutenção da saúde, e tratamentos de doenças⁴⁷. Sua inclusão tornou-se mais presente após o melhor conhecimento da população quanto aos riscos no uso de medicamentos sintéticos podendo ser tóxicos e possuir efeitos colaterais, resultando assim na revolução nutracêutica⁵¹, tornando esse cada vez mais comercializado⁴⁵.

Produtos nutracêuticos tem apresentando uma grande expansão no mercado⁴⁵. Outro ponto que lhe torna tão atrativo e competitivo é acessibilidade e o valor em comparação às terapias convencionais⁴⁵. Uma análise da indústria global apresentou um crescimento com mais de 85% do mercado no consumo de nutracêutico, especialmente nos EUA, Europa e Japão⁵², mercados esses

considerados vanguardas da indústria de nutracêutico, tanto produtores quanto consumidores, devido à conscientização dos produtos, medicina preventiva e estilo de vida relacionado com aumento da atividade física e alta ingestão de frutas e verduras⁴⁵.

As populações em que o consumo de dietas ricas em vegetais, frutas e chás^{48,53} são mais frequentes, os índices de doenças cardiovasculares⁵⁴, artrite reumatóide, diabetes⁵⁵, alguns tipos de cânceres, acidente vascular cerebral⁵⁶ e doenças neurológicas, são menos evidentes⁴⁸. Possivelmente os fitoquímicos presentes naturalmente nesses alimentos originam benefícios para saúde do corpo, particularmente do cérebro⁴⁸.

1.1.1.1 Fitoquímicos

Fitoquímicos são considerados moléculas bioativas que estão presentes naturalmente nos alimentos, podendo ser adicionados a outras preparações alimentícias com a intenção de fortificar, suplementar ou tornar alimentos “funcionais”⁵³. As moléculas bioativas podem ser obtidas por meio de extração a partir de fontes naturais ou biotecnológica⁴⁵.

Presume-se que mais de 5000 fitoquímicos já foram detectados, porém uma grande porcentagem permanece desconhecida⁵⁷. Necessita-se identificá-los, para que os benefícios relacionados a sua atuação na saúde possam ser totalmente compreendidos e aplicados⁵⁷.

Entre os fitoquímicos já identificados, é possível verificar seus efeitos positivos para saúde os quais na maioria das vezes, acredita-se que seja devido as suas propriedades antioxidantes intrínsecas, atuando assim sobre o estresse oxidativo e desempenhando papel essencial na prevenção e tratamento de doenças⁴⁸. Contudo, para que os fitoquímicos presentes nos alimentos consigam atingir essa capacidade antioxidante no organismo, é necessária uma determinada concentração micromolar desses compostos bioativos, exigindo assim um consumo de grandes quantidades desses alimentos, muito além do que realmente são consumidos⁴⁸.

A presença de fitoquímicos nas plantas compreende fatos da evolução advindo durante anos da coevolução de plantas e animais, respondendo assim, o motivo pelo qual as plantas produzem um variável acervo de fitoquímicos, como

mecanismos complexos de defesas desenvolvidos pelos animais que os consomem⁴⁸. Diversos fatores de estresse estão em contato com as plantas constantemente, com ambientes bióticos e abióticos, entre eles: calor, frio, seca e ataques de herbívoros e patógenos⁵⁸, sendo assim as plantas desenvolveram duas principais estratégias de defesa, de natureza físicas e químicas⁴⁸.

A técnica de defesa realizada pelas plantas ocorre através da sintetização de metabólitos secundários, esses denominados fitoquímicos, para dissuadir insetos e outros herbívoros de comê-los, resultando na maioria das vezes em gostos amargos em um nível consideravelmente baixo na composição da planta⁴⁸. A coevolução de plantas e animais propiciou a adaptação dos animais a essas substâncias potencialmente tóxicas, sendo que o consumo dessas substâncias presentes nas plantas em baixas doses, sejam benéficos ou estimuladores em células animais^{48,53}.

Uma ampla variedade de alimentos entre eles: frutas, legumes, cereais, oleaginosas, plantas, raízes, ervas, apresentam em sua composição os fitoquímicos⁵⁹. A presença desses compostos bioativos nos alimentos evidenciam ser eficazes no aumento de enzimas antioxidantes, fatores neurotróficos e proteínas anti-apoptóticas tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* em estruturas encefálicas como córtex, estriado e hipocampo⁶⁰. Comprovando dessa forma, que uma dieta rica em alimentos compostos por fitoquímicos pode ao deparar-se com uma neuroinflamação, interceder a ativação de vias de sinalização, induzindo à expressão de proteínas citoprotetoras e restauradoras⁶⁰.

Diversos mecanismos moleculares dos fitoquímicos, como a modulação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e atividades das enzimas antioxidantes, têm sido apresentados para benefício da saúde⁶⁰. Contudo, sua habilidade de articular cascatas de transdução de sinal, acionar fatores de transcrição que antagonizam a neuroinflamação e estresse oxidativo tem instigado um interesse notável^{60,61}. Uma das plantas que contém uma série de fitoquímicos potencialmente bioativos e amplamente consumida em todo mundo é o gengibre, apresentando na sua oleoresina a fração pungente não-volátil, principalmente a família dos gingerols e shogaols⁶².

1.1.2 Gengibre

Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae), conhecido como o gengibre, é uma planta Asiática, mais precisamente das Ilhas de Java da China e Índia¹⁰. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (Embrapa) (2001)⁶³, o gengibre também é conhecido popularmente como mangarataia, mangaratiá e gengivre⁶³. Trata-se de uma planta herbácea que pode atingir até 150cm de altura, possui caule articulado, rizoma horizontal, com ramificações localizadas em um mesmo plano, com formato digitiforme⁶³ (Figura 1).

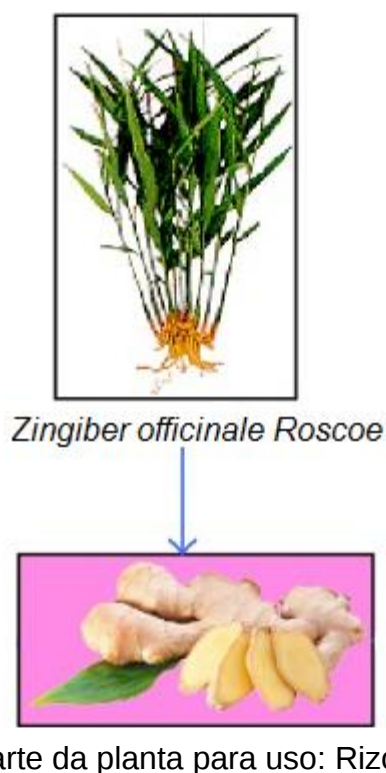


Figura 1. Representação da planta herbácea (*Zingiber officinale* Roscoe): popularmente conhecida como gengibre e seu respectivo rizoma.

Fonte: Adaptado Prasad e Tyagi, 2015⁶⁴.

O gengibre é considerado uma especiaria, cujo seu rizoma apresenta um aroma intenso e uma ampla utilização e comercialização na área industrial, alimentícia, especialmente como matéria prima para fabricação de bebidas, perfumes e também como erva medicinal²². O seu uso tem sido relatado desde 3.500 aC e a produção global dessa especiaria, considerada importante e popular no

mercado internacional, é estimada em 100.000 toneladas por ano^{22,65}. O rizoma do gengibre e seus extratos têm sido utilizado, devido a sua extensa gama de efeitos biológicos confirmados tanto em estudos experimentais quanto em ensaios clínicos⁶⁶.

Em todo mundo o gengibre é cultivado, apresentando aplicações diversas em cada cultura, sendo utilizado como infusões para tratar tosse e gripes na Colômbia e Birmânia^{10,67}. Na China é adicionado açúcar mascavo para aliviar resfriados e o gengibre em pó é misturado com ovos mexidos para reduzir a tosse^{10,67}. No Congo o suco de gengibre e manga são considerados capazes de remediar qualquer tipo de doença^{10,67}. Na Índia e Nepal a mistura de gengibre com limão e sal preto são ingeridos para combater náuseas ou a pasta feita do rizoma de gengibre para dores de cabeça^{10,67}. Na Indonésia acredita-se na utilização do gengibre para reduzir fadiga, prevenir reumatismo e melhorar a digestão^{10,67}. Nas Filipinas é aplicado para dores na garganta, nos EUA serve para aliviar enjoos durante a gravidez e redução de câimbras para praticantes de atividade física. Peruanos utilizam as infusões de gengibre para redução de cólicas estomacais e japoneses para circulação sanguínea^{10,68,69}.

Considerado um medicamento tradicional ayurvédico, o gengibre tem ampla utilização em todas as culturas e povos, sendo que chineses, árabes e africanos utilizam para tratamentos de dores de cabeça, náusea, resfriados, artrite, reumatismo, desconforto muscular e inflamação^{10,68,69}. Os compostos presentes no gengibre fresco e seco são inúmeros, mais de 400 já se tem descrito e identificados por diferentes métodos analíticos⁶⁴, sendo eficazes no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias, devido a sua ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, bactericida e antiviral²¹. Conhecido por seu excelente valor nutracêutico, o gengibre possui uma vasta fonte de compostos fitoquímicos, incluindo entre os principais: gingerols, paradols e os shogaols^{23,62,70} (Figura 2).

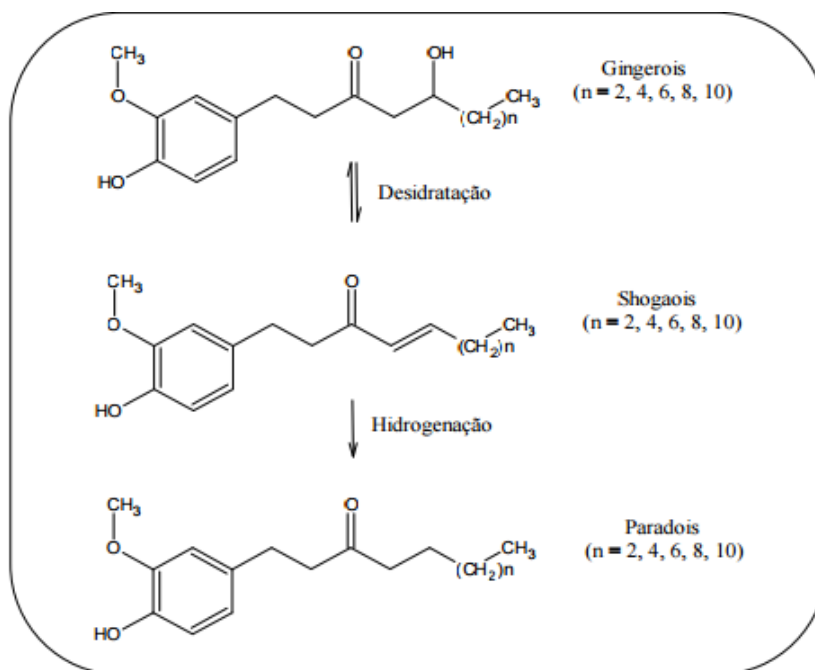


Figura 2. Representação simplificada da conversão dos gingerols em outras formas homólogas.

Fonte: Adaptado de Grzanna et al., 2005⁷¹.

Os gingerols e os shogaols são os mais abundantes na composição do gengibre em comparação com os outros constituintes, sendo encontrados na sua forma fresca ou seca respectivamente, possuindo assim diferentes propriedades, pois o processo de secagem resulta na alteração da composição do rizoma²³. Desta forma, assim como o aroma, o sabor do rizoma se altera nas duas formas, sendo que o sentido gustativo pungente do rizoma de gengibre fresco é atribuído à presença dos gingerols, grupo composto fenólico voláteis⁶⁸.

Elevadas temperaturas transformam os gingerols em shogaols, por serem compostos termolábeis, alterando, além da sua estrutura química, o sabor, tornando-se picante e doce^{70,72}. Entre os gingerols existe uma família, porém o mais frequente é o 6-gingerol^{70,72}. Pode-se encontrar outros compostos como 4-, 8-, 10- e 12-gingerol, contudo esses são em menores concentrações^{70,72}. A conversão do rizoma fresco para o seco é correspondendo ao gingerol, logo o 6-shogaol é o composto bioativo mais presente, demonstrando-se em alguns casos melhores atividades biológicas do que o 6-gingerol^{10,72}.

1.1.2.1 Compostos Bioativos

O gengibre apresenta em sua composição química componentes voláteis (terpenos) em quantidade de 1,0-3,0%, e não voláteis (compostos fenólicos e alcalóides), além das oleoresinas extraíveis, gorduras, ceras, carboidratos, vitaminas e minerais estão presentes, possuindo também uma enzima proteolítica potente chamada zingibain^{73,74}. Mesomo e colaboradores⁷⁵, em pesquisa realizada com extrato do gengibre, concluíram que a atividade antioxidante da oleoresina de gengibre deve-se especialmente aos gingerols e shogaols, substâncias presentes no gengibre que dão o seu sabor característico⁷⁵.

Um dos compostos bioativos presente no gengibre que se apresenta na forma de extrato seco ou pó é o 6-shogaol^{76,77}. Esse composto tem feito parte de pesquisas devido a sua atividade biológica superior e sua estabilidade melhorada em comparação com extrato fresco, 6-gingerol^{76,77}. O 6-shogaol, como um composto carbonilo eletrofílico α,β insaturada, tem sido mencionado para vários efeitos farmacológicos, incluindo anti-inflamatório, analgésico, antipirético, antioxidante^{22,78,79}.

Estudo realizado por Dugasani e colaboradores (2010)⁸⁰ comparou os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios presentes nos compostos bioativos do gengibre e identificaram que o 6-gingerol apresentou atividade anti-inflamatória⁸⁰. Contudo quando comparado com a atuação do 6-shogaol, ele proporcionou menor atividade anti-inflamatória, levando assim à hipótese de que o 6-shogaol é um melhor protótipo para síntese de medicamentos na indústria farmacêutica⁸⁰.

1.1.2.1.1 6-Shogaol

O 6-shogaol, composto bioativo presente no gengibre principalmente na sua forma desidratada, tem apresentado efeitos neurobiológicos e anti-inflamatórios^{30,76,79-83}(Figura 3).

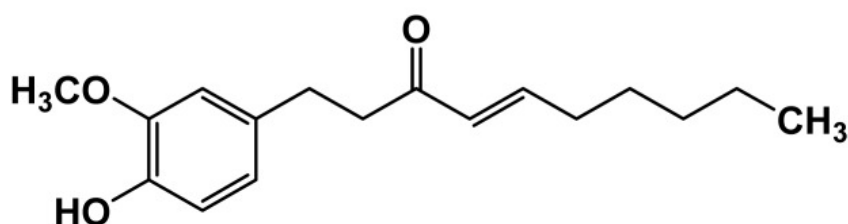


Figura 3. Estrutura química de um dos principais compostos bioativos do gengibre - 6-shogaol.

Fonte: Adaptado de Ok e Jeong, 2012⁷².

Em um estudo realizado por Bhattarai e colaboradores (2007)⁸⁴, simulando a cinética da degradação do 6-gingerol e 6-shogaol em fluidos gástricos e intestinais, foi observado que esses compostos bioativos sofrem reações de desidratação e hidratação reversíveis de primeira ordem para formar 6-shogaol e 6-gingerol, respectivamente⁸⁴. Verificou que esses processos de degradação eram catalisados por íons de hidrogênio e atingiram o equilíbrio após aproximadamente 200 horas⁸⁴. O perfil de degradação de 6-gingerol e 6-shogaol relatadas sob condições fisiológicas simuladas forneceram uma visão de estabilidade desses compostos quando administrados oralmente⁸⁴.

Quanto a toxicidade da administração do gengibre e seus metabólitos, estudo realizado como o 6-shogaol verificou que a sua utilização é segura em doses de 2000mg, sendo que esse valor está abaixo das recomendações estabelecidas pelas diretrizes de Critérios Comuns de Toxicidade do Instituto Nacional do Câncer dos EUA⁷⁶. Em uma revisão sistemática e metanálise realizado por Viljoen e colaboradores (2014)⁷⁶ utilizando doses mais elevadas de gengibre e seus compostos, foi verificado em indivíduos sintomas gastrointestinais leves como: eructação e pirose⁷⁶. Contudo, pesquisa realizada com diferentes doses de 6-shogaol identificou que doses de 10mg/Kg/dia é adequada para inibir a inflamação atenuando a ativação microglial e revertendo declínio cognitivo em modelos animais de doenças neurológicas^{24,29}.

O 6-shogaol apresenta entre as atividades farmacológicas mais estudadas, a sua ação antioxidante e anti-inflamatória, devido aos compostos fenólicos presentes, sendo esses responsáveis pela transferência de hidrogênio, possuindo a capacidade de capturar e neutralizar as EROs, modulando importantes vias de sinalização celular^{24,27}. Confirmado em estudos de doenças neurológicas a atenuação da

produção de EROs e aumento da viabilidade celular após a exposição a uma espécie reativa^{24,27}.

Estudos mostraram atuações importantes no uso do composto 6-shogaol em doenças neurológicas, como proteção das células endoteliais nos danos induzidos por beta-amilóide em modelo animal da doença de Alzheimer⁸⁵. Neste estudo, o 6-shogaol foi capaz de reduzir a morte celular e restaurar a função motora em modelos animais de lesão da medula espinal⁸⁶. Também atenuou a depressão da dopamina em respostas a 6-hidroxidopamina⁸⁷, preveniu a proliferação de células gliais através do aumento do BDNF em astrócitos tratados com LPS⁸⁸ e protegeu os neurônios do hipocampo através do aumento da colina acetiltransferase do transportador de colina⁸⁹.

O 6-shogaol protegeu as células da micróglia contra a toxicidade induzida por LPS em modelos inflamatórios *in vitro* e *in vivo*²⁴. Inibiu a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandinas E e citocinas pró-inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) por meio da regulação negativa da COX-2, da enzima de óxido nítrico-sintase induzível (i-NOS), proteína cinase p38 ativada por mitógenos e expressão do Fator Nuclear kappa B (NF-kB, do inglês *Nuclear Factor-kappa B*)²⁴. Exibiu também efeitos neuroprotetores através da inibição da micróglia em um modelo de isquemia global transitória²⁴.

Sabe-se que em situações de doenças neurológicas as vias de sinalização de proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKs, do inglês *Mitogen-activated protein kinase*) estão desreguladas²⁴. Estudo de Ha e colaboradores (2012)²⁴ identificou que a exposição ao LPS estimulou a fosforilação de Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 / 2 (ERK 1 / 2), Cinase N-Terminal de c-Jun (JNK) e p38, sendo fortemente suprimida após tratamento com 6-shogaol, inibindo também a ativação JNK²⁴.

Escassas são as informações das atividades farmacológicas do gengibre, assim como do 6-shogaol, embora seja uma planta já utilizada há muitos anos e participado de estudos tanto experimentais quanto clínicos^{90,91}. Estudo realizado por Qiu e colaboradores (2015)⁹² utilizando o composto bioativo 6-shogaol para tratamento de demência em modelo experimental, identificou que a administração via oral do 6-shogaol tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, devido a seu potencial inibitório da colinesterase, juntamente com suas atividades antagonistas muscarínicas e de canais de cálcio, demonstrando assim seu possível

desempenho benéfico em doenças neurológicas igualmente como suas atuações no SNC^{92,93}.

Propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes presentes no 6-shogaol, demonstraram ser uma boa alternativa terapêutica nutracêutica para doenças neurológicas²⁹. Estudo utilizando 6-shogaol como alternativa de tratamento, realizado com modelos animais de doenças neurológicas expostos a ativação induzida por A β O₁₋₄₂, identificou a melhora da função cognitiva, aprendizagem e redução do comprometimento da memória em modelos animais de demência²⁹.

1.1.3 Memória

A memória é a capacidade de obtenção, formação, armazenamento e evocação de informações^{94,95}. É o método de arquivar e reconstruir o conhecimento aprendido⁹⁶. A memória pode ser classificada de maneiras, considerando sua aplicabilidade, seu conteúdo e tempo de duração⁹⁷. O tempo da memória em alguns casos, pode durar somente alguns segundos enquanto em outras situações podem durar horas, dias, meses ou anos⁹⁷.

Pode-se classificar assim a memória como, memórias de trabalho ou de curta duração (MCD) ou longa duração (MLD)⁹⁸. Outras possíveis divisões de memória, em dois sistemas de memórias distintas: (i) memória declarativa (explícita) de fatos e acontecimento, para as pessoas, lugares e objetivos, classificadas em episódica (eventos) e memória semântica (fatos)⁹⁶; e (ii) memória não declarativa (implícita), relacionada à habilidades motoras e perceptivas, que abrange condicionado clássico simples, a aprendizagem não associativa, preparação e memória processual^{96,99}.

A formação da memória ocorre na forma de eventos moleculares ao nível de uma conexão sináptica individual, denominada plasticidade sináptica, mesmo sendo decorrente de uma infinidade de processos interativos¹⁰⁰. A expressão da memória se dá em nível comportamental, contudo essas alterações sinápticas integram-se através de múltiplas conexões sinápticas que envolvem redes neuronais maiores^{100,101}. Alterações micro-anatômicas que integram a formação da memória não são somente relacionadas com neurônios e suas partes, mas envolvem as células não neuronais, incluindo os astrócitos^{101,102}.

A estrutura encefálica considerada fundamental para a formação da memória é o hipocampo¹⁰¹. Nele existe uma alta densidade de receptores de citocinas,

sinalizando que o hipocampo, pode ser particularmente susceptível durante a neuroinflamação¹⁰³. Estudos utilizando modelos animais, tem demonstrado que a administração de citocinas ou outros estímulos imunogênicos, como o LPS pode impedir ou atrasar o processo de aprendizagem e de memória dependente do hipocampo¹⁰³⁻¹⁰⁹.

1.1.4 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura encefálica que se localiza no lobo temporal, bilateralmente, exercendo um papel fundamental na formação de MCD e MLD¹¹⁰. Diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com esta estrutura para organizar a aquisição e o armazenamento de novas informações¹¹¹. Cada processo de memória acontece em bases anatômicas específicas, porém interconectadas, trabalhando de maneira adjacente com outros sistemas neuronais, funcionando corretamente no cérebro¹¹².

O papel crucial do hipocampo, é a formação de memória declarativa¹¹³. Um estudo de metanálise realizada por Van Petten (2004)¹¹³ mostrou ser esta uma das primeiras a sofrer alterações em paciente com doença de Alzheimer¹¹³. Em outro estudo, identificaram que indivíduos com TEA de baixo funcionamento, apresentam déficits de memória declarativa e implícita^{96,114}. A presença de condições patológicas neuronais que prejudicam a memória, é decorrente especialmente de alterações hipocámpicas^{115,116}.

O hipocampo é uma área do cérebro funcionalmente complexa e particularmente sensível ao estresse¹¹⁷. É possível identificar uma grande expressão de fatores neurotróficos do cérebro, especialmente BDNF na estrutura dos hipocámpos¹¹⁸. O BDNF realiza a modulação de várias funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal¹¹⁹. As neurotrofinas, especialmente o BDNF, estão envolvidas no fundamento fisiopatológico de diferentes doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como TEA¹¹⁹.

1.1.5 Fatores Neurotróficos

Os fatores neurotróficos são conjuntos de proteínas identificadas como neurotrofinas, indispensáveis para desempenhar papéis importantes na formação do SNC e do sistema nervoso periférico (SNP), atuando na modulação da transmissão e plasticidade sináptica, sobrevivência, morfologia e diferenciação neuronal^{120,121,122}.

As neurotrofinas são compostas por família que tem como integrantes o NGF, o BDNF, e as neurotrofina-3 (NT-3), NT-4/5 e NT-6^{120,121,122}. No retículo endoplasmático ocorre a síntese dessas proteínas, que a partir daí são clivadas em moléculas menores chegando até as vesículas secretoras, podendo essas ser secretadas por duas diferentes vias de secreção, a via de Ca^{2+} dependente ou exocitose de grânulos de secreção¹²³.

Diversas funções celulares são mediadas por fatores neurotróficos através da ativação de receptores, envolvendo a expressão dos genes compreendidos na regulação da neuroplasticidade e vitalidade celular¹²⁴. As neurotrofinas executam grande parte dos papéis através dos receptores tirosina cinase (Trk), que apresentam como membros também da família o receptor tirosina cinase tipo A (TrkA), juntamente com o receptor neurotrófico tirosina cinase tipo B (TrkB) e o receptor neurotrófico tirosina cinase tipo C (TrkC)¹²⁵.

Seletivamente as neurotrofinas ligam-se a receptores específicos de Trk à medida que todas se conectam a p75. Contudo, outras vias de sinalização podem estar relacionadas como a p38, no entanto levando ao mesmo encontro final^{93,123,125,126}. A imunoglobulina G (IgG) está presente nos receptores Trk para domínios extracelulares de ligação ao ligante e uma sequência de Trk catalítico no domínio intracelular¹²⁵.

Vias de transdução de sinal são ativadas por cada receptor específico, a porção extracelular do p75 NTR (do inglês p75 *Neutrophin Receptor*) são compostos por quatro repetições fartas em cisteína e a parte intracelular compreende um domínio de morte¹²⁶. A sobrevivência, migração celular e a mielinização são intercedidas pela ligação ao receptor p75, através de diversas vias de sinalização^{123,125,126}. As relações entre os receptores Trk e p75 podem guiar a alterações na afinidade de ligação para as neurotrofinas¹²⁶ (Figura 4).

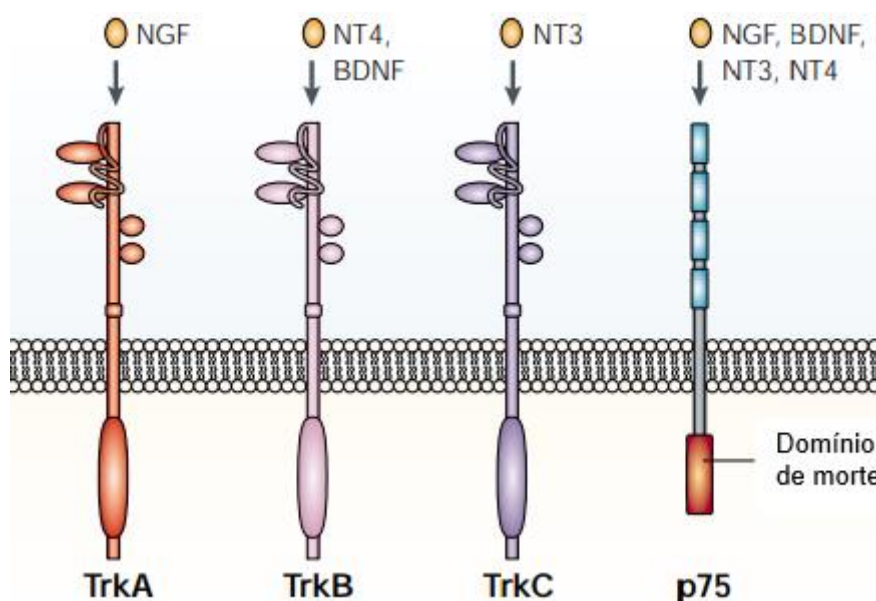


Figura 4. Tipos de Trk e suas distintas afinidades para as neurotrofinas.

Fonte: Adaptado de Chao, 2003¹²⁶.

As neurotrofinas aumentadas têm como principal função proteger os neurônios da excitotoxicidade, visando desta forma apresentar-se como moduladoras da plasticidade sináptica^{93,127}. Atuando na neuroproteção e reorganização, agindo como dispositivo de equilíbrio endógeno para originar regeneração e reparação no SNC e SNP^{93,127}.

1.1.5.1 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O BDNF é uma proteína da família das neurotrofinas, encontrada em grande quantidade e largamente distribuída no SNC^{121,122}. Apresenta uma expressão significativa nas estruturas encefálicas como hipocampo e córtex de crianças e adultos jovens, estando envolvida nos processos de aprendizagem e memória^{121,122}. O BDNF tem atuação indispensável no ajuste da plasticidade e atividade sináptica, tanto por meio de alterações funcionais como estruturais nos neurônios^{128,129}.

As atividades celulares do BDNF advêm da mediação do TrkB e pelo receptor de neurotrofina p75, membro da família TNF¹³⁰. A transcrição de exons é orientada por agentes diferentes, e guiada por um conjunto de mecanismos de sinalização, abrangendo Ca^{2+} , CREB (Proteína Ligante ao Elemento de Resposta ao AMPc, do inglês *cAMP Response Element-Binding*), MEK (proteína cinase ativada por mitógeno / proteína cinase regulada por sinais extracelulares, do inglês *mitogen*

activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase), MeCP2 (proteína de ligação a CpG metilado 2, do inglês, *methyl-CpG-binding protein 2*), CaMKII (proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina tipo 2, do inglês, *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*) e hormônios^{129,131,132}.

Uma série de cascatas de transdução de sinais são estimuladas pela ativação dos receptores, compreendendo a MAPK, o fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K, do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*) e a via da fosfolipase C-γ (PLC-γ, do inglês, *Phospholipase C, gamma*), utilizada também para conduzir a liberação e ativação do receptor neurotrófico^{129,132}. Após a ligação da proteína BDNF ao receptor TrkB, acontece uma dimerização e autofosforilação, assim que esses resíduos são fosforilados, locais específicos de ligações são formados para as enzimas e proteínas “*scaffolds*”^{133,134}, que são mediadores na ativação dos domínios intracelulares de três cascatas de sinalização^{129,133,134,135}.

As três vias de sinalização são: (1) a ativação intervinda por sch/Frs2 e Ras/Raf da via de MAPK que inclui MEK e ERK, levando ao crescimento e diferenciação celular; (2) a ativação mediada por sch/Frs2 e GAB1 da via PI3K, e a jusante via de Akt, conduzindo à sobrevivência celular e, finalmente, a (3) via de sinalização que é ativada diretamente pelo receptor PLCγ, que origina IP3 (*Inositol triphosphate*) e DAG (*diacylglycerol*) elevando os níveis de Ca²⁺ intracelular, ocasionando um acréscimo da atividade calmodulina cinase (CaMK), induzindo a plasticidade sináptica^{129,133,134,135}.

Essas vias descritas anteriormente convergem no fator de transcrição CREB^{129,134,136}. Sendo CREB alvo posterior deste mecanismo, encarregado pela transcrição de determinada quantidade de genes que promovem a resistência celular, abrangendo a Proteína 2 de Linfoma da Célula B (Bcl-2, do inglês *B-cell lymphoma 2*) que por meio da inibição da liberação do citocromo c, protege o efeito anti-apoptótico^{129,134,136} (Figura 5).

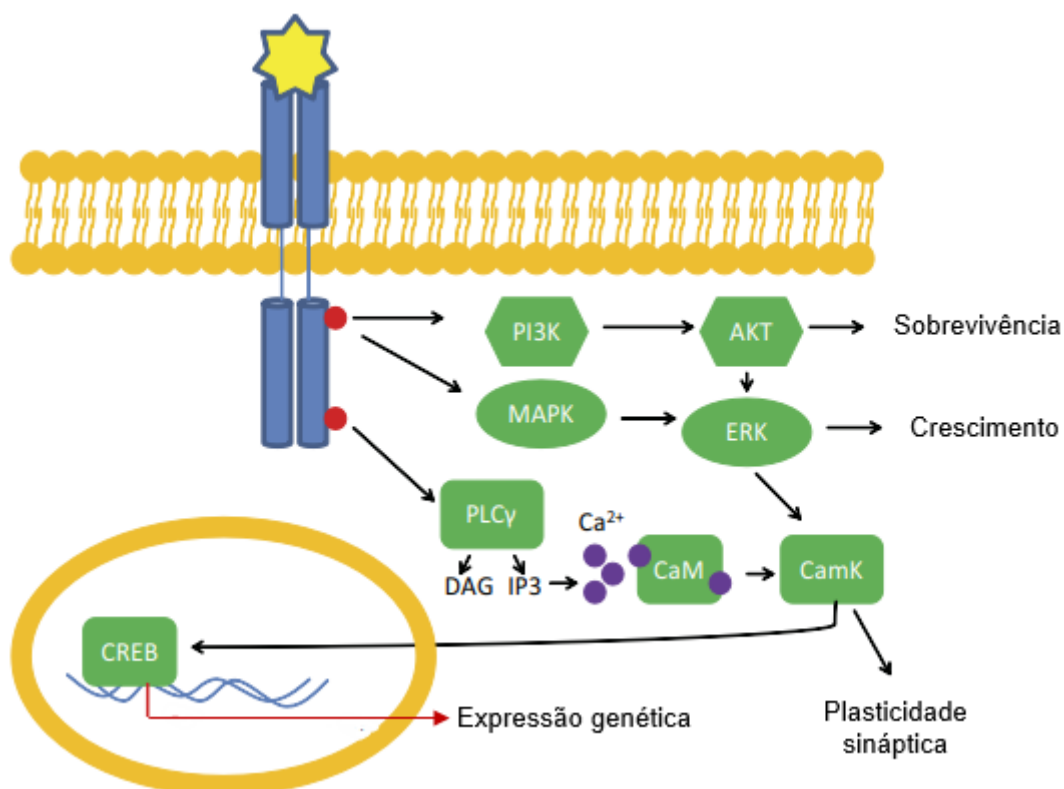


Figura 5. Visão geral do BDNF a sinalização através de receptores de TrkB.

Fonte: Adaptado de Autry e Monteggia, 2012¹³⁴.

Estudo realizado por Kim e Kwon (2013)²⁷, utilizando culturas de astrócitos de ratos, expostos ao estresse oxidativo induzidas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), demonstraram que as culturas de astrócitos tiveram níveis de fatores neurotróficos reduzidos e aumento nas proteínas apoptóticas, promovendo assim a apoptose oxidativa²⁷. Quando utilizaram como tratamento o 6-shogaol, composto bioativo do gengibre, verificaram maiores níveis de BDNF e uma reversão na fosforilação de ERK 1 / 2 em astrócitos²⁷.

Outro estudo que apresentou resultados semelhantes, foi realizado por Shim e colaboradores (2012)⁸⁸ em culturas de astrócitos de ratos expostos ao LPS, nessas identificou-se um aumento da produção de EROs, no grupo que recebeu tratamento com 6-shogaol houve uma supressão na produção de EROs induzida por LPS⁸⁸. A utilização do 6-shogaol mostrou efeitos neuroprotetores mediados pela regulação positiva do BDNF⁸⁸. Fatores neurotróficos, incluindo BDNF estão associados à proliferação e diferenciação de células neuronais e executam um efeito neuroprotetor, alterações diminuídas nos níveis de BDNF podem estar envolvidas com doenças do SNC^{88,131}.

O tratamento com gengibre e seus compostos bioativos, como o 6-shogaol vêm sendo fortemente proposto para doenças neurodegenerativas, traumatismo cerebral e transtornos neurológicos¹³⁷. O equilíbrio do BDNF é importante para regularização da sobrevivência, desenvolvimento e função neuronal²⁷. A utilização do gengibre pode representar como um tratamento terapêutico adequado atuando como neuroprotetor, para doenças neurológicas desencadeadas pelo estresse oxidativo exacerbado²⁷ (Figura 6).

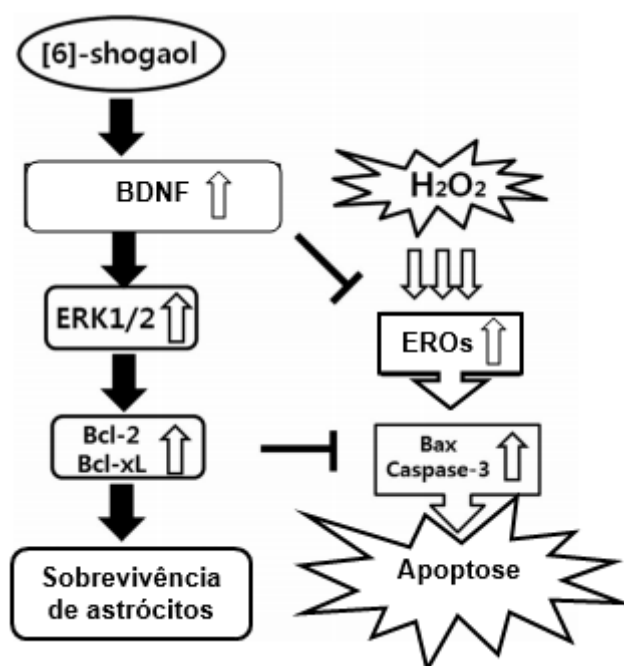


Figura 6. Diagrama esquemático da visão geral do efeito anti-apoptose do 6-shogaol contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Nos astrócitos tratados com H₂O₂, o 6-shogaol produz fatores neurotróficos e induz a via de sinalização ERK 1 / 2 de acordo com as proteínas anti-apoptóticas de sobrevivência celular, tais como Bcl-2 e Bcl-xL, enquanto inibe o EROs envolvidos na ação das proteínas apoptóticas tais como Proteína X Associada à Bcl-2 (Bax, do inglês *Bcl-2-associated X protein*) e caspase-3.

Fonte: Adaptado: Kim e Kwon, 2013²⁷.

Os baixos níveis de BDNF contribuem para etiologia de doenças neurológicas, como o TEA¹¹⁹. Pesquisa realizada com animais mostrou que o BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica em ambos os sentidos¹¹⁹. Portanto, as concentrações verificadas no sangue, certamente estão correlacionadas com as

concentrações no encéfalo¹¹⁹. Skogstrand e colaboradores (2019), em um estudo de caso-controle, identificaram baixos níveis séricos do BDNF em recém-nascidos, considerando assim um potencial biomarcador para o desenvolvimento encefálico¹¹⁹.

1.1.6 Biomarcadores Encefálicos

Indicadores de processos biológicos normais, patológicos ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica são definidos como biomarcadores¹³⁸. Proteínas ou enzimas podem representar, direta ou indiretamente, um ou mais processos biológicos ou patológicos ativos de um sistema definido ou estado de doença¹³⁹. Sendo assim, bioquimicamente, os biomarcadores são consideradas moléculas sistêmicas que podem ser determinadas em laboratórios¹³⁹, podendo ser utilizadas como alvos potenciais de terapias na prevenção e/ou tratamento de doenças sistêmicas¹⁴⁰ e do SNC¹⁴¹.

Biomarcadores encefálicos frequentemente utilizados são: adenilato cinase, S100- β e Enolase Específica Neurônio (NSE), sendo a proteína NSE um dos biomarcadores importante de danos às células neuronais^{142,143}. A função ou dano de estruturais neuronais em doenças psiquiátricas e neurológicas, incluindo o TEA, podem ser investigadas por meio da avaliação dos níveis de NSE, contribuindo para diagnosticar ou tratar esses tipos de doenças¹⁴⁴.

1.1.6.1 Enolase Específica do Neurônio (NSE)

Um dos marcadores de soro específico para danos neuronais utilizados para avaliar lesão, é a NSE¹⁴⁵. A NSE pode ser mensurada também em outras regiões encefálicas distintas, conforme foi identificado em um estudo *post mortem* realizado no hipocampo de indivíduos com Alzheimer, detectando nesses uma oxidação da NSE no encéfalo¹⁴⁶.

A NSE é uma enzima glicolítica concentrada no citoplasma dos neurônios e células com diferenciação neuroendócrina, no sangue periférico ela existe em quantidade desprezível¹⁴⁷. Um aumento das concentrações de NSE no líquido ou sangue ocorrem quando a mesma não é excretada, consequentemente significando uma associação com dano estrutural para células neuronais¹⁴⁷. Logo pode ser

considerado um importante biomarcador para acompanhar a progressão de doenças neurológicas, e/ou avaliar o grau de severidade de determinada doença¹⁴⁵.

A quantidade de 1,5% das proteínas solúveis totais do encéfalo é representada pela NSE^{148,149}. Nos estágios de lesão encefálica essas podem ser utilizadas para sugerir prognóstico baseado na quantificação do grau de lesão neuronal, isto é, um aumento na expressão de NSE antes dos sinais clínicos possibilita detectar danos neuronais em estágios subclínicos e servir como referência para mensurar o grau de neurodegeneração^{148,149,150}.

Gelderblom e colaboradores (2013)¹⁴⁹ quantificaram níveis de NSE no plasma em um estudo realizado com modelos animais de doenças neurológicas agudas e crônicas, com o objetivo de avaliar a NSE como biomarcador para aferir grau de lesão neuronal, e identificaram um aumento na expressão da NSE tanto nas doenças neurológicas agudas quanto as crônicas, sendo que no modelo de doença neurológica aguda foi observado uma elevação dos níveis de NSE no plasma três horas após a lesão, sugerindo um dano neuronal precoce e generalizado¹⁴⁹. No modelo de doença neurológica crônica, assim como o TEA, foi verificado no decorrer da doença níveis aumentados de NSE no plasma, com isso é possível detectar uma elevação dos níveis de NSE antes do início dos sintomas clínico, permitindo estratégias de tratamentos neuroprotetores¹⁴⁹.

Em estudo realizado por Ogundele e colaboradores (2014)¹⁵¹, utilizando modelo animal exposto ao cianeto, em que foram induzidos o estresse oxidativo, verificou uma ativação descontrolada da glia e neuroinflamação, contribuindo esses para os danos encefálicos¹⁵¹. A presença do estresse oxidativo, juntamente com alteração no metabolismo neuronal, identificou-se um aumento nos níveis de NSE, demonstrando assim uma estreita ligação entre a ativação exacerbada da glia, o metabolismo neuronal e níveis elevados de NSE em doenças neurológicas¹⁵¹.

1.1.7 Estresse Oxidativo

Radicais livres são átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, proporcionando alta reatividade¹⁵². Esses são formados a partir de processos fisiológicos normais ou patogênicos¹⁵². Em condições prejudiciais, o elétron não emparelhado atua com outros íons ou moléculas ligando-se a um elétron desta outra molécula, com objetivo de emparelhar-se, produzindo assim

perturbações e conseqüentemente danos às células¹⁵³. Os metabólitos resultantes desse processo, considerados em conjunto, são denominadas EROs e também espécies reativas de nitrogênio (ERN)¹⁵⁴.

Em condições fisiológicas é possível verificar um equilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante das células endógenas em organismos vivos¹⁵⁴. Contudo quando há um desequilíbrio em favor das EROs, isso representa o fenômeno do “estresse oxidativo”¹⁵⁴. A presença do estresse oxidativo pode originar dano celular, posteriormente morte das células por apoptose, especialmente na neurodegeneração, pois as EROs podem oxidar elementos celulares vitais como, lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), originando doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, esquizofrenia e TEA^{155,156}.

As EROs são compostos químicos resultantes das reações catabólicas derivadas da redução do oxigênio, entre eles pode-se citar o superóxido (O_2^-), H_2O_2 , NO e radicais hidroxilas (OH^-)¹⁵⁷. O radical OH^- apresenta grande potencial reativo e instabilidade¹⁵⁸, essas características o transformam no radical livre mais favorável na produção de danos oxidativos¹⁵⁹, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica, alterando funções biológicas das membranas celulares, atuando sobre as proteínas, alterando suas estruturas e funções, atacando o DNA permitindo a ocorrência de mutações e desencadeando respostas inflamatórias^{156,160}.

A presença do processo de estresse oxidativo advém do desequilíbrio entre as EROs e defesas antioxidantes, em favor da produção excessiva de EROs ou em desvantagem da velocidade de remoção destas pelos antioxidantes¹⁶⁰. O processo de estresse oxidativo, pode ocasionar na oxidação de biomoléculas, tais como: lipídios, proteínas e DNA, resultando assim na perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, da qual sua manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos^{152,160}. Com o dano as estruturas celulares, o estresse oxidativo pode desencadear respostas inflamatórias, sendo assim a estabilidade entre compostos oxidantes e antioxidantes é primordial para a satisfatória função dos tecidos e órgãos¹⁶⁰⁻¹⁶³.

O encéfalo devido a sua metabolização de 20% de oxigênio corporal, sua alta taxa de ácidos graxos insaturados facilmente peroxidáveis e capacidade antioxidante limitada, torna-se particularmente vulnerável ao dano oxidativo em relação aos outros órgãos^{162,164,165,166}. A peroxidação lipídica ocorre nas membranas

celulares quando ácidos graxos insaturados reagem com níveis elevados de EROs, formando radicais de ácidos graxos e hidroperóxidos lipídicos, desencadeando assim autooxidação de ácidos graxos poli-insaturados, associados na iniciação e progressão de doenças relacionadas principalmente em disfunções neurológicas¹⁶⁷.

Um aldeído altamente reativo e considerado um dos produtos mais importantes e tóxicos da peroxidação lipídica é o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)¹⁶⁸. O HNE encontra-se em concentrações aumentadas no tecido encefálico em doenças neurodegenerativas como: Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Parkinson¹⁶⁹. Considerado neurotóxico, o HNE quando identificado em níveis aumentados em doenças neurológicas podem indicar ação fisiopatológica do estresse oxidativo¹⁶⁹.

A 3-nitrotirosina (3-NT) marcador do dano oxidativo às proteínas, é um produto da nitração da tirosina mediado por ERN, tais como o ânion peroxinitrito (ONOO^-) e o dióxido de nitrogênio, detectado em condições patológicas, considerado um marcador de estresse oxidativo dependente de NO¹⁷⁰. O excesso de NO compete com antioxidantes e promove a geração de ONOO^- , e gerando dano oxidativo da proteína¹⁷⁰. A elevação crônica desses radicais livres, esgotam a capacidade redox / antioxidante, permitindo geração de radicais livres ininterruptas e ciclos de auto-perturbação, resultando em estresse oxidativo crônico e danos encefálicos¹⁷⁰.

Células imunes como macrófagos e neutrófilos também produzem espécies reativas, que por ação da enzima MPO ocorre formação de ácido hipocloroso, que se dissocia no íon hipoclorito possuindo ação microbicida¹⁷¹. Quando há ativação de neutrófilos, concomitantemente com a fagocitose, eles sofrem explosão respiratória¹⁷¹. Causando a produção de O_2^- , H_2O_2 e outros derivados reativos de oxigênio, todos tóxicos para os micróbios¹⁷². A enzima MPO catalisa a conversão de H_2O_2 e íons cloreto (Cl) em ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso é 50 vezes mais potente na morte microbiana do que o H_2O_2 ^{172,173}.

A atividade da enzima MPO é considerada um marcador de inflamação e oxidação¹⁷³. Promove o estresse oxidativo durante a inflamação, sendo regulada em várias condições inflamatórias agudas e crônicas, incluindo a esquizofrenia e o TEA^{173,174}. Níveis elevados da enzima MPO foram demonstrados em doenças neurológicas crônicas, tais como o TEA¹⁷³, doença de Alzheimer¹⁷⁵, Parkinson¹⁷⁶ e esclerose múltipla¹⁷⁷.

No estado fisiológico normal, o organismo se encarrega de neutralizar estas substâncias por meio da capacidade antioxidante de células presentes no organismo que possuem função específica de remover ou inativar as EROs após a sua produção, assim como reparar os danos causadas por elas^{157,178}. Entre as ERNs incluem-se o NO, óxido nítrico (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e ONOO⁻¹⁷⁹.

A presença de uma produção sucessiva de EROs e ERNs durante processos metabólicos, dispõe para o organismo uma proteção através do sistema antioxidante, objetivando limitar os níveis de tais espécies e controlar os danos consequentes^{158,160}. O sistema antioxidante é dividido em não enzimático e enzimático^{158,160}. O sistema de defesa não enzimático inclui compostos antioxidantes de origem dietética, tais como: vitaminas, minerais e compostos fenólicos^{158,160}.

A inclusão de alimentos ricos em compostos fenólicos, como os presentes no gengibre tem apresentado efeitos positivos na regulação de agentes antioxidantes provenientes da dieta, equilibrando os níveis de produção das EROs e inibindo a peroxidação lipídica⁶². O gengibre e os seus compostos em estudos prévios já foram reconhecidos como potentes antioxidantes, devido a sua capacidade de inibir a oxidação de radicais livres e a produção de NO^{24,25,29,180}.

1.1.8 Neuroinflamação

A neuroinflamação exerce uma função crítica em diferentes doenças neurológicas e psiquiátricas¹⁸¹. É considerada um processo de defesa fisiológica, benéfica para reparação e recuperação do SNC¹⁸², contudo quando em desequilíbrio, tem sido associada com doenças encefálicas diversas, entre elas depressão¹⁵⁶, doença de Alzheimer¹⁸³, esquizofrenia e TEA¹⁸⁴.

A ativação dos processos neuroinflamatórios são tipicamente desencadeados como uma resposta protetora após uma infecção, lesão ou doença, e inclui um espectro de complexas e integradas respostas celulares, tais como a ativação da micróglia¹⁸⁵. No entanto, quando ativada de forma desregulada, libera mediadores pró-inflamatórios e substâncias neurotóxicas em excesso, como EROs, NO, podendo potencialmente contribuir para disfunção neuronal e progressão de doenças do SNC^{186,187,188}.

No que se refere à ativação de astrócitos, resulta na ativação da enzima de i-NOS, elevação da expressão e/ou liberação de citocinas e quimiocinas caracterizando o processo de neuroinflamação^{189,190}. A ativação de astrócitos e micróglia e sua resposta pró-inflamatória quando ocorre em período pré-natal, pode comprometer o desenvolvimento encefálico do feto, acarretando assim em déficits de comunicação, motor, movimentos estereotipados caracterizando comportamentos autistas ou contribuindo para alterações sinápticas e a morte neuronal^{191,192}.

O processo de neuroinflamação tem sido identificado em transtornos neurológicos como o TEA, caracterizado pela potencialização das reações gliais e estresse oxidativo¹⁹³. Essas reações e a presença do estresse oxidativo, resultam em crescimento neuronal anormal e apoptose, alterando a função neuronal¹⁹³.

1.1.9 Transtornos Neurológicos e Ativação Imune Materna

Transtornos neurológicos do desenvolvimento associados com infecção materna vem sendo descritos desde 1964, período que ocorreu a pandemia de rubéola em gestantes, fazendo com que as crianças nascidas nessa época apresentassem comportamentos característicos do TEA, demonstrando assim a ativação imune materna como uma causa não genética do TEA^{194,195}. Infecções maternas, incluindo a influenza, citomegalovírus, varicela, sarampo e rubéola, foram associadas com fator de risco para manifestação do TEA, corroborando assim que a causa principal da presença do transtorno não foi o agente patogênico, mas sim a ativação generalizada do sistema imune materno¹⁹⁴⁻¹⁹⁹.

Experiências vivenciadas durante o período pré-natal são determinantes para a saúde do feto¹⁹⁸. A ocorrência de infecções maternas e a consequente ativação do sistema imune da mãe ocasionam uma série de alterações estruturais e funcionais no sistema nervoso da prole, podendo predispor o indivíduo a doenças neurológicas na vida pós-natal, incluindo o TEA¹⁹⁸.

Spencer e colaboradores (2007)²⁰⁰, em um estudo pré-clínico do TEA, mostraram que a administração intraperitoneal (ip) de LPS no período pré-natal induziu a um processo inflamatório no SNC dos fetos através do aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, após atravessarem a barreira hematoencefálica, conseguiram modular a atividade dos neurônios causando alteração na neurotransmissão e, conseqüentemente, desenvolvendo

comportamentos semelhantes ao TEA em ratos *Wistar*²⁰¹. Os comportamentos atípicos associados à exposição pré-natal de LPS podem se manifestar em períodos de curto ou longo prazo²⁰¹.

Evidências clínicas^{202,203} e experimentais^{198,204} têm apontado que as infecções pré-natais podem interferir no ambiente intra-uterino, promovendo anormalidades comportamentais com similaridades ao autismo^{41,202}, inclusive com a ativação inadequada de citocinas pró-inflamatórias^{41,202,203} e alterações na resposta imune^{41,202,205}. Neste sentido, um dos modelos experimentais de TEA estudados extensivamente nos últimos anos mostra que a ativação imune materna a partir da administração de LPS no dia gestacional (DG) 9.5 (9 dias e 12 horas), período antes do fechamento do tubo neural é capaz de promover anormalidades comportamentais semelhantes àsquelas encontradas em pacientes com autismo²⁰⁶.

A ativação imune materna permite caracterizar a exposição ao LPS como modelo adequado para o estudo do autismo^{198,199}. Uma vez que os animais submetidos sistematicamente a esta endotoxina conseguiram estabelecer as três características principais de um modelo animal de doença: (a) validade de face (sintomas semelhantes)^{198,207}; (b) validade de constructo (causa semelhante)^{198,207} e (c) validade preditiva (resposta análoga a tratamentos para prevenir ou reverter os sintomas)^{198,207}.

1.1.10 Transtornos do Espectro Autista

Em 1943, Leo Kanner, um psiquiatra infantil apresentou 11 casos de crianças que vinham sendo observadas e exibiam características como movimentos repetitivos e estereotipados, comportamentos obsessivos e em alguns casos com alterações de linguagem, identifico-os com transtornos autísticos do contato afetivo²⁰⁸. Até a década de 80 as teorias e conceitualização do autismo era considerado com transtorno básico dos processos cognitivos e da linguagem, ignorando os sintomas sociais e afetivos que apresentava²⁰⁸.

Foi em 1987 que o autismo apareceu pela primeira vez no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III-R). Este formulou os critérios de diagnóstico com uma perspectiva de progresso, classificando o termo autismo como um Transtorno Invasivo de Desenvolvimento (TID)²⁰⁹, sendo esse utilizado até 2013 para diagnosticar indivíduos com déficit de interação social,

linguagem e comunicação e padrões repetitivos de comportamento²⁰⁹. Com a publicação do DSM-IV, o autismo apresentou critérios em um grau mais elevado de especificidade e sensibilidade para grupos de diferentes faixas etárias e entre indivíduos com habilidade cognitivas e linguagem distinta^{209,210}.

A complexidade dos casos de indivíduos com autismo avaliados nem sempre foram suficientes para preencher os critérios para diagnóstico^{37,211,212}. Com isso, em 2013, com a última publicação do DSM-V, a Associação Americana de Psiquiatria (APA) discutiu novos critérios clínicos e formularam uma nova categoria para diagnosticar, excluindo o termo TID, criando uma categoria única como TEA, excluindo o Transtorno Desintegrativo da Infância e a Síndrome de Rett da atual classificação do TEA^{37,211,212}.

A definição apresentada no DSM-V³⁷ para o TEA ficou descrito como um transtorno neurocomportamental complexo caracterizado por vários graus de deficiência, entre eles: interação social, agilidade de pensamento, mudanças peculiares de linguagem e/ou percepção atrasada, prejuízo na comunicação verbal e não verbal e incapacidade em responder a certos estímulos apresentando um comportamento restrito e repetitivo^{36,37}. Sintomas presentes desde a infância limitando/prejudicando o dia-a-dia^{36,213}.

As avaliações comportamentais ainda representam os principais parâmetros de diagnósticos do TEA, devido à ausência de marcadores biológicos para identificá-los^{214,215}, e a maioria dos casos são diagnosticados depois dos três anos de idade²¹⁶. Em alguns casos os sintomas do TEA podem ser identificados a partir dos 18 meses de idade²¹⁶. A APA sugere acompanhar o desenvolvimento de todas as crianças até os 24 meses, pois a partir do segundo ano de vida que os comportamentos característicos do TEA se manifestam e são capazes de auxiliar no diagnóstico²¹⁷. Estudos sobre a base neurológica do TEA identificaram que diagnósticos antes dos três anos de idade são cruciais para começar o tratamento, pois é nessa fase que iniciam os cuidados primários da infância, podendo ter melhores resultados²¹⁷.

Irmãos já diagnosticados com TEA apresentam maiores chances de desenvolverem o transtorno, sendo que a taxa de frequência é cerca de 2% a 8% dos casos^{218,219}. As modificações morfológicas do TEA geram confusão para compreensão de sua fisiopatologia²²⁰. Parellada e colaboradores²²¹, em 2013, identificaram em um estudo que crianças com autismo apresentam o perímetro

cefálico aumentado, especialmente o cerebelo²²¹. Um aumento foi verificado a partir do primeiro ano de vida, incluindo alterações no córtex encefálico, amígdala e hipocampo²²². Podendo estas anormalidades morfométricas estar relacionadas com as características principais do TEA²²¹.

A prevalência do TEA tem aumentando mundialmente²²³, estima-se que a prevalência global do TEA seja 1:68 crianças, de acordo com pesquisas realizadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e *Autism and Developmental Disabilities Monitoring* (ADDM) nos anos de 2011-2012, representando um aumento de 23% quando comparado ao período de 2006-2008²²⁴. Nos EUA, a prevalência do TEA apresentada pelos centros de pesquisa mostrou 1:45 crianças americanas tem diagnóstico de TEA, representando cerca de 2,25%^{35,224,225,226}.

No Brasil, um estudo transversal estimou uma frequência de 27,2:10.000 habitantes, ou seja 0,3% de casos de TEA em crianças com idade entre 7 e 12 anos²²⁷. No estado de Santa Catarina, de acordo com as bases de dados das Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), da Associação de Amigos dos Autistas (AMA) e da Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE), a prevalência de casos diagnosticados apresentou um índice de 1,31 casos para cada 10.000 habitantes^{228,229}. Contudo, o estudo realizado em Santa Catarina mostrou limitações devido ao fato de os dados serem secundários, retrospectivos e adquiridos por fontes via e-mail, ligação telefônica e instituições^{228,229}.

Na obtenção dessas informações pode ter ocorrido subnotificações, já que esses dados não eram informatizados e sem nenhum órgão ou instituição responsável em armazenar essas informações. Além do mais, os dados registrados foram somente da população com evidências diagnósticas que frequentavam as instituições, sendo que nem todos os indivíduos portadores do transtorno estão inseridos nestas instituições^{228,229}.

A mudanças no critério de diagnóstico não tem sido o único fator para o aumento dos dados de prevalência de TEA^{35,226}. Segundo Blumberg e colaboradores, esse aumento pode estar relacionado, pela observação precoce dos sintomas do transtorno por parte dos pais, professores e profissionais da saúde^{35,226}.

A etiologia do TEA é bastante complexa²³⁰, até o momento continua indefinida, porém ele é considerado um transtorno multifatorial, influenciado pela genética, epigenética, fatores neurobiológicos, neuroanatômicos, ambientais e/ou imunológicos^{174,231,235}. De acordo com Chauhan e colaboradores (2012)²³⁶, existem

evidências sugerindo a exposição ao estresse oxidativo juntamente com a disfunção mitocondrial, possam contribuir com a etiologia multifatorial do TEA relacionada com a inflamação pelas alterações imunológicas²³⁶, considerado um transtorno do desenvolvimento neurológico que pode estar associado a um processo de neuroinflamação^{237,238,239}.

Estudo realizado por Gesundheit e colaboradores (2013)²⁴⁰, relacionaram o TEA com fatores de risco pré-natal, como idade avançada de ambos os pais, uso de substâncias psiquiátricas, doenças autoimunes nos familiares ou condições imunes como diabetes, doença celíaca, alergias e asma durante a gestação²⁴⁰. Fatores como infecções pré-natais, traumatismo ou exposição a toxinas ambientais também foram associadas a maior frequência de filhos diagnosticados com TEA^{241,242,243}.

O uso da ressonância magnética funcional tem sido empregada para evidenciar alterações nos padrões, ativação e sincronização dos circuitos corticais²⁴⁴, essa técnica utiliza o fluxo sanguíneo para quantificar a atividade neural. Parellada e colaboradores (2013)²²¹ apresentaram em estudo que a conectividade funcional estava diminuída no encéfalo de crianças com TEA, evidenciando alterações a respeito da linguagem, memória, mecanismo de resolução de problemas e interação social²²¹.

Os tratamentos farmacológicos utilizados para o TEA na sua grande maioria, não são conduzidos para os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fisiopatologia desse transtorno, devido ao fato deles ainda não serem totalmente compreendidos²⁴⁵. Outra grande dificuldade enfrentada pela terapia farmacológica é a baixa adesão dos pacientes aos medicamentos, principalmente devido à demora da resposta terapêutica e aos efeitos colaterais²⁴⁵. Com isso, a busca por opções não-farmacológicas capazes de atrasar o início e a progressão dos sintomas apresentados pelo TEA e suas complicações são prementes²⁴⁶.

Alimentos como frutas, legumes, cereais, oleaginosas, plantas, café, vinho, contém ampla gama de metabólitos secundários, conhecidos como fitoquímicos, que demonstram ser eficazes no aumento de enzimas antioxidantes, fatores neurotróficos e proteínas anti-apoptóticas⁵⁹. Nutracêutico como o composto bioativo presente no gengibre, o 6-shogaol, oferecem benefícios promissores podendo incluir a promoção a saúde e reduzir a excitotoxicidade, melhorando sistemas imunomoduladores, minimizando o estresse oxidativo e reduzindo contaminação por fatores ambientais²⁴⁷.

O 6-shogaol, devido sua ação neuroprotetora, pode estar atenuando fatores desencadeantes de transtornos neurológicos, como os presentes no TEA, que tem aumentando muito sua prevalência nos últimos anos e que carece de tratamentos que minimizem os comportamentos gerados por essa doença, com o mínimo de efeitos colaterais^{226,247}. Neste sentido, a nutrição tem alcançado cada vez mais uma atuação significativa, tanto no desenvolvimento quanto na alteração do percurso de doenças neurológicas e psiquiátricas^{248,249}. Se sabe que a administração de 6-shogaol pode contribuir positivamente em diversas doenças neurológicas^{24,29,30}, contudo ainda não se tem conhecimento de sua atuação no TEA.

Baseando-se nessas evidências, esse estudo foi delineado visando aprofundar os conhecimentos sobre a atuação do 6-shogaol, na compreensão sobre sua atuação terapêutica, em modelo pré-clínico do TEA fundamentado em uma infecção bacteriana pré-natal, originada através de um estímulo neuroinflamatório, a partir da exposição ao LPS.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do 6-shogaol, em um modelo pré-clínico baseado em uma infecção bacteriana pré-natal a partir da exposição ao LPS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Etapa 1 – Análise comportamental

Investigar o efeito do 6-shogaol em uma prole de ratos machos da linhagem *Wistar*, expostos a uma infecção bacteriana por LPS em período pré-natal, no dia pós-natal (DPN) 35 a 37 e DPN 60 a 62, 24 horas após o fim do tratamento, quanto aos parâmetros:

- Exploratórios, através do teste de *Open Field*
- Memória aversiva, por meio do teste de esquiva inibitória.

2.2.2 Etapa 2 – Análise bioquímica

Analisar o efeito do 6-shogaol, de uma prole de ratos machos jovens da linhagem *Wistar* expostos a uma infecção bacteriana por LPS em período pré-natal, na estrutura encefálica do hipocampo, em DPN 37 e 62, sobre parâmetros bioquímicos de:

- Imunodeteção da ERK 1 / 2
- Nível do fator neurotrófico BDNF
- Nível do biomarcador NSE
- Dano oxidativo em lipídios por HNE
- Dano oxidativo em proteínas por 3-NT
- Atividade da enzima MPO.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental mimetizando uma neuroinflamação realizada em modelo de exposição ao LPS em período pré-natal, semelhando comportamento tipo-autista, utilizando como tratamento na prole de machos, o composto bioativo 6-shogaol.

3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

LPS obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma-Aldrich®).

6-Shogaol (Sigma-Aldrich®; EUA) diluída em solução salina 0,9%.

Balança eletrônica modelo SF – 400

Aparato de campo aberto (caixa de 60 x 60 x 30 cm).

Webcam 2.0 megapixels, tripé e notebook.

Aparelho de esquiva inibitória (esquiva passiva).

Leitor de microplacas (Versamax, Molecular Device, Sunnyvale, CA, EUA).

Leitora de microplacas (SPECTRAMAX, Molecular Devices, EUA).

Espectrofotômetro digital – GT.

Densitômetro de Bio-Rad (BioRad, hercules, CA, EUA).

CL-XPosure Film (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

Sistema de detecção ECL *Western Blotting Plus* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tampão RIPA [Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, , 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e inibidores de protease (Roche)].

Membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Solução salina tamponada com Tris Tween-20 (TTBS) contendo solução albumina bovina a 5% anticorpo de coelho anti-coelho a 4°C (1:1000, Cell Signalling, EUA).

IgG anti-rato conjugado com fluoróforo infravermelho (1:10000 Cell Signalling, EUA).

Kit Elisa Duo set (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Inibidor de protease (50mM - Roche AG, Basileia, Suíça).

Kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, EUA).

Beta-actina (anti-rato, 1:1000, Cell Signalling, USA).

Hanks balanced salt solution (HBSS) – Life Technologies, MA, EUA.

DMEM – Life Technologies, MA, EUA.

Dodecil-sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Anticorpos anti-NSE (1:2.000; Abcam Inc.).

Anticorpo anti- β -actina (1: 5000; *Sigma-Aldrich*®).

Solução salina tamponada com fosfato suplementada com 0,003% de Tween 20 (PBST).

Parceiros para realização dos experimentos e análises neuroquímicas: Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (NEUROIMet) Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Laboratório de Imunofarmacologia – Instituto Oswaldo Cruz (IOC - FIOCRUZ).

3.3 ANIMAIS

3.3.1 Animais experimentais

Foram utilizados para realização do estudo 24 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) fêmeas, virgens, pesando entre 250 e 300g, procedentes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), essas foram acasaladas com 12 machos da mesma linhagem e peso. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em padrão sanitário controlado, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno (46 x 31 x 21cm) forradas com cama de maravalha e proteção em grades. Os animais ficaram em temperatura controlada (22°C $\pm$ 1°C) e períodos de luz artificial (12 horas claro/escuro). Os animais receberam ração comercial padronizada e água *ad libitum*.

3.3.2 Acasalamento

Para concretização do acasalamento, foram colocados os ratos fêmeas nas gaiolas dos machos ao final do ciclo de luz (19 horas), considerando sempre a proporção de duas fêmeas para cada macho. No início do ciclo de luz (7 horas) do dia seguinte, foi verificado se ocorreu a prenhez através do procedimento de esfregaço vaginal, que consiste na introdução de cloreto de sódio (NaCl) por meio de uma pipeta plástica na vagina da fêmea. Foi coletado a secreção para análise em microscópio óptico e investigada a presença de espermatozoides junto ao material biológico do animal, esse procedimento seguiu as descrições de Held e colaboradores^{250,251}.

Nas fêmeas que foram constatadas a presença de espermatozoides, considerou-se o DG zero (DG 0)^{252,253}. Estas fêmeas, foram denominadas de matrizes, separadas aleatoriamente e colocadas em gaiolas moradias individualmente, permanecendo nas mesmas durante todo o período de prenhez. Nos casos da ausência de espermatozoide, as etapas de pareamento de machos e fêmeas, seguidos do procedimento de esfregaço vaginal foram repetidos nos dias seguintes até a constatação de espermatozoides.

3.3.3 Modelo animal por exposição pré-natal ao LPS

Para a caracterização do modelo animal exposto em período pré-natal ao LPS, foi realizado a ativação imune materna, as matrizes foram divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com o protocolo experimental, um grupo recebeu administração ip de uma única injeção de LPS adquirido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (*Sigma-Aldrich*®), na dose de 100 µg/Kg no DG 9.5 (9 dias e 12 horas), período antes do fechamento do tubo neural²⁰⁶, diluída em 50 µg/ml de solução aquosa de NaCl 0,9% estéril^{200,206}, caracterizando o grupo experimental (LPS-expostos). O outro grupo recebeu apenas solução NaCl 0,9% estéril ip no volume equivalente ao grupo experimental, caracterizando o grupo controle (Salina-expostos). A administração das substâncias ocorreu sempre no período vespertino (entre 15 – 17 horas) para concluir as 12 horas, confirmando o prazo de DG 9.5²⁵⁴.

3.3.4 Padronização da Ninhada

Os partos aconteceram de forma natural, no DPN 1 e 2 não foi realizada nenhuma manipulação nos animais, para prevenir a rejeição das mães em relação as suas proles. No DPN 3 ocorreu os ajustes da ninhada em 4 fêmeas e 4 machos, totalizando 8 animais por ninhada. A diferenciação entre os gêneros foi obtida por meio da identificação da distinção visual relacionada à distância anogenital, sendo considerada maior em machos. Entre o DPN 8-15 foi possível confirmar a diferença entre os gêneros devido a presença de testículos nos machos e de mamas nas fêmeas^{255,256}.

3.3.5 Medida do Peso Corporal

O peso corporal foi avaliado de acordo com a descrição de Cysneiros e colaboradores (2010)²⁵⁷ na balança eletrônica modelo SF – 400, inicialmente houve a verificação do peso corporal das matrizes em DG 9.5, para ajuste da dosagem de LPS e/ou salina, para caracterização do modelo experimental na prole.

Outro momento que houve medida do peso corporal, foi na prole macho que participou do estudo, que ocorreu em DPN 30 e DPN 55 para ajustar o volume das dosagens de tratamento indicada para cada animal, sendo que a pesagem durante o tratamento só foi realizada no primeiro dia de administração dos tratamentos.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para obtenção dos objetivos desse desenho experimental, foi realizado o acasalamento com animais experimentais participantes do estudo, sendo eles fêmeas e machos na proporção de 24:12 respectivamente. Assim que confirmado o diagnóstico de prenhez através do esfregaço vaginal, os machos foram retirados do estudo e permaneceram somente as fêmeas, essas foram separadas em gaiolas-moradias individualmente durante todo o período gestacional. Em DG 9.5, foi induzido um modelo animal exposto ao LPS (100 µg/kg, ip) ou a solução de salina na mesma dosagem, período antes do fechamento do tubo neural da prole (feto), capaz de promover anormalidades comportamentais semelhantes às aquelas encontradas em pacientes com autismo²⁰⁶.

O estudo foi realizado na prole macho, das matrizes expostas ao LPS ou a solução salina no período pré-natal. Após o nascimento e a sexagem das proles, foram eliminados a prole fêmea através do procedimento de morte indolor assistida (MIA), realizada pelo responsável técnico do biotério da UNISUL, e somente os machos permaneceram no estudo. Esses foram divididos primeiramente em quatro grupos:

Grupo Salina + salina (n= 20): formado por ratos machos, procedentes de mães do grupo controle (Salina-expostos) e posteriormente tratados com salina, via gavagem.

Grupo Salina + 6-Shogaol (n= 20): formado por ratos machos, procedentes de mães do grupo controle (Salina-expostos) e posteriormente tratados com 6-shogaol (*Sigma-Aldrich®*; EUA) (10 mg/Kg/dia) diluída em 0,9% de solução salina, via gavagem.

Grupo LPS + salina (n= 20): formado por ratos machos, procedentes de mães do grupo experimental (LPS-expostos) e posteriormente tratados com salina, via gavagem.

Grupo LPS + 6-Shogaol (n= 20): formado por ratos machos, procedentes de mães do grupo experimental (LPS-expostos) e posteriormente tratados com 6-shogaol (*Sigma-Aldrich®*; EUA) (10 mg/Kg/dia) diluída em 0,9% de solução salina, via gavagem.

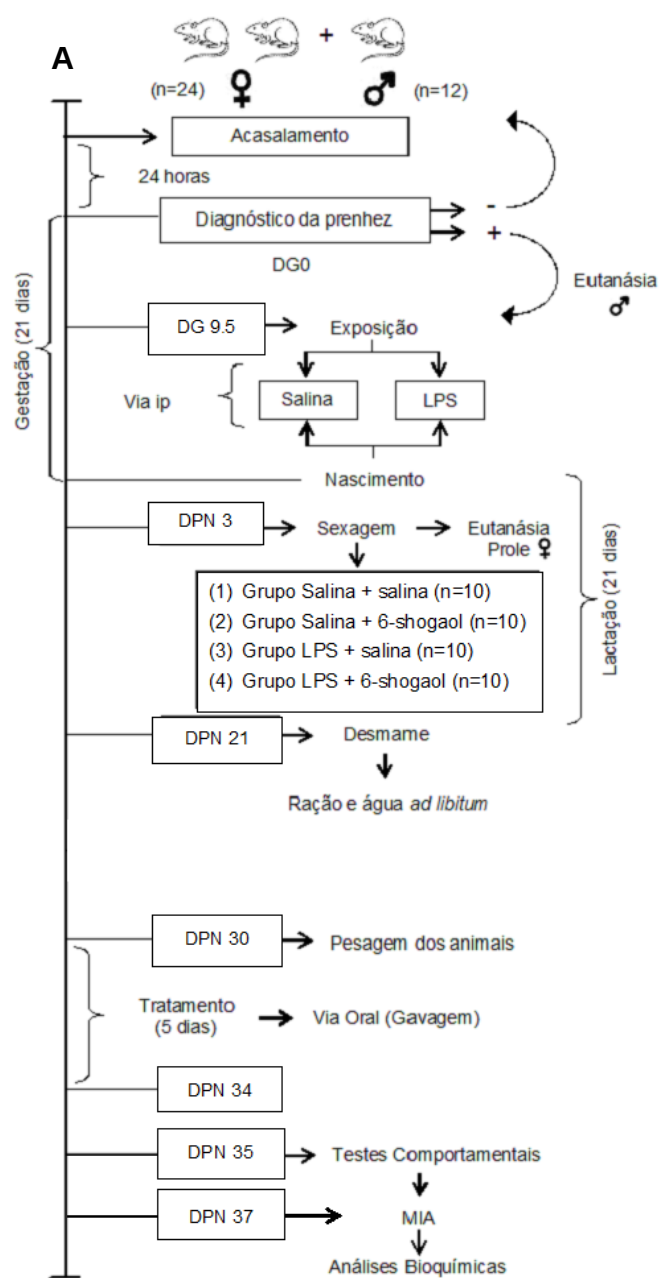
A dosagem do 6-shogaol e via de administração foram baseados no trabalho prévio de Moon e colaboradores (2014)²⁹, assim como o período de tratamento. O início do tratamento, considerou a idade da prole fundamentada em estudo anterior, realizado por Fortunato e colaboradores (2017)²⁵⁸.

Todos os animais machos continuaram com suas mães até DPN 21, período final da lactação, após essa etapa foi realizado o desmame e as mães foram submetidas ao procedimento de MIA, que foi realizado pelo responsável técnico do biotério da UNISUL. A prole de machos permaneceu no biotério até o final dos procedimentos experimentais, onde continuaram recebendo água e ração *ad libitum*.

Em DPN 30, metade da prole (10 animais) realizaram a pesagem para ajuste da dosagem dos tratamentos. A outra metade da prole de cada grupo permaneceu em gaiolas moradias, com até 4 animais por gaiola recebendo água e ração *ad*

libitum, até completarem DPN 55, e em seguida foi iniciado a administração de salina ou 6-shogaol (dependendo do grupo) que ocorreu por 5 dias consecutivos sempre no mesmo horário pela manhã (10:00 horas). Após 24 horas a conclusão do tratamento, em DPN 35, iniciaram os testes comportamentais de *Open Field*, foram avaliados comportamentos exploratórios de *grooming*, *crossing* e *rearing*, seguido posteriormente de esquiva inibitória que avaliou memória aversiva, esses testes aconteceram até DPN 37 com metade do grupo. A outra metade iniciou os testes em DPN 60 até DPN 62, período final do experimento em que ocorreu a MIA do restante dos animais, sendo realizado pelo responsável técnico do biotério da UNISUL. Em seguida ocorreu a dissecação do encéfalo para retirada da estrutura do hipocampo para realização das análises bioquímicas, que aconteceu parcialmente nos Laboratório NEUROIMet, UNISUL e Laboratório IOC, FIOCRUZ.

A Figura 7 (A e B) na sequência resume a síntese das etapas do delineamento do estudo.



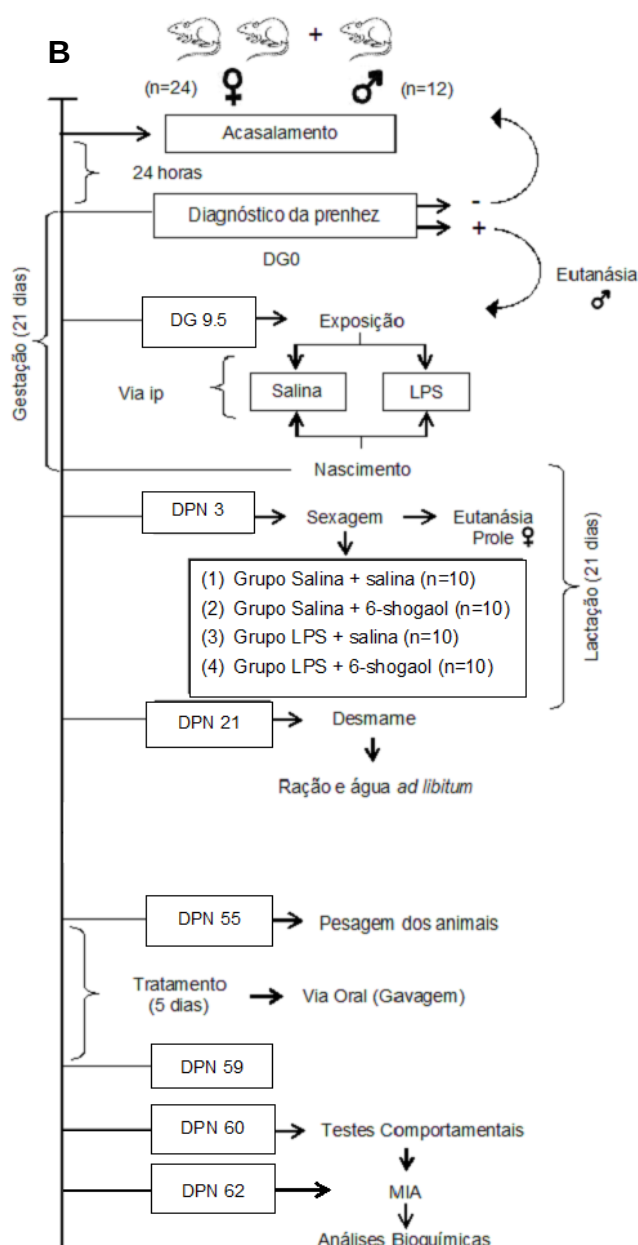


Figura 7. Síntese das duas etapas (figura A e B) do delineamento do estudo. o experimento iniciou com acasalamento (2:1 – fêmeas:macho), 24 horas após foi realizado o diagnóstico de prenhez, resultado negativo voltou ao acasalamento, resultado positivo considerou DG 0, efetivado a prenhez ocorreu a MIA dos machos. No DG 9.5, as ratas prenhes receberam administração de salina ou LPS para grupo controle ou experimental, respectivamente, via ip. A partir DG 21, ocorreu o nascimento da prole, e em DPN 3 foi executada a sexagem. Somente a prole de machos continuou no experimento ficando com as matrizes até completar o período da lactação (DPN 21), nas proles fêmea foram realizadas a MIA. Os animais participantes do experimento foram divididos em grupos: salina + salina; salina + 6-shogaol; LPS + salina; LPS + 6-shogaol, (n=20, por grupo). Em DPN 21, passaram pelo desmame e receberam água e ração *ad libitum*. Em DPN 30, metade dos animais (n=10, por grupo) de cada grupo foram pesados, e iniciou-se o tratamento com administração via oral (gavagem) por 5 dias, até DPN 34, em DPN 35 iniciaram os testes comportamentais, em DPN 37 ocorreu a MIA com dissecação do encéfalo e retirada do tecido (hipocampo) para as análises bioquímicas, o restante dos animais (n=10, por grupo) continuaram recebendo água e ração *ad libitum* até completarem DPN 54, sendo então pesados em DPN 55, receberam o mesmo tratamento, durante 5 dias, em DPN 60 iniciaram os testes comportamentais, em DPN 62 ocorreu a MIA com dissecação do encéfalo para retirada do tecido (hipocampo) para as análises bioquímicas. **Abreviaturas:** DG = dia gestacional; DPN = dia pós-natal; ip = intraperitoneal; LPS = lipopolissacarídeo; MIA = morte indolor assistida.

3.5 ENSAIOS / TESTES / TÉCNICAS

3.5.1 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados após a conclusão do tratamento em DPN 35 e DPN 60. Os testes iniciaram a partir das 10:00 horas da manhã em baixa iluminação, sendo previamente ambientalizados em uma sala reservada do biotério por um período de 60 minutos, representando o período de habituação.

Os experimentos aconteceram em ambientes com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), sendo todos os testes monitorados e registrados por *webcam* acopladas nos *notebooks*. Os equipamentos utilizados foram higienizados com álcool 70% após cada teste com cada animal, evitando a permanência de odores e influência nos testes.

3.5.1.1 Teste de habituação ao campo aberto (*Open Field*)

O teste de campo aberto (*Open Field*) realizado com os animais inclusos no experimento, analisou a atividade exploratória e locomotora, assim como a memória de habituação. O ensaio experimental ocorreu no biotério da UNISUL, em uma sala escura com uma luz branda que incidiu indiretamente sob a caixa, onde realizou o teste.

Individualmente os animais foram inseridos em uma arena de campo aberto, com três paredes de madeira no fundo e nas laterais, e uma parede de vidro na parte frontal da caixa, na dimensão 60x60x30cm, dividida igualmente em 12 quadrantes. Os animais foram introduzidos na caixa e ficaram durante 5 minutos, onde puderam livremente explorar todos os quadrantes. Nesse teste foram analisados os parâmetros comportamentais: *grooming* (movimentos de autolimpeza, analisando número de episódios), *crossing* (movimentos de caminhar, verificando o número de cruzamentos por quadrantes) e *rearing* (levantar-se nas patas traseiras, elevando as patas dianteiras, sem tocar nas paredes da arena, avaliando o número de movimentos).

Primeiramente houve uma sessão treino, que ocorreu 24 horas antes a sessão teste. Para realização do ensaio os animais foram introduzidos cuidadosamente na caixa pelo canto superior esquerdo, a partir do qual puderam

explorar o ambiente por 5 minutos. Após a conclusão do treino, retornaram para caixa moradia, sendo que o teste se repetiu o mesmo procedimento do treino^{259,260}.

3.5.1.2 Esquiva inibitória

O teste na esquiva inibitória foi realizado para avaliar memória aversiva do animal. Neste ensaio experimental foi realizado treino simples para avaliar aprendizado, e treino múltiplos para avaliar memória.

A esquiva inibitória consiste em um aparato com parede frontal confeccionada em acrílico transparente, medindo 50x25x25cm, dividida em dois compartimentos (um claro, iluminado por uma lâmpada e um compartimento escuro, ambos os lados com assoalho composto por um grade de barras de bronze paralelas de 0,1cm de calibre, separadas entre si por 1cm, conectada a um estimulador elétrico que emite choques elétricos quando tocado) separados por uma porta²⁶¹.

O protocolo utilizado para realização desse teste ocorreu de acordo com Imanishi e colaboradores (1997)²⁶². Os testes aconteceram em dois momentos com grupos de idades diferente, sendo a primeira etapa com animais em DPN 36 e 37 após o tratamento, e segunda etapa com animais em DPN 61 e 62 após tratamento, cada animal foi colocado no canto esquerdo do equipamento (desligado), durante um minuto, para habituação. Transcorrido este tempo, o animal foi retirado e após 30 segundos, recolocado no compartimento claro (desta vez, ligado), iniciando assim a fase de treino.

No momento em que o animal atravessou o compartimento claro para o escuro, recebeu um choque de 1,0mA de intensidade, durante 1 segundo, sendo retirado do equipamento em seguida. Decorrido 15 minutos do treino, o procedimento foi repetido, para registrar então o tempo em que o animal levou para entrar no compartimento escuro do aparelho (latência) e recebeu novamente o choque. Está fase avaliou o aprendizado do animal (esquiva 15 minutos). Após 24 horas, o procedimento foi realizado novamente para avaliar a memória do animal (esquiva 24 horas). O tempo limite de permanência do animal no compartimento claro foi de 300 segundos (ou 5 minutos)²⁶¹.

3.5.2 Análises Bioquímicas

Após os testes comportamentais realizados, os animais foram submetidos à MIA e a estrutura encefálica de interesse foi dissecada (hipocampo), e removida rapidamente sobre superfície congelada e armazenada em freezer (-80°C) para análises bioquímicas, conforme descrito a seguir:

3.5.2.1 Quantificação nos níveis de ERK

A imunodeteção da via de sinalização da ERK 1 / 2, foram quantificados por *Western Blotting*. Inicialmente foram dosados os conteúdos totais de proteínas de cada amostra utilizando o método descrito por Lowry e colaboradores (1951)²⁶³.

Para realização da imunodeteção das vias de sinalização ERK 1 / 2, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10mM, NaCl 150mM Ph 7,5) por 1 hora e após foi realizado sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) incubadas durante a noite (4°C) com os anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das seguintes proteínas ERK 1 / 2⁹³.

Os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo BSA 2% na diluição 1:2.000 (anti-fosfo-ERK 1 / 2) e 1:40.000 (anti-total ERK 1 / 2). Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho ou rato (ligado à peroxidase) e revelados em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana nitrocelulose, de acordo com as recomendações do fabricante.

As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (1:2.000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. O anticorpo contra as formas totais e fosforiladas de ERK 1 / 2 foram detectadas em duas bandas, uma aproximadamente 44kDa e a segunda com cerca de 42kDa, respectivamente para as isoformas ERK 1 / 2. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image®.

3.5.2.2 Quantificação dos níveis de BDNF e NSE

Os níveis de BDNF e NSE foram analisados por Kit Elisa, em amostras de tecido cerebral (hipocampo) dos grupos experimentais pelo kit R&D dual set. Para o teste foram utilizadas placas de fundo chato para ensaio em volume reduzido, que foram cobertas com o anticorpo de captura diluído em PBS (50 µL/poço). Após incubação por 16 horas a 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS Tween® 0,05%) (100µL/poço) e incubadas durante uma hora com a tampão de bloqueio (PBS com 1% de albumina sérica bovina-BSA) (100 µL/poço) (*Sigma-Aldrich*).

A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) e aplicada na placa, bem como as amostras (50 µL/poço). Após nova incubação por 16 horas a 4°C as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) (50 µL/poço) foi adicionado.

Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (R&D dual set) (50 µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, as placas foram lavadas 8 vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de Tetrametilbenzidina (TMB, *Sigma-Aldrich*), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 0,4N (50 µL/poço) e a absorvância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas.

3.5.2.3 Quantificação dos níveis de dano oxidativo a lipídios e a proteínas

Os níveis de HNE e 3-NT foram determinados por transferência de slot como descrito em detalhes por Joshi et al. (2006)²⁶⁴. A formação de HNE foram avaliados para verificação do dano oxidativo em lipídios, e para avaliar dano oxidativo em proteína foi analisado a formação de 3-NT. Foram utilizadas as amostras (5 ml) (normalizadas para 4 mg/ml), 5 ml de dodecil de sódio a 12% sulfato de sódio (SDS) e 5 ml de tampão Laemmli modificado contendo Tris 0,125 M pH básico 6,8, SDS a 4% (v / v) e glicerol a 20% (v / v) foram incubados por 20 minutos a temperatura

ambiente. As amostras (250 ng) foram carregadas em cada poço em uma membrana de nitrocelulose em um aparelho de slot blot sob vácuo.

Para avaliação da peroxidação lipídica de HNE a membrana foi bloqueada como acima e incubados com uma diluição 1: 5000 de policlonal anti-HNE anticorpo em PBS por 1 hora e 30 minutos, e para avaliação do dano oxidativo em proteína por 3-NT foi utilizada diluição 1: 2000 do anticorpo policlonal anti-3-NT. A especificidade dos anticorpos primários HNE e 3-NT foi verificada conforme descrito por Sultana et al. (2005)²⁶⁵.

3.5.2.4 Atividade da enzima MPO

Para a avaliação da atividade da enzima MPO, os tecidos foram homogeneizados (50 mg/ml) em 0,5% de hexadeciltrimetilamônio brometo e centrifugados a 15.000 giros durante 40 minutos. A suspensão foi então sonicada três vezes durante 30 segundos. Uma parte do sobrenadante foi misturado a solução de tetrametilbenzidina 1,6mM e 1mM de H₂O₂. A atividade foi mensurada espectrofotometricamente, com a variação de absorbância a 650nm a 37°C^{266,267}. As análises da atividade da enzima MPO foi normalizada pelo conteúdo de proteínas que foi determinada conforme método descrito por Lowry e colaboradores (1951)²⁶³.

3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados dos testes comportamentais e da análise bioquímica foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM, 95%). As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si com *post hoc* de *Newman-Keuls*. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 4.0*.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de

Saúde dos EUA, NHI, publicação número 80-23, revisada em 1996) e a Diretriz Brasileira para Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016, publicado no Diário Oficial da União – Seção 1)²⁶⁸. Para que fosse minimizado o sofrimento dos animais, considerou-se o tamanho de amostra mínimo e adequado para a realização da análise estatística, baseado em estudo prévio em modelo animal de doenças neurológicas utilizando como tratamento o 6-shogaol²⁹.

4 ARTIGO

**6-shogaol bioactive compound improves behavior and memory in Wistar rats
prenatally exposed to lipopolysaccharides**

Running title: lipopolysaccharide and 6-shogaol and behavior

Naiana da Rosa^{a*}, Fabiana Durante de Medeiros^a, Juliana de Oliveira^a, Ana Olívia
Martins Laurentino^a, Eduardo de Medeiros Peretti^a, Patricia Alves Reis^b, Hugo Caire
de Castro Faria Neto^b, Jucélia Jeremias Fortunato^a, Fabrícia Petronilho^a.

^a Neurobiology Laboratory of Inflammatory and Metabolic Processes (NeuroIMet).
Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina.
Tubarão, Santa Catarina, Brazil. Cep 88704-900.

^b Immunopharmacology Laboratory. Instituto Oswaldo Cruz / IOC / FIOCRUZ -
Manguinhos - Rio de Janeiro - Brazil. Cep: 21040-360.

***Correspondence to:** Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade do
Sul de Santa Catarina. Tubarão, Santa Catarina, Brazil. Cep 88704-900. Fax: # 55
48 3621 3363. E-mail: naianarosa@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: 6-shogaol, bioactive compound of *Zingiber Officinale* Roscoe, has anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective properties. The objective was to study the effect of 6-shogaol on behavioral parameters in a preclinical model based on a prenatal bacterial infection from maternal immune activation by lipopolysaccharide (LPS).

Methodology: Twelve pregnant Wistar rats received 100 µg/kg LPS or saline solution on gestational day (GD) 9.5. Male offspring participated in the study, 4 groups were divided, and evaluated at different ages. From the postnatal day (PND) 30 and 55 respectively, they were supplemented with 6-shogaol or saline solution, by gavage at a dose of 10mg/kg/day, orally for 5 days. In the PND 35 and 60 the animals performed behavioral tests: grooming, crossing and rearing that evaluated repetitive movements, anxiety, interest in the new, respectively and the inhibitory avoidance test that evaluated short-term (STM) and long-term memory (LTM).

Result: Prenatal exposure to LPS significantly increased at different ages, the grooming episodes, crossing number and reduced rearing episodes in PND 37, with 6-shogaol administration reversing these parameters evaluated. In the inhibitory avoidance test, STM and LTM, an improvement was identified at both ages in relation to training and testing of treated groups and between groups.

Conclusion: Administration of postnatal 6-shogaol reversed behaviors in prenatal LPS-exposed offspring, acting as a promising therapeutic component against brain disorders associated with the process of maternal immune activation.

- 1 **Keywords:** maternal immune activation and autism and 6-shogaol and
- 2 lipopolysaccharide and behavior and memory.

**O nutracêutico 6-shogaol exerce fator neuroprotetor em modelo animal de
autismo por ativação imune materna**

Título curto: 6-shogaol e neuroproteção e autismo e ativação imune
materna

Naiana da Rosa^{a*}, Fabiana Durante de Medeiros^a, Juliana de Oliveira^a, Ana Olívia
Martins Laurentino^a, Eduardo de Medeiros Peretti^a, Millena Pais Lourenço^b, Thatiany
Igreja da Silva^b, Tamires da Cunha Fernandes^b, Patrícia Alves Reis^b, Hugo Caire de
Castro Faria Neto^b, Jucélia Jeremias Fortunato^a, Fabrícia Petronilho ^a.

^a Laboratório de Neurobiologia dos Processos Inflamatórios e Metabólicos
(NeuroIMet). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do
Sul de Santa Catarina. Tubarão, Santa Catarina, Brasil. Cep 88.704-900.

^b Laboratório de Imunofarmacologia. Instituto Oswaldo Cruz / IOC / FIOCRUZ -
Manguinhos - Rio de Janeiro – Brasil. Cep: 21040-360.

* **Correspondente:** Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Universidade do Sul de Santa Catarina. Tubarão, Santa Catarina, Brasil. Cep
88.704-900. Fax: #55 48 3621 3365. E-mail: naianarosa@hotmail.com.

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito do 6-shogaol, componente fenólico bioativo do gengibre, com propriedades neuroprotetores e atuação anti-apoptótica neuronal, sobre parâmetros bioquímicos, em uma prole de ratos expostos a um insulto infeccioso no período pré-natal a partir da ativação imune materna por lipopolissacarídeo (LPS).

Metodologia: Doze ratas *Wistar* prenhes, receberam 100 µg/Kg de LPS ou salina no dia gestacional (DG) 9.5. Participaram do estudo as proles de machos, a partir do dia pós-natal (DPN) 30 e 55 respectivamente, foram suplementados com 6-shogaol ou salina, por gavagem na dose de 10mg/Kg/dia, via oral por 5 dias. No DPN 37 e 62, ocorreu a morte por eutanásia, em seguida a dissecação do encéfalo (hipocampo) para as análises da cinase regulada por sinal extracelular 1 / 2 (ERK 1 / 2), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), enolase (NSE), dano em proteínas e lipídeos e a enzima mieloperoxidase (MPO).

Resultado: A exposição pré-natal ao LPS diminuiu significativamente níveis de ERK e BDNF em DPN 37 e 62, aumentou níveis de NSE e dano em lipídeos em ratos no DPN 37 e aumentou dano em proteínas nos ratos em DPN 62. Com o tratamento utilizando o 6-shogaol, identificou-se um aumento nos níveis de ERK e BDNF em DPN 37 e 62, redução no dano em lipídeos e na atividade da MPO nos ratos em DPN 37 e 62, respectivamente.

Conclusão: O 6-shogaol, reverteu positivamente níveis da proteína ERK 1 / 2 e BDNF, reduziu o estresse oxidativo hipocampal, demonstrando ação antioxidante e anti-inflamatória, em modelo animal de autismo por ativação imune materna.

1 **Palavras-Chave:** 6-shogaol; ativação imune materna; lipopolissacarídeo;
2 neuroproteção; anti-inflamatório; antioxidante.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, como alvo para possíveis tratamentos de doenças do SNC, sendo essas condutas menos invasivas e mais acessíveis, visando a redução de efeitos colaterais gerado pelos fármacos e atuando na redução das condições comportamentais e neuroquímicas, já existentes.

O presente estudo se mostra como a primeira evidência de que o tratamento com 6-shogaol, um fitoquímico com ação neuroprotetora por exercer efeito anti-inflamatório e antioxidante, está associado a melhora, no comportamento de estereotipia, exploratório, memória e déficits cognitivos em uma prole de ratos *Wistar* macho que sofreu uma intervenção em período pré-natal por meio de uma ativação imune materna provocada pela administração de LPS no DG 9.5, gerando alterações condizentes com o TEA. Tal resposta pode ser em decorrência do seu efeito no mesmo modelo animal sobre a modulação de níveis de ERK, BDNF, dano em lipídeos e atividade da MPO em diferentes fases do neurodesenvolvimento da prole.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo auxiliam a compreensão do potencial papel na terapia não-farmacológica para tratamento do TEA. Mesmo com resultados comportamentais e bioquímicos positivos, novos estudos são necessários para avaliar os efeitos na utilização do 6-shogaol em outras fases do desenvolvimento e em doses de administração diferentes para confirmar sua potencial ação como alternativa terapêutica para o tratamento do TEA. E, a partir desses resultados, propor estudos com uma abordagem clínica.

REFERÊNCIAS

1. Kantati YT, Kodjo KM, Dogbeavou KS, Vaudry D, Leprince J, Gbeassor M. Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. *J Ethnopharmacol.* 2016;181:214-20.
2. Sen T, Samanta SK. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2015;147:59-110.
3. Baker P, Friel S. Food systems transformations, ultra-processed food markets and the nutrition transition in Asia. *Global Health.* 2016;12(1):80.
4. Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Phytotherapy in primary health care. *Rev Saude Publica.* 2014;48(3):541-53.
5. Pan SY, Litscher G, Gao SH, Zhou SF, Yu ZL, Chen HQ, et al. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:525340.
6. Fürst R, Zündorf I. Evidence-Based Phytotherapy in Europe: Where Do We Stand? *Planta Med.* 2015;81(12-13):962-7.
7. Williams RJ, Mohanakumar KP, Beart PM. Neuro-nutraceuticals: The path to brain health via nourishment is not so distant. *Neurochem Int.* 2015;89:1-6.
8. Burnett BP, Mullin G. Therapeutic food claims: a global perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2017;20(6):522-28.
9. Si H, Liu D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J Nutr Biochem.* 2014;25(6):581-91.
10. Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen AM. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry.* 2015;117:554-68.
11. Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, et al. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules.* 2015;20(12):21138-56.
12. Zarshenas MM, Zargaran A, Blaschke M. Convenient, Traditional and Alternative Therapies for Cardiovascular Disorders. *Curr Pharm Des.* 2017;23(7):1112-8.
13. Baena Ruiz R, Salinas Hernández P. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas.* 2016;94:13-9.
14. Hassan HA, El-Gharib NE. Obesity and Clinical Riskiness Relationship: Therapeutic Management by Dietary Antioxidant Supplementation--a Review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;176(3):647-69.

15. Ricordi C, Garcia-Contreras M, Farnetti S. Diet and Inflammation: Possible Effects on Immunity, Chronic Diseases, and Life Span. *J Am Coll Nutr.* 2015;34 Suppl 1:10-3.
16. Boyanapalli SS, Tony Kong AN. "Curcumin, the King of Spices": Epigenetic Regulatory Mechanisms in the Prevention of Cancer, Neurological, and Inflammatory Diseases. *Curr Pharmacol Rep.* 2015;1(2):129-39.
17. Gao Y, Chen J. Informatics for Nutritional Genetics and Genomics. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1005:143-66.
18. Mohamed OI, El-Nahas AF, El-Sayed YS, Ashry KM. Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver. *Pharm Biol.* 2016;54(7):1164-72.
19. Nile SH, Nile AS, Keum Y. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech.* 2017;7:76
20. Zahoor S, Anwar F, Mehmood T, Sultana B, Qadir R. Variation in antioxidant attributes and individual phenolics of citrus fruit peels in relation to different species and extraction solvents. *J Chil Chem Soc.* 2016;61:2.
21. Nagendra chari KL, Manasa D, Srinivas P, Sowbhagya HB. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Food Chem.* 2013;139(1-4):509-14.
22. Mashhadi NS, Ghiasvand R, Askari G, Hariri M, Darvishi L, Mofid MR. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: review of current evidence. *Int J Prev Med.* 2013;4(Suppl 1):S36-42.
23. Saxena R, Rida PC, Kucuk O, Aneja R. Ginger augmented chemotherapy: A novel multitarget nontoxic approach for cancer management. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(6):1364-73.
24. Ha SK, Moon E, Ju MS, Kim DH, Ryu JH, Oh MS, et al. 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: a new approach to neuroprotection. *Neuropharmacology.* 2012;63(2):211-23.
25. Li Y, Hong Y, Han Y, Wang Y, Xia L. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1011:223-32.
26. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E. Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn.* 1984;7(11):836-48.
27. Kim S, Kwon J. [6]-shogaol attenuates neuronal apoptosis in hydrogen peroxide-treated astrocytes through the up-regulation of neurotrophic factors. *Phytother Res.* 2013;27(12):1795-9.

28. Gaire BP, Kwon OW, Park SH, Chun KH, Kim SY, Shin DY, et al. Neuroprotective effect of 6-paradol in focal cerebral ischemia involves the attenuation of neuroinflammatory responses in activated microglia. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120203.
29. Moon M, Kim HG, Choi JG, Oh H, Lee PK, Ha SK, et al. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in animal models of dementia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;449: 8–13.
30. Park G, Kim HG, Ju MS, Ha SK, Park Y, Kim SY, et al. 6-Shogaol, an active compound of ginger, protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via anti-neuroinflammation. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34: 1131–9.
31. Banks WA. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun*. 2015;44:1-8.
32. Lucchina L, Depino AM. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res*. 2014;7(2):273-89.
33. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child*. 1943;(2):217-50.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Linha de cuidado para atenção integral às pessoas com transtorno do espectro autista e suas famílias no sistema único de saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.
35. Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu MC. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011–2012. *Natl Health Stat Report* 2013; 20(65):1-11.
36. Brigandi SA, Shao H, Qian SY, Shen Y, Wu BL, Kang JX. Autistic children exhibit decreased levels of essential Fatty acids in red blood cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10061-76.
37. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V). 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
38. Lowe JK, Werling DM, Constantino JN, Cantor RM, Geschwind DH. Social responsiveness, an autism endophenotype: genomewide significant linkage to two regions on chromosome 8. *Am J Psychiatry*. 2015;172(3):266-75.
39. Napoli E, Dueñas N, Giulivi C. Potential therapeutic use of the ketogenic diet in autism spectrum disorders. *Front Pediatr*. 2014;2:69.
40. Hampson DR, Blatt GJ. Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. *Front Neurosci*. 2015;9:420.
41. Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Sobre o autismo, neuroinflamação e Modelos Animais para estudo de Autismo: Uma Revisão. *Rev Neurocienc*, 2012; 20(1):117-27.

42. Rose D, Ashwood P. Potential cytokine biomarkers in autism spectrum disorders. *Biomark Med.* 2014;8(9):1171-81.
43. Downs JM, Lechler S, Dean H, Sears N, Patel R, Shetty H, et al. The Association Between Comorbid Autism Spectrum Disorders and Antipsychotic Treatment Failure in Early-Onset Psychosis: A Historical Cohort Study Using Electronic Health Records. *J Clin Psychiatry.* 2017;78(9):e1233-e1241.
44. Mark PJ, Wyrwoll CS, Zulkafli IS, Mori TA, Waddell BJ. Rescue of glucocorticoid-programmed adipocyte inflammation by omega-3 fatty acid supplementation in the rat. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:39.
45. Suleria HA, Osborne S, Masci P, Gobe G. Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Mar Drugs.* 2015;13(10):6336-51.
46. Sharma V, Singh L, Verma N, Kalra G. "The Nutraceutical Amino Acids"-Nature's Fortification for Robust Health. *Br J Pharm Res.* 2016;11(3):1-20.
47. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *Int J Prev Med.* 2015;5(12):1487-99.
48. Murugaiyah V, Mattson MP. Neurohormetic Phytochemicals: An Evolutionary – Bioenergetic Perspective. *Neurochemistry international.* 2015;89:271-80.
49. Martirosyan D, Singh J. A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? *Funct. Food Health Dis. J.* 2015;5:209–23.
50. Hang L, Basil AH, Lim K-L. Nutraceuticals in Parkinson's Disease. *NeuroMolecular Med.* 2016;16:1–16.
51. Singh MC, Gujar KN. Nutraceuticals: uses, risks and regulatory scenario. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013; 5(Suppl 3): 23-6.
52. Mordor Intelligence Global Nutraceuticals Market-Growth, Trends and Previsions (2015-2020) [(acessado em 05 de junho de 2017)]. Disponível on-line: <http://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nutraceuticals-market-industry>.
53. Lee J, Jo DG, Park D, Chung HY, Mattson MP. Adaptive cellular stress pathways as therapeutic targets of dietary phytochemicals: focus on the nervous system. *Pharmacol Rev.* 2014;66:815–68.
54. Satija A, Hu FB. Plant-based diets and cardiovascular health. *Trends Cardiovasc Med.* 2018. pii: S1050-1738(18)30024-0.

55. Mamluk L, O'Doherty MG, Orfanos P, Saitakis G, Woodside JV, Liao LM, et al. Fruit and vegetable intake and risk of incident of type 2 diabetes: results from the consortium on health and ageing network of cohorts in Europe and the United States (CHANCES). *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(1):83-91.
56. Howes MJ, Simmonds MS. The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;17(6):558-66.
57. Liu RH. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci.* 2013;78 Suppl 1:A18-25.
58. Ha CV, Leyva-González MA, Osakabe Y, Tran UT, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(2):851-6.
59. Davinelli S, Maes M, Corbi G, Zarrelli A, Willcox DC, Scapagnini G. Dietary phytochemicals and neuro-inflammation: from mechanistic insights to translational challenges. *Immun Ageing.* 2016;13:16.
60. Venigalla M, Sonogo S, Gyengesi E, Sharman MJ, Münch G. Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2016;95:63-74.
61. Yang Y, Jiang S, Yan J, Li Y, Xin Z, Lin Y, et al. An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(1):47-57.
62. Gundala SR, Mukkavilli R, Yang C, Yadav P, Tandon V, Vangala S, et al. Enterohepatic recirculation of bioactive ginger phytochemicals is associated with enhanced tumor growth-inhibitory activity of ginger extract. *Carcinogenesis.* 2014;35(6):1320-9.
63. EMBRAPA. Plantas Medicinais. Folder 12, Porto Velho, 2001.
64. Prasad S, Tyagi AK. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:142979.
65. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A. Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:258.
66. Koch W, Kukula-Koch W, Marzec Z, Kasperek E, Wyszogrodzka-Koma L, Szwerc W, et al. Application of Chromatographic and Spectroscopic Methods towards the Quality Assessment of Ginger (*Zingiber officinale*) Rhizomes from Ecological Plantations. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2). Pii: E452.

67. Khaki A, Fathiazad F. Diabetic nephropathy – using herbals in diabetic nephropathy prevention and treatment – the role of ginger (*Zingiber officinale*) and onion (*Allium cepa*) in diabetics' nephropathy. In: Bhattacharya, A. (Ed.), A Compendium of Essays on Alternative Therapy. In Tech Publisher, Rijeka, Croatia. 2012, 207-32.
68. Baliga MS, Haniadka R, Pereira MM, D'Souza JJ, Pallaty PL, Bhat HP, et al. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(6):499-523.
69. Dehghania I, Mostajerana A, Asgharib G. In vitro and in vivo Production of Gingerols and Zingiberene in Ginger Plant (*Zingiber officinale Roscoe*). *IJPS*. 2011; 7(2): 129-33.
70. Bode AM, Dong Z. The amazing and mighty ginger. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; Chapter 7. 2011.
71. Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food*. 2005;8(2):125-32.
72. Ok S, Jeong W-S. Optimization of Extraction Conditions for the 6-Shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Prev Nutr Food Sci*. 2012;17(2): 166–71.
73. Srinivasan K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*. 2017; 5:18-28.
74. Funk JL, Frye JB, Oyarzo JN, Chen J, Zhang H, Timmermann BN. Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oils of Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) in Experimental Rheumatoid Arthritis. *PharmaNutrition*. 2016;4(3):123-131.
75. Mesomo MC, Corazza ML, Ndiaye PM, Santa ORD, Cardozo L, Scheer AP. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale R.*): Chemical composition and antibacterial activity. *J. of Supercritical Fluids*. 2013;80:44–9.
76. Viljoen E, Visser J, Koen N, Musekiwa A. A systematic review and meta-analysis of the effect and safety of ginger in the treatment of pregnancy-associated nausea and vomiting. *Nutr J*. 2014;13:20.
77. Liu R, Heiss EH, Sider N, Schinkovitz A, Gröblacher B, Guo D, et al. Identification and characterization of [6]-shogaol from ginger as inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(5):843-52.
78. Kubra IR, Rao LJ. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(8):651-88.

79. Han YA, Song CW, Koh WS, Yon GH, Kim YS, Ryu SY, et al. Anti-inflammatory effects of the *Zingiber officinale* roscoe constituent 12-dehydrogingerdione in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells. *Phytother Res*. 2013;27(8):1200-5.
80. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Baliyepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(2):515-20.
81. Seow SLS, Hong SL, Lee GS, Malek SNA, Sabaratnam V. 6-shogaol, a neuroactive compound of ginger (*jahe gajah*) induced neurotogenic activity via NGF responsive pathways in PC-12 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):334.
82. Azam F, Amer AM, Abulifa AR, Elzwawi MM. Ginger components as new leads for the design and development of novel multi-targeted anti-Alzheimer's drugs: a computational investigation. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:2045-59.
83. Sohn Y, Han NY, Lee MJ, Cho HJ, Jung HS. [6]-Shogaol inhibits the production of proinflammatory cytokines via regulation of NF- κ B and phosphorylation of JNK in HMC-1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013;35(4):462-70.
84. Bhattarai S, Tran VH, Duke CC. Stability of [6]-gingerol and [6]-shogaol in simulated gastric and intestinal fluids. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(4):648-53.
85. Wang CZ, Qi LW, Yuan CS. Cancer Chemoprevention Effects of Ginger and its Active Constituents: Potential for New Drug Discovery. *Am J Chin Med*. 2015; 43(7):1351-63.
86. Shim S, Kim S, Kwon YB, Kwon J. [6]-shogaol attenuates neuronal apoptosis in hydrogen peroxide-treated astrocytes through the up-regulation of neurotrophic factors. *Phytother Res*. 2013;27(12):1795-9.
87. Ahmad B, Rehman MU, Amin I, Arif A, Rasool S, Bhat SA, et al. A Review on Pharmacological Properties of Zingerone (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone). *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:816364
88. Shim S, Kim S, Kwon YB, Kwon J. Protection by [6]-shogaol against lipopolysaccharide-induced toxicity in murine astrocytes is related to production of brain-derived neurotrophic factor. *Toxicol Food Chem*. 2012;50(3-4):597-602.
89. Shim S, Kwon J. Effects of 6-shogaol on cholinergic signaling in HT22 cells following neuronal damage induced by hydrogen peroxide. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:1454–9.
90. Marrelli M, Menichini F, Conforti F. A comparative study of *Zingiber officinale* Roscoe pulp and peel: phytochemical composition and evaluation of antitumour activity. *Nat Prod Res*. 2015;29(21):2045-9.
91. Haniadka R, Saldanha E, Sunita V, Palatty PL, Fayad R, Baliga MS. A review of the gastroprotective effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Funct*. 2013;4(6):845-55.

92. Qiu JX, Zhou ZW, He ZX, Zhang X, Zhou SF, Zhu S. Estimation of the binding modes with important human cytochrome P450 enzymes, drug interaction potential, pharmacokinetics, and hepatotoxicity of ginger components using molecular docking, computational, and pharmacokinetic modeling studies. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:841-66.
93. Lim S, Moon M, Oh H, Kim HG, Kim SY, Oh MS. Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse. *J Nutr Biochem.* 2014;25(10):1058-65.
94. Izquierdo I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol.* 1989;51(2):171-202.
95. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82:171-177.
96. Reichenberg A. The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci.* 2010;12(3):383-392.
97. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(24):13515-13522.
98. Alonso M, Vianna MRM, Depino AM, Souza TM, Pereira P, Szapiro G, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus.* 2002;12:551-560.
99. Dudai, Y., and Morris, R. G. Memorable trends. *Neuron.* 2013;80:742-750.
100. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell.* 2014;157:163-186.
101. Zorec R, Horvat A, Vardjan N, Verkhatsky A. Memory Formation Shaped by Astroglia. *Front Integr Neurosci.* 2015;9:1-7.
102. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 2009;513:532-541.
103. Czerniawski J, Miyashita T, Lewandowski G, Guzowski JF. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation. *Brain Behav Immun.* 2015;44:159-166.
104. Czerniawski J, Guzowski JF. Acute Neuroinflammation Impairs Context Discrimination Memory and Disrupts Pattern Separation Processes in Hippocampus. *The Journal of Neuroscience.* 2014;34:12470-12480.

105. Oitzl MS, van Oers H, Schöbitz B, Ron de Kloet E. Interleukin-1 β , but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Research*. 1993;613:160-163.
106. Gibertini M, Newton C, Friedman H, Klein TW. Spatial Learning Impairment in Mice Infected with *Legionella pneumophila* or Administered Exogenous Interleukin-1 β . *Brain, Behavior, and Immunity*. 1995; 9:113-128.
107. Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. Selective Effects of Peripheral Lipopolysaccharide Administration on Contextual and Auditory-Cue Fear Conditioning. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1998; 12:212-229.
108. Pugh RC, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1 β . *Neurosci Biobehav Rev*. 2001; 25(1):29-41.
109. Barrientos RM, Higgins EA, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 β into dorsal hippocampus. *Behav Brain Res*. 2002; 134:291-298.
110. Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed; 2002.
111. Izquierdo, I. *Memória*. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
112. Cuartas DR. Neuropsicología de la memoria. *Cultura e Investigación en Ciencias de la Salud*. Año II, n.2. 2010.
113. Van Petten C. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. *Neuropsychologia*. 2004;42(10):1394-413.
114. Boucher J, Mayes A, Bigham S. Memory in autistic spectrum disorder. *Psychol Bull*. 2012;138(3):458-96.
115. Szachta P, Skonieczna-Zydecka K, Adler G, Karakua-Juchnowicz H, Madlani H, Igny's I. Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(14):3060-72.
116. Moore AH, Wu M, Shafteel SS, Graham KA, O'Banion MK. Sustained expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience*. 2009;164(4):1484-1495.
117. Hawley DF, Morch K. Differential response of hippocampal subregions to stress and learning. *Plos One*, 2012.
118. Shimizu E, Hashimoto K. Serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls. *Neurosci Lett*, 2003.

119. Skogstrand K, Hagen CM, Borbye-Lorenzen N, Christiansen M, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, et al. Reduced neonatal brain-derived neurotrophic factor is associated with autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):252.
120. Fortunato JJ, Réus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Stertz L, Kapczinski F, et al. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(8):1425-30.
121. Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 122:169-92.
122. Yeh FC, Kao CF, Kuo PH. Explore the Features of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Mood Disorders. *PLoS One* 2015; 10 (6):e0128605.
123. Kojima M, Mizui T. BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. *Vitam Horm*. 2017;104:19-28.
124. Bryn V, Halvorsen B, Ueland T, Isaksen J, Kolkova K, Ravn K, et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) and autism spectrum disorders (ASD) in childhood. *Eur J Paediatr Neurol*. 2015;19(4):411-4.
125. Sakuragi S, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. Involvement of TrkB- and p75(NTR)-signaling pathways in two contrasting forms of long-lasting synaptic plasticity. *Sci Rep*. 2013;3:3185.
126. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):299-309.
127. Kasarpalkar NJ, Kothari ST, Dave UP. Brain-Derived Neurotrophic Factor in children with Autism Spectrum Disorder. *Ann Neurosci*. 2014;21(4):129-33.
128. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 2014; 76 Pt C:639-56.
129. Perito MES, Fortunato JJ. Marcadores biológicos da depressão: uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. *Rev Neurocienc* 2012;20(4):597-603.
130. Francis K, Dougali A, Sideri K, Kroupis C, Vasdekis V, Dima K, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with ASD and their parents: a 3-year follow-up. *Acta Psychiatr Scand*. 2018;137(5):433-41.
131. Sangiovanni E, Brivio P, Dell'Agli M, Calabrese F. Botanicals as Modulators of Neuroplasticity: Focus on BDNF. *Neural Plast*. 2017; 2017:5965371.
132. Castrén E, Kojima M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol Dis*. 2017; 97(Pt B):119-26.

133. Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2018;1727:1-17.
134. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64(2):238-58.
135. Gokce O, Runne H, Kuhn A, Luthi-Carter R. Short-term striatal gene expression responses to brain-derived neurotrophic factor are dependent on MEK and ERK activation. *PLoS One* 2009; 4(4):e5292.
136. Pilar-Cuéllar F, Vidal R, Díaz A, Castro E, dos Anjos S, Pascual-Brazo J, et al. Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication. *Neural Plast.* 2013;2013:537265.
137. Carretero L, Llavona P, López-Hernández A, Casado P, Cutillas PR, de la Peña P, et al. ERK and RSK are necessary for TRH-induced inhibition of r-ERG potassium currents in rat pituitary GH3 cells. *Cell Signal.* 2015;27(9):1720-30.
138. Isaac MB, Vamvakas S. Swings and Roundabouts in CNS Drug Biomarkers. *J Prev Alzheimers Dis.* 2017;4(3):134-5.
139. Jessen F, Frölich L. [ICD-11: Neurocognitive Disorders]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2018;86(3):172-177.
140. Hawro T, Bogucki A, Krupińska-Kun M, Maurer M, Woźniacka A. Serum neuron specific enolase - a novel indicator for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus? *Lupus.* 2015. pii: 0961203315593818.
141. Henstridge CM, Jackson RJ, Kim JM, Herrmann AG, Wright AK, Harris SE, Bastin ME, et al. Post-mortem brain analyses of the Lothian Birth Cohort 1936: extending lifetime cognitive and brain phenotyping to the level of the synapse. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3(1):53.
142. Graham EM, Everett AD, Delpech JC, Northington FJ. Blood biomarkers for evaluation of perinatal encephalopathy: state of the art. *Curr Opin Pediatr.* 2018;30(2):199-203.
143. Stammet P, Wagner DR, Gilson G, Devaux Y. Modeling serum level of s100 β and bispectral index to predict outcome after cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(9):851-8.
144. Züngün C, Yilmaz FM, Tutkun E, Yilmaz H, Uysal S. Assessment of serum S100B and neuron specific enolase levels to evaluate the neurotoxic effects of organic solvent exposure. *Clin Toxicol (Phila).* 2013;51(8):748-51.
145. Schmidt FM, Mergl R, Stach B, Jahn I, Schönknecht P. Elevated levels of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase (NSE), but not S100B in major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry.* 2015;16(2):106-13.

146. Shen L, Chen C, Yang A, Chen Y, Liu Q, Ni J. Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage. *J Proteomics*. 2015;123:101-13.
147. Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ. Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Res*. 1980;190(1):195-214.
148. Marangos PJ, Schmechel D, Parma AM, Clark RL, Goodwin FK. Measurement of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J Neurochem*. 1979;33(1):319-29.
149. Gelderblom M, Daehn T, Schattling B, Ludewig P, Bernreuther C, Arunachalam P, et al. Plasma levels of neuron specific enolase quantify the extent of neuronal injury in murine models of ischemic stroke and multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2013;59:177-82.
150. Wang Y, Fang Y, Zhang F, Xu M, Zhang J, Yan J, et al. Hypermethylation of the enolase gene (ENO2) in autism. *Eur J Pediatr*. 2014;173(9):1233-44.
151. Ogundele OM, Omoaghe AO, Ajonijebu DC, Ojo AA, Fabiyi TD, Olajide OJ, et al. Glia activation and its role in oxidative stress. *Metab Brain Dis*. 2014;29(2):483-93.
152. Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J*. 2014;37(3):99-105.
153. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.
154. Rasool M, Malik A, Qureshi MS, Manan A, Pushparaj PN, Asif M, et al. Recent Updates in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Using Natural Compounds. *Evid Based Complement Alternat Med*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:979730.
155. Rossignol DA, Frye RE. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. *Front Physiol*. 2014;5:150.
156. Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. *Pharmacol Rep*. 2015;67(3):569-80.
157. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014;32(1):1-17.
158. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659.

159. Andreazza AC. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Mol Biosyst.* 2012;8(10):2503-12.
160. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
161. Messina A, Monda V, Sessa F, Valenzano A, Salerno M, Bitetti I, et al. Sympathetic, Metabolic Adaptations, and Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorders: How Far From Physiology? *Front Physiol.* 2018;9:261.
162. Togashi H, Aoyama M, Oikawa K. Imaging of reactive oxygen species generated in vivo. *Magn Reson Med.* 2016;75(3):1375-9.
163. Sani NF, Belani LK, Sin CP, Rahman SN, Das S, Chi TZ, et al. Effect of the combination of gelam honey and ginger on oxidative stress and metabolic profile in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:160695.
164. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* 2018;15:490-503.
165. Garcia-Esparcia P, Sideris-Lampretsas G, Hernandez-Ortega K, Grau-Rivera O, Sklaviadis T, Gelpi E, et al. Altered mechanisms of protein synthesis in frontal cortex in Alzheimer disease and a mouse model. *Am J Neurodegener Dis.* 2017;6(2):15-25.
166. Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;46:214-23.
167. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers.* 2013;35(6):773-90.
168. Uchida K, Stadtman ER. Clivagem seletiva da ligação tioéter em proteínas modificadas com 4-hidroxinonenal. *Proc Natl Acad Sci US A.* 1992; 89 : 5611–5615.
169. Zarkovic K. Doenças 4-hidroxinonenais e neurodegenerativas. *Mol Aspects Med.* 2003; 24 : 293–303.
170. Hegazy HG, Ali EH, Elgoly AH. Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine.* 2015; 71(2):173-80.
171. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003;90:221–32

172. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: amigo e inimigo. J. Leukoc Biol. 2005; 77 : 598–625.
173. Russo AJ. Decreased plasma myeloperoxidase associated with probiotic therapy in autistic children. Clin Med Insights Pediatr. 2015 Feb 3;9:13-7. doi: 10.4137/CMPed.S17901. eCollection 2015
174. Al-Asmari AK, Khan MW. Inflammation and schizophrenia: alterations in cytokine levels and perturbation in antioxidative defense systems. Hum Exp Toxicol. 2014;33(2):115-22.
175. Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2004; 90:724-33.
176. Choi DK, Pennathur S, Perier C, Tieu K, Teismann P, Wu DC, et al. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. J Neurosci. 2005; 25:6594-6600.
177. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1997; 78:97-107.
178. Sree SL, Sethupathy S. Evaluation of the efficacy of taurine as an antioxidant in the management of patients with chronic periodontitis. Dent Res J (Isfahan). 2014;11(2):228-33.
179. Villanueva C, Kross RD. Antioxidant-induced stress. Int J Mol Sci. 2012;13(2):2091-109.
180. Oboh G, Ademiluyi AO, Akinyemi AJ. Inhibition of acetylcholinesterase activities and some pro-oxidant induced lipid peroxidation in rat brain by two varieties of ginger (*Zingiber officinale*). Exp Toxicol Pathol. 2012;64(4):315-9.
181. Jones KA, Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. Mol Cell Neurosci. 2013;53:52-62.
182. Jha MK, Lee WH, Suk K. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. Biochem Pharmacol. 2016;103:1-16
183. Beauquis J, Vinuesa A, Pomilio C, Pavía P, Saravia F. [Hippocampal and cognitive alterations precede amyloid deposition in a mouse model for Alzheimer's disease]. Medicina (B Aires);74(4):282-6.
184. Reick C, Ellrichmann G, Thöne J, Scannevin RH, Saft C, Linker RA, et al. Neuroprotector fumarate dimethylsynergizes with immunomodulator interferon beta to provide better protection of the axon in autoimmune neuroinflammation. Exp Neurol. 2014; 257:50-6.

185. Lee KM, MacLean AG. New advances on glial activation in health and disease. *World J Virol.* 2015;4(2):42-55.
186. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules.* 2015;20(5):9183-213.
187. Bosch ME, Kielian T. Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Front Neurosci.* 2015; 9:1-11.
188. Xing B, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Deficiency in p38 β MAPK fails to inhibit cytokine production or protect neurons against inflammatory insult in in vitro and in vivo mouse models. *PLoS One.* 2013; 8(2):e56852.
189. Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:480739.
190. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front Cell Neurosci.* 2016;9:1-10.
191. Rodriguez JI, Kern JK. Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(2-4):205-13.
192. Wright C, Shin JH, Rajpurohit A, Deep-Soboslay A, Collado-Torres L, Brandon NJ, et al. Altered expression of histamine signaling genes in autism spectrum disorder. *Transl Psychiatry.* 2017; 7(5):e1126.
193. Qasem H, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. Cysteinyl leukotriene correlated with 8-isoprostane levels as predictive biomarkers for sensory dysfunction in autism. *Lipids Health Dis.* 2016;15:130.
194. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science.* 2016; 353(6301):772-7.
195. Hsiao EY.. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol.* 2013;113:269-302.
196. Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Mol Cell Neurosci.* 2013;53:69-76.
197. Liew Z, Ritz B, Virk J, Olsen J. Maternal use of acetaminophen during pregnancy and risk of autism spectrum disorders in childhood: A Danish national birth cohort study. *Autism Res.* 2016;9(9):951-8.
198. Meltzer A, Van de Water J. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(1):284-98.

199. Zerbo O, Jsif AM, Walker C, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delays? Results from the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) study. *J Autism Dev Disord.* 2013;43(1):25-33.
200. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(2):R581-9.
201. Labouesse MA, Langhans W, Meyer U. Long-term pathological consequences of prenatal infection: beyond brain disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(1):R1-R12.
202. Schlickmann E; Fortunato JJ. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. *J Bras Psiquiatr.* 2013;62(2):153-9.
203. Mezzacappa A, Lasica PA, Gianfagna F, Cazas O, Hardy P, Falissard B, et al. Risk for Autism Spectrum Disorders According to Period of Prenatal Antidepressant Exposure: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2017; 171(6):555-63.
204. Careaga M, Murai T, Bauman MD. Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol Psychiatry.* 2017;81(5):391-401.
205. Hill DS, Cabrera R, Wallis Schultz D, Zhu H, Lu W, Finnell RH, et al. Autism-Like Behavior and Epigenetic Changes Associated with Autism as Consequences of In Utero Exposure to Environmental Pollutants in a Mouse Model. *Behav Neurol.* 2015;2015:426263.
206. Kirsten TB, Taricano M, Tezcan E, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(4):240-51.
207. Ku KM, Weir RK, Silverman JL, Berman RF, Bauman MD. Behavioral Phenotyping of Juvenile Long-Evans and Sprague-Dawley Rats: Implications for Preclinical Models of Autism Spectrum Disorders. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158150.
208. Backes B, Zanon RB, Bosa CA. Características Sintomatológicas de Crianças com Autismo e Regressão da Linguagem Oral. *Psic.: Teor. e Pesq.* 2017; 33:1-10.
209. Cesa PK, Smeha LN. Repercussões do autismo no subsistema fraterno na perspectiva de irmãos adultos. *Estud. psicol. (Campinas).* 2016; 33(1):51-60.
210. American Psychiatric Association. Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais DSM-IV. 4 ed. São Paulo: Manole; 1994.
211. Mecca TP, Bravo RB, Velloso RL, Schwartzman JS, Brunoni D, Teixeira MCTV, Rastreamento de sinais e sintomas de transtornos do espectro do autismo em irmãos. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul, Porto Alegre.* 2011; 33(2):116-20.

212. First, MB. Autism and Other Pervasive Developmental Disorders Conference (February 3-5, 2008). Arlington: American Psychiatric Association. *Int J Tryptophan Res.* 2013; 6(1):15-28.
213. Zinkstok J, Buitelaar J. [DSM-5: neurodevelopmental disorders]. *Tijdschr Psychiatr.* 2014; 56(3):162-6.
214. Goddard MN, Swaab H, Rombouts SA, van Rijn S. Neural systems for social cognition: gray matter volume abnormalities in boys at high genetic risk of autism symptoms, and a comparison with idiopathic autism spectrum disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2016;266(6):523-31.
215. Wolfers T, Buitelaar JK, Beckmann CF, Franke B, Marquand AF. From estimating activation locality to predicting disorder: A review of pattern recognition for neuroimaging-based psychiatric diagnostics. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015. pii: S0149-7634(15)00201-8.
216. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, State and Local Area Integrated Telephone Survey. 2011–2012 National Survey of Children's Health frequently asked questions. March 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/slatis/nsch.htm>.
217. Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ.* 2016;65(3):1-23.
218. Van Wijngaarden-Cremers PJ, van Eeten E, Groen WB, Van Deurzen PA, Oosterling IJ, Van der Gaag RJ. Gender and age differences in the core triad of impairments in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *J Autism Dev Disord.* 2014;44(3):627-35.
219. Yusuf A, Elsabbagh M. At the cross-roads of participatory research and biomarker discovery in autism: the need for empirical data. *BMC Med Ethics.* 2015; 16(1):88.
220. Román GC, Ghassabian A, Bongers-Schokking JJ, Jaddoe VW, Hofman A, de Rijke YB, et al. Association of gestational maternal hypothyroxinemia and increased autism risk. *Ann Neurol.* 2013; 74(5):733-42.
221. Parellada M, Penzol MJ, Pina L, Moreno C, Gonzáles EV, Zalsman G, et al. The neurobiology of autism spectrum disorders. *European Psychiatry.* 2013; 29(1):11-9.
222. Takano T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. *Dev Neurosci.* 2015;37(3):195-202.
223. Ogundele MO. Behavioural and emotional disorders in childhood: A brief overview for paediatricians. *World J Clin Pediatr.* 2018;7(1):9-26.

224. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders – autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2012;61(3):1-19.
225. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ.* 2014;63(2):1-21.
226. Cannell JJ. Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Med Hypotheses.* 2013;81(2):195-8.
227. Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercadante MT. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. *J Autism Dev Disord.* 2011;41(12):1738-42.
228. Ferreira ECV. Prevalência de autismo em Santa Catarina: uma visão epidemiológica contribuindo para a inclusão social [dissertação]. Florianópolis:Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
229. Teixeira MCTV, Mecca TP, Velloso RI, Bravo RB, Ribeiro SHB, Mercadante MT, Paula CS. Literatura científica brasileira sobre transtornos do espectro autista. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(5):607-14.
230. Goh S, Dong Z, Zhang Y, DiMauro S, Peterson BS. Mitochondrial dysfunction as a neurobiological subtype of autism spectrum disorder: evidence from brain imaging. *JAMA Psychiatry.* 2014;71(6):665-71.
231. Supekar K, Menon V. Sex differences in structural organization of motor systems and their dissociable links with repetitive/restricted behaviors in children with autism. *Mol Autism.* 2015;6:50.
232. Schendel DE, Grønberg TK, Parner ET. The genetic and environmental contributions to autism: looking beyond twins. *JAMA.* 2014;311(17):1738-9.
233. Kim SY, Choi US, Park SY, Oh SH, Yoon HW, Koh YJ. Abnormal activation of the social brain network in children with autism spectrum disorder: an FMRI study. *Psychiatry Investig.* 2015;12(1):37-45.
234. Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Bernardes S, Scavone C, Sarkis JE, Bernardi MM, et al. Lipopolysaccharide Exposure Induces Maternal Hypozincemia, and Prenatal Zinc Treatment Prevents Autistic-Like Behaviors and Disturbances in the Striatal Dopaminergic and mTOR Systems of Offspring. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134565.
235. Onore CE, Schwartzer JJ, Careaga M, Berman RF, Ashwood P. Maternal immune activation leads to activated inflammatory macrophages in offspring. *Brain Behav Immun.* 2014;38:220-6.

236. Chauhan A, Gu F, Chauhan V. Mitochondrial respiratory chain defects in autism and other neurodevelopmental disorders. *J Pediatr Biochem* 2. 2012;213–23.
237. Uddin LQ, Superkar K, Menon V. Reconceptualizing functional brain connectivity in autism from a developmental perspective. *Front Hum Neurosci*. 2013;(7):458.
238. Miller AH, Haroon E, Felger JC. Therapeutic Implications of Brain-Immune Interactions: Treatment in Translation. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):334-59.
239. Thibaut F. Neuroinflammation: new vistas for neuropsychiatric research. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(1):3-4.
240. Gesundheit B, Rosenzweig JP, Naor D, Lerer B, Zachor DA, Procházka V, et al. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J Autoimmun*. 2013; 44:1-7.
241. Ruskin DN, Murphy MI, Slade SL, Masino SA. Ketogenic diet improves behaviors in a maternal immune activation model of autism spectrum disorder. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171643.
242. Lappé M, Lau L, Dudovitz RN, Nelson BB, Karp EA, Kuo AA. The Diagnostic Odyssey of Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. 2018 Apr;141(Suppl 4):S272-S279.
243. Corbett BA, Swain DM, Newsom C, Wang L, Song Y, Edgerton D. Biobehavioral profiles of arousal and social motivation in autism spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014;55(8):924-34.
244. Jiang L, Hou XH, Yang N, Yang Z, Zuo XN. Examination of Local Functional Homogeneity in Autism. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:174371.
245. Levy SE, Hyman SL. Complementary and alternative medicine treatments for children with autism spectrum disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2015; 24(1):117-43.
246. Su KP, Matsuoka Y, Pae CU. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prevention of Mood and Anxiety Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2015;13(2):129-37.
247. Alanazi AS. The role of nutraceuticals in the management of autism. *Saudi Pharm J*. 2013;21(3):233-43.
248. Anjos T, Altmäe S, Emmett P, Tiemeier H, Closa-Monasterolo R, Luque V, et al. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr*. 2013;52(8):1825-42.
249. Cooper JK. Nutrition and the brain: what advice should we give? *Neurobiol Aging*. 2014;35 Suppl 2:S79-83.

250. Held HE, Pilla R, Ciarlone GE, Landon CS, Dean JB. Female rats are more susceptible to central nervous system oxygen toxicity than male rats. *Physiol Rep*. 2014;2(4):e00282.
251. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol*. 2015; 43(6):776-93.
252. Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, Macfabe DF. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. *PLoS One*. 2014;9(1):e87072.
253. Leite LG, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Piacent A, Aragão M, Schons SV. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por *Ateleia glazioviana*. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2002; 22(2):73-8.
254. Bernardi MM. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: H.S. Spinosa, S. L. Górniak, et al (Ed.). Book title. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 807-16.
255. László A, Novák Z, Szöllősi-Varga I, Hai du Q, Vetró Á, Kovács A. Blood lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and hemorheological changes in autistic children. *Ideggyogy Sz*. 2013; 66(1-2):23-8.
256. Holson JF, Memec MD, Stump DG, Kaufman IE, Lindstöm P, Varsho J. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. 2002;22:185-221.
257. Cysneiros RM, Ferrari D, Arida RM, Terra VC, de Almeida AC, Cavalheiro EA, et al. Qualitative analysis of hippocampal plastic changes in rats with epilepsy supplemented with oral omega-3 fatty acids. *Epilepsy Behav*. 2010;17(1):33-8.
258. Fortunato JJ, da Rosa N, Martins Laurentino AO, Goulart M, Michalak C, Borges LP, et al. Effects of ω -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides. *Nutrition*. 2017;35:119-27.
259. Moreira RM. Depleção cerebral de serotonina durante o período neonatal programa homeostase metabólica energética e a expressão comportamental de ratos adultos [Dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, 2008.
260. Fu L, Chen YH, Chen X, Xu S, Yu Z, Xu DX. Vitamin D deficiency impairs neurobehavioral development in male mice. *Physiol Behav*. 2017;179:333-39.
261. Felipe CFB. Estudo dos efeitos comportamentais, neuroquímicos e tóxicos do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2004.

262. Imanishi T, Sawa A, Ichimaru Y, Miyashiro M, Kato S, Yamamoto T, et al. Ameliorating effects of rolipram on experimentally induced impairments of learning and memory in rodents. *Eur J Pharmacol*. 1997;321(3):273-8.
263. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
264. Joshi G, Perluigi M, Sultana R, Agrippino R, Calabrese V, Butterfield DA. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (faee) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (aaph) or $Fe(2+)/H_2O_2$: insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Neurochem Int*. 2006;48(4):318-27.
265. Sultana R, Ravagna A, Mohammad-Abdul H, Calabrese V, Butterfield DA. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β -peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J. Neurochem*. 2005; 92, 749–58.
266. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. 1982;60(3):618-22.
267. Barichello T, Generoso JS, Goularte JA, Collodel A, Pitcher MR, Simões LR, et al. Does Infection-Induced Immune Activation Contribute to Dementia? *Aging Dis*. 2015; 6(5):342-8.
268. BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA do CONCEA. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de nov. 2016. Seção 1.º 33, p. 5.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 01 de fevereiro de 2018
Registro na CEUA (código): 17.029.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabrícia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do efeito do composto bioativo 6-Shogaol como alvo terapêutico para o Transtorno do Espectro Autista: Estudo Pré-Clinico", registrada com o nº 17.029.4.01.IV, sob a responsabilidade de Fabrícia Cardoso Petronilho - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 08 de fevereiro de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br

ANEXO B – Produção científica publicada 2015-2019

2016

Biochem Cell Biol. 2016 Oct;94(5):451-458. Epub 2016 May 3.

Single dose and repeated administrations of liraglutide alter energy metabolism in the brains of young and adult rats.

Prá M¹, Ferreira GK², de Mello AH¹, Schraiber RB¹, Cardoso LC¹, Souza LD¹, da Rosa N³, Fortunato JJ³, Rezin GT¹.

Author information

- 1 a Laboratory of Clinical and Experimental Pathophysiology, Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, 88704-900 SC, Brazil.
- 2 b Laboratory Pharmacology and Pathophysiology of Skin, Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, 81531-980 PR, Brazil.
- 3 c Laboratory of Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, 88704-900 SC, Brazil.

Abstract

Liraglutide is a human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue that was recently approved to treat obesity in some countries. Considering that liraglutide effects on brain energy metabolism are little known, we evaluated the effects of liraglutide on the energy metabolism. Animals received a single or daily injection of saline or liraglutide during 7 days (25, 50, 100, or 300 µg/kg i.p.). Twenty-four hours after the single or last injection, the rats were euthanized and the hypothalamus, prefrontal cortex, cerebellum, hippocampus, striatum, and posterior cortex were isolated. Our results demonstrated that a single dose of liraglutide in young rats increased the activity of complexes and inhibited creatine kinase activity. Repeated administrations of liraglutide in young rats reduced the activity of complexes and activated creatine kinase activity. In adult rats, a single dose of liraglutide reduced the activity of complex I and creatine kinase and increased the activity of complexes II and IV. Repeated administrations of liraglutide in adult rats increased the activity of complexes I and IV and reduced the activity of complex II and creatine kinase. We concluded that liraglutide may interfere in energy metabolism, because analysis of different times of administrations, concentrations, and level of brain development leads to divergent results.

KEYWORDS: GLP-1; energy metabolism; incretin system; liraglutide; métabolisme énergétique; obesity; obésité; système des incrétines

2017

Nutrition. 2017 Mar;35:119-127. doi: 10.1016/j.nut.2016.10.019. Epub 2016 Nov 22.

Effects of ω -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides.

Fortunato JJ¹, da Rosa N², Martins Laurentino AO², Goulart M², Michalak C², Borges LP², da Cruz Cittadin Soares E², Reis PA³, de Castro Faria Neto HC³, Petronilho F².

Author information

- 1 Neurobiology Laboratory of Inflammatory and Metabolic Processes (NeuroIMet), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil; Clinical Research Center, Nossa Senhora da Conceição Hospital and the University of Southern Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil. Electronic address: Jucelia.fortunato@unisul.br.
- 2 Neurobiology Laboratory of Inflammatory and Metabolic Processes (NeuroIMet), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil.
- 3 Immunopharmacology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz/IOC/FIOCRUZ-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

OBJECTIVE: Supplementation with ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can positively contribute to neurologic development, modulating inflammatory responses, promoting homeostasis, and having a positive effect on animal behaviors associated with mental disorders. The aim of this study was to evaluate behavioral and biochemical effects of ω -3 fatty acid supplementation in an animal model for mental disorders by prenatal maternal exposure to lipopolysaccharides (LPS) from the maternal immune activation.

METHODS: Twelve pregnant Wistar rats were used. Each rat received 100 μ g/kg of LPS or saline solution on gestational day (GD) 9.5. The offspring remained with mothers until weaning and from postnatal day (PND) 30 were supplemented with ω -3 PUFA or saline solution by gavage at a dose of 0.8 g/kg orally for 21 d. On PND 52, the animals underwent behavioral tests; then, they were sacrificed, and the brain structures were dissected and analyzed by levels: neuron-specific enolase (NSE), brain-derived neurotrophic factor, and transforming growth factor (TGF)- β .

RESULT: Prenatal exposure to LPS significantly increased the episodes of stereotyped movements and decreased social interaction in the offspring ($P = 0.009$ and $P = 0.001$, respectively), after ω -3 PUFA supplementation these parameters reversed ($P = 0.005$ and $P = 0.013$, respectively). Significant changes also were identified in the biochemical analysis in NSE and TGF- β in the brain structures; these conditions were reversed after ω -3 PUFA supplementation.

CONCLUSION: Supplementation with ω -3 PUFA reversed animal behaviors that often are observed in autism and other mental disorders in rats prenatally exposed to LPS, and also exerted neuroprotective effects in marker levels of neuronal damage and expression of TGF- β .

Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Lipopolysaccharides; Maternal immune activation; Neuron-specific enolase; Transforming growth factor- β ; ω -3

Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis.

Della Giustina A¹, Goldim MP¹, Danielski LG¹, Florentino D¹, Mathias K¹, Garbossa L¹, Oliveira Junior AN¹, Fileti ME¹, Zarbato GF¹, da Rosa N¹, Martins Laurentino AO¹, Fortunato JJ¹, Mina F², Belletini-Santos T², Budni J², Barichello T³, Dal-Pizzol F⁴, Petronilho F⁵.

Author information

- 1 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.
- 2 Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.
- 3 Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA; Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, TX, USA; Neuroscience Graduate Program, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX, USA; Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.
- 4 Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.
- 5 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil. Electronic address: fabricia.petronilho@unisc.br.

Abstract

Sepsis is a complication of an infection which imbalance the normal regulation of several organ systems, including the central nervous system (CNS). Evidence points towards inflammation and oxidative stress as major steps associated with brain dysfunction in sepsis. Thus, we investigated the α -lipoic acid (ALA) effect as an important antioxidant compound on brain dysfunction in rats. Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or sham (control) and treated orally with ALA (200 mg/kg after CLP) or vehicle. Animals were divided into sham + saline, sham + ALA, CLP + saline and CLP + ALA groups. Twelve, 24 h and 10 days after surgery, the hippocampus, prefrontal cortex and cortex were obtained and assayed for levels of TNF- α and IL-1 β , blood brain barrier (BBB) permeability, nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase (MPO) activity, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation, protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity and neurotrophins levels. Behavioral tasks were performed 10 days after surgery. ALA reduced BBB permeability and TNF- α levels in hippocampus in 24 h and IL-1 β levels and MPO activity in hippocampus and prefrontal cortex in 24 h. ALA reduced nitrite/nitrate concentration and lipid peroxidation in 24 h in all structures and protein carbonylation in 12 and 24 h in hippocampus and cortex. CAT activity increased in the hippocampus and cortex in all times. ALA enhanced NGF levels in hippocampus and cortex and prevented cognitive impairment. Our data demonstrates that ALA reduces the consequences of polymicrobial sepsis in rats by decreasing inflammatory and oxidative stress parameters in the brain.

Copyright © 2017. Published by Elsevier Ltd.

KEYWORDS: Alpha-lipoic acid (PubChem CID:6112); Antioxidant; Behavior; Blood brain barrier; Ceftriaxone (PubChem CID:5479530); Copper sulfate (PubChem CID:24462); Dinitrophenylhydrazine (PubChem CID:5367495); Dipyrone (PubChem CID:522325); Evans blue dye (PubChem CID:24832074); Hexadecyltrimethylammonium bromide (PubChem CID:121494050); Ketamine (PubChem CID:15851); Neuroinflammation; Oxidative stress; Sepsis; Thiopental (PubChem CID:23665410); Trichloroacetic acid (PubChem CID:6421); Xylazine (PubChem CID:5707)

2018

Neurotox Res. 2018 Oct;34(3):418-430. doi: 10.1007/s12640-018-9900-8. Epub 2018 Apr 30.

Dimethyl Fumarate Limits Neuroinflammation and Oxidative Stress and Improves Cognitive Impairment After Polymicrobial Sepsis.

Zarbato GF¹, de Souza Goldim MP¹, Giustina AD¹, Danielski LG¹, Mathias K¹, Florentino D¹, de Oliveira Junior AN¹, da Rosa N¹, Laurentino AO¹, Trombetta T¹, Gomes ML², Steckert AV³, Moreira AP³, Schuck PF², Fortunato JJ¹, Barichello T^{3,4}, Petronilho F⁵.

Author information

- 1 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarao, SC, Brazil.
- 2 Laboratory Inborn Errors of Metabolism, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciuma, SC, Brazil.
- 3 Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciuma, SC, Brazil.
- 4 Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA.
- 5 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarao, SC, Brazil. fabricia.petronilho@unisul.br.

Abstract

Sepsis is caused by a dysregulated host response to infection, often associated with acute central nervous system (CNS) dysfunction, which results in long-term cognitive impairment. Dimethyl fumarate (DMF) is an important agent against inflammatory response and reactive species in CNS disorders. Evaluate the effect of DMF on acute and long-term brain dysfunction after experimental sepsis in rats. Male Wistar rats were submitted to the cecal ligation and puncture (CLP) model. The groups were divided into sham (control) + vehicle, sham + NAC, sham + DMF, CLP + vehicle, CLP + NAC, and CLP + DMF. The animals were treated with DMF (15 mg/kg at 0 and 12 h after CLP, per gavage) and the administration of n-acetylcysteine (NAC) (20 mg/kg; 3, 6, and 12 h after CLP, subcutaneously) was used as positive control. Twenty-four hours after CLP, cytokines, myeloperoxidase (MPO), nitrite/nitrate (N/N), oxidative damage to lipids and proteins, and antioxidant enzymes were evaluated in the hippocampus, total cortex, and prefrontal cortex. At 10 days after sepsis induction, behavioral tests were performed to assess cognitive damage. We observed an increase in cytokine levels, MPO activity, N/N concentration, and oxidative damage, a reduction in SOD and GPx activity in the brain structures, and cognitive damage in CLP rats. DMF treatment was effective in reversing these parameters. DMF reduces sepsis-induced neuroinflammation, oxidative stress, and cognitive impairment in rats subjected to the CLP model.

KEYWORDS: Cognitive impairment; Dimethyl fumarate; Neuroinflammation; Oxidative stress; Sepsis

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats.

Netto MB¹, de Oliveira Junior AN¹, Goldim M¹, Mathias K¹, Fileti ME¹, da Rosa N¹, Laurentino AO¹, de Farias BX¹, Costa AB¹, Rezin GT¹, Fortunato JJ¹, Giustina AD¹, Barichello T², Dal-Pizzol F³, Petronilho F⁴.

Author information

- 1 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.
- 2 Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil; Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA.
- 3 Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil.
- 4 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil. Electronic address: fabricia.petronilho@unisc.br.

Abstract

Postoperative cognitive dysfunction (POCD) is defined by cognitive impairment determined by neuropsychological tests from before to after surgery. Several mechanisms have been proposed in this bidirectional communication between the immune system and the brain after surgery. We aimed at understanding the mechanisms underlying POCD elderly rats in an experimental tibial fracture model. Elderly male Wistar rats were subjected to tibial fracture (TF) model. Control (sham) and fracture (TF) groups were followed to determine nitrite/nitrate concentration; oxidative damage to lipids and proteins; the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase-SOD and catalase-CAT), mitochondrial respiratory chain enzymes, and creatine kinase (CK); and BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex (at 24 h and at seven days) and cognitive function through habituation to the open field task and novel object recognition task (only at seven days). TF group presented increased concentration of nitrite/nitrate, hippocampal lipid peroxidation at seven days, protein oxidative damage in the prefrontal cortex and hippocampus at 24 h, decreased antioxidant activity in both structures on the first postoperative day and compromised function of the mitochondrial respiratory chain complexes as well as the CK enzyme. In addition, the levels of BDNF were reduced and memory function was impaired in the TF group. In conclusion, elderly rats submitted to an experimental model of tibial fracture displayed memory impairment accompanied by an increase in oxidative stress, mitochondrial dysfunction and reduced neurotrophin level.

Copyright © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Mitochondrial respiratory chain; Oxidative stress; Postoperative cognitive dysfunction

Fish oil-rich lipid emulsion modulates neuroinflammation and prevents long-term cognitive dysfunction after sepsis.

Della Giustina A¹, Goldim MP¹, Danielski LG¹, Florentino D¹, Garbossa L¹, Joaquim L¹, Oliveira Junior AN¹, Mathias K¹, Fileti ME¹, Zarbato GF¹, da Rosa N¹, Laurentino AOM¹, Fortunato JJ¹, Palandi J², de Oliveira BH², Martins DF², Bonbinski F², Belletini-Santos T³, Garcez M³, Budni J³, Barichello T⁴, Petronilho F⁵.

Author information

- 1 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.
- 2 Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, Texas, USA.
- 3 Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The University of Texas Health Science Center at Houston, McGovern Medical School, Houston, Texas, USA.
- 4 Neuroscience Graduate Program, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, Texas, USA; Laboratory of Neurosciences, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil; Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil.
- 5 Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil. Electronic address: fabricia.petronilho@unisc.br.

Abstract

OBJECTIVES: Sepsis is a severe organic dysfunction caused by an infection that affects the normal regulation of several organ systems, including the central nervous system. Inflammation and oxidative stress play crucial roles in the development of brain dysfunction in sepsis. The aim of this study was to determine the effect of a fish oil (FO)-55-enriched lipid emulsion as an important anti-inflammatory compound on brain dysfunction in septic rats.

METHODS: Wistar rats were subjected to sepsis by cecal ligation and perforation (CLP) or sham (control) and treated orally with FO (600 µL/kg after CLP) or vehicle (saline; sal). Animals were divided into sham+sal, sham+FO, CLP+sal and CLP+FO groups. At 24 h and 10 d after surgery, the hippocampus, prefrontal cortex, and total cortex were obtained and assayed for levels of interleukin (IL)-1β and IL-10, blood-brain barrier permeability, nitrite/nitrate concentration, myeloperoxidase activity, thiobarbituric acid reactive species formation, protein carbonyls, superoxide dismutase and catalase activity, and brain-derived neurotrophic factor levels. Behavioral tasks were performed 10 d after surgery.

RESULTS: FO reduced BBB permeability in the prefrontal cortex and total cortex of septic rats, decreased IL-1β levels and protein carbonylation in all brain structures, and diminished myeloperoxidase activity in the hippocampus and prefrontal cortex. FO enhanced brain-derived neurotrophic factor levels in the hippocampus and prefrontal cortex and prevented cognitive impairment.

CONCLUSIONS: FO diminishes the negative effect of polymicrobial sepsis in the rat brain by reducing inflammatory and oxidative stress markers.

Copyright © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Antioxidant; Brain; Cognition; Fish oil; Neuroinflammation; ω-3 PUFAs

2019

Neuropsychiatr Dis Treat. 2019 Mar 11;15:669-673. doi: 10.2147/NDT.S193896. eCollection 2019.

Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction.

Martins Laurentino AO¹, Durante de Medeiros E¹, de Oliveira J^{1,2}, da Rosa N^{1,2}, Mateus Gomes T¹, de Medeiros Peretti E¹, Somariva Prophiro J^{1,2}, Fortunato JJ^{1,2}.

Author information

- 1 Neurobiology Laboratory of Inflammatory and Metabolic Processes, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil, fabiana.durante@gmail.com.
- 2 Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, Brazil.

Abstract

The neurodevelopment period is susceptible to alterations by genetic and environmental factors, such as the exposure to organophosphates (OP). The OP is neurotoxic and has been associated with neurological diseases pathophysiology. The OP temephos is widely used against *Aedes aegypti* in Brazil's public health programs.

PURPOSE: To evaluate behavioral effects of prenatal exposition to temephos in *Wistar* rats.

METHODS: First, we divided pregnant females into groups: those who received temephos diluted in distilled water by gavage between gestational days 6-13 and those who received only distilled water in the same period and volume. Then, we divided pups according to sex and exposure, and we made the behavioral tests on postnatal day 30.

RESULTS: Prenatal exposure to temephos caused hyperactivity, stereotyped behavior, and social impairment in animals.

CONCLUSION: These results are similar to the altered behavior presented in some neurobiological diseases models, like Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorders, and this study may bring a red alert to the large use of temephos in Brazil, due to the damage caused by its exposure.

KEYWORDS: neurodevelopment; organophosphate; temephos; toxicity