

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Efeito de ácidos graxos saturados e poli-insaturados em cultura primária de astrócitos de  
ratos Wistar neonatos

Fernanda Carolina Telles da Silva Fróes

**Orientadora:** Marina Concli Leite

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Frões, Fernanda Carolina Telles da Silva  
Efeito de ácidos graxos saturados e poli-  
insaturados em cultura primária de astrócitos de  
ratos Wistar neonatos / Fernanda Carolina Telles da  
Silva Frões. -- 2017.  
59 f.

Orientadora: Marina Concli Leite.

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

1. Ácidos graxos. 2. Neuroinflamação. 3. S100B. 4.  
Astrócitos. I. Leite, Marina Concli, orient. II.  
Título.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa

Dedico esse trabalho às minhas avós Diana Maria e Maria Nilza, mulheres inteligentes,  
fortes e incansáveis, que me inspiram a ir mais longe e dar o melhor de mim.

## **Agradecimentos**

À minha família e amigos pelo amor e apoio. Aos meus irmãos Henrique, Diana, Bernardo e Giovanna por serem as pessoas mais incríveis do mundo, amo vocês mais do que palavras podem expressar. Aos meus pais Nilza e André e minha avó Diana pelo amor incondicional, sem vocês nada disso seria possível. Ao Thierry pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos, também a sua família por estar sempre comigo. Às minhas tias e prima queridas, por alegrarem nossa família.

À Caroll pelo aprendizado, paciência, ajuda e amizade. À Fafá por me aceitar como IC e por todos os ensinamentos. À Maria pelo carinho, amizade e por dividir comigo seu conhecimento.

Aos alunos de iniciação científica por toda a ajuda e dedicação: Gabriel, Jé, Jéssica, Lili e Marina. A ajuda de vocês foi imprescindível para a realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório 31 e 33 pela convivência e coleguismo do dia a dia.

Ao professor Carlos Alberto por toda ajuda, opiniões e aprendizado.

À minha orientadora Marina Leite por ser a melhor orientadora que eu poderia querer. Por sua ajuda e carinho em todos os momentos, o que tornou possível a realização desse trabalho. Obrigada por aceitar me orientar e pelo incentivo, apoio e amizade.

À UFRGS e ao PPG Bioquímica por me permitirem realizar esse trabalho.

Ao apoio financeiro: CNPq, CAPES e Fapergs.

A todos vocês o meu muito obrigada.

## Índice

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas .....	3
1. Introdução.....	5
1.1. Ácidos Graxos.....	5
1.2. Obesidade e inflamação .....	7
1.3. Astrócitos .....	10
1.4. Neuroinflamação.....	12
2. Objetivos .....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos .....	16
3. Metodologia .....	17
3.1. Animais e cultura primária de astrócitos .....	17
3.2. Conjugação dos ácidos graxos com albumina .....	18
3.3. Desenho Experimental.....	18
3.4. Técnicas Bioquímicas e Imunológicas .....	19
3.4.1. Redução de MTT .....	19
3.4.2. Incorporação do corante vermelho neutro .....	19
3.4.3. Incorporação de iodeto de propídio .....	19
3.4.4. Medida da concentração de GSH .....	20
3.4.5. Atividade da Glutamina Sintetase .....	20
3.4.6. Captação de glutamato.....	20
3.4.7. Secreção de TNF- $\alpha$ .....	21
3.4.8. Secreção de S100B .....	21
3.4.9. Imunoconteúdo de GFAP .....	22
3.4.10. Imunoquantificação de RAGE, COX-2 e TLR4 .....	23
3.4.11. Medida de formação de espécies reativas.....	24
3.4.12. Dosagem de Proteínas .....	24
3.5. Análise Estatística.....	24
4. Resultados .....	25
4.1. Efeito dos ácidos graxos sobre a viabilidade celular .....	25
4.2. Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção da proteína S100B .....	25
4.3. Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GFAP .....	27

4.4.	Efeito dos ácidos graxos sobre a captação de glutamato e a atividade da GS .	27
4.5.	Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GSH e oxidação de DCF-DA .	28
4.6.	Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção de TNF- $\alpha$ .....	30
4.7.	Efeito dos ácidos graxos no imunoconteúdo de COX-2, TLR4 e RAGE.....	31
5.	Discussão.....	32
6.	Conclusões .....	41
7.	Perspectivas.....	42

## Resumo

A ingestão de ácidos graxos na forma de gordura proveniente da dieta tem aumentado nos últimos anos, principalmente na forma de gordura saturada. Tem sido observado que ácidos graxos saturados podem causar a liberação de citocinas em diversos tecidos e células. Além disso, em indivíduos obesos, tem se observado que há uma inflamação crônica e de baixo grau, que poderia ter entre seus causadores os ácidos graxos provenientes da dieta. Já os ácidos graxos poli-insaturados têm sido citados como sendo neuroprotetores devido a suas propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas. A barreira hematoencefálica (BHE) é um dos principais fatores que regulam a captação dos ácidos graxos no sistema nervoso central (SNC). A captação de ácidos graxos pelo cérebro é seletiva, priorizando a entrada de ácidos graxos poli-insaturados e suprimindo a entrada de ácidos graxos saturados. Além disso, a quantidade relativa de ácidos graxos no sangue pode afetar o grau de penetração desses no SNC. Existem diversas condições onde há aumento na permeabilidade da BHE e, nessas situações, o SNC pode ficar mais exposto a substâncias que normalmente não estão presentes ou estão em baixas concentrações, como os ácidos graxos saturados de cadeia longa. Dessa forma, é importante que se analise os efeitos dessas substâncias em células cerebrais. Os astrócitos são células presentes no SNC caracterizadas por expressarem e secretarem a proteína S100B e por expressarem a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Os astrócitos captam glutamato e o metaboliza através da enzima glutamina sintetase (GS), formando glutamina, um processo importante para evitar o acúmulo de glutamato e excitotoxicidade. Essas células são muito resistentes ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de glutathione reduzida (GSH). Em condições patológicas, os astrócitos liberam o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e a produção dessa citocina é um importante componente da resposta neuroinflamatória que está associada com muitas desordens neurológicas. Os astrócitos possuem o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), que tem entre seus ligantes a S100B e sua ativação está envolvida na resposta inflamatória imediata. O receptor tipo toll 4 (TLR4) também está presente nessas células e ligado à resposta inflamatória. A ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma enzima associada à inflamação e sua indução é responsável por desencadear muitas citocinas e mediadores inflamatórios presentes em diversos tipos celulares. Utilizando cultura primária de astrócitos de ratos Wistar, nós investigamos a ação dos ácidos graxos saturados e insaturados sobre parâmetros função de astrocitária, oxidativos e inflamatórios. Nosso estudo não encontrou alterações na viabilidade e integridade celular. Observamos um aumento dose-dependente na secreção de S100B nos astrócitos incubados apenas com o ácido palmítico. Não encontramos alterações para nenhum ácido graxo no conteúdo de GFAP, GSH ou captação de glutamato. Para o ácido linoleico observamos um aumento na atividade da GS e na oxidação do DCF. A secreção de TNF- $\alpha$  aumentou para os ácidos graxos saturados e não se alterou para os poli-insaturados. O conteúdo de COX-2, TLR4 e RAGE não foi alterado. Nossos resultados reforçam os dados de que ácidos graxos saturados, e não os insaturados, causam aumento na liberação de citocinas e podem contribuir para o processo neuroinflamatório encontrado em condições de aumento na permeabilidade da BHE. Além disso, verificamos que nem toda inflamação desencadeia aumento na secreção de S100B, visto que só tivemos esse comportamento para o ácido palmítico. Nossos resultados também reforçam o potencial terapêutico do ácido linoleico, que poderia desencadear adaptações nos astrócitos com possíveis benefícios para pacientes acometidos por patologias que envolvam a excitotoxicidade glutamatérgica.

## Abstract

The intake of fatty acids in the form of fat from the diet has increased in recent years, especially in the form of saturated fat. It has been observed that saturated fatty acids can cause the release of cytokines in various tissues and cells. Furthermore, in obese individuals, it has been observed a chronic and low-grade inflammation, which could have among their causes the diet fatty acids. Polyunsaturated fatty acids have been considered neuroprotective because of their antiinflammatory and antiapoptotic properties. The blood-brain barrier (BBB) is one of the major factors regulating the uptake of fatty acids in the central nervous system (CNS). The brain uptake of fatty acids is selective, prioritizing the entry of polyunsaturated fatty acids and suppressing the entry of saturated fatty acids. In addition, the relative amount of fatty acids in the blood can affect the degree of penetration of these into the CNS. There are several conditions where there is an increase in BBB permeability and in these situations the CNS may be more exposed to substances that are not normally present or are in low concentrations, such as saturated long chain fatty acids. Thus, it is important to analyze the effects of these substances in brain cells. Astrocytes are cells present in the CNS characterized by expressing and secreting the S100B protein and by expressing the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Astrocytes uptake glutamate and metabolize it through the glutamine synthetase (GS) enzyme, forming glutamine, an important process to avoid the accumulation of glutamate and excitotoxicity. These cells are very resistant to oxidative stress because of their high reduced glutathione content (GSH). In pathological conditions, astrocytes release tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and the production of this cytokine is an important component of the neuroinflammatory response that is associated with many neurological disorders. Astrocytes have the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE), which has among its ligands S100B and its activation is involved in the immediate inflammatory response. The toll-like receptor 4 (TLR4) is another receptor present in these cells, which is also linked to the inflammatory response. The cyclooxygenase-2 (COX-2) is an enzyme associated with inflammation and its induction is responsible for triggering many cytokines and inflammatory mediators in many cell types. Using astrocyte primary cultures from Wistar rats, we investigated the effect of saturated and unsaturated fatty acids on astrocytic function and oxidative and inflammatory parameters. Our study found no changes in cell viability and integrity. We observed a dose-dependent increase in S100B secretion in astrocytes incubated only with palmitic acid. We did not find alterations from fatty acids in the content of GFAP and GSH as well as uptake of glutamate. For linoleic acid, we observed an increase in GS activity and in DCF oxidation. TNF- $\alpha$  secretion increased to the saturated fatty acids and did not change for polyunsaturated. The contents of COX-2, TLR4 and RAGE did not change. Our results reinforce the data that saturated fatty acids, and not unsaturated, cause an increase in the release of cytokines and may contribute to the neuroinflammatory process found under conditions of increase in BBB permeability. In addition, we found that inflammation not always triggers an increase in S100B secretion, since we only had this behavior for palmitic acid. Our results also reinforce the therapeutic potential of linoleic acid, which could trigger adaptations in astrocytes with possible benefits for patients affected by pathologies involving glutamatergic excitotoxicity.

## Lista de Abreviaturas

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPS	Padrões moleculares associados a perigo
DCF	Diclorodifluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutationa reduzida
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HMGB1	Proteína do grupo 1 de alta mobilidade

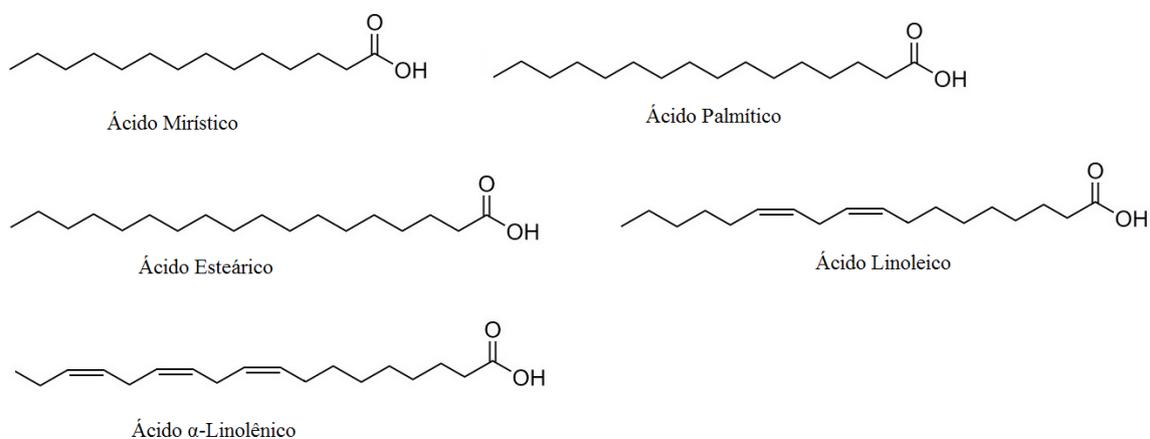
IL	Interleucina
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolissacarídeo
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B
OPD	o-fenilenediamina
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
SNC	Sistema nervoso central
TBS	Tampão a base de tris
TIR	Domínio de receptor de IL1/Toll
TLR	Receptor tipo toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
T-TBS	Tampão a base de tris contendo 0,05% de tween 20

## 1. Introdução

### 1.1. Ácidos Graxos

Os lipídeos são uma família ampla de biomoléculas que possuem a característica comum de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Os ácidos graxos são lipídeos compostos por um ácido carboxílico, na maioria das vezes com uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par ou ímpar de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. Os ácidos graxos classificados como saturados de cadeia longa são aqueles que possuem de quatorze a vinte átomos de carbono e não possuem insaturações na molécula e os insaturados possuem uma ou mais insaturações na cadeia carbônica (CURI, 2002).

A estrutura química dos ácidos graxos saturados mirístico (14:0, ácido tetradecanoico), palmítico (C16:0, ácido hexadecanoico) e esteárico (C18:0, ácido octadecanoico) e insaturados linoleico (C18:2<sup>9,12</sup>, ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico) e linolênico (C18:3<sup>9,12,15</sup>, ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico) está ilustrada na figura 1 (figura 1).



**Figura 1.** Estrutura química dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e 6 são considerados essenciais. Esses ácidos graxos devem ser ingeridos na alimentação, pois, apesar de serem necessários para a função normal do organismo, eles não podem ser sintetizados por humanos e outros mamíferos, devido à ausência de enzimas endógenas para dessaturação de ômega-3 (SIMOPOULOS, 2016).

A ingestão de ácidos graxos na forma de gordura proveniente da dieta tem aumentado nos últimos anos. Também houve modificações no tipo de gordura consumida, aumentando o consumo de gordura saturada de origem animal e diminuindo a insaturada, presente em plantas e animais marinhos (KREMMYDA *et al.*, 2011).

O cérebro é o órgão principal do sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados. Ele possui uma composição lipídica diferente de outros órgãos. O cérebro é rico em ácidos graxos insaturados e colesterol (DIETSCHY; TURLEY, 2004) e é muito ativo na síntese de lipídeos (EDMOND, 2001). Os lipídeos atuam na construção das membranas e, portanto, são importantes para a mielinização (CHRAST *et al.*, 2011), o crescimento de neuritos (TABERNERO *et al.*, 2001) e a sinaptogênese (MAUCH *et al.*, 2001), além de agirem como moléculas de sinalização (BAZAN, 2003). No entanto, em excesso, essas biomoléculas podem ter efeitos deletérios sobre o sistema nervoso central (GUPTA *et al.*, 2012, BRUCE-KELLER; KELLER; MORRISON, 2009).

O cérebro utiliza pouco os ácidos graxos de cadeia longa no seu metabolismo energético, mas isso não é bem compreendido. Por outro lado, outros órgãos com alto gasto energético, como coração e fígado, oxidam amplamente ácido graxos. A baixa oxidação de ácidos graxos no cérebro pode ser explicada pela passagem lenta dos ácidos graxos através da barreira hematoencefálica (BHE), pela baixa capacidade enzimática para degradação dos ácidos graxos e pelos efeitos dos ácidos graxos na síntese

mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP) no equilíbrio entre a geração e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHÖNFELD; REISER, 2013).

## **1.2. Obesidade e inflamação**

A obesidade é uma doença crônica de etiologia complexa e multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos, influência do ambiente, estilo de vida e fatores emocionais. Nos últimos anos, a ocorrência de obesidade humana aumentou de forma intensa em todo o mundo. Diante do crescente número de pessoas com obesidade, muitos estudos têm sido feitos nessa área e foi observado que diversas citocinas estão aumentadas em tecidos de animais obesos (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006, BERG; SCHERER, 2005, HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995) caracterizando um estado de inflamação crônica e de baixo grau encontrada nesses indivíduos. O gatilho inflamatório na obesidade é metabólico e causado pelo consumo excessivo de nutrientes. Células especializadas, como os adipócitos, são as responsáveis por iniciar e sustentar o processo inflamatório, danificando a homeostase metabólica (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). O excesso de ingestão de nutrientes, ocasionando altos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos livres, e aminoácidos, além de ser um contribuinte para o excesso de energia, tem sido reconhecido como um fator externo independente que é alvo de sistema imunológico inato para desencadear uma forma atípica de inflamação, que leva a disfunções metabólicas a nível celular, de órgãos e sistêmico (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011, LEHRKE; LAZAR, 2004, BERG; SCHERER, 2005, SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008, SHOELSON; GOLDFINE, 2009).

A BHE é a interface entre o sangue e o cérebro. Ela é um dos principais fatores que regulam a atividade e a captação dos ácidos graxos no SNC. A captação de ácidos graxos pelo cérebro é seletiva, priorizando a entrada de ácidos graxos poli-insaturados e suprimindo a entrada de colesterol e ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Além disso, a quantidade relativa de ácidos graxos no sangue pode afetar o grau de penetração desses no SNC (CURI, 2002). Apesar da preferência pela captação de ácidos graxos poli-insaturados, foi observado que ácidos graxos saturados administrados periféricamente, são captados pelo cérebro e se acumulam principalmente nos astrócitos, se comparados aos neurônios (MORAND; BAUMANN; BOURRE, 1979). O transporte de ácidos graxos através de membranas é controverso e pode envolver difusão passiva (movimento *flip-flop*) bem como processo mediado por proteínas (incluindo proteína de transporte de ácido graxo 1-6, ácido graxo translocase/CD 36, proteínas ligantes de ácidos graxos intracelulares 1-9, proteínas ligantes de ácidos graxos membrana plasma e caveolina-1) (MITCHELL; HATCH, 2011).

Sabe-se que em diversas condições patológicas, como esclerose múltipla, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral isquêmico, traumatismo craniano e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, há um aumento na permeabilidade da BHE (BOER; GAILLARD, 2006) e, conseqüentemente, um aumento da exposição do cérebro aos ácidos graxos. Também foi observado, que dietas ricas em ácidos graxos saturados estão relacionadas à disfunção da BHE (TAKECHI *et al.*, 2013). Nessas condições de maior suscetibilidade, efeitos tóxicos dos ácidos graxos saturados de cadeia longa tem sido observados *in vivo*. Entre os efeitos observados *in vivo* com relação aos ácidos graxos saturados estão o aumento da inflamação central em hipotálamo e córtex cerebral, a diminuição da plasticidade neuronal no hipocampo, o estresse oxidativo no córtex cerebral e o comprometimento cognitivo no hipocampo

(BRUCE-KELLER; KELLER; MORRISON, 2009, YU *et al.*, 2009, MILANSKI *et al.*, 2009, MOLTENI *et al.*, 2002, WINOCUR; GREENWOOD, 2005, WHITE *et al.*, 2009).

Tem sido observado que uma dieta rica em ácidos graxos saturados está relacionada com aumento de parâmetros inflamatórios séricos no tecido adiposo, no fígado e no músculo de animais (FRITSCHÉ, 2015, WANG *et al.*, 2012, CAI *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* mostram que ácidos graxos saturados, e não os insaturados, de cadeia média ou, principalmente, longa têm também efeito inflamatório em macrófagos, monócitos, astrócitos e células dendríticas (GUPTA *et al.*, 2012, LEE, J Y *et al.*, 2001, LEE, *et al.*, 2004, LAINE *et al.*, 2007, CALDER, 2013, HUANG *et al.*, 2012). Foi observado que ácidos graxos saturados, principalmente esteárico, láurico e palmítico, ativam receptores do tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e TLR4) e levam a uma resposta pró-inflamatória pela ativação da via do fator nuclear  $\kappa$ B (Nf- $\kappa$ B), levando ao aumento da expressão de genes-alvo pró-inflamatórios e prostaglandinas pelo aumento na expressão e atividade da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) em monócitos (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012, LEE *et al.*, 2001 e 2004).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tem um papel importante na resistência à insulina, visto que foi observado sua interferência na ação da insulina (XU *et al.*, 2003, DANDONA, 2004). Lembrando que uma inflamação de baixa intensidade e crônica tem sido relacionada à patogênese da obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (XU *et al.*, 2003, WEISBERG *et al.*, 2003, GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011, JACOBI; STANYA; LEE, 2012). Alguns trabalhos mostraram que ácidos graxos saturados livres liberados por adipócitos aumentam a secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos e o TNF- $\alpha$  reciprocamente estimula a lipólise e a liberação de ácidos graxos saturados livres pelos adipócitos (SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA,

2005). Também foi observado que ácidos graxos saturados de cadeia longa aumentam a secreção dessa citocina em cultura de astrócitos (GUPTA *et al.*, 2012).

### 1.3. Astrócitos

Os astrócitos são células com morfologia estrelada, possuem numerosos processos que se estendem e envolvem neurônios e vasos sanguíneos vizinhos e contém a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) como filamentos intermediários. Essas células captam o glutamato liberado na fenda sináptica pelos neurônios num processo crítico para o chamado ciclo glutamato-glutamina. Nesse processo, os astrócitos captam e metabolizam o glutamato em glutamina via glutamina sintetase (GS), enzima glia-específica no SNC, numa reação de amidação dependente de ATP (MARTINEZ-HERNANDEZ; BELL; NORENBORG, 1977, OTTERSEN; ZHANG; WALBERG, 1992). A glutamina é redistribuída para os neurônios para síntese *de novo* de glutamato. É importante ressaltar que, nesse sistema, a glutamina liberada não interfere diretamente na neurotransmissão, pois diferentemente do glutamato, não causa excitotoxicidade e não ativa os receptores de glutamato. O glutamato captado pelos astrócitos também pode ser convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato, através de uma reação de desaminação pela enzima glutamato desidrogenase ou por transaminação. O  $\alpha$ -cetoglutarato pode ser metabolizado através do ciclo do ácido cítrico ou ser metabolizado a malato que pode ser descarboxilado a piruvato e reduzido a lactato. Esse lactato também pode ser exportado dos astrócitos para ser utilizado pelos neurônios (MAGISTRETTI, 1994, DANBOLT, 2001).

Os astrócitos são as células mais resistentes ao estresse oxidativo entre as células cerebrais e proporcionam proteção aos neurônios. Isso se deve, principalmente, ao seu alto conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). A GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e também o principal antioxidante cerebral (AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008). O astrócito secreta GSH que serve de substrato para a ectoenzima astrogliol  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase que tem como produto o dipeptídeo cistenilglicina, a qual é utilizada pelos neurônios como precursor para a síntese de GSH (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000). A habilidade para reduzir ou sintetizar GSH é um importante fator que deve determinar como se encontra o estado redox celular, visto que o estresse oxidativo tem sido associado com o desenvolvimento de condições patológicas como as doenças neuroinflamatórias.

Uma proteína característica de astrócitos é a proteína ligante de cálcio S100B. A S100B é membro da família de proteínas S100, que são proteínas diméricas ligantes de cálcio de 21 kDa. A S100B se localiza no citoplasma das células, como um homodímero na qual as duas subunidades são mantidas juntas por ligações não-covalentes e são arranjadas de um modo antiparalelo sendo encontrada na forma solúvel bem como associada com membranas intracelulares dos centróssomos, microtúbulos e filamentos intermediários tipo III (DONATO, 2003). A S100B no SNC é principalmente expressa e secretada por astrócitos constitutivamente e sobre estimulação astrocítica com vários agentes (PINTO *et al.*, 2000), incluindo TNF- $\alpha$  (EDWARDS; ROBINSON, 2006). Entre os alvos intracelulares, foi mostrado que a S100B tem participação na regulação da proliferação, diferenciação e morfologia celular, homeostase do cálcio, fosforilação de proteínas, transcrição, atividade e metabolismo enzimático. (DONATO *et al.*, 2001 e 2009). A S100B também apresenta efeitos extracelulares observados em culturas neuronais dependendo de sua concentração, uma vez que em concentrações picomolar e

nanomolar apresenta efeito trófico, enquanto em concentrações micromolar, efeito apoptótico. Estes efeitos envolvem a ativação via receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e vias de sinalização como da cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e do NF- $\kappa$ B (DONATO *et al.*, 2009).

Outra proteína marcadora de astrócitos maduros é a GFAP que é uma proteína de filamento intermediário do citoesqueleto. Em situações de dano no SNC, os astrócitos ficam em um estado ativado chamado de astrogliose, tendo como marcador desta condição um aumento de GFAP (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). Esta proteína é modificada por fosforilação particularmente em sítios específicos na porção N-terminal e isto modula a plasticidade de filamentos intermediários gliais (RODNIGHT *et al.*, 1997). O aumento no imunoconteúdo de GFAP, independentemente de haver ou não proliferação astrogliar, é comumente usado como medida de astrogliose.

#### **1.4. Neuroinflamação**

No cérebro, os mediadores inflamatórios são produzidos principalmente pelas células endoteliais e gliais, incluindo astrócitos e microglia (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). A expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro é aumentada em resposta a diversas situações, como por exemplo, infecções, lesões, trauma e estresse oxidativo. A neuroinflamação possui um papel importante em diversas desordens neurológicas, como nas doenças de Alzheimer e Parkinson, no acidente vascular cerebral e no traumatismo craniano (LAYÉ, 2010, OLMOS; LLADÓ, 2014, GOODMAN *et al.*, 1990, FILLIT *et al.*, 1991, ÁLVAREZ *et al.*, 2007, BOKA *et al.*, 1994). A proteína S100B extracelular em altas concentrações, pode agir como uma citocina, exibindo efeitos dose-

dependentes no tecido nervoso e estimulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito pró-inflamatório da S100B tem sido atribuído a sua afinidade ao receptor RAGE em microglia, astrócitos e neurônios no SNC (VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003, FUJIYA *et al.*, 2014, PONATH *et al.*, 2007, BIANCHI *et al.*, 2011).

O RAGE é um receptor de reconhecimento de padrão e mediador central da resposta imune inata. A ativação desse receptor está envolvida na resposta inflamatória imediata. A perduração da sinalização do RAGE sustenta a inflamação e leva ao estabelecimento de distúrbios inflamatórios crônicos (YAN *et al.*, 2009, BIERHAUS; STERN; NAWROTH, 2006, KIERDORF; FRITZ, 2013). Além dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), o RAGE é capaz de ligar grande quantidade de ligantes de variadas origens e propriedades, entre elas, proteínas da família S100, oligômeros e fibrilas de A $\beta$ , proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1) e ácido lisofosfatídico (LPA) (FRITZ, 2011).

Outros receptores classificados como receptor de reconhecimento de padrão são os receptores do tipo Toll (TLR). Entre os TLRs, o TLR4 é o único que tem a habilidade de ativar as vias MyD88-dependente e MyD88-independente expressando predominantemente moléculas inflamatórias e interferons tipo I, respectivamente. O TLR4 também é o único membro da família dos TLRs que envolve todos os quatro domínios de receptor de IL1/Toll (TIR), contendo proteínas adaptadoras para sinalizar a resposta inflamatória (KAGAN *et al.*, 2008, LU; YEH; OHASHI, 2008).

Diferentes fontes associadas a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de origem bacterianas, fúngicas e virais ativam a sinalização do TLR. O lipopolissacarídeo (LPS) proveniente das paredes celulares de células bacterianas gram-negativas é o principal PAMP e um ligante natural do TLR4 (CALABRESE;

CIGHETTI; PERI, 2014). O TLR4 também é ativado por padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) endógenos liberados em consequência a insultos e inflamação, tais como lipoproteína de baixa densidade oxidada e fosfolípídeos oxidados (CALABRESE; CIGHETTI; PERI, 2014, LUCAS; MAES, 2013). Esses estímulos inflamatórios estéreis, da mesma forma os microbianos, também podem resultar em recrutamento de neutrófilos e macrófagos, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, principalmente TNF- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (CHEN; NUÑEZ, 2010). Outros possíveis agonistas para o TLR4 são os ácidos graxos saturados, mas esse ponto tem sido pouco explorado. De fato, evidências sugerem que os ácidos graxos saturados e o LPS compartilham a mesma via de sinalização inflamatória com o TLR4, promovendo a expressão de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF- $\kappa$ B e a COX-2 (LEE *et al.*, 2003, ROCHA *et al.*, 2016).

A COX-2 é uma enzima associada à inflamação e sua indução é responsável por desencadear muitas citocinas e mediadores inflamatórios presentes em muitas células inflamatórias. Em estados inflamatórios agudos e crônicos, a COX-2 é a enzima limitante na síntese de prostanóides, como as prostaglandinas, e essas moléculas contribuem para o processo patológico de muitas condições inflamatórias, incluindo câncer, artrite reumatóide e doença de Alzheimer (RUMZHM; AMMIT, 2016). Sua expressão no cérebro é altamente regulada em condições fisiológicas, e tem sido mostrado que sua expressão é dividida em duas fases: precocemente em neurônios e mais tarde em células não neuronais, como os astrócitos (TAKEMIYA; MATSUMURA; YAMAGATA, 2007).

Uma das citocinas importantes no SNC é o TNF- $\alpha$  que exerce tanto funções homeostáticas quanto patológicas (MONTGOMERY; BOWERS, 2012, SANTELLO;

VOLTERRA, 2012). Em situações normais de saúde o TNF- $\alpha$  tem papel em funções regulatórias, como plasticidade sináptica (BEATTIE *et al.*, 2002, KANEKO *et al.*, 2008), aprendizado e memória (BESTE *et al.*, 2010, BAUNE *et al.*, 2008), sono (KRUEGER, 2009), ingestão de comida e água (PLATA-SALAMÁN, 2001) e gliotransmissão glutamatérgica (SANTELLO; BEZZI; VOLTERRA, 2011). Em condições patológicas, astrócitos e microglia liberam grande quantidade de TNF- $\alpha$ , e a produção dessa citocina é um importante componente da resposta neuroinflamatória que está associada com muitas desordens neurológicas (MONTGOMERY; BOWERS, 2012, MCCOY; TANSEY, 2008, FRANKOLA *et al.*, 2011, OLMOS; LLADÓ, 2014).

Tendo em vista a importância da função normal dos astrócitos para o bom funcionamento do SNC e considerando as situações em que os ácidos graxos podem se elevar no SNC, sendo ou não por dano de BHE, é importante que se verifique como se encontram as funções astrocíticas perante a presença de diferentes ácidos graxos saturados e poli-insaturados.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da exposição de culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos a diferentes ácidos graxos de cadeia longa saturados e poli-insaturados sobre a viabilidade celular, parâmetros inflamatórios, bem como outros parâmetros funcionais característicos desse tipo celular.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Verificar a ação de diferentes concentrações (de 25 a 100  $\mu\text{M}$ ) de ácidos graxos de cadeia longa saturados (ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico) e insaturados (ácido linoleico e ácido linolênico) em cultura primária de astrócitos sobre a viabilidade celular e sobre a secreção da proteína S100B. Com base nesses experimentos, escolher uma concentração para a realização dos demais experimentos (citados a seguir).

Analisar a ação dos ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa em cultura primária de astrócitos sobre:

- Parâmetros de função astrocitária: conteúdo de GFAP, captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase.
- Parâmetros inflamatórios: secreção de TNF- $\alpha$  e expressão de TLR4, RAGE e COX-2.
- Parâmetros de estresse oxidativo: conteúdo de GSH e oxidação de diclorodifluoresceína diacetato (DCF-DA).

### 3. Metodologia

#### 3.1. Animais e cultura primária de astrócitos

Foram utilizados ratos Wistar entre 1 e 4 dias de idade (GOTTFRIED *et al.*, 1999), machos ou fêmeas, provenientes de ninhadas do acasalamento harém de colônia expansão (1:2), de acordo com a disponibilidade do biotério. Os ratos foram criados em padrão sanitário convencional controlado, no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro (07h/19h) e temperatura controlada (21-23°C). As fêmeas progenitoras foram mantidas em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 16 cm, devidamente identificadas, em cama de maravalha de pinus autoclavada e alimentadas com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água *ad libitum*. Os neonatos utilizados neste estudo não permanecem no biotério após o 4º dia de vida. Os animais foram retirados do biotério e levados imediatamente à sala de cultivo celular, onde foram mortos por decapitação sem o uso de anestésicos, conforme descrito na literatura (GORINA *et al.*, 2011, WERRY *et al.*, 2012, ZHOU *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2011).

As culturas primárias de astrócitos foram realizadas como previamente descrito (GOTTFRIED *et al.*, 1999). Os córtices cerebrais foram removidos e mecanicamente dissociados em solução salina balanceada livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , com pH 7,4. Após centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos, o *pellet* foi suspenso em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram semeadas em placas recobertas com poli-L-lisina. As culturas foram mantidas em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$ /95% de ar a 37°C até atingirem a confluência (aproximadamente 21 dias *in vitro*).

### **3.2. Conjugação dos ácidos graxos com albumina**

A conjugação dos ácidos graxos com a albumina foi realizada com a finalidade de deixá-los solúveis ao meio de cultura. Os diferentes ácidos graxos (Sigma: ácidos mirístico M3128, esteárico S4751, palmítico P5585, linoleico L1012, linolênico L2376) foram solubilizados em etanol (Merk) e armazenados a -20°C. Pouco antes de cada experimento, os ácidos graxos foram conjugados com albumina livre de ácidos graxos (Sigma A8806) e com baixa concentração de endotoxinas na proporção 10:1 (ácido graxo:albumina) por 1 hora e 30 minutos a 37°C, com agitação ocasional. A concentração final de etanol era menor do que 0,5%.

### **3.3. Desenho Experimental**

Quando as células atingiram a confluência, o meio de cultivo foi substituído por DMEM sem soro fetal bovino adicionado ou não dos ácidos graxos saturados ou insaturados complexados com albumina livre de ácidos graxos (em concentrações variando de 25 a 100 µM) ou veículo. O tempo de incubação foi de 24 horas (GUPTA *et al.*, 2012) e, após, as amostras para as técnicas bioquímicas e imunológicas foram processadas como segue.

### **3.4. Técnicas Bioquímicas e Imunológicas**

#### **3.4.1. Redução de MTT**

Foi realizada por ensaio colorimétrico previamente descrito (LEITE *et al.*, 2009). O MTT foi incubado (0,05 mg/mL) nos 30 minutos antes de completar as 24 horas de incubação dos ácidos graxos nas células e o produto corado resultante de sua redução foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). As absorbâncias foram determinadas a 560 e a 650 nm e o resultado foi calculado pela diferença entre os valores de absorbância encontrados nos diferentes comprimentos de onda (absorbância 560 nm – absorbância 650 nm). O resultado foi mostrado em percentual em relação ao basal.

#### **3.4.2. Incorporação do corante vermelho neutro**

Foi realizada conforme previamente descrito (LEITE *et al.*, 2009). O corante foi incubado (0,05 mg/mL) nos 30 minutos antes de completar as 24 horas de incubação dos ácidos graxos nas células e, após 3 lavagens com tampão fosfato (PBS), foi adicionada uma solução de extração (ácido acético, etanol e água, na proporção de 1:50:49). O corante captado foi avaliado em espectrofotômetro a 560 nm. O resultado foi mostrado em percentual em relação ao basal.

#### **3.4.3. Incorporação de iodeto de propídio**

Foi incubado 7,5  $\mu$ M de iodeto de propídio nos 15 minutos antes do término das 24 horas de incubação dos ácidos graxos. A fluorescência foi visualizada em filtro para cor vermelha em microscópio Nikon Eclipse TE300. Foram fotografados campos representativos em contraste de fase e fluorescência.

#### **3.4.4. Medida da concentração de GSH**

Foi avaliado por uma técnica fluorimétrica, de acordo com Guerra e colaboradores (BROWNE; ARMSTRONG, 1998). As células foram lisadas em tampão fosfato KCl (fosfato de sódio bibásico 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4) e adicionou-se MPA (ácido metafosfórico). Após, incubou-se com OPT (o-phthaldialdehyde). A fluorescência das amostras foi medida nos comprimentos de onda de excitação (350 nm) e emissão (420nm) e comparada a uma curva padrão de GSH variando de 0,98  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ . O resultado foi corrigido pelo valor de proteínas.

#### **3.4.5. Atividade da Glutamina Sintetase**

A medida da atividade da glutamina sintetase foi realizada segundo Minet e colaboradores (1997) (MINET *et al.*, 1997). As células foram lisadas em tampão imidazol 50 mM (pH 6,8) e incubadas por 15 minutos em um tampão contendo imidazol 50 mM, glutamina 100 mM, hidroxilamina 50 mM, arsenato de sódio 25 mM, cloreto de manganês 2 mM e ADP 0,2 mM. Após, a reação foi parada com a adição de cloreto férrico em meio ácido e, após centrifugação e separação do sobrenadante, o produto corado formado foi lido em 540 nm. A atividade da GS foi calculada a partir da comparação dos resultados obtidos com uma curva padrão do produto corado. O resultado foi corrigido por mg de proteína dosadas através de técnica de Lowry modificada por Peterson (PETERSON, 1977).

#### **3.4.6. Captação de glutamato**

A captação de glutamato foi realizada segundo Feoli e colaboradores com algumas modificações (FEOLI *et al.*, 2006). As células foram incubadas a 37 °C em solução salina balanceada de Hanks (HBSS). O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1

mM de L-glutamato e 0,33  $\mu$ Ci/mL de L-[2,3-3 H] glutamato. A incubação foi parada após 7 minutos, pela remoção do meio e lavagem das células três vezes com HBSS gelado. As células foram lisadas em uma solução 0,5 M de NaOH. Após a adição de líquido de cintilação (PerkinElmer: Optiphase HiSafe 3), a radioatividade foi medida em um contador de cintilações PerkinElmer precisely Tri-Carb 2800TR. Os valores foram corrigidos pelo valor de proteínas totais de cada poço medidas através de técnica de Lowry modificada por Peterson (PETERSON, 1977).

#### **3.4.7. Secreção de TNF- $\alpha$**

O meio de cultivo foi coletado e congelado a -80°C até a hora do ensaio. O TNF- $\alpha$  foi quantificado através de kit comercial de enzimmunoensaio (ELISA), conforme as instruções do fabricante (eBioscience – San Diego, USA).

#### **3.4.8. Secreção de S100B**

A secreção de S100B foi quantificada pelo método de ELISA de acordo com Leite e colaboradores (LEITE *et al.*, 2008). Inicialmente a placa foi coberta com anticorpo monoclonal anti-S100B (1:1000 em tampão carbonato (Sigma) e, após 12 horas, a placa foi lavada com solução de lavagem (PBS com 0,1% de ovoalbumina e 0,005 % de Twen 20) e bloqueada com PBS contendo 2% de ovoalbumina durante 1 hora. Após, a placa foi lavada e, então, as amostras previamente diluídas e a curva padrão foram incubadas com tampão Tris 50 mM, pH 8,6 durante 2 horas à 37°C. Depois, a placa foi lavada, o anticorpo policlonal anti-S100 produzido em coelho (1:5000) foi incubado durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Posteriormente, a placa foi novamente lavada e incubada durante 30 minutos com o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A reação de cor foi feita pela adição de o-

fenilenediamina (OPD) (pastilhas Sigma Fast P9187) e, transcorridos 30 minutos, a reação foi parada com ácido clorídrico 3 M e a coloração foi medida em 492 nm. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,5% de ovoalbumina. O valor de concentração de S100B foi calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 – 1 ng/mL.

#### **3.4.9. Imunoconteúdo de GFAP**

O conteúdo de GFAP foi quantificado por ELISA conforme Tramontina e colaboradores (TRAMONTINA *et al.*, 2007). Iniciando com revestimento de microplacas com as amostras ou com a curva padrão (com concentrações entre 0,1 e 10 ng/mL) junto à albumina 1 ng/ $\mu$ l durante 12 horas a 4°C. A placa foi lavada e bloqueada com TBS (tampão a base de tris, pH 7,5), contendo 5% de leite em pó desnatado durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois, a placa foi lavada e foi feita a incubação com anticorpo policlonal anti-GFAP de coelho durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após isso, foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após, a placa foi novamente lavada e foi adicionado OPD para a reação colorimétrica. Após 30 minutos, a reação foi parada pela adição ácido clorídrico (3 M) e a leitura da absorvância foi realizada em 492 nm. O valor da concentração de GFAP foi calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de GFAP, variando de 0,1 a 10 ng GFAP e corrigido pelo valor de proteínas totais através de técnica de Lowry modificada por Peterson (PETERSON, 1977).

### 3.4.10. Imunoquantificação de RAGE, COX-2 e TLR4

O imunoconteúdo de RAGE, COX-2 e TLR4 foi medido através da técnica de eletroforese, transferência e imunoquantificação. As amostras de cultura foram lisadas em solução A (SDS 4%, EDTA 2 mM e tris 50 mM) e submetidas à desnaturação térmica (100 °C por 5 minutos). As amostras foram centrifugadas (10000 g por 5 minutos a 4 °C), e do sobrenadante foi dosada a quantidade de proteína, em seguida adicionou-se solução B (glicerol 40%, tris 50 mM e azul de bromofenol quantidade suficiente para deixar azul escuro) contendo 5% de mercaptoetanol. Após isso, foi feita a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% utilizando voltagem de 180 V durante 1 h, sendo aplicados 10 µg de proteína por amostra. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando amperagem de 1,2 mA/área de membrana durante 1 hora. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, as membranas foram bloqueadas com albumina bovina 2% diluída em TBS contendo 0,005% de Tween 20 (T-TBS) durante 12 h à 4°C sob agitação leve, a fim de evitar ligações inespecíficas. Os anticorpos foram incubados em T-TBS conforme a tabela 1.

**Tabela 1. Diluições e tempos de incubação dos anticorpos utilizados para imunodeteção.**

<b>Proteína</b>	<b>Anticorpo Primário (diluição/tempo)</b>	<b>Anticorpo Secundário (tipo/diluição/tempo)</b>
RAGE	Anti-RAGE/ 1:10000/ 1h	
COX-2	Anti-COX-2/ 1:10000/ 1h	Anti-IgG-cabra/ 1:10000/ 1h
TLR4	Anti-TLR4/ 1:10000/ 1h	
Actina	Anti-actina/ 1:10000/ 12h	Anti-IgG-camundongo/ 1:10000/ 1h

Todos os anticorpos foram incubados a 4 °C sob agitação leve e entre cada uma das incubações as membranas foram lavadas com T-TBS sob agitação leve. Após a

incubação com o anticorpo secundário as membranas foram novamente lavadas com T-TBS e, foi feita uma última lavagem de 10 minutos com TBS sob agitação leve. Ao final do procedimento as membranas foram expostas à ECL e foi feita a detecção com o uso de fotodocumentador (GE Healthcare Life Sciences) durante 5 minutos de exposição. As imagens obtidas foram quantificadas utilizando o software Image J.

#### **3.4.11. Medida de formação de espécies reativas**

A medida de formação de espécies reativas foi realizada por técnica de DCF-DA. Foi adicionado 10  $\mu$ M de DCF 30 minutos antes do término do tratamento. Depois, o meio foi removido e foi feita uma lavagem com PBS. As células foram lisadas em PBS contendo 0,2% de Tritom X-100. A fluorescência foi lida em 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão). O resultado foi expresso por porcentagem em relação ao controle.

#### **3.4.12. Dosagem de Proteínas**

A medida de quantidade de proteínas foi feita através de técnica de Lowry modificada por Peterson (PETERSON, 1977).

### **3.5. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o software SPSS versão 20.0. Utilizou-se teste t de student ou ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet ou Duncan, conforme indicado nas legendas, para a avaliação dos resultados que foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Efeito dos ácidos graxos sobre a viabilidade celular

Inicialmente, avaliamos o efeito do tratamento com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 100  $\mu$ M por 24 horas sobre a viabilidade celular dos astrócitos. Não observamos diferenças significativas tanto na redução do MTT quanto na incorporação do corante vermelho neutro (tabela 2) ou incorporação de iodeto de propídio (dados não mostrados).

**Tabela 2. Efeito dos ácidos graxos sobre a viabilidade celular.**

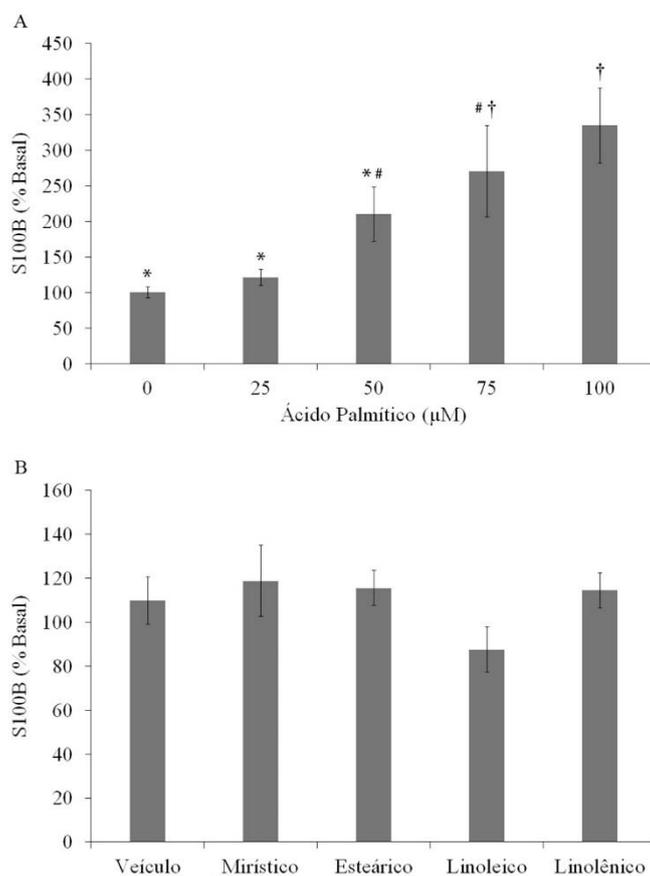
	MTT	VN
Basal	0,245 $\pm$ 0,034	0,248 $\pm$ 0,015
Veículo	0,239 $\pm$ 0,034	0,238 $\pm$ 0,014
Mirístico	0,273 $\pm$ 0,042	0,242 $\pm$ 0,015
Palmítico	0,271 $\pm$ 0,039	0,227 $\pm$ 0,013
Esteárico	0,252 $\pm$ 0,033	0,218 $\pm$ 0,014
Linoleico	0,227 $\pm$ 0,038	0,237 $\pm$ 0,028
Linolênico	0,218 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,037

Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 100  $\mu$ M por 24 horas. Ao final da incubação, a viabilidade celular foi avaliada por redução de MTT ou incorporação do corante vermelho neutro (VN). Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão das absorbâncias obtidas de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas para cada ensaio (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ).

### 4.2. Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção da proteína S100B

Na incubação dos astrócitos com o ácido palmítico, houve um aumento de secreção da proteína S100B dose-dependente, em 24 horas, em relação ao veículo (Fig 2A). Esse efeito não foi observado com os outros ácidos graxos (dados não mostrados), representados apenas pela concentração de 75  $\mu$ M (Fig 2B), que foi a escolhida para os

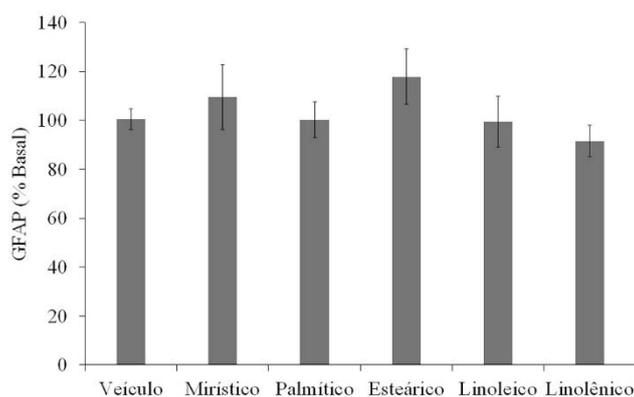
demais ensaios. A concentração de 75  $\mu\text{M}$  foi a escolhida por ser uma concentração intermediária e por ter sido capaz de aumentar a liberação de S100B na incubação com o ácido palmítico.



**Figura 2: Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção da proteína S100B.** Em (A) astrócitos foram incubados nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ou 100  $\mu\text{M}$  de ácido palmítico por 24 horas. Símbolos iguais indicam o mesmo grupo estatístico (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0.05$ ). Em (B) astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu\text{M}$  por 24 horas (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ). Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão como porcentagem em relação ao basal de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas.

### 4.3. Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GFAP

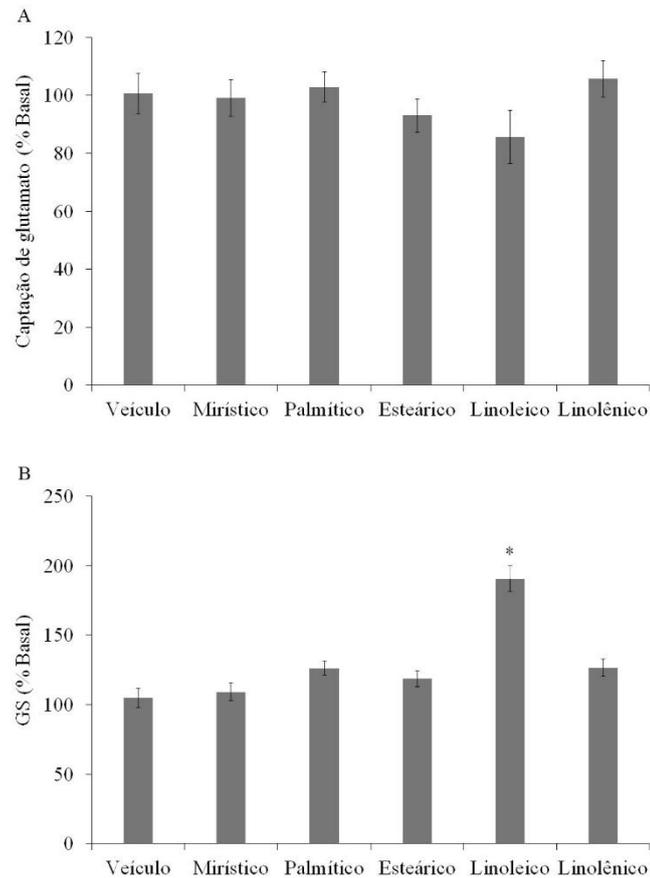
O conteúdo de GFAP foi medido após 24 horas da incubação com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 75  $\mu$ M. Não houve alteração significativa no conteúdo de GFAP nos diferentes ácidos graxos (Fig 3).



**Figura 3: Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GFAP.** Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas. Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão como porcentagem em relação ao basal de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ).

### 4.4. Efeito dos ácidos graxos sobre a captação de glutamato e a atividade da GS

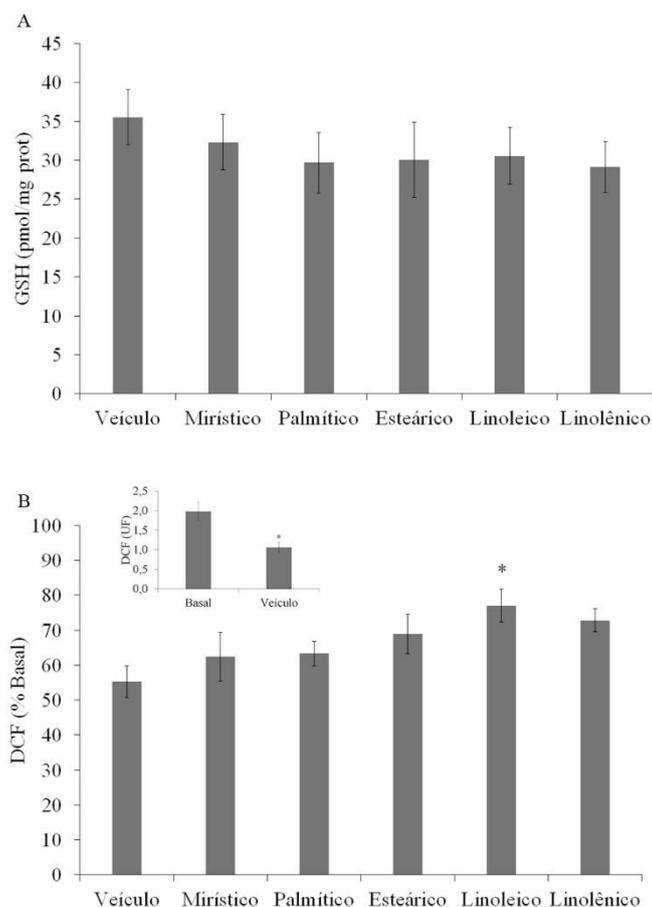
A captação de glutamato e a atividade da GS foram medidos após 24 horas de incubação com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 75  $\mu$ M (Fig 4). Não houve alteração significativa na captação de glutamato (Fig 4A). A atividade da GS foi alterada apenas com a incubação com o ácido linoleico, onde houve um aumento na sua atividade em relação ao veículo (Fig 4B).



**Figura 4: Efeito dos ácidos graxos sobre a captação de glutamato e a atividade da GS.** Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas. A captação de glutamato em (A) e a atividade da GS em (B) foram medidos e corrigidos pela quantidade de proteínas totais. Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão como porcentagem em relação ao basal e, no total foram 6 experimentos independentes realizados em triplicatas para cada ensaio. \* Indica diferença estatística significativa em comparação ao veículo (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ).

#### 4.5. Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GSH e oxidação de DCF-DA

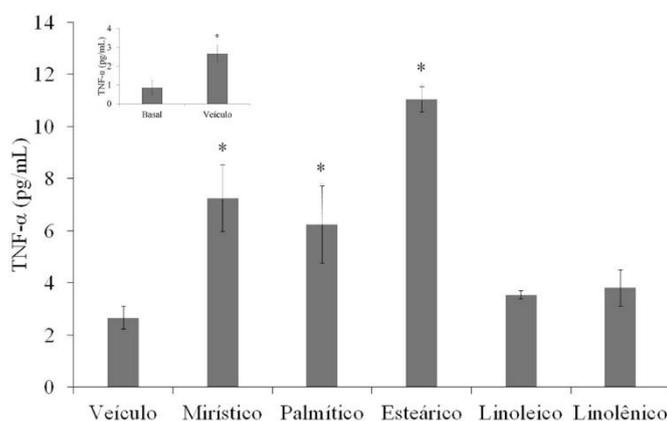
O conteúdo de GSH e a oxidação de DCF-DA foram medidos após 24 horas de incubação com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 75  $\mu$ M (Fig 5). Não houve alteração significativa no conteúdo de GSH (Fig 5A). Já no teste de oxidação de DCF-DA, houve um aumento em relação ao veículo observado nas células incubadas com o ácido linoleico (Fig 5B).



**Figura 5: Efeito dos ácidos graxos sobre o conteúdo de GSH e oxidação de DCF-DA.** Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas. O conteúdo de GSH (A) e a oxidação de DCF em (B) foram medidos e corrigidos pela quantidade de proteínas totais. Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão em (A) e como média  $\pm$  o erro padrão como porcentagem em relação ao basal em (B), no total foram 6 experimentos independentes realizados em triplicatas para cada ensaio. \* Indica diferença estatística significativa em comparação ao veículo (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ). No *insert*, teste t entre basal e veículo para a técnica de oxidação de DCF, considerando  $p < 0.05$  (UF = unidade de fluorescência).

#### 4.6. Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção de TNF- $\alpha$

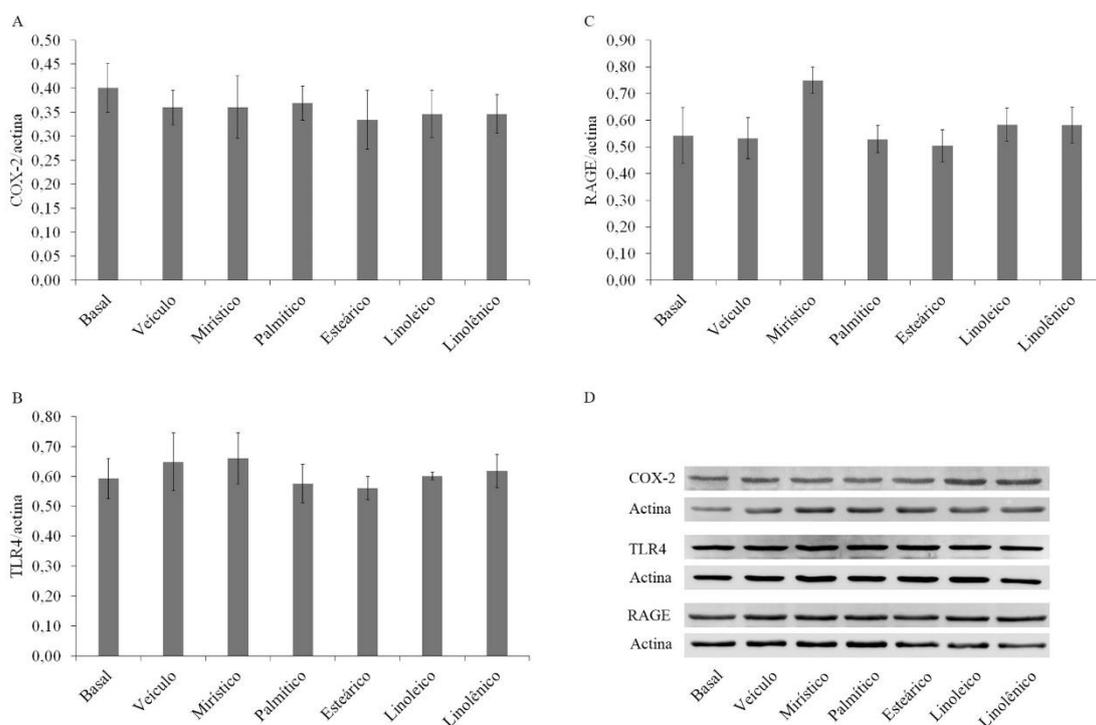
A secreção de TNF- $\alpha$  foi medida após a incubação com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas (Fig 6). Um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  foi observado nos ácidos graxos saturados (ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico). Já para os ácidos graxos insaturados (ácido linoleico e ácido linolênico) não se observou alteração significativa na secreção dessa citocina.



**Figura 6: Efeito dos ácidos graxos sobre a secreção de TNF- $\alpha$ .** Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas e o meio extracelular foi coletado para avaliar a secreção de TNF- $\alpha$ . Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão de 6 experimentos independentes realizados em triplicata. \* Indica diferença estatística significativa em comparação ao veículo (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ). No *insert*, teste t entre basal e veículo, considerando  $p < 0.05$ .

#### 4.7. Efeito dos ácidos graxos no imunocnteuído de COX-2, TLR4 e RAGE

O imunocnteuído de COX-2, TLR4 e RAGE foi medido após 24 horas da incubação com os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico na concentração de 75  $\mu$ M (Fig 7). Não houve alteração significativa no cnteuído de COX-2 (Fig 7A), TLR4 (Fig 7B) ou RAGE (Fig 7C), porém se observa uma tendência a um aumento no cnteuído de RAGE nos astrócitos incubados com ácido mirístico.



**Figura 7: Efeito dos ácidos graxos no imunocnteuído de COX-2, TLR4 e RAGE.** Astrócitos foram incubados com ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico ou ácido linolênico na concentração de 75  $\mu$ M por 24 horas. Em (A) o cnteuído de COX-2, em (B) o cnteuído de TLR4 e em (C) o cnteuído de RAGE. Os valores estão mostrados como média  $\pm$  o erro padrão, no total foram 6 experimentos independentes realizados em triplicatas para cada proteína (ANOVA de 1 via, seguido de pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0.05$ ). Em (D) imagens representativas das membranas que foram utilizadas para a quantificação.

## 5. Discussão

A ingestão de ácidos graxos, consumidos na forma de gordura proveniente da dieta tem aumentado nos últimos anos, principalmente na forma de gordura saturada. A BHE é a interface entre o cérebro e o sangue, sendo um dos principais fatores que regulam a captação dos ácidos graxos no SNC. A entrada dos ácidos graxos no SNC é seletiva, priorizando a captação de ácidos graxos poli-insaturados em relação aos saturados. Em situações nas quais há aumento na permeabilidade da BHE, como em doenças neurodegenerativas e no diabetes tipo 2 (BOER; GAILLARD, 2006), o cérebro fica mais exposto a várias substâncias que normalmente não estão presentes ou estão em pequenas quantidades, incluindo-se aí os ácidos graxos saturados de cadeia longa. Os ácidos graxos poli-insaturados tem sido citados como neuroprotetores devido a suas propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (ZENDEDEL *et al.*, 2015, DESAI *et al.*, 2016) e no presente trabalho, foram utilizados como um controle para os ácidos graxos saturados.

Tem sido observado que na obesidade há uma inflamação crônica e de baixo grau. Os ácidos graxos saturados provenientes da dieta podem ser um dos causadores dessa inflamação, visto que eles são capazes de causar a liberação de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (GUPTA *et al.*, 2012). Sob essas circunstâncias, é interessante que se observe os efeitos dessas substâncias em células do SNC, como os astrócitos os quais são essenciais para que as funções cerebrais ocorram de maneira adequada. Além disso, já foi observado previamente que quando administrados periféricamente, os ácidos graxos saturados se acumulam principalmente nos astrócitos em comparação aos neurônios (MORAND; BAUMANN; BOURRE, 1979) e que os astrócitos secretam

citocinas na presença de ácidos graxos saturados de cadeia longa na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (GUPTA *et al.*, 2012).

O primeiro passo para a avaliação dos efeitos desses compostos nos astrócitos foi verificar a integridade e a viabilidade celular. Em nosso trabalho, não observamos alterações na viabilidade e integridade celulares nos astrócitos incubados com os diferentes ácidos graxos testados, tanto saturados quanto insaturados. Esse resultado está de acordo com outro trabalho realizado em cultura de astrócitos de ratos Sprague-Dawley, que mostrou diminuição da viabilidade celular apenas em concentrações mais altas (400  $\mu\text{M}$ ) de ácido palmítico em 24 horas (GUPTA *et al.*, 2012). Para nossos objetivos, era importante que a viabilidade celular não se alterasse, pois dessa forma, obtemos um resultado mais fidedigno sobre a secreção de proteínas, sem que ela seja confundida pelo extravasamento de material intracelular liberado pela lise de células.

Escolhemos a dosagem de secreção da proteína S100B para determinar a concentração dos ácidos graxos para os demais experimentos. Optamos pela proteína S100B como a determinante, por ela ser marcadora de astrócitos no SNC e por ela ser sugerida por muitos trabalhos como marcadora de dano central (GONÇALVES; LEITE; NARDIN, 2008). A mesma curva de concentração foi feita para todos os ácidos graxos (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) para verificar sua ação sobre a secreção de S100B em 24 horas (dados não mostrados). Observamos que, apenas para o ácido palmítico, houve um aumento dose-dependente da secreção de S100B em 24 horas a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$ .

O ácido palmítico é ácido graxo saturado mais abundante na maioria das dietas (KIEN *et al.*, 2013) e o ácido graxo primordial na síntese endógena de ácidos graxos. Com base nisso e no aumento da secreção de S100B induzida pelo ácido palmítico,

escolhemos a concentração de 75  $\mu\text{M}$  para fazer os demais ensaios bioquímicos e imunológicos, pois essa era uma concentração intermediária que foi capaz de causar aumento na liberação da S100B.

Essa foi a primeira vez que se observou que o ácido palmítico aumenta a secreção de S100B em astrócitos e esse é um importante achado, uma vez que esse efeito foi exclusivo desse ácido graxo. Esse é um resultado muito interessante, pois o ácido palmítico é ácido graxo saturado mais abundante na maioria das dietas (KIEN *et al.*, 2013) e o ácido graxo primordial na síntese endógena de ácidos graxos. Além disso, a S100B tem sido descrita como um marcador molecular de dano cerebral em diferentes situações agudas ou crônicas. Muitos estudos têm considerado o aumento nos níveis de S100B como um componente de resposta neuroinflamatória, principalmente em doenças neurodegenerativas. Dessa forma, a entrada de maiores quantidades de ácido palmítico no cérebro poderia ser um contribuinte para o aumento dos níveis de S100B que é observado nessas situações de dano. Também devemos considerar que essa S100B liberada pelos astrócitos pode ter, *in vivo*, efeitos parácrinos e autócrinos nas células gliais, neurônios e microglia.

Outra proteína característica de astrócitos é a GFAP. Nós não observamos alterações no conteúdo de GFAP dos astrócitos, tanto nos ácidos graxos saturados quanto insaturados, indicando que esses compostos não foram capazes de gerar um processo de astrogliose. Outro trabalho testou a concentração de 200  $\mu\text{M}$  de ácido palmítico e ácido esteárico por 12 horas em cultura de astrócitos de ratos Sprague-Dawley, concentração ainda mais alta que as usadas em nosso estudo, porém com tempo menor, e fez um imunoenensaio para GFAP e não observou alteração na fluorescência

dessa proteína de citoesqueleto dos astrócitos (PATIL; CHAN, 2005), corroborando nosso resultado.

A captação do glutamato é uma importante função dos astrócitos, quando há prejuízo nessa função pode haver excitotoxicidade. As células gliais são responsáveis pela absorção e metabolismo da maior parte do glutamato no cérebro (DANBOLT, 2001). Na concentração e no tempo testados, não houve alteração na captação de glutamato, tanto para os ácidos graxos saturados, quanto para os insaturados. Já foi observado que o TNF- $\alpha$  pode potencializar a excitotoxicidade mediada pelo glutamato por dois mecanismos complementares. Indiretamente, pela inibição dos transportadores de glutamato dos astrócitos e diretamente, pelo aumento de receptores ionotrópicos localizados nas sinapses (PICKERING; CUMISKEY; O'CONNOR, 2005). Apesar de termos observado um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  em nosso trabalho, ele não foi acompanhado de uma inibição da captação do glutamato.

A enzima GS, é responsável por metabolizar o glutamato a glutamina, numa reação de amidação dependente de ATP. Essa reação é importante, por auxiliar na detoxificação do glutamato e da amônia presentes do SNC. Em nossos resultados, o ácido linoleico causou um aumento na atividade dessa enzima independente de modificação na captação do glutamato, podendo indicar que o ácido linoleico pode deixar a GS mais ativa, favorecendo a formação de glutamina. Em humanos, uma deficiência na atividade da GS tem sido citada como contribuinte para muitas desordens psiquiátricas, incluindo epilepsia do lobo temporal, doença de Alzheimer e esquizofrenia (HUYGHE *et al.*, 2014, HÄBERLE *et al.*, 2011, HÄBERLE *et al.*, 2006, BURBAEVA *et al.*, 2005, STEFFEK *et al.*, 2008, EID *et al.*, 2012). Assim, o ácido linoleico poderia ser usado como uma importante estratégia terapêutica ou como

suplementação alimentar para pacientes acometidos por patologias que envolvam a excitotoxicidade glutamatérgica ou excesso de amônia. Também devemos lembrar que a GS é uma enzima suscetível ao estresse oxidativo, nesse caso, o ácido linoleico poderia ser um componente adjuvante no intuito de aumentar a atividade dessa enzima.

Os astrócitos são as células cerebrais mais resistentes ao estresse oxidativo e proporcionam proteção aos neurônios, principalmente devido ao seu alto conteúdo de GSH, que é o principal antioxidante cerebral. Além disso, os astrócitos secretam GSH, que pode ser clivada em um dipeptídeo que pode ser captado pelos neurônios para síntese de GSH neuronal. A habilidade para reduzir ou sintetizar GSH é um importante fator que determina como se encontra o estado redox celular, visto que o estresse oxidativo tem sido associado com o desenvolvimento de condições patológicas como as doenças neuroinflamatórias. Em nosso trabalho não observamos alterações no conteúdo de GSH tanto para os ácidos graxos saturados, quanto para os insaturados. Assim, essas substâncias não parecem alterar o estado redox dessas células na concentração e no tempo testados. Um trabalho realizado em cultura de fibroblastos humanos mostrou que a suplementação das culturas com ácido araquidônico ou ácido linoleico conjugado por 48 horas ou 7 dias aumenta o conteúdo de GSH (ARAB *et al.*, 2007).

Apesar de o conteúdo de GSH não ter se alterado, encontramos alterações na formação de EROs pela técnica de medida da oxidação de DCF-DA. A técnica de DCF-DA é uma medida que indica a formação de espécies reativas de oxigênio. Quanto mais EROs, mais o DCF-DA é oxidado, formando um produto fluorescente. Nós observamos uma redução na formação de EROs no controle com etanol e albumina em relação ao basal. Existem evidências que um consumo moderado de etanol exerce efeito protetor contra isquemia cerebral e do miocárdio (SUN; KORTHUIS, 2007), em contraste com o

consumo em altas concentrações que é relacionado à toxicidade. O etanol, em baixas concentrações, é metabolizado pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase de baixo  $K_m$ , ambas as reações resultando na produção de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH). Isso cria um ambiente redutor, diminuindo o estresse oxidativo (VASDEV; GILL; SINGAL, 2006). Surpreendentemente, em nossos resultados, observamos um pequeno aumento de oxidação do DCF-DA nos astrócitos incubados com ácido linoleico (para os demais não houve alteração em relação ao veículo). No entanto, não encontramos alterações em nenhum outro parâmetro tóxico para o ácido linoleico. Além disso, os valores de formação de EROs encontrados para o ácido linoleico, se aproximam dos valores que encontramos n basal, sem ultrapassá-los. Dessa forma, consideramos que esse pequeno aumento que encontramos na medida de EROs poderia atuar nas respostas adaptativas celulares.

Em situações de dano ou insulto ao SNC, como no caso de uma inflamação, astrócitos e microglia são ativados. Nessas situações, essas células secretam citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as quais podem se ligar aos astrócitos e levar ao aumento na secreção de S100B pelos astrócitos. A S100B, por sua vez, pode se ligar ao receptor RAGE, que está presente tanto em microglia quanto em astrócitos, e, através dessa ligação, ativar fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, o qual pode estimular a liberação de mais citocinas e induzir a síntese de COX-2.

Foi observado um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  no veículo em relação ao basal. Um estudo utilizando linhagem microglial N9 mostrou que em 24 horas 0,1 mg/mL de albumina de soro bovino já era capaz de aumentar a secreção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e quanto maior sua concentração (de 0,1 a 2,0 mg/mL) e o tempo (de 3 a 24 horas), maior a secreção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (ZHAO *et al*, 2009). Tendo isso em vista, foi

importante termos feito o controle e comparado o efeito dos ácidos graxos com o veículo, para separar o efeito do veículo do efeito dos ácidos graxos. Observamos um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  com a incubação dos ácidos graxos saturados nos astrócitos, apesar de não haver astrogliose. Esse aumento não foi observado para os ácidos graxos insaturados, indicando que o aumento na secreção de TNF- $\alpha$  é específico para ácidos graxos saturados. Um trabalho utilizando ácidos graxos na concentração de 100  $\mu$ M por 24 horas em cultura de astrócitos de ratos Sprague-Dawley, também mostrou que ácidos graxos saturados e não os insaturados são capazes de aumentar a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (GUPTA *et al.*, 2012). Em uma resposta inflamatória astrogliar, pode ocorrer aumento na secreção de citocinas e na secreção de S100B (GUERRA *et al.*, 2011). Existem evidências de que o aumento de citocinas, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , pode causar diretamente um aumento na secreção de S100B como um componente da resposta neuroinflamatória (DE SOUZA *et al.*, 2009, EDWARDS; ROBINSON, 2006). Nós só observamos essa relação para o ácido palmítico, pois nossos resultados mostraram aumento na secreção de TNF- $\alpha$  para todos os ácidos graxos saturados testados, porém só encontramos aumento de secreção de S100B nos astrócitos incubados com o ácido palmítico. Isso demonstra que o astrócito pode estar tendo uma resposta inflamatória, secretando citocinas, sem, necessariamente, ter um aumento de proteínas que caracterizam sua ativação (como a S100B e a GFAP).

Os receptores TLR4 e RAGE e a enzima COX-2 estão associados à resposta inflamatória central, além disso o RAGE também liga a proteína S100B. Mesmo que tenhamos observado um aumento da liberação de TNF- $\alpha$ , não foi observado aumento na expressão de TLR4, RAGE ou COX-2. Um fato relevante de ser destacado é que a secreção de TNF- $\alpha$  aumentou independentemente do aumento da expressão dessas proteínas. Para as células incubadas com ácido mirístico, observamos uma tendência a

aumento na expressão de RAGE. Esse parece ser um comportamento exclusivo do ácido mirístico, o qual pode ser devido à sua cadeia carbônica ser a menor quando comparada aos outros ácidos graxos saturados testados, o que poderia facilitar sua circulação e ação na célula. Um trabalho em cultura de astrócitos de ratos Sprague-Dawley mostrou que o ácido palmítico na concentração de 100  $\mu\text{M}$  incubado por 24 horas causava aumento na secreção de TNF- $\alpha$  ou IL-6, porém esse aumento não era verificado quando em presença de inibidores de TLR4 (GUPTA *et al.*, 2012), o que poderia indicar uma dependência do TLR4 para a secreção dessas citocinas nos astrócitos. É interessante observarmos que aumento de expressão é diferente de aumento de atividade. Essas enzimas ou receptores podem estar mais ativos, sem obrigatoriamente terem sua expressão aumentada.

Alguns trabalhos mostram que a concentração de ácidos graxos saturados necessária para ativar o TLR4 excede 100  $\mu\text{M}$  em sistemas de cultura celular (SNODGRASS *et al.*, 2013, HWANG; KIM; LEE, 2016, ROCHA *et al.*, 2016). Dessa forma, não podemos descartar que, em concentrações superiores às utilizadas nesse trabalho, poderíamos observar também um aumento da expressão proteica desse receptor. Um trabalho utilizando linhagem de macrófagos ácidos graxos saturados, e não os insaturados, incubados por 11 horas na concentração de 75  $\mu\text{M}$  são capazes de ativar a COX-2 (LEE *et al.*, 2001), mostrando que os macrófagos podem ter uma sensibilidade maior aos ácidos graxos saturados em relação aos astrócitos, e terem assim uma resposta mais ativa na inflamação.

Analisando os resultados obtidos, observamos poucas alterações significativas estatisticamente nos parâmetros medidos. Isso pode ter ocorrido devido à concentração de ácidos graxos que foi utilizada, um pouco menor que a utilizada pela maioria dos

estudos. Nós escolhemos essa concentração com o intuito de verificar os efeitos dessas substâncias em menores concentrações, que poderiam ser atingidas mais comumente em condições fisiológicas. Outra limitação pode ter sido o tempo de incubação de 24 horas. Talvez em um tempo maior de exposição aos ácidos graxos, tivéssemos obtido mais resposta dos astrócitos. Além disso, os astrócitos podem não ser as células mais atingidas em um aumento nas concentrações dos ácidos graxos, outros tipos celulares, como os neurônios, podem ser mais sensíveis. Os astrócitos são células de metabolismo complexo e talvez por isso tenham maior capacidade para se adaptarem em condições adversas.

## **6. Conclusões**

Nossos resultados reforçam os dados de que ácidos graxos saturados causam aumento na liberação de citocinas e podem contribuir para o processo neuroinflamatório encontrado em condições de aumento na permeabilidade da BHE. Diferentemente dos ácidos graxos poli-insaturados que não parecem causar inflamação. Além disso, verificamos que nem toda inflamação desencadeia aumento na secreção de S100B, visto que só tivemos esse comportamento para o ácido palmítico. Nossos resultados também sugerem o potencial terapêutico do ácido linoleico, que poderia desencadear adaptações nos astrócitos, especialmente aumentando a atividade da GS, com possíveis benefícios para pacientes acometidos por patologias que envolvam a excitotoxicidade glutamatérgica. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa confirmar essa hipótese.

## 7. Perspectivas

- Incubação crônica dos os ácidos graxos nos astrócitos (48 horas ou mais) e verificar parâmetros de função astrocítica e inflamatórios;
- Tratamento *in vivo*, com injeção intraperitoneal ou intracerebroventricular dos ácidos graxos em ratos para verificar parâmetros inflamatórios centrais e periféricos;
- Incubação dos ácidos graxos em cultura de neurônio e microglia para verificar parâmetros inflamatórios;
- Incubação dos ácidos graxos em cultura mista de neurônios e células da glia e analisar parâmetros inflamatórios.

## 8. Referências Bibliográficas

- ÁLVAREZ, A.; CACABELOS, R.; SANPEDRO, C.; GARCÍA-FANTINI, M.; ALEIXANDRE, M. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, v. 28, n. 4, p. 533–536, 2007.
- AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*, v. 108, p. 227–238, 2008.
- ARAB, K.; ROSSARY, A.; SOULÈRE, L.; STEGHENS, J. P. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *British Journal of Nutrition*, v. 96, n. 05, p. 811–819, 2007.
- BAUNE, B. T.; WIEDE, F.; BRAUN, A.; GOLLEDGE, J.; AROLT, V.; KOERNER, H. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- $\alpha$  and its receptors. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, v. 147B, n. 7, p. 1056–64, 2008.
- BAZAN, N. G. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *Journal of lipid research*, v. 44, n. 12, p. 2221–33, 2003.
- BEATTIE, E. C.; STELLWAGEN, D.; MORISHITA, W.; BRESNAHAN, J. C.; HA, B. K.; VON ZASTROW, M.; BEATTIE, M. S.; MALENKA, R. C. Control of Synaptic Strength by Glial TNF  $\alpha$ . *Science*, v. 295, n. 5563, p. 2282–2285, 2002.
- BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*, v. 96, n. 9, p. 939–49, 2005.
- BESTE, C.; BAUNE, B. T.; FALKENSTEIN, M.; KONRAD, C. Variations in the TNF- $\alpha$  Gene (TNF- $\alpha$  -308G  $\rightarrow$ A) affect attention and action selection mechanisms in a dissociated fashion. *J Neurophysiol*, v. 104, n. 5, p. 2523–2531, 2010.
- BIANCHI, R.; KASTRISIANAKI, E.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem*, v. 286, p. 7214–7222, 2011.
- BIERHAUS, A.; STERN, D. M.; NAWROTH, P. P. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr. Opin. Investig.*, v. 7, n. 11, p. 985–991, 2006.
- BOER, P. J.; GAILLARD, A. G. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm.*, v. 113, n. 4, p. 455–62, 2006.
- BOKA, G.; ANGLADE, P.; WALLACH, D.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; HIRSCH, E. C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 172, n. 1-2, p. 151–154, 1994.

- BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, v. 108, p. 347–352, 1998.
- BRUCE-KELLER, A. J.; KELLER, J. N.; MORRISON, C. D. Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1792, n. 5, p. 395–400, 2009.
- BURBAEVA, G.; BOKSHA, I. S.; TERESHKINA, E. B.; SAVUSHKINA, O. K.; STARODUBTSEVA, L. I.; TURISHCHEVA, M. S. Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurochem. Res.*, v. 30, p. 1443–1451, 2005.
- CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine*, v. 11, n. 2, p. 183–90, 2005.
- CALABRESE, V.; CIGHETTI, R.; PERI, F. Molecular simplification of lipid A structure: TLR4-modulating cationic and anionic amphiphiles. *Mol. Immunol.*, v. 63, n. 2, p. 153–161, 2014.
- CALDER, P. C. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 16, n. 4, p. 425–33, 2013.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 12, p. 826–37, 2010.
- CHRAST, R.; SAHER, G.; NAVE, K. A.; VERHEIJEN, M. H. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *Journal of lipid research*, v. 52, n. 3, p. 419–34, 2011.
- CURI, R.; POMPEIA, C.; MYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. [S.l.]: *Manole*, p. 469, 2002.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, v. 65, p. 1–105, 2001.
- DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*, v. 25, p. 4–7, 2004.
- DE SOUZA, D. F.; LEITE, M. C.; QUINCOZES-SANTOS, A.; NARDIN, P.; TORTORELLI, L. S.; RIGO, M. M.; GOTTFRIED, C.; LEAL, R. B.; GONÇALVES, C.A. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *Journal of neuroimmunology*, v. 206, n. 1-2, p. 52–7, 2009.
- DESAI, A.; PARK, T.; BARNES, J.; KEVALA, K.; CHEN, H.; KIM, H. Y. Reduced acute neuroinflammation and improved functional recovery after traumatic brain injury by  $\alpha$ -linolenic acid supplementation in mice. *Journal of neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 253, 2016.

- DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of lipid research*, v. 45, n. 8, p. 1375–97, 2004.
- DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, v. 60, p. 540–551, 2003.
- DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. v. 33, p. 637–668, 2001.
- DONATO, R.; SORCI, G.; RIUZZI, F.; ARCURI, C.; BIANCHI, R.; BROZZI, F.; TUBARO, C.; GIAMBANCO, I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1793, n. 6, p. 1008–22, 2009.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, v. 267, p. 4912–4916., 2000.
- EDMOND, J. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci.*, v. 16, p. 181–93, 2001.
- EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, v. 113, n. 11, p. 1709–1715, 2006.
- EID, T.; BEHAR, K.; DHAHER, R.; BUMANGLAG, A. V., LEE, T. S. Roles of glutamine synthetase inhibition in epilepsy. *Neurochem. Res.*, v. 37, p. 2339–2350, 2012.
- FEOLI, A. M.; SIQUEIRA, I.; ALMEIDA, L. M.; TRAMONTINA, A. C.; BATTU, C.; WOFCHUK, S. T.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M. L.; GONÇALVES, C. A. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 9, p. 2357–61, 2006
- FILLIT, H.; DING, W. H.; BUEE, L.; KALMAN, J.; ALTSTIEL, L.; LAWLOR, B, WOLF-KLEIN, G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 129, n. 2, p. 318–320, 1991.
- FRANKOLA, K. A.; GREIG, N. H.; LUO, W.; TWEEDIE, D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS and Neurological Disorders— Drug Targets*, v. 10, n. 3, p. 391–403, 2011.
- FRITSCHKE, K. L. The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Adv Nutr.*, v. 15, n. 6, p. 293S–301S, 2015.
- FRITZ, G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in biochemical sciences*, v. 36, n. 12, p. 625–32, 2011.
- FUJIYA, A.; NAGASAKI, H.; SEINO, Y.; OKAWA, T.; KATO, J.; FUKAMI, A.; HIMENO, T.; UENISHI, E.; TSUNEKAWA, S.; KAMIYA, H.; NAKAMURA, J.;

- OISO, Y.; HAMADA, Y. The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, v. 22, n. 2, p. 371–9, 2014.
- GONÇALVES, C. A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*, v. 41, n. 10-11, p. 755–63, 2008.
- GOODMAN, J. C.; ROBERTSON, C. S.; GROSSMAN, R. G.; NARAYAN, R. K. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *Journal of Neuroimmunology*, v. 30, n. 2-3, p. 213–217, 1990.
- GORINA, R.; FONT-NIEVES, M.; MÁRQUEZ-KISINOUSKY, L.; SANTALUCIA, T.; PLANAS, A. M. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*, v. 59, n. 2, p. 242–55, 2011.
- GOTTFRIED, C.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C.; KARL, J.; WOFCHUK, S. T.; RODNIGHT, R. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain research*, v. 833, p. 142–9, 1999.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, v. 29, p. 415–45, 2011.
- GUERRA, M. C.; TORTORELLI, L. S.; GALLAND, F.; DA RÉ, C.; NEGRI, E.; ENGELKE, D. S.; RODRIGUES, L.; LEITE, M. C.; GONÇALVES, C. A. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 128, 2011.
- GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; GUPTA, S.; KELLER, J. N.; BRUCE-KELLER, A. J. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, v. 120, n. 6, p. 1060–71, 2012
- HÄBERLE, J.; GÖRG, B.; TOUTAIN, A.; RUTSCH, F.; BENOIST, J. F.; GELOT, A.; SUC, A. L.; KOCH, H. G.; SCHLISS, F.; HÄUSSINGER, D. Inborn error of amino acid synthesis: human glutamine synthetase deficiency. *J. Inh. Metab. Dis.*, v. 29, p. 352–358, 2006.
- HÄBERLE, J.; SHAHBECK, N.; IBRAHIM, K.; HOFFMANN, G. F.; BEN-OMRAN, T. Natural course of glutamine synthetase deficiency in a 3 year old patient. *Mol. Genet. Metab.*, v. 103, p. 89–91, 2011.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L., SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Investig.*, v. 95, p. 2409–2415, 1995.

- HUANG, S.; RUTKOWSKY, J. M.; SNODGRASS, R. G.; ONO-MOORE, K. D.; SCHNEIDER, D. A.; NEWMAN, J. W.; ADAMS, S. H.; HWANG, D. H. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of lipid research*, v. 53, n. 9, p. 2002–13, 2012.
- HUYGHE, D.; NAKAMURA, Y.; TERUNUMA, M.; FAIDEAU, M.; HAYDON, P.; PANGALOS, M. N.; MOSS, S. J. Glutamine synthetase stability and subcellular distribution in astrocytes are regulated by  $\gamma$ -aminobutyric type B receptors. *The Journal of biological chemistry*, v. 289, n. 42, p. 28808–15, 2014.
- HWANG, D. H.; KIM, J.A.; LEE, J. Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *European journal of pharmacology*, v. 785, p. 24–35, 2016.
- JACOBI, D.; STANYA, K. J.; LEE, C. H. Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte.*, v. 1, n. 1, p. 4–12, 2012.
- JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological reviews*, v. 249, n. 1, p. 218–38, 2012.
- KAGAN, J.C.; SU, T.; HORNG, T.; CHOW, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.*, v. 9, n. 4, p. 361–368, 2008.
- KANEKO, M.; STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C.; STRYKER, M. P. Tumor necrosis factor-alpha mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Neuron*, v. 58, n. 5, p. 673–80, 2008.
- KIEN, C. L.; BUNN, J. Y.; TOMPKINS, C. L.; DUMAS, J. A.; CRAIN, K. I.; EBENSTEIN, D. B.; KOVES, T. R.; MUOIO, D. M. Substituting dietary monounsaturated fat for saturated fat is associated with increased daily physical activity and resting energy expenditure and with changes in mood. *Am J Clin Nutr*, v. 97, n. 4, p. 689–697, 2013.
- KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of leukocyte biology*, v. 94, n. 1, p. 55–68, 2013.
- KREMMYDA, L. S.; TVRZICKA, E.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 155, n. 3, p. 195–218, 2011.
- KRUEGER, J. M. The Role of Cytokines in Sleep Regulation. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n. 32, p. 3408–3416, 2009.

- LAINE, P. S.; SCHWARTZ, E. A.; WANG, Y.; ZHANG, W. Y.; KARNIK, S. K.; MUSI, N.; REAVEN, P. D. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 358, p. 150–155, 2007.
- LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, v. 82, n. 4-6, p. 295–303, 2010.
- LEE, J. Y.; Zhao, L.; Youn, H. S.; Weatherill, A. R.; Tapping, R.; Feng, L.; Lee, W. H.; Fitzgerald, K.; Hwang, D. H. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 20, p. 16683–9, 2001.
- LEE, J. Y.; YE, J.; GAO, Z.; YOUN, H. S.; LEE, W. H.; ZHAO, L.; SIZEMORE, N.; HWANG, D. H. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 39, p. 37041–51, 2003.
- LEE, J. Y.; ZHAO, L.; YOUN, H. S.; WEATHERILL, A. R.; TAPPING, R.; FENG, L.; LEE, W. H.; FITZGERALD, K. A.; HWANG, D. H. Saturated fatty but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor acid activates 6 or 1. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 17, p. 16971–9, 2004.
- LEHRKE, M.; LAZAR, M. Inflamed about obesity. *Nature medicine*, v. 10, n. 2, p. 126–7, 2004.
- LEITE, M. C.; GALLAND, F.; BROLESE, G.; GUERRA, M. C.; BORTOLOTTI, J. W.; FREITAS, R.; ALMEIDA, L. M.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C. A. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, v. 169, n. 1, p. 93–9, 2008.
- LEITE, M. C.; GALLAND, F.; DE SOUZA, D. F.; GUERRA, M. C.; BOBERMIN, L.; BIASIBETTI, R.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C. A. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*, v. 87, n. 11, p. 2439–46, 2009.
- LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008.
- LUCAS, K.; MAES, M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.*, v. 48, n. 1, p. 190–204, 2013.
- MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis : A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 1994.

- MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K. P.; NORENBURG, M. D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, v. 195, p. 1356–1358, 1977.
- MAUCH, D. H.; NÄGLER, K.; SCHUMACHER, S.; GÖRITZ, C.; MÜLLER, E. C.; OTTO, A.; PFRIEGER, F. W. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, v. 294, n. 5545, p. 1354–7, 2001.
- MCCOY, M. K; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*, v. 5, p. 45, 2008.
- MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L.A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 2, p. 359–70, 2009.
- MINET, R.; VILLIE, F.; MARCOLLET, M.; MEYNIAL-DENIS, D.; CYNOBER, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin Chim Acta*, v. 268, p. 121–32, 1997.
- MITCHELL, R. W; HATCH, G. M. Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, v. 85, n. 5, p. 293–302, 2011.
- MOLTENI, R.; BARNARD, R. J.; YING, Z.; ROBERTS, C. K.; GÓMEZ-PINILLA, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, v. 112, n. 4, p. 803–14, 2002.
- MONTGOMERY, S. L; BOWERS, W. J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, v. 7, n. 1, p. 42–59, 2012.
- MORAND, O.; BAUMANN, N.; BOURRE, J. M. In vivo incorporation of exogenous [1-14C] stearic acid into neurons and astrocytes. *Neurosci Lett*, v. 13, n. 2, p. 177–8, 1979.
- O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*, v. 4, p. 433–442, 2005.
- OLMOS, G; LLADÓ, J. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm*, v. 2014, p. 12, 2014.

- OTTERSEN, O. P.; ZHANG, N.; WALBERG, F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience*, v. 46, p. 519–53, 1992.
- PATIL, S.; CHAN, C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neuroscience letters*, v. 384, n. 3, p. 288–93, 2005.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, v. 356, p. 346–356, 1977.
- PICKERING, M.; CUMISKEY, D.; O'CONNOR, J. J. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Experimental physiology*, v. 90, n. 5, p. 663–70, 2005.
- PINTO, S. S.; GOTTFRIED, C.; MENDEZ, A.; GONÇALVES, D.; KARL, J.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S.; RODNIGHT, R. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters*, v. 486, n. 3, p. 203–7, 2000.
- PLATA-SALAMÁN, C. R. Cytokines and feeding. *International Journal of Obesity*, v. 25, n. 5, p. 48–52, 2001.
- PONATH, G.; SCHETTLER, C.; KAESTNER, F.; VOIGT, B.; WENTKER, D.; AROLT, V.; ROTHERMUNDT, M. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol*, v. 184, p. 214–222, 2007.
- ROCHA, D. M.; CALDAS, A. P.; OLIVEIRA, L. L.; BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, v. 244, p. 211–5, 2016.
- RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S. T.; LEAL R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*, v. 30, p. 325–338, 1997.
- ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain : biology , pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, v. 1, n. 00, p. 618–625, 2000.
- RUMZHUM, N. N.; AMMIT, A. J. Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 46, n. 3, p. 397–410, 2016.
- SANTELLO, M.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, v. 69, n. 5, p. 988–1001, 2011.
- SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNF $\alpha$  in synaptic function: switching gears. *Trends in neurosciences*, v. 35, n. 10, p. 638–47, 2012.

- SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest*, v. 118, p. 2992–3002, 2008.
- SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 33, n. 10, p. 1493–9, 2013.
- SHOELSON, S. E; GOLDFINE, A. B. Fanning the flames of obesity-induced inflammation. *Nat. Med*, v. 15, n. 4, p. 373–374, 2009.
- SHOELSON, S. E; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Review series Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 2006.
- SIMOPOULOS, A. P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 128, 2016.
- SNODGRASS, R. G.; HUANG, S.; CHOI, I. W.; RUTLEDGE, J. C.; HWANG, D. H. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 $\beta$  in human monocytes through TLR2 activation; Modulation by dietary fatty acids. *J Immunol.*, v. 191, n. 8, p. 4337–47, 2013.
- STEFFEK, A. E.; MCCULLUMSMITH, R. E.; HAROUTUNIAN, V.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 103, p. 71–8, 2008.
- SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 25, n. 10, p. 2062–8, 2005.
- SUN, G. Y; KORTHUIS, R. J. Ethanol preconditioning protects against ischemia/reperfusion-induced brain damage: Role of NADPH oxidase-derived ROS. *Free Radic Biol Med*, v. 43, n. 7, p. 1048–1060, 2007.
- TABERNERO, A.; LAVADO, E. M.; GRANDA, B.; VELASCO, A.; MEDINA, J. M. Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *Journal of neurochemistry*, v. 79, n. 3, p. 606–16, 2001.
- TAKECHI, R.; PALLEBAGE-GAMARALLAGE, M. M.; LAM, V.; GILES, C.; MAMO, J. C. Aging-related changes in blood-brain barrier integrity and the effect of dietary fat. *Neuro-degenerative diseases*, v. 12, n. 3, p. 125–35, 2013.
- TAKEMIYA, T.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int*, v. 51, p. 112–120, 2007.
- TRAMONTINA, F.; LEITE, M. C.; CERESER, K.; DE SOUZA, D. F.; TRAMONTINA, A. C.; NARDIN, P.; ANDREAZZA, A. C.; GOTTFRIED, C.; KAPCZINSKI, F.; GONÇALVES, C. A. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein:

antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods*, v. 162, p. 282–6, 2007.

VAN ELDIK, L. J.; WAINWRIGHT, M. S. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, v. 21, p. 97–108, 2003.

VASDEV, S.; GILL, V.; SINGAL, P. K. Beneficial effect of low ethanol intake on the cardiovascular system: possible biochemical mechanisms. *Vascular Health and Risk Management*, v. 2, n. 3, p. 263–276, 2006.

WANG, Z.; LIU, D.; WANG, F.; LIU, S.; ZHAO, S.; LING, E. A.; HAO, A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B signalling. *The British journal of nutrition*, v. 107, n. 2, p. 229–41, 2012.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, 2003.

WERRY, G. J.; LIU, G. J.; LOVELACE, M. D.; NAGARAJAH, R.; BENNETT, M. R. Glutamate potentiates lipopolysaccharide-stimulated interleukin-10 release from neonatal rat spinal cord astrocytes. *Neuroscience*, v. 207, p. 12–24, 2012.

WHITE, C. L.; PISTELL, P. J.; PURPERA, M. N.; GUPTA, S.; FERNANDEZ-KIM, S. O.; HISE, T. L.; KELLER, J. N.; INGRAM, D. K.; MORRISON, C. D.; BRUCE-KELLER, A. J. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: Contributions of maternal diet. *Neurobiol Dis.*, v. 35, n. 1, p. 3–13, 2009.

WINOCUR, G.; GREENWOOD, C. E. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiol Aging*, v. 26, p. 46–9, 2005.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 2003.

YAN, S. F.; YAN, S. D.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A. M. Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Annals of medicine*, v. 41, n. 6, p. 408–22, 2009.

YU, H.; BI, Y.; MA, W.; HE, L.; YUAN, L.; FENG, J.; XIAO, R. Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int J Dev Neurosci*, v. 28, n. 3, p. 271–6, 2009.

ZENDEDEL, A.; HABIB, P.; DANG, J.; LAMMERDING, L.; HOFFMANN, S.; BEYER, C.; SLOWIK, A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate

neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. *Journal of neuroimmunology*, v. 278, p. 200–11, 2015.

ZHANG, N.; LIU, L.; DUMITRU, C. D.; CUMMINGS, N. R.; CUKAN, M.; JIANG, Y.; LI, Y.; LI, F.; MITCHELL, T.; MALLEM, M. R.; OU, Y.; PATEL, R. N.; VO, K.; WANG, H.; BURNINA, I.; CHOI, B. K.; HUBER, H. E.; STADHEIM, T. A.; ZHA, D. Glycoengineered *Pichia* produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *MAbs*, v. 3, p. 289–98, 2011.

ZHAO, T. Z.; XIA, Y. Z.; LI, L.; LI, J.; ZHU, G.; CHEN, S.; FENG, H.; LIN, J. K. Bovine serum albumin promotes IL-1beta and TNF-alpha secretion by N9 microglial cells. *Neurol Sci*, v. 30, n. 5, p. 379–383, 2009.

ZHOU, F.; YAO, H. H.; WU, J. Y.; YANG, Y. J.; DING, J. H.; ZHANG, J.; HU, G. Activation of Group II/III metabotropic glutamate receptors attenuates LPS-induced astroglial neurotoxicity via promoting glutamate uptake. *J Neurosci Res*, v. 84, n. 2, p. 268–77, 2006.