

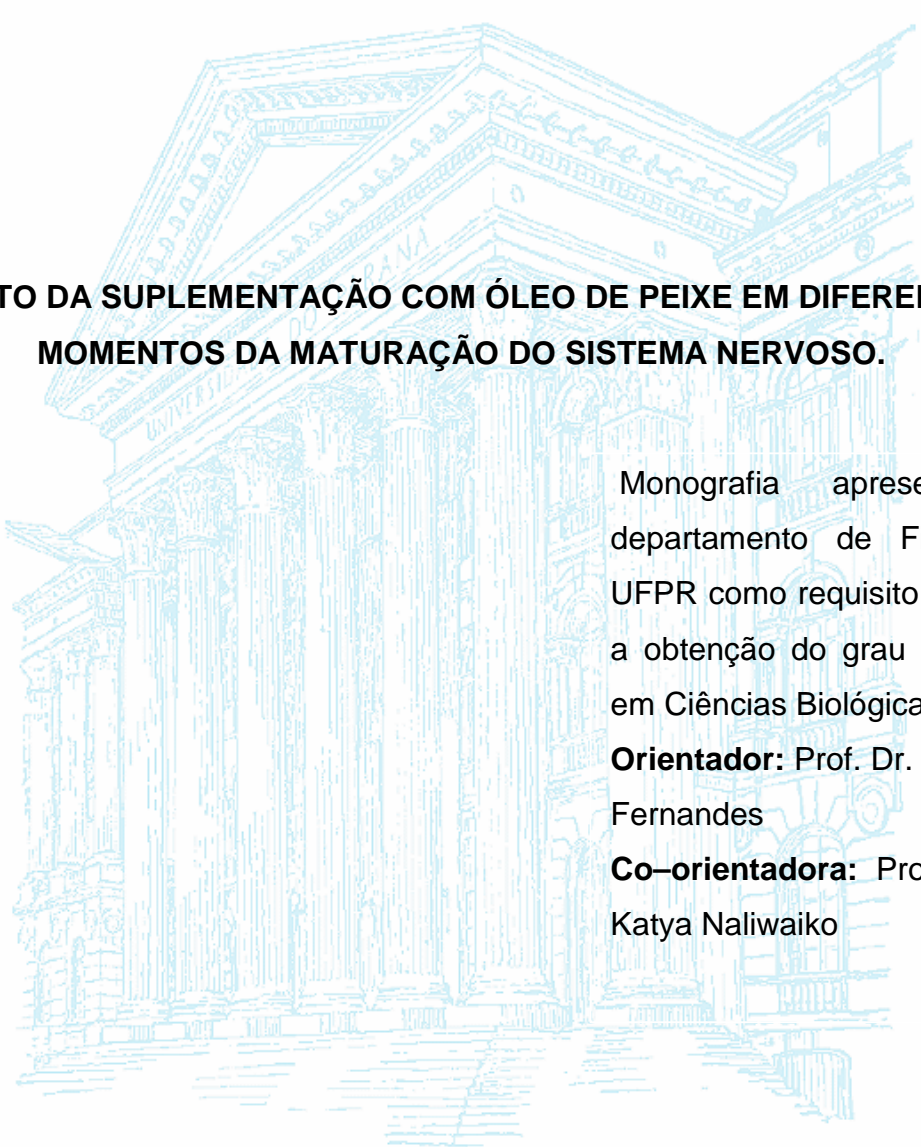


JULIANA JEANE DE SOUSA FORVILLE

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM DIFERENTES
MOMENTOS DA MATURAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO.**

CURITIBA
2008

JULIANA JEANE DE SOUSA FORVILLE



**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM DIFERENTES
MOMENTOS DA MATURAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO.**

Monografia apresentada ao departamento de Fisiologia da UFPR como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Co-orientadora: Prof^a .M.Sc. Katya Naliwaiko

CURITIBA
2008

**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 15 dias do mês de dezembro de 2008, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Luiz Claudio Fernandes, Claudia Salgei e Gilda Nakawako, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia Efeito da Suplementação com óleo de peixe em diferentes momentos da maturação do sistema nervoso de autoria do (a) acadêmico (a) Juliana J. de S. Forville.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 10,0.

[Assinatura]
Prof. (a) Orientador(a)
Nome por extenso e assinatura

[Assinatura]
Membro da Comissão
Nome por extenso e assinatura

[Assinatura]
Membro da Comissão
Nome por extenso e assinatura

Curitiba, 15 de dezembro de 2008.

Deve ser impresso em 3 vias uma para o aluno, uma para coordenação e outra para arquivo na secretaria do departamento.

Depois de corrigida a monografia deverá ser entregue à coordenação em 2 cd(s) em pdf. Não há necessidade de cópias impressas.

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA JEANE DE SOUSA FORVILLE

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM DIFERENTES MOMENTOS DA MATURAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO.

Monografia aprovada na disciplina de Estágio em Fisiologia – BZ027 do Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Departamento de Fisiologia , UFPR

Prof. Dr.^a Claudia Maria Sallai- Tanhoffer
Departamento de Fisiologia ,UFPR

Doutoranda. Katya Naliwaiko
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 15 de dezembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por guiar meus caminhos e sempre me dá forças para seguir em frente.

Á minha mãe, Hilda de Sousa, por toda sua perseverança, esforço em proporcionar uma boa educação e condições para que pudesse concluir esse curso. Obrigada por ter ensinado valores como honestidade e justiça.

Á minha família obrigada pelas orações, incentivo, agradeço á Deus pela vida de cada um.

Ao Ricardo Groxco, por compreender e aceitar todos os momentos em que estive ausente, nervosa, estressada. Obrigada pelo seu apoio e carinho.

Á minha grande amiga Danielle, apesar da distância sei que posso contar com você em todos os momentos.

Aos meus orientadores Luiz Cláudio Fernandes e Katya Naliwaiko, os maiores e sinceros agradecimentos. Toda admiração e respeito não são só pela competência acadêmica. Obrigada por guiarem meus passos durante essa trajetória. Katya suas palavras de incentivo e sua ajuda em todas as horas disposta á escutar minhas tristezas, incertezas foram fundamentais para que continuasse e conclui-se o curso. Professor, sua ajuda em momentos onde não tinha idéia qual caminho seguir foram essenciais.

Ao pessoal do LABMETAB muito obrigada pela ajuda nos experimentos, especialmente ao Everson e Fabíola, apesar do pouco convívio, minha admiração por vocês é enorme. Á minhas colegas de graduação, Priscila e Caroline pela ajuda na suplementação dos ratos, pelos feriados, sábados, véspera de natal e ano novo. Obrigada por tudo!

Ao Luizão e todos do biotério UFPR, muito obrigada pela ajuda.

Aos meus amigos da UNIOESTE, apenas um ano estudando com vocês, foi o suficiente para fazerem parte da minha vida, hoje agradeço por não ter passado no vestibular (UFPR), pois as pessoas que encontrei em Cascavel, aprovação nenhuma iria valer tanto a pena!! Amo vocês!!!!!!!

Aos meus colegas da UFPR, por aguentarem minhas reclamações, crises existenciais, todo meu mimimi (né Maicon!!) , os momentos de descontração , todas as risadas , foi muito bom ter vocês do meu lado durante esse tempo!!!

Á Rô por toda paciência em todos os semestres, tendo que dá um “jeito” na minha matrícula.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

**“Agora, pois, Senhor, que espero eu?
a minha esperança está em ti”.**
Rei Davi - Salmos 39:7

RESUMO

Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são representados por duas famílias, ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6), diferenciam-se devido a localização de sua primeira dupla ligação ao longo da cadeia, são essenciais ao organismo e não podem ser sintetizados pelos mamíferos. Ácido linoléico é o precursor de outros ácidos graxos n-6 como o ácido araquidônico, do mesmo modo a família n-3 possui precursor, ácido α -linolênico, que sintetiza ácido docosahexaenóico (n-3, DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA, n-3). A dieta ocidental é deficiente em ácidos graxos n-3, que pode ocasionar falhas durante o desenvolvimento neuronal podendo ser refletida nas funções cerebrais (falhas cognitivas e comportamentais). Atualmente estudos ressaltam a importância de mulheres grávidas e lactantes possuírem uma dieta rica em ácidos graxos n-3, pois durante o último trimestre de gestação e os primeiros 18 meses pós-nascimento, ocorre desenvolvimento significativo do cérebro, sendo primordial a incorporação de DHA. Nos últimos anos tem-se dado grande importância aos AGPI, preferencialmente EPA e o DHA, sendo utilizados na prevenção e tratamento de diversos transtornos neurológicos como depressão, esquizofrenia e doença de Alzheimer. Estudos relacionam a depressão (ou risco) com a baixa ingestão de peixe. Nosso estudo verificou o potencial efeito antidepressivo do óleo de peixe, composto rico em ácidos graxos n-3, EPA e DHA, utilizando o teste de natalidade forçada, modelo animal para verificar o efeito antidepressivo de substâncias. Ratos Wistar foram oralmente suplementados com 1,0 g/kg/dia de óleo de peixe (OP), ou 1g/kg/dia de gordura de coco (GC) ou sem suplementação (grupo controle (C)), nos seguintes intervalos do desenvolvimento: 1) gestação e amamentação (42 dias); 2) pós-desmame (21 até 90 dias); 3) adulto (de 60 a 90 dias de idade) e 4) intervalo total (da gestação à idade adulta). Após o teste foram coletadas amostras de tecido cerebral e o perfil lipídico foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O efeito antidepressivo foi identificado nos intervalos: 1 (gestação e amamentação) (ANOVA 4.84; $p \leq 0.05$); 2 (pós-desmame) (ANOVA 2.48, $p \leq 0.05$) e 4 (intervalo total) (ANOVA 9.64; $p \leq 0.05$). O teste de *Pearson* indicou correlação apenas entre os intervalos 1 e 4 ($r = 0,64$; $p \leq 0.05$) e embora haja efeito antidepressivo no intervalo 2, não existe correlação com o efeito encontrado nos intervalos 1 e 4. Identificamos ainda aumento na concentração de DHA no tecido nervoso dos animais do intervalo 4 (DHA (OP- $38,95 \pm 0,8$; GC- $4,28 \pm 0,2$; C- $4,3 \pm 0,3$)), mas não no intervalo 1 (DHA (OP- $5,28 \pm 0,4$; GC- $5,45 \pm 0,3$; C- $5,93 \pm 0,2$)), sugerindo que devido interrupção da suplementação, houve substituição deste AGPI por outros presentes na dieta. Nossos resultados indicam que a suplementação apenas durante o período mais crítico do desenvolvimento apresentou eficiência similar àquela do intervalo total. A presença de efeito comportamental após interrupção da suplementação pode ser atribuída ao denominado efeito residual, o que explica a correlação entre os resultados das fases 1 e 4 e exclui as fases 2 e 3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS GRAXOS PRECURSORES.....	5
FIGURA 2: GRÁFICO DO CONSUMO DE PEIXE/PER CAPITA E AS TAXAS DE DEPRESSÃO EM DIFERENTES PAÍSES.....	10
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA UTILIZANDO CILINDROS DE PVC.....	14
FIGURA 4- TEMPO DE IMOBILIDADE (S) DOS ANIMAIS CONTROLE, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU GORDURA DE COCO NO INTERVALO 1 (GESTAÇÃO E LACTAÇÃO).....	16
FIGURA 5 – TEMPO DE IMOBILIDADE (S) DOS ANIMAIS CONTROLE, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU GORDURA DE COCO NO INTERVALO 2 (PÓS-DESMAME).....	16
FIGURA 6 – TEMPO DE IMOBILIDADE (S) DOS ANIMAIS CONTROLE, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU GORDURA DE COCO NO INTERVALO 3 (ADULTO).....	17
FIGURA 7 – TEMPO DE IMOBILIDADE (S) DOS ANIMAIS CONTROLE, SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE OU GORDURA DE COCO NO INTERVALO 4 (GESTAÇÃO À IDADE ADULTA).....	17

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS AG INSATURADOS.....**5**

QUADRO 1 - ETAPAS BIOQUÍMICAS PARA A SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS.....**7**

TABELA 2 - PERCENTUAL DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO OBTIDAS DE RATOS CONTROLE (C) OU SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU GORDURA DE COCO (GC), NO INTERVALO 4.....**19**

TABELA 3 - PERCENTUAL DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NAS AMOSTRAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO OBTIDAS DE RATOS CONTROLE (C) OU SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE (OP) OU GORDURA DE COCO (GC), NO INTERVALO 1.....**20**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido Araquidônico

AGs- Ácidos Graxos

AGEs- Ácidos graxos essenciais

AGPIs- Ácidos Graxos Poliinsaturados

AGPIs-CL- Ácidos Graxos Poliinsaturados de cadeia longa

AL- Ácido Linoléico

ALA- Ácido α -linolênico

ANOVA- Análise de Variância

C- Controle

DHA- Ácido docosahexaenóico

EPA- Ácido Eicosapentaenóico

GC- Gordura de Coco

n-3 – Ômega 3

n-6- Ômega 6

OP- Óleo de Peixe

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	3
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1.ÁCIDOS GRAXOS.....	4
3.1.1 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.....	6
3.1.2 ÁCIDOS GRAXOS E O SISTEMA NERVOSO.....	9
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 ANIMAIS.....	12
4.2 SUPLEMENTAÇÃO.....	12
4.3TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA.....	13
4.4PERFIL LIPÍDICO.....	14
4.5ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
5.RESULTADOS.....	15
5.1.TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA.....	15
5.2.TESTE DE CORRELAÇÃO DE PERSON.....	18
5.3. PERFIL LÍPIDICO.....	18
6.DISSCUSSÃO.....	20
7.CONCLUSÃO.....	24
8.PERSPECTIVAS.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Lipídios compreendem 60% do peso seco do cérebro, são essenciais para a estrutura e funções neuronais (YOUNG 2003). Por suas características morfofuncionais, o cérebro necessita de ácidos graxos (AG) saturados, poliinsaturados, colesterol e outros lipídios. O organismo pode metabolizar facilmente AG saturados e colesterol, mas o mesmo não ocorre com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Existem duas séries de AGPI que são essenciais e não podem ser sintetizados pelos mamíferos, devendo ser supridos pela dieta. A série ômega-6 (ω -6, n-6) é derivada do ácido linoléico (AL) e a série ômega-3 (ω -3, n-3) do ácido α - linolênico (ALA), sendo os precursores de AGPIs de cadeia longa como ácido araquidônico (n-6) e do ácido docosahexaenóico (n-3, DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA, n-3) respectivamente. As duas famílias são metabolizadas pela mesma enzima (delta-6 desaturase), o que as faz competir pelo mesmo sistema enzimático (SIMOPOULOS 1999). Estudos sugerem que o DHA possui função na neurogênese, neurotransmissão e na proteção contra o estresse oxidativo (INNIS 2007), sendo encontrado em diferentes tecidos do organismo, mas em maiores concentrações no cérebro e na retina. Durante o processo de desenvolvimento, o requerimento de AGPIs para síntese de membranas e proliferação celular é altíssimo. Neste período, dieta deficiente em ácidos graxos n-3, que não atenda as necessidades do sistema nervoso em desenvolvimento, pode prejudicar a formação e funcionalidade do encéfalo (INNIS, 2007).

Ácidos graxos essenciais são transferidos eficientemente via placentária e posteriormente pelo leite materno, sendo acumulados no cérebro e retina durante o desenvolvimento fetal e infantil. A presença elevada de DHA (n-3) nestes períodos do desenvolvimento intensifica as funções intelectuais, melhora a aprendizagem e pode ter efeito terapêutico em transtornos neurológicos (INNIS 2003, DA SILVA, 2008). Mesmo adultos podem melhorar suas funções cerebrais decorrentes de modificações na alimentação. Dietas marinhas, especialmente àquelas que contêm peixes de água fria, são ricas em ácidos graxos n-3 como o EPA e o DHA. O uso de dietas desta natureza pode

exercer efeito protetor ou terapêutico contra inúmeros distúrbios neurológicos (KAKAR, 2008).

As doenças mentais representam elevado custo econômico e psicológico. Cerca de 10 % das pessoas diagnosticadas com depressão tentam suicídio (NESTLER, 2002). De acordo com a organização mundial de saúde a depressão maior está em 1º lugar no “ranking” nos custos para o tratamento (1990) (ANDREASEN, 2005). Estudos demonstram existir relação direta entre a composição deficiente de ácidos graxos nas membranas celulares do cérebro e a depressão (HIBBELN, 1995). Estudos epidemiológicos mostram a alimentação como um fator que contribui para os riscos de depressão. Atualmente há um aumento considerável no índice de risco de depressão maior, o qual tem sido diretamente correlacionado à mudança no consumo de ácidos graxos n-3 (EDWARD, 1998). Estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação inversa entre níveis de consumo de peixe e a prevalência de depressão ou risco de depressão (YOUNG, 2003; LOGAN, 2004; TIMONEN, 2004).

O potencial efeito antidepressivo da suplementação crônica com óleo de peixe, em ratos já foi demonstrado previamente através do teste de natação forçada (NALIWAIKO, 2004). O teste de natação forçada foi desenvolvido por Porsolt *et al* (1978) é utilizado para se avaliar o potencial efeito antidepressivo de uma dada substância. Por ser um modelo é de fácil manuseio e entendimento, é amplamente utilizado (CRYAN, 2002). O procedimento que utilizaremos nesse estudo será o descrito por *Naliwaiko* (2004) modificado do método proposto por Porsolt *et al.*, (1978) que se baseia em observar o tempo de imobilidade do animal, em aquários contendo uma coluna de água de 15 cm, durante 2 sessões. Na sessão de treino o animal é mantido no aquário por 15 minutos, após 24 horas realiza-se a sessão teste, onde então se mensura o comportamento de imobilidade do animal durante 5 minutos. (NALIWAIKO, 2004).

As vantagens do modelo animal incluem o controle da ingestão de ácidos graxos, a duração dos períodos de privação ou suplementação, além da possibilidade de análise de órgãos e tecidos, procedimentos que não podem ser facilmente realizados em seres humanos. No entanto, as diferenças entre as espécies nas exigências nutricionais e do metabolismo, a duração do

tratamento alimentar devem ser considerados antes de se extrapolar os resultados para seres humanos (INNIS, 2000).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é identificar o potencial efeito antidepressivo da suplementação com óleo de peixe, composto rico em ácidos graxos n-3, em diferentes períodos do desenvolvimento cerebral, através do teste da natação forçada.

Os objetivos específicos são:

Identificar:

- Quais períodos do desenvolvimento cerebral o sistema nervoso é sensível às alterações da dieta.
- Existência de correlação entre os resultados obtidos nos diferentes intervalos.
- Determinar o conteúdo lipídico do córtex cerebral e hipocampo dos animais suplementados e controle.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos (AG) são produzidos pela hidrólise dos lipídios. São formados por cadeias de carbono e hidrogênio, ligadas a um grupo carboxílico (COOH). Podem apresentar insaturações, como os monoinsaturados (uma dupla ligação) e os poliinsaturados (mais de 2 duplas ligações na cadeia hidrocarbônica) ou serem saturados (não possuem dupla ligação) (ORNELLAS, 1983). De acordo com o número átomos presentes na cadeia, são classificados, em:

- Cadeia Curta – 2 a 4 átomos de carbono.
- Cadeia Média – 6 a 10 átomos de carbono.
- Cadeia Longa – acima de 12 átomos de carbono.

São constituintes estruturais de membranas celulares e participam nos processos metabólicos. As células do corpo humano possuem duas vezes mais ácidos graxos insaturados que saturados, mas a composição é variável nos diferentes tecidos e está relacionada com consumo de ácidos graxos na alimentação (CURI *et al* 2002). Entre os importantes componentes das membranas celulares estão os fosfolipídios que contêm AG. A proporção de AGs pode variar nas membranas celulares, devido aos AGs presentes na dieta. Fosfolipídios constituídos por lipídios saturados têm estrutura diferente e são menos fluídos do que aqueles que incorporaram ácido graxo poliinsaturado (YEHUDA, 2005). Ácidos graxos insaturados de cadeia longa (PUFAs) são representados por 4 séries (Tabela 1). :

Classificação dos ácidos graxos insaturados			
Classe	AG precursor	Nº. dupla Ligação	Estrutura
Omega 3 (ω -3)	Ácido linolênico	3	9,12,15- 18:3
Omega 6 (ω -6)	Ácido linoléico	2	9,12-18:2
Omega 7 (ω -7)	Ácido palmitoleico	1	9-16:1
Omega 9 (ω -9)	Ácido oléico	1	9-18:1

Tabela 1: Classificação dos AG insaturados. Fonte: Curi et al (2002).

Com base nas características da molécula e a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica, podemos identificar duas importantes famílias de AGPIs conhecidas como ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3). A família n-6 é caracterizada por apresentar a primeira insaturação no sexto carbono da cadeia a contar do carbono que está ligado ao radical metila (carbono- ω) e é toda originada do ácido linoléico (AL). A família n-3 apresenta a primeira insaturação no terceiro carbono a contar do carbono ω e é obtida a partir do ácido α -linolênico (ALA) (FAROOQUI *et al*, 2007).

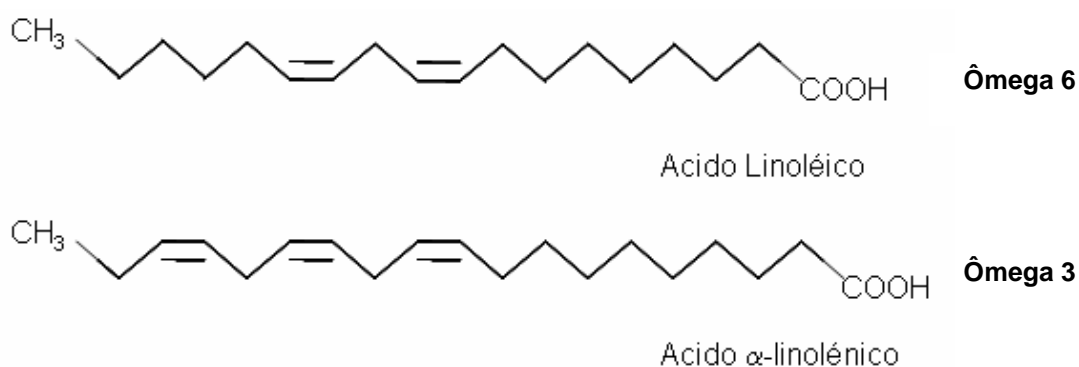


Figura 1: Cadeia carbônica dos ácidos graxos precursores. Fonte: Naliwaiko, 2004.

3.1.1 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Os ácidos graxos n-3 e n-6 são sintetizados a partir de dois AGs essenciais (AGEs). Estes são assim chamados, pois humanos e outros mamíferos não são capazes de sintetizá-los sendo necessário obtê-los na dieta. (CURI *et al* 2002). O ALA precursor de outros ácidos graxos n-3 pode ser metabolizado no fígado, entretanto esta conversão é limitada nos seres humanos onde apenas 5-15% de ALA são convertidos em DHA (LOGAN, 2004). O ácido graxo AL (n-6), pode ser convertido pelas células do fígado, em gama-linolênico ou ácido araquidônico (AA). Os produtos de cadeia longa podem ser produzidos pela ação de enzimas alongase e dessaturase (Quadro 1). As alongases introduzem dois átomos de carbono e as dessaturases oxidam dois átomos de carbono originando uma dupla ligação com a configuração cis, a partir da cadeia longa inicial (precursores n-3 e n-6) (MARTIN, 2006).

Ácidos graxos essenciais competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação, existindo preferência das enzimas pelos AGs n-3. É importante ressaltar que apesar da afinidade das enzimas pela série ômega-3, a conversão de ALA é fortemente relacionada a presença deste na dieta. Há evidências que Δ -5 e Δ -6 dessaturase diminuem com o consumo de álcool, tabagismo, estresse, consumo elevado de gordura trans, avanço na idade, em prematuros, hipertensos e alguns diabéticos. O estresse libera hormônios como catecolaminas e os glucorticóides, que inibem a Δ -6 dessaturase (MILLS, 1994). Nesses indivíduos está limitada a capacidade de converter EPA e DHA a partir de ALA, de forma que a suplementação com AGs n-3 pode representar importante fator para melhora destas condições humanas.

Família n-6	Família n-3
Ácido linoléico (LA, 18:2)	Ácido linolênico (ALA, 18:3)
	Δ6 desaturase
Ácido gamalinolênico (GLA, 18:3)	Ácido octanodecatetraenóico (18:4)
	Elongase
DihomoGLA (DGLA, 20:3)	Ácido eicosatetraenóico (20:4)
	Δ5 desaturase
Ácido araquidônico (AA, 20:4)	Ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5)
	Elongase
Ácido adrênico (22:4)	Ácido docosapentaenóico (22:5)
	Elongase
Ácido tetracosatetraenóico (24:4)	Ácido tetracosapentaenóico (24:5)
	Δ6 desaturase
Ácido tetracosapentaenóico (24:5)]	Ácido tetracosahexaenóico (24:6)
	B-oxidação
Ácido docosapentaenóico (22:5)	Ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6)

QUADRO 1: etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos

Ao longo dos últimos 100 anos, os ácidos graxos consumidos pela população mudaram consideravelmente. A dieta ocidental é deficiente em ácidos graxos n-3 e possui maior quantidade de ácidos graxos n-6. O desequilíbrio da razão n-6: n-3 tem sido correlacionado com o desencadeamento de diversas doenças, como as cardiovasculares, câncer, doenças auto imune e transtornos neurológicos. O aumento no nível de n-3 e o equilíbrio da razão exercem significativos efeitos terapêuticos. Na prevenção de doenças cardiovasculares a proporção de AGEs em 4/1 de n-6/ n-3 foi associado à redução de 70% na mortalidade. A mesma proporção parece ser ideal para mediar às funções cerebrais (SIMOPOULOS, 2003). Quando dietas são complementadas com n-3, esse substitui parcialmente o n-6 em praticamente todas as membranas celulares, modulando o metabolismo de prostaglandinas e diminuindo os triacilgliceróis. O equilíbrio de ácidos graxos essenciais seria o ideal na redução de riscos de doenças crônicas de alta

prevalência em sociedades ocidentais e em países em desenvolvimento (SIMOPOULOS, 1991).

Os precursores dos AGEs são encontrados na alimentação. Nas hortaliças com coloração verde-escura (couve, agrião, espinafre, brócolis) encontramos o ácido α -linolênico (n-3) em pequenas proporções, mas com benefícios para dietas vegetarianas. Em óleos vegetais (soja, linhaça, canola) é encontrado em quantidades apreciáveis, enquanto o precursor da família ômega 6 (ácido linoléico) que está presente de forma abundante. Os cereais e leguminosas como arroz e feijão constituem outras fontes de n-3 *apud* MARTIN 2006.

Além das espécies vegetais encontramos AGEs n-3 em alimentos de origem animal principalmente os marinhos, nesses além dos precursores estão presentes os produtos de cadeia longa poliinsaturada (EPA e DHA). Isso é possível, pois algas, fitoplancton e outros microrganismos realizam alongação e dessaturação da cadeia longa poliinsaturada, ômega 3, resultando nos produtos EPA e DHA. A formação desses produtos e sua transferência ao longo da cadeia alimentar marinha explica a prevalência de ômega 3 em animais de marinhos, principalmente em peixes de águas frias. Estudos mostram a concentração de EPA e DHA em peixes da costa brasileira mostrando que nas espécies estudadas o consumo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e bonito (*Katsuwonus pennis*) são fontes ideais de ômega 3, especialmente a sardinha pelo custo benefício (VISENTAINER, 2000).

A dieta ocidental moderna não promove níveis adequados de ácidos graxos ômega 3, pensando nisso a indústria de alimentos está direcionada na incorporação de n-3 a alimentos. Pode-se encontrar atualmente margarina, pães, maionese, molhos de salada, cereais matinais, entre outros, enriquecidos com ômega 3 (GÓMEZ, 2003). A fabricação de pães enriquecidos é comum na Europa e também um dos melhores procedimentos adotados na incorporação de n-3, pois o dióxido de carbono gerado durante o processo age como antioxidante, dificultando o processo de oxidação do ácido graxo quando presentes em altas temperaturas (MENEGALDO, 1999).

Com base nestes dados, alimentares ricos em AGPIs n-3 assim como suplementos encapsulados com óleo de peixe, composto rico em ômega 3 , têm sido encorajados por pesquisadores, como forma de manter ou melhorar a saúde do organismo.

3.1.2 ÁCIDOS GRAXOS E O SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso possui a segunda maior concentração de lipídios do organismo (CURI, *et al* 2002). Um terço do cérebro é constituído de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), n-3 e n-6, perfazendo 20% do peso seco do cérebro (SWINGLER, 2008). Os AGPI que o cérebro necessita são obtidos a partir dos precursores das famílias n-3 e n-6 ou diretamente da dieta, são eles: Ácido araquidônico e DHA são importantes componentes estruturais do sistema nervoso central, agindo na fluidez, permeabilidade e outras funções na membrana. O DHA é o mais abundante AG n-3 presente no cérebro dos mamíferos, seu nível na membrana lipídica neuronal é alterado pela deficiência na alimentação.

Existem dois períodos na vida onde os ácidos graxos são primordiais - na infância e na senescencia. Deficiências de AGE na infância podem resultar em atrasos no desenvolvimento neuronal e acelerar a perda das funções cerebrais no envelhecimento (YEHUDA, 2005). Em humanos, o último trimestre gestacional e os primeiros dezoito meses de vida pós-natal são críticos para o desenvolvimento cerebral e, coincidentemente, são os períodos de maior incorporação de DHA (CETIN & KOLETZKO, 2008). Durante estes períodos significativas alterações morfológicas ocorrem no encéfalo em maturação. É durante estas etapas que os neurônios estabelecem e fortalecem conexões, desenvolvem axônios e aumentam o número de contatos sinápticos. A deficiência de DHA durante desenvolvimento neuronal será refletida a longo prazo nas funções cerebrais (falhas cognitivas e comportamentais). O leite materno contém nutrientes essenciais como os AGPI, incluindo as famílias n-3 e n-6. A carência desses AGEs na alimentação materna pode ocasionar sérios problemas cognitivos á criança(INNIS,2004). Assim, atualmente estudos

ressaltam a importância de mulheres grávidas e lactantes consumirem alimentos com ácidos graxos n-3. (INNIS, 2007).

Os transtornos neurológicos estão entre as enfermidades mais comuns entre os seres humanos. A depressão e o transtorno bipolar atingem 10 a 20 % da população (YOUNG, 2003). Cerca de 10 % das pessoas que sofrem de depressão tentam suicídio (ANDREASEN, 2005).

Estudos epidemiológicos relacionaram os hábitos alimentares e o índice de transtornos depressivos (ou risco deles) em vários países e constataram que países onde o consumo de peixe é elevado, ocorrem menores taxas de depressão (HILBBELN, 1998). O Japão apresenta uma das maiores taxas de consumo de peixe/ per capita a taxa de depressão é de 0,12 % enquanto na França onde é consumido peixe em menor quantidade a prevalência de depressão é de 4-5 % (Figura 3) (YOUNG, 2003). Isso pode estar relacionado ao fato de dietas marinhas, serem ricas em ácidos graxos n-3, como o EPA e o DHA, especialmente em peixes de água fria.

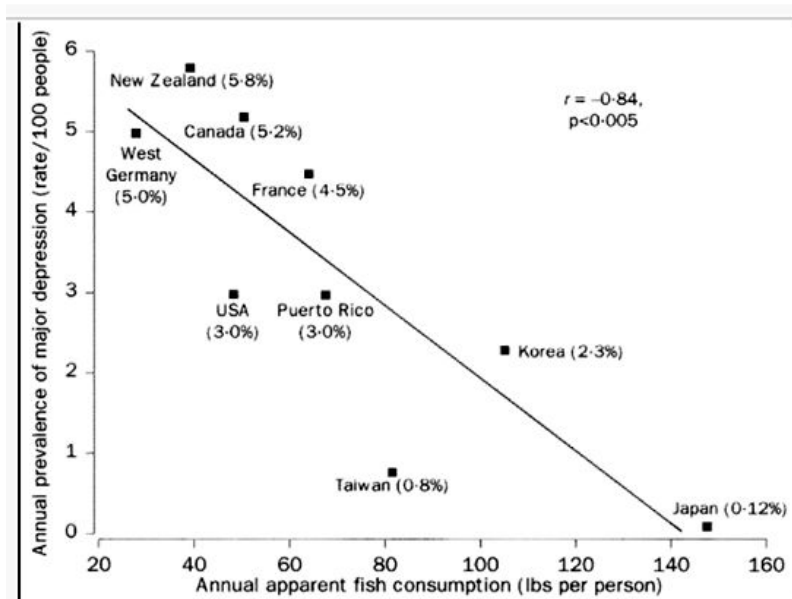


Figura 2: Gráfico do consumo de peixe/per capita e as taxas de depressão em diferentes países. Fonte: Hibbeln, 1998

A avaliação do perfil lipídico dos eritrócitos de pacientes com depressão, mostrou que estes pacientes apresentam menores índices de ácidos graxos n-3, correlacionando de maneira direta o *status* lipídico do indivíduo e a

severidade da depressão. O risco de depressão pós parto também está associado a decréscimos de DHA. Durante a gestação a mãe chega a transferir até 2,2 g/dia de DHA para o feto. Se a mãe encontra-se sob dieta com restrição em AGs n-3, há mobilização dos estoques maternos. É preciso salientar que o processo de restabelecimento nos níveis de DHA materno é extremamente lento, fazendo com que aumente o risco no desenvolvimento desse tipo de depressão apud LOGAN 2004.

A análise criteriosa dos dados disponíveis na literatura sugere que restrição de AGs n-3 em diferentes momentos da vida pode ser relacionada com prejuízo morfológico e funcional do sistema nervoso. Desta forma, uma vez que DHA é essencial para formação do encéfalo e deficiência em DHA promove redução no tamanho do encéfalo (RAPOPORT *et al.*, 2007). O fornecimento adequado destes AGPIs, pode garantir o maior suprimento celular ao encéfalo em formação (INNIS, 2007; BELTZ *et al.*, 2007), além de maior fluidez de membrana podendo alterar de maneira significativa os processos de transmissão sináptica e função cognitiva (CURI, *et al.* 2002).

Nas diversas áreas cerebrais, algumas são mais susceptíveis à redução de AGPIs. Regiões como hipocampo e córtex pré-frontal, onde a densidade e variedade de receptores são elevadas, assim como a frequência de excitação destas áreas, decréscimos de DHA são prejudiciais. A depressão está associada com a diminuição da densidade e tamanho de neurônios no hipocampo e no córtex pré-frontal. Os produtos de cadeia longa da família ômega 3, são relacionados à depressão por desempenhar benefícios nos sintomas, podendo ser utilizados separadamente ou em misturas de EPA e DHA como encontrado no óleo de peixe (SINCLAIR, 2007).. Em situações onde se reconhece déficit das capacidades cerebrais, recomenda-se a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados pré-formados, para disponibilidade de DHA nas membranas neuronais (INNIS,2007). A reposição desses AGs permite o equilíbrio das concentrações dos lipídios celulares e restabelecimento das atividades neurais. Estudos fornecem forte apoio para o DHA relacionando-o no crescimento das células neuronais e proteção contra apoptose (SINCLAIR, 2007).

Uma vez que AGs n-3 tem efeito abrangente sobre o sistema nervoso, podendo exercer efeito terapêutico em diversos momentos da vida de um indivíduo, e a deficiência destes durante o desenvolvimento pode provocar prejuízo das funções cerebrais, torna-se importante investigar os efeito dos AGPIs n-3 em diferentes momentos do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Neste estudo utilizamos ratos da linhagem Wistar, adquiridos e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em ambiente com temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro (12/12 horas). Fêmeas com idade ± 70 dias, foram suplementadas por 15 dias e posteriormente acasaladas com machos não suplementados. O teste da natação forçada e outros experimentos foram realizados no laboratório de metabolismo celular da UFPR.

4.2. SUPLEMENTAÇÃO

A suplementação, por via oral, foi realizada com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável, diariamente. Os animais eram pesados a cada 2 dias, em balança digital (GEHAKA, 350).

l) Grupos de suplementação

- ◆ Grupo óleo de peixe (OP) recebeu diariamente 1,0 g/kg de composto de extratos marinhos rico em ácidos graxos n-3, contendo 180mg de EPA, 120mg de DHA e antioxidante tocoferol. O óleo de peixe utilizado foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A
- ◆ Grupo gordura de coco (GC) recebeu diariamente 1,0g/kg de gordura de coco (Gordura de coco Brasil, RMB Ltda.).
- ◆ Grupo controle (C), não foi suplementado, sendo alimentado com ração para ratos (Nuvilab CR₁ – Nuvital nutrientes S/A).

II) Intervalos de suplementação

Em todos os intervalos, animais machos e fêmeas foram divididos entre os três grupos de suplementação, 10 animais em cada grupo, durante os seguintes intervalos de tempo:

Intervalo 1 (Gestação +Amamentação) - Durante todo o período de gestação (21 dias) e amamentação (21 dias) as genitoras receberam suplemento sendo este transferidos para os filhotes pela placenta e leite. Uma vez desmamada, a geração F1 não foi suplementada.

Intervalo 2 (Grupo Pós-desmame) - Animais gerados por mães que não foram suplementadas, após serem desmamados (21 dias), receberam suplementação até a idade de 90 dias.

Intervalo 3 -(Idade Adulta): Animais com a idade de 60 dias foram suplementados até a idade de 90 dias.

Intervalo 4 (Gestação + Lactação + Crescimento): Após o desmame, animais obtidos de ratas suplementadas, receberam suplementação até alcançarem a idade de 90 dias.

Em todos os grupos os animais receberam água e ração á vontade. Após a suplementação os animais foram submetidos ao teste de natação forçada, modelo animal para a identificação do potencial antidepressivo.

4.3. TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA

O procedimento a ser realizado foi descrito por Porsolt et al., (1978), alterado do proposto por Naliwaiko 2003.

O teste baseia - se em avaliar o tempo de imobilidade do animal, quando colocado em um aquário de onde ele não poderá escapar. Neste trabalho utilizamos cilindros de PVC ($\varnothing=30$ cm; h=50 cm), com coluna d'água de 15 cm, com temperatura 21°C. O teste é dividido em uma sessão de treino com 15 minutos de duração, e uma sessão de teste, após 24 horas da primeira

exposição, quando será avaliado o tempo de imobilidade do animal durante 5 minutos, ou seja, quando este pára de nadar e bóia. Cada animal foi colocado em 1 cilindro (figura 3) , para minimizar as possíveis interferências. Após o teste de natação forçada os animais foram ortotansasiados por decapitação e amostras de córtex cerebral e hipocampus, foram utilizados para análise do perfil lipídico.



Figura 3: Representação do teste de natação forçada utilizando cilindros de PVC.

FONTE: Foto laboratório de metabolismo celular – UFPR 2007

4.4. PERFIL LIPÍDICO

Córtex e hipocampo dos ratos suplementados e controles foram dissecados sob placa de gelo e utilizados para análise dos componentes lipídicos por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography –HPLC) segundo proposto por Naliwaiko et al., (2004). Lipídios totais das amostras foram extraídos usando clorofórmio: metanol (2:1 v/v) segundo método de Folch et al. (1957). Os ácidos graxos foram saponificados em solução alcalina em metanol e derivatizados com 4-bromomethyl-7-metoxi-coumarin (BMMC) (Nishiyama-Naruke et al., 1998). Após a derivatização, os ácidos graxos extraídos das amostras foram separados em cromatógrafo líquido de alta performance Varian, utilizando-se equipamento com bomba ternária (modelo ProStar 230), autoinjeter (modelo Autosampler 410) e detetor de fluorescência (modelo FLU 363.28). Para

separação dos ácidos graxos derivatizados, utilizou-se coluna analítica de fase reversa: microsorb MV-C8 4,6 mm i.d.x 25 cm com partículas de 5 μ m (Varian) precedida de pré-coluna (A3000 MG 8,0 mm i.d.x 1,5 cm).

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados foram injetados de 50 μ L dos derivados diluídos com fluxo de 1,2 mL/min à temperatura ambiente. Os compostos foram detectados fluorimetricamente, com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm, utilizando-se como fase móvel para eluição um gradiente binário de acetonitrila e água (77-23% a 90-10% v/v) em 40 minutos de corrida. Os dados foram registrados e integrados pelo *software* Star LC workstation, versão 6.0.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos experimentos serão tabulados e analisados por ANOVA seguidos de pós testes de Tukey. A correlação entre os resultados obtidos em cada intervalo, será avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Diferenças serão consideradas significativas, quando $p \leq 0,05$. Para composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados, utilizou-se o *software* Prism GraphPad versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA.

5. RESULTADOS

5.1. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

O emprego do teste de natação forçada permitiu avaliar, em quais intervalos do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso, a suplementação com óleo de peixe apresentou efeito antidepressivo. Dos quatro intervalos investigados, em três deles foi possível identificar o possível efeito antidepressivo da suplementação.

No intervalo 1, que compreende o período de desenvolvimento apenas (Gestação + Lactação), os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram significativa redução no tempo de imobilidade (ANOVA 4.84; $p < 0.05$) ((Figura 4).

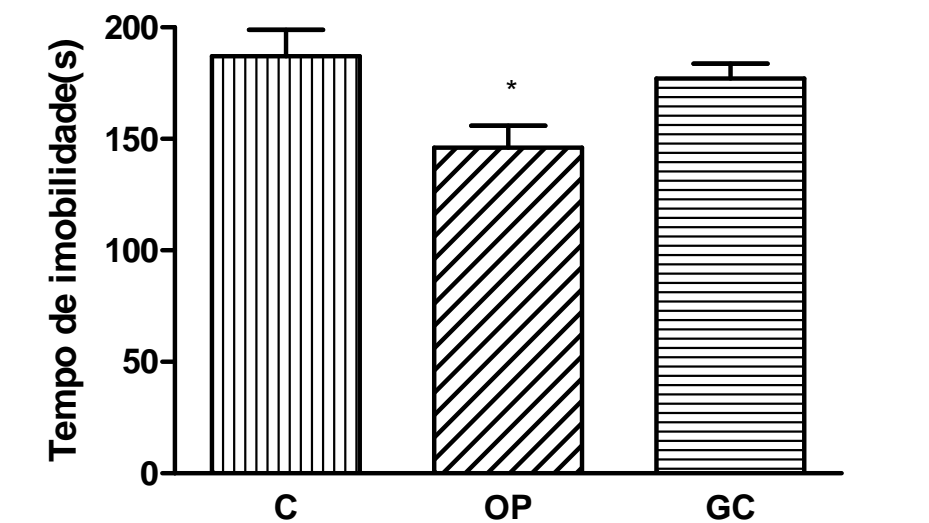


Figura 4– Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco no intervalo 1 (gestação e lactação). Dados representam média \pm EPM (n=10). * $p \leq 0.05$

De maneira semelhante os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram redução no tempo de imobilidade no intervalo 2 (pós-desmame) (ANOVA 2.48, $p \leq 0.05$) (figura 5).

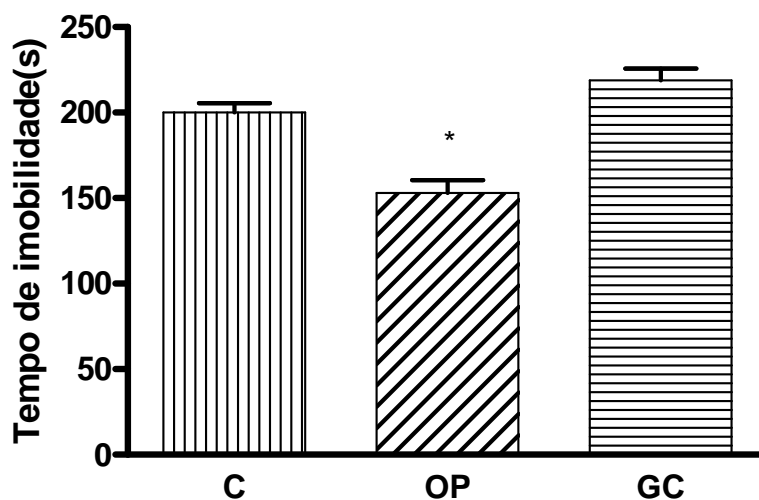


Figura 5 – Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco no intervalo 2 (pós-desmame). Dados representam média \pm EPM (n=10). * $p \leq 0.05$. (C- controle, OP- óleo de peixe, GC- gordura de coco).

Os animais do intervalo 3 (adulto), não apresentaram redução no tempo de imobilidade, sugerindo que a suplementação pelo período de 30 dias na concentração de 1g/kg, foi insuficiente para exercer efeito antidepressivo nos animais suplementados (Figura 6).

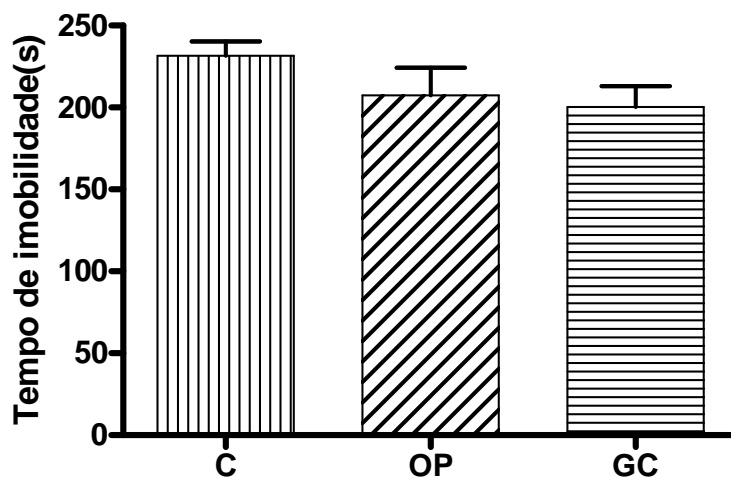


Figura 6 – Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco no intervalo 3 (adulto). Dados representam média \pm EPM (n=10). * $p \leq 0.05$. (C- controle, OP- óleo de peixe, GC- gordura de coco).

Os animais suplementados durante o período de gestação, lactação e crescimento (intervalo 4), apresentaram significativa redução do tempo de imobilidade no teste da natação forçada (ANOVA 9.64; $p \leq 0.05$) (figura 7).

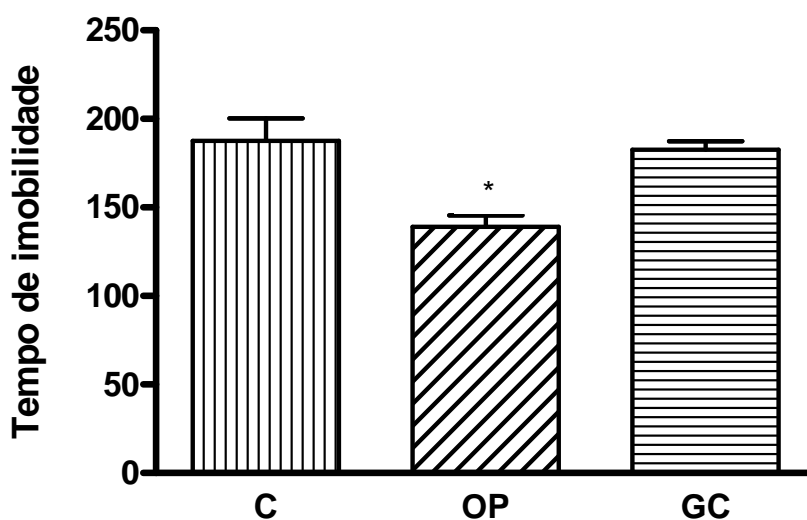


Figura 7 – Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco no intervalo 4 (gestação à idade adulta). Dados representam média \pm EPM (n=10). * $p \leq 0.05$. (C- controle, OP- óleo de peixe, GC- gordura de coco).

5.2 TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

Os resultados obtidos no teste de natação forçada foram então submetidos ao teste de correlação de Pearson, para identificar a possível correlação entre o efeito antidepressivo obtido nos diferentes intervalos de suplementação. Dentre os três intervalos onde se identificou efeito antidepressivo, a correlação positiva ocorreu apenas entre os intervalos 1 e 4, sugerindo alta correlação entre os dados obtidos ($r = 0,64$; $p < 0,05$).

5.3 PERFIL LÍPIDICO

A análise do perfil lipídico por cromatografia líquida, mostrou que a suplementação com óleo de peixe nos animais do intervalo 4, foi hábil em provocar alterações na composição lipídica de duas áreas cerebrais envolvidas na fisiopatologia de depressão (Tabela 2). Neste intervalo a incorporação destes ácidos graxos aumentou cerca de 20 vezes para EPA no hipocampo dos animais suplementados ($30,8 \pm 0,7$) quando comparado aos controles ($4,2 \pm 0,05$); e 30 vezes para DHA nos animais suplementados ($38,95 \pm 0,1$) quando comparados aos controles. Nos córtices dos animais suplementados, o aumento foi cerca de nove vezes maior quando comparado aos outros grupos. Sugerindo que a suplementação foi capaz de promover alteração na disponibilidade de ácidos graxos na dieta e, por conseguinte, alterar alteração na composição lipídica das membranas. O aumento da incorporação lipídica também promoveu o aumento do índice de insaturação, indicando maior concentração de AGPIs nas membranas avaliadas, corroborando o que foi postulado por Naliwaiko et al., 2004.

Ácidos Graxos	Córtex			Hipocampo		
	Controle	Óleo de peixe	Gordura de coco	Controle	Óleo de peixe	Gordura de coco
Laurico (12:0)	5.41 ± 0.84	1.61 ± 0.09 ^a	5.20 ± 0.18	3.31 ± 0.4	2.87 ± 0.2	2.87 ± 0.05
Mirístico (14:0)	2.99 ± 0.03	1.37 ± 0.18	4.06 ± 0.27	5.53 ± 0.1	1.06 ± 0.1 ^a	3.9 ± 0.8 ^c
Palmitico (16:0)	3.58 ± 0.49	1.23 ± 0.18 ^a	7.04 ± 0.44 ^a	26.89 ± 0.5	1.8 ± 0.39 ^a	25.4 ± 0.4
Palmitoléico (16:1)	1.41 ± 0.03	3.59 ± 0.17 ^a	1.24 ± 0.36	1.01 ± 0.003	4.08 ± 0.4 ^a	0.89 ± 0.04
Estearico (18:0)	3.56 ± 0.52	0.60 ± 0.018 ^a	3.97 ± 0.34	31.55 ± 0.1	0.83 ± 0.05 ^a	27.79 ± 0.3 ^c
Oléico (18:1)	9.75 ± 1.29	5.59 ± 0.26 ^a	16.46 ± 1.07 ^c	8.17 ± 0.01	3.85 ± 0.3 ^a	9.09 ± 0.8
Linoléico (18:2)	60.5 ± 0.21	10.87 ± 0.35 ^a	49.6 ± 3.19 ^a	14.73 ± 0.3	1.6 ± 0.06 ^a	23.07 ± 0.7 ^b
α-Linolenico (18:3)	3.03 ± 0.12	2.63 ± 0.21	2.05 ± 0.28	1.56 ± 0.3	2.62 ± 0.2	1.67 ± 0.03
Araquidônico (20:4)	1.45 ± 0.45	2.76 ± 0.16	1.12 ± 0.33	3.06 ± 0.1	3.51 ± 0.2	2.07 ± 0.5
EPA (20:5)	4.15 ± 0.05	30.79 ± 0.78 ^a	4.5 ± 0.11	1.43 ± 0.4	41.58 ± 0.6 ^a	1.37 ± 0.5
DHA (22:6)	4.3 ± 0.03	38.95 ± 0.79 ^a	4.28 ± 0.19	2.02 ± 0.001	36.19 ± 0.7 ^a	1.8 ± 0.6
Índice de Insaturação	193.6	473.5	175.7	74.8	458.1	87.1

Tabela 2: Percentual de concentração de ácidos graxos nas amostras de Córtex Cerebral e Hipocampo obtidas de ratos controle (C) ou suplementados com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC), no intervalo 4. Os dados representam as MÉDIAS ± EPM.

a $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C e GC; b $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C; c $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C e OP

Nos animais do intervalo 1, embora tenha sido identificado o efeito antidepressivo, não foram encontradas alterações na composição lipídica de córtices e hipocampos dos animais (tabela 3). Os valores de DHA nos animais suplementados ($3.1 \pm 0,6$) não foi diferente dos animais controle ($2.6 \pm 0,2$), assim como EPA ($0.31 \pm 0,05$) nos animais suplementados e ($0,2 \pm 0,04$). Uma vez que a suplementação foi interrompida logo após o desmame dos animais, e os animais passaram alimentar-se com quantidades equilibradas de AGPIs n-3, muito provavelmente, os ácidos graxos incorporados durante o desenvolvimento, foram substituídos por aqueles disponíveis na ração, fazendo com que os níveis cerebrais de DHA e EPA retornassem a valores iguais àqueles dos animais controle. Também não foi identificado aumento no índice de insaturação nos tecidos investigados, sugerindo a substituição dos AGPIs n-3, por outros encontrados na dieta.

Ácidos Graxos	Córtex			Hipocampo		
	Controle	Óleo de peixe	Gordura de coco	Controle	Óleo de peixe	Gordura de coco
Laurico (12:0)	0.241 ± 0.03	0.239 ± 0.02	0.248 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.43 ± 0.1	0.63 ± 0.17 ^c
Mirístico (14:0)	0.299 ± 0.04	0.301 ± 0.08	0.406 ± 0.07 ^c	0.55 ± 0.1	0.51 ± 0.2	0.68 ± 0.4
Palmitico (16:0)	14.04 ± 1.03	17.43 ± 0.22	16.60 ± 0.49	16.3 ± 0.7	15.26 ± 0.9	16.57 ± 0.4
Palmitoléico (16:1)	0.240 ± 0.02	0.423 ± 0.03	0.285 ± 0.09	0.25 ± 0.1	0.43 ± 0.2	0.26 ± 0.4
Esteárico (18:0)	8.04 ± 1.18	10.38 ± 0.18	11.24 ± 0.24	10.25 ± 0.9	7.47 ± 0.6 ^a	10.49 ± 1.2 ^c
Oléico (18:1)	22.41 ± 0.56	22.16 ± 1.07	23.42 ± 0.49	19.26 ± 0.2	21.93 ± 0.4 ^a	18.34 ± 0.5
Linoléico (18:2)	1.43 ± 0.14	1.51 ± 0.07	1.51 ± 0.07	1.90 ± 0.1	2.3 ± 0.06 ^a	2.04 ± 0.3b
α-Linolenico (18:3)	0.199 ± 0.03	0.211 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.207 ± 0.02	0.37 ± 0.2	0.14 ± 0.1
Araquidônico (20:4)	20.88 ± 1.56	19.69 ± 0.18	20.12 ± 0.5	23.19 ± 0.3	21.95 ± 0.8	24.42 ± 0.5
EPA (20:5)	0.244 ± 0.04	0.312 ± 0.05	0.205 ± 0.2	0.28 ± 0.05	0.41 ± 0.1 ^a	0.21 ± 0.1
DHA (22:6)	26.06 ± 0.25	31.05 ± 1.6 ^a	27.06 ± 0.7	29.61 ± 2.17	31.36 ± 2.3 ^a	30.81 ± 1.4
Índice de Insaturação	272.11	297.61	266.5	305.9	316.1	270.2

Tabela 3: Percentual de concentração de ácidos graxos nas amostras de Córtex Cerebral e Hipocampo obtidas de ratos controle (C) ou suplementados com óleo de peixe (OP) ou gordura de coco (GC), no intervalo 1. Os dados representam as MÉDIAS ± EPM.

a $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C e GC; b $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C; c $p < 0.05$ quando comparado aos grupos C e OP.

6.DISCUSSÃO

Os lipídios são conhecidos há muito tempo como importante fonte de energia para os mamíferos, mas em 1920 pesquisadores demonstraram a essencialidade de alguns ácidos graxos, presentes na alimentação. Esses AGEs que não podem ser sintetizados pelos mamíferos e devem ser obtidos na dieta, os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6, são cruciais para o adequado desenvolvimento cerebral. Estes ácidos podem ser ingeridos diretamente da dieta, no caso do DHA e EPA(n-3) , AA (n-6) ou de seus precursores o ácido alfa- linolênico (n-3) e o ácido linoléico (n-6) (MacLean 2005). Devido a importância destes ácidos graxos n-3 na nutrição humana e o papel que desempenham na funcionalidade do organismo, é preciso ingeri-los de maneira balanceada, numa relação adequada entre n-6 e n-3 (Simopoulos 2002).

Em sociedades industrializadas, como as ocidentais, a relação entre n-6 e n-3 vem aumentando significativamente, devido ao acréscimo do consumo de óleos vegetais ricos em ácido linoléico (n-6) e redução no consumo de alimentos ricos em ácidos graxos n-3 (Connor, 2000). Embora a razão postulada como ideal seja 4:1 (n-6:n-3), nas sociedades ocidentais, onde o consumo de peixes é muito reduzido, esta relação tem alcançado valores entre

20:1 ou até 40:1. O considerável aumento nas quantidade de n-6 ingeridas por estas populações, vem sendo correlacionado com o surgimento de uma série de doenças crônico degenerativa, como câncer, diabetes, cardiopatias e transtornos neurológicos (Simopoulos, 2002).

A incorporação de AGPI no cérebro e sangue pode ser afetada pelas quantidades destes na dieta, assim o perfil lipídico de plasma e células sanguíneas representa importante ferramenta para estimar o perfil lipídico cerebral em humanos (Nemets et al, 2002). Pacientes com depressão, apresentaram menor concentração de ácidos graxos ômega 3, quando avaliado seu perfil lipídico nos eritrócitos, correlacionando de maneira direta o status lipídico do indivíduo e a severidade da depressão (Edwards, 1998; Su et al, 2003).

Países onde o consumo de peixe, rico em DHA e EPA, é elevado estudos demonstram menores índices de depressão ou risco de depressão na população, quando comparado a países onde existe deficiência destes ácidos graxos (Young 2003; Logan 2004, Timonen 2004). Dentre os inúmeros transtornos afetivos, o uso de ácidos graxos n-3 tem produzido efeitos satisfatórios sobre as diferentes formas de depressão. O uso de AGs n-3 no tratamento da depressão tem sugerido a capacidade terapêutica de EPA e DHA, quando associados ou não à medicação de rotina (Puri et L, 2000; Su et al, 2003). Acredita-se que o aumento na disponibilidade destes AGs n-3 na circulação, podem melhorar o perfil lipídico encefálico, melhorando os sintomas da doença, nos pacientes que faze uso destes juntamente com a medicação de rotina.

Embora nossos resultados obtidos no intervalo 3 demonstrem que a suplementação em animais adultos não apresenta efeito sobre o testa da natação forçada, na literatura tem sido sugerido que mesmo adultos podem melhorar sua funções cerebrais modificando a alimentação e consumindo maiores quantidades ácidos graxos ômega-3 (Yehuda, 2005). Uma justificativa para este resultado, seria o fato de existir um desequilíbrio na proporção de AGs em indivíduos com deprimidos (Edward set al, 1998). Nosso experimento valeu-se de animais saudáveis para efetuar os testes, onde talvez sejam necessárias maiores quantidades de AGs n-3 para que ocorra a identificação

de alteração comportamental. Neste grupo também não foi identificada alteração no perfil lipídico, o que indica que a dose e tempo utilizados, foram insuficientes para ocasionar a incorporação lipídica nas áreas cerebrais de interesse. Para esclarecer os resultados obtidos, são necessários novos estudos adequando tempo e/ ou dose de suplementação para reproduzir os dados terapêuticos encontrados na literatura.

A composição das membranas biológicas pode ser alterada por fatores nutricionais, essa modificação deve-se a distribuição dos diferentes tipos de ácidos graxos nos fosfolipídios (Curi et al). A maior concentração de lipídios no cérebro, está na forma de AGPI, que possuem funções nas propriedades físicas das membranas neuronais. Influenciam na permeabilidade, interações entre lipídios e lipídios-proteínas. (Curi et al 2002). Fornecimento adequado de AA e DHA são necessários para o crescimento, desenvolvimento e funcionalidade do cérebro (Horrocks 1999), mas é o DHA (n-3) que está presente em maiores quantidades e também pode apresentar importantes funções neuronais, exercendo efeito na fluidez de membrana, algo que o AA não é capaz de exercer (Horrocks 1999). Existe preferência pelo DHA (n-3), que pode ser devido a sua estrutura tridimensional, pois essa molécula possui conformação mais empacotada e espiralizada, podendo ser relevante em suas esterificação aos fosfolipídios e nas interações entre lipídios e proteínas (Curi et al 2002). Ácidos graxos AA e DHA acumulam-se rapidamente na substância cinzenta do cérebro, especificamente durante o rápido desenvolvimento neuronal. A distribuição desses ácidos graxos essenciais depende do fornecimento na alimentação, tanto a integridade como as funções neurais podem ser prejudicadas pela deficiência de ácidos graxos essenciais. (Fritsche 1993).

Os resultados obtidos no intervalo 1, quando a suplementação aconteceu durante o período mais importante do desenvolvimento, demonstram o efeito da suplementação com óleo de peixe, durante a formação e estabelecimento de conexões neurais. Assim, a presença de efeito antidepressivo nos animais suplementados durante este período, sugere fortemente a presença de efeito residual dos AGPIs n-3, uma vez que o teste foi efetuado mais de 60 dias após a interrupção da suplementação. Uma vez que os AGEs são transferidos

ativamente pela mãe para o feto, através da placenta e pelo leite materno, a quantidade de DHA na dieta da genitora será diretamente relacionada à quantidade de DHA no leite e ao perfil lipídico de sua prole (Horrocks 1999).

As maiores modificações nas concentrações de DHA ocorrem durante o último trimestre de gestação e os primeiros estágios do desenvolvimento pós-natal, quando ocorre o desenvolvimento rápido do cérebro, (Curi et al 2002). Embora este período seja crítico para a formação do encéfalo, a suplementação com AGs pode apresentar efeito satisfatório, mesmo quando empregada em outros períodos da vida de um indivíduo. Durante toda a vida de um indivíduo, as redes neurais formadas em seu cérebro podem ser remodeladas, melhorando seu desempenho cognitivo. A presença de efeito da suplementação com óleo de peixe no intervalo 2, sugere que a ingestão de AGs ao longo da vida, pode melhorar o desempenho cerebral e evitar o surgimento de transtornos neurodegenerativos, justamente porque enriquece o ambiente cerebral, melhorando a interação entre neurônios.

No último intervalo investigado, a suplementação aconteceu durante toda a vida do animal, havendo grande disponibilidade de AGs n-3 durante todo o período de desenvolvimento e amadurecimento do encéfalo. Neste caso, também foi possível identificar reduzido tempo de imobilidade dos animais suplementados com óleo de peixe. Este achado corrobora o que foi descrito por Naliwaiko et al (2004), onde o mesmo protocolo experimental foi utilizado, entretanto a concentração de óleo para a suplementação foi três vezes maior.

Uma vez que o desenvolvimento do sistema nervoso compreende diversas fases como multiplicação, estabelecimento e diferenciação celular, sendo o período de gestação e os primeiros meses de vida os períodos mais críticos, a suplementação durante estes períodos pode representar uma forma de garantir status funcional melhorado. A presença de efeito antidepressivo no intervalo 1 sugere que o óleo de peixe pode provocar alterações no estabelecimento de conexões sinápticas, que podem perdurar durante a idade adulta, provocando o que é conhecido como efeito residual da suplementação com ácidos graxos. A presença de efeito semelhante no intervalo 4 e de correlação com o intervalo 1, sugere ainda que a principal atuação da suplementação ocorra nos períodos do desenvolvimento refletindo na funcionalidade posterior. Embora de maneira

semelhante exista efeito no intervalo 2, não há correlação com aquele encontrado no intervalo 4, sugerindo fortemente o papel fundamental da suplementação nos períodos do desenvolvimento.

7. CONCLUSÕES

Nosso protocolo experimental permitiu identificar a presença de efeito antidepressivo, quando empregado em diversos períodos do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso. A suplementação por períodos prolongados como no intervalo 2 permite confirmar a capacidade terapêutica do óleo de peixe, até então demonstrada clinicamente. O efeito encontrado nos intervalos 1 e 4 nos permitem sugerir que o efeito do óleo de peixe se dá pela ação sobre o desenvolvimento neural, especialmente nas fases proliferativa e de maturação do sistema nervoso. A correlação entre os resultados encontrados nestes dois intervalos, nos permite sugerir a presença do chamado efeito residual do óleo de peixe, efeito este que pode sugerir a capacidade do óleo de peixe em prevenir indivíduos que se desenvolveram sob dieta rica em AGS n-3, do surgimento de neuropatias na idade avançada.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras:

- Maior tempo de suplementação e/ ou maior dose do composto ômega 3 no intervalo 3 (Adulto), para verificar se existe efeito antidepressivo em ratos suplementados após o período crítico de incorporação de AGEs.
- Identificar as possíveis alterações morfológicas no tecido cerebral, decorrentes da suplementação. Para tanto serão empregadas técnicas de microscopia de luz e eletrônica.
- Verificar se a diminuição de ácidos graxos ômega 3, em ratas prenhas devido à transferência desses para o feto, pode estar relacionado à depressão pós-parto.

- Investigar o efeito terapêutico da suplementação com óleo de peixe, utilizando modelo animal de depressão, pela exposição crônica à glicocorticóides sintéticos como a dexametasona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREASEN, **Admirável Cérebro Novo. Vencendo a doença mental na era do genoma.** Editora Artmed. 2005

BELTZ B.S; TLUSTY M.F; BENTON J.L; SANDEMAN D.C. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. **Neurosci Lett.** 2007 Mar 26; 415(2):154-8.

BEIJAMINI V; SKALISZ, L.L; JOCA, S.R; ANDREATINI R. The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. **Eur Journal Pharmacol.** 1998 Apr 17;347(1):23-7

CETIN I, KOLETZKO B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2008 May; 11(3):297-302

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences** Vol.23 No.5 May 2002

CURI, R; POMPEIA, C; MIYASAKA, C K; ARAÚJO FILHO, J P. **Entendendo a Gordura. Os Ácidos Graxos.** 1. ed. São Paulo: Manole, 2001.

DA SILVA, T.M, MUNHOZ, R.P, ALVAREZ, C; NALIWAIKO, K; KISS A, ANDREATINI, R; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders.** 2008 May 14.

EDWARDS ,R.; PEET, M.; SHAY, J.; HORROBIN D Omega- 3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients **Journal of Affective Disorders** 48 ,149–155,1998.

FRITSCHKE, K. L; HUANG, S. C; CASSITY, N. A. Enrichment of omega-3 fatty acids in suckling pigs by maternal dietary fish oil supplementation. **Journal of Animal Science** 1993. 71:1841-1847.

FAROOQUI, A.A; ONG, W.Y; HORROCKS, L.A; CHEN, P; FAROOQUI T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: the battle of the titans. **Brain Research Reviews**. 2007

FOLCH, J; LEES, M; SLOANE, S.G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. 1957 May; 226(1):497-509

HORROCKS, L A; YEO, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, Vol. 40, No. 3, 1999

HIBBELN, JR.; SALEM N. Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. **American Journal of Clinical Nutrition**;62:1-9. 1995

INNIS,S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long chain polyunsaturated fatty acids. **Jounal Pediatric**. 2003;143:S1–8.

INNIS, S.M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. **Adv Exp Med Biol** 2004; 554:27-43.

INNIS, S.M Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. **American Society for Nutrition**. J. Nutr. 137: 855–859, 2007.

KAKAR P, WATSON T, LIP, G.Y. New approaches to therapy with omega-3 fatty acids. **Current Atheroscler Rep**. 2008 Feb;10(1):79-87. Review.

LOGAN, A.C Omega-3 fatty acids and major depression: A primer for the mental health professional **Lipids in Health and Disease**. 2004; 3: 25.

MACLEAN, C.H; ISSA, A.M; NEWBERRY, S.J; MOJICA, W.A; MORTON, S.C; GARLAND, R.H; HILTON, L.G; TRAINA, S.B, SHEKELLE, P.G Function with Aging, Dementia, and Neurological Diseases. Evidence Report/ Technology Assessment No. 114. Rockville (MD): **National Library of Medicine**; 2005.

MARANGELL, L.B; MARTINEZ, J.M; ZBOYAN, H.A; KERTZ, B; KIM, H.F.S; PURYEAR, L.J: A double-blind, placebo-controlled study of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the treatment of major depression. **American Journal Psychiatry** 2003; 160:996–998

MILLS, D.E; HUANG, Y.S; NARCE,M; POISSON, J.P; *Psychosocial stress catecholamines, and essential fatty acids metabolism in rats.* **Proc Soc Exp Biol Med.** 1994; 205(1):56-61.

NALIWAIKO K, ARAÚJO R. L, DA FONSECA, R.V, CASTILHO, J.C, ANDREATINI R, BELLISSIMO M.I, OLIVEIRA B.H, MARTINS E.F, CURI R, FERNANDES L.C, FERRAZ, A.C. **Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant?** Nutr Neurosci. 2004 Apr; 7(2):91-9.

NEMETS B, STAHL, Z, BELMAKER, R.H: Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. **American Journal Psychiatry** 2002; 159:477–479

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

NESTLER, E.J; GOULD, E; MANJI, H; BUNCAN, M; DUMAN, R.S; GRESHENFELD, H.K; HEN, R; KOESTER, S; LEDERHENDLER, I; MEANEY,

M; ROBBINS, T; WINSKY, L; ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**. 2002 Sep 15;52(6):503-28. Review.

NISHIYAMA, A.N; SOUZA, J.A.; CARNELLÓS, M.; CURI, R. **HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues**. Analytical Letters, v.31, n.14, 2565-2576, 1998.

ORNELLAS, A.; ORNELLAS, L.H **Alimentação da criança. Nutrição Aplicada**. 2 edição revista e atualizada, editora Atheneu São Paulo 1983.

RAPOPORT, S.I; RAO, J.S; IGARASHI, M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. 2007 Nov-Dec;77(5-6):251-61.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development **American Journal of Clinical Nutrition**.;54:438–63. 1991

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition**, 60 (5-6) , 421-429 1999.

SIMOPOULOS, A.P.; CLELAND, L.G (eds): Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence. **World Rev Nutr Diet**. Basel, Karger, vol 92, pp I-XIII, 2003.

SMITH, T.L; GERHART, M.J. Alterations in brain lipid composition of mice made physically dependent to ethanol. **Life Sciences** 31:1419-25 , 1982

SWINGLER, D. Omega-3 fatty acids and mood Rhodes University, South Africa Abstracts / **Journal of Affective Disorders** 107 ,S21–S52, 2008

TIMONEN, T.; HORROBIN, D.; JOKELAINEN, J.; LAITINEN, A.H.; HERVA, A.; PIRKKO. R Fish consumption and depression: the Northern Finland birth cohort study **Journal of Affective Disorders** 82, 447–452,2004.

VALENZUELA, A.B; NIETO, S.K. Ácidos grasos omega-6 y omega- 3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Rev Children Pediatr.** 2003; 74: 149-57.

VISENTAINER, J.V; CARVALHO ,P.O; IKEGAKI , M; PARK , Y.K
Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciências Tecnologia e Alimentos.** v.20 n.1 Campinas, abril. 2000

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; MOSTOFSKY D. I.; Essential fatty acids and the brain: From infancy to aging **Neurobiology of Aging** 26S ,S98–S102, 2005.

YOUNG, C.; MARTIN, A.Omega-3 fatty acids in mood disorders:an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria,** v.25, n.3, p.184-187, 2003.