

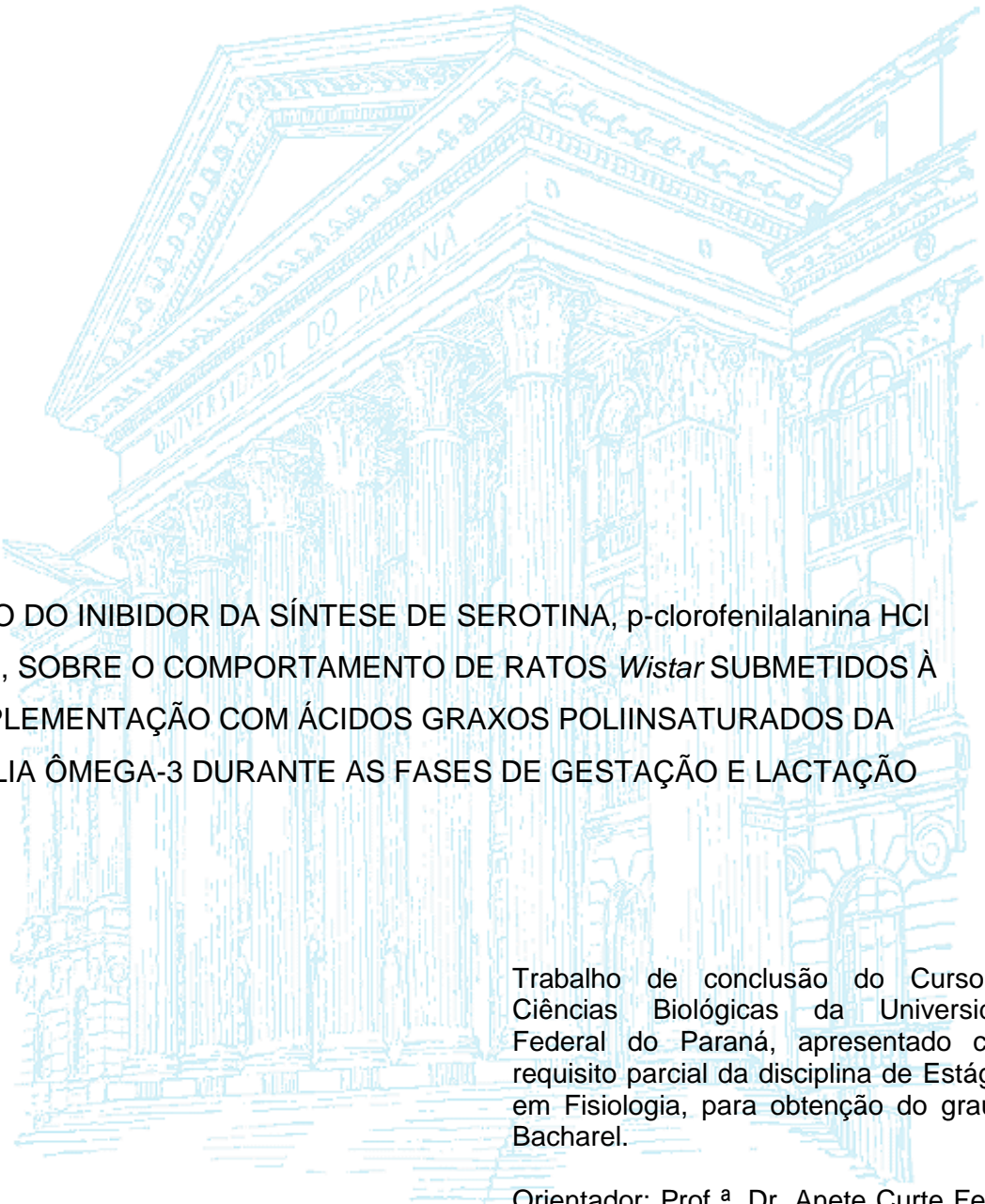
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAIS SOARES RODRIGUES

EFEITO DO INIBIDOR DA SÍNTESE DE SEROTINA, p-clorofenilalanina HCl (PCPA), SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS À SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 DURANTE AS FASES DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

CURITIBA
2011

LAIS SOARES RODRIGUES



EFEITO DO INIBIDOR DA SÍNTESE DE SEROTINA, p-clorofenilalanina HCl (PCPA), SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS À SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 DURANTE AS FASES DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial da disciplina de Estágio II em Fisiologia, para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Prof^a. Dr. Anete Curte Ferraz.

CURITIBA
2011

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Anete Curte Ferraz, por ter me acolhido no Laboratório de Neurofisiologia e por ter me orientado sempre com muita paciência e dedicação, por tudo que aprendi ao longo desses anos de iniciação científica, muito obrigada.

À minha família, pelo orgulho, apoio e confiança constantes durante todo o período da graduação; por todos os momentos que pensei em desistir, ou que desanimei, e vocês sempre tiveram palavras de conforto que me deram ânimo para continuar, meus sinceros agradecimentos.

À queridíssima e sempre prestativa mestranda Aparecida Vines, com quem aprendi muito, por ter me acompanhado em todas as etapas desta monografia, por toda a amizade que construímos, paciência, confiança mútua, apoio e ajuda, serei eternamente grata.

À doutoranda Ana Márcia Delattre, quem me guiou pelos primeiros passos do projeto, me ensinando como proceder em cada etapa, com a dedicação e calma de sempre, agradeço muito.

Aos colegas de laboratório, que fazem parte dessa grandiosa equipe, por sempre oferecerem ajuda, pela disponibilidade, vontade de aprender juntos, pelo convívio e amizade, muito obrigada a todos.

A todos os meus amigos, por todos os anos de convivência, amizade, e por todos os momentos difíceis em que me ajudaram de forma direta ou indiretamente; pela motivação e carinho constantes, vocês foram essenciais, agradeço muito.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta em todas as etapas, para que esse estudo fosse possível, muito obrigada.

SUMÁRIO

	RESUMO	
1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	Depressão	6
1.2	Ácidos graxos	8
1.2.1	Os Ácidos Graxos e sua relação com o Sistema Nervoso	8
1.2.2	Suplementação com óleo de peixe nas fases de gestação e lactação	10
1.3	Serotonina, Depressão e Óleo de peixe	11
1.4	Serotonina e PCPA	11
2.	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Animais	14
3.2	Suplementação	15
3.3	Tratamento Farmacológico	15
3.4	Testes Comportamentais	16
3.4.1	Teste da Natação Forçada Modificado	16
3.4.2	Teste do Campo Aberto	17
3.5	Avaliação Neuroquímica	17
3.6	Análise Estatística	18
4.	RESULTADOS	19
4.1	Teste da Natação Forçada Modificado	19
4.2	Teste do Campo Aberto	20
4.3	Dosagem de Serotonina	21
5.	DISCUSSÃO	23
6.	CONCLUSÃO	26
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8.	ANEXO	34

RESUMO

Vários estudos epidemiológicos mostraram que a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 (AGPIs ω -3) é inversamente relacionada com a prevalência e gravidade da depressão. É relatado que a suplementação de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA), durante os períodos de gestação e lactação, é essencial para a maturação cortical, sinaptogênese e mielinização, e também pode reduzir o risco de déficit cognitivo e psicopatologias na idade jovem adulta. O presente estudo foi dedicado a avaliar um possível envolvimento serotoninérgico no efeito antidepressivo da suplementação com óleo de peixe em ratos *Wistar* machos durante as fases de gestação e lactação. Foram examinados os efeitos do óleo de peixe nos testes da natação forçada modificado e campo aberto em ratos na idade de 90 dias tratados com uma droga inibidora da síntese de serotonina. Foram quantificados, aos 90 dias de idade, o neurotransmissor serotonina (5-HT) e seu metabólito, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Os resultados indicam um efeito antidepressivo gerado pela suplementação com óleo de peixe. Porém, os ratos tratados com p-clorofenilalanina HCl (PCPA), tiveram esse efeito revertido. Foi detectado que o conteúdo de serotonina no hipocampo está aumentado no grupo óleo de peixe enquanto a formação de 5 - HIAA encontra-se diminuída. Estes dados corroboram e ampliam a noção de que a suplementação com AGPIs é capaz de provocar efeitos antidepressivos relacionados com o aumento da neurotransmissão serotoninérgica, particularmente no hipocampo.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados, óleo de peixe, PCPA, sistema serotoninérgico.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um transtorno caracterizado por uma desordem psíquica global que provoca alterações na maneira de condução e valorização da vida (KLERMAN *et al.*, 1994). Também é conhecido como Transtorno Depressivo Maior (SADOCK e SADOCK, 2007) sendo que a recorrência estimada é considerada alta variando de 50% após um episódio até 90% para pacientes com três ou mais ocorrências.

Depressão maior é o transtorno mental mais prevalente durante a vida, que afeta 2% a 5% da população dos EUA e até 20% da população sofre de formas mais leves da doença, representando assim um grave problema de saúde pública uma vez que o risco de suicídio em pessoas depressivas corresponde a 15% (Nestler *et al.*, 2002; Ross, 2007).

Essa patologia é caracterizada pela presença de no mínimo cinco dos sintomas a seguir: humor deprimido; perda de interesse ou de anedonia; alterações de peso; insônia ou hipersonia; agitação ou retardo psicomotor; fadiga ou perda de energia; sentimento de irritabilidade ou culpa excessiva; diminuição da concentração; e ainda pensamentos de morte ou idéias suicidas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

A Organização Mundial de Saúde prevê que a depressão será, em 2020, a segunda maior causa de incapacidade entre as populações dos países desenvolvidos e a primeira causa nos países em desenvolvimento (SU *et al.*, 2003).

A depressão tem a etiologia complexa que comumente envolve a interação de fatores genéticos e ambientais (CHARNEY e MANJI, 2004) entre esses, o estresse que o indivíduo é submetido no dia a dia (MAZURE e MACIEJEWSKI, 2003; HEIM *et al.*, 2004). Por outro lado, resultados de várias pesquisas relacionam a depressão à hereditariedade e à disfunção monoaminérgica (CARLSON, 2001; KOLB e WHISHAW, 2002; SADOCK e SADOCK, 2007), que acaba por resultar na manifestação das características clínicas desta doença (ULAK *et al.*, 2010).

A hipótese monoaminérgica postula que a depressão é causada por uma diminuição da função monoaminérgica no cérebro, incluindo serotonina, noradrenalina e dopamina cerebrais (PORCELLI *et al.*, 2011).

Em 1965, o psiquiatra Joseph Schildkraut propôs a hipótese das catecolaminas, sugerindo um déficit, particularmente da noradrenalina (NA), em todas as formas de depressão. A hipótese baseava-se em estudos farmacológicos, mostrando que a ação dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase (IMAO) era mediada pelo aumento da noradrenalina na fenda sináptica. Posteriormente, surgiu a hipótese serotoninérgica (KORF e Van PRAAG, 1971), que foi impulsionada pelo desenvolvimento da classe dos antidepressivos denominados inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRI) que, por sua vez, aumentam a disponibilidade de serotonina (5-HT) na fenda sináptica. Completando o quadro da hipótese das monoaminas, Paul Willner, em 1990, propôs a hipótese dopaminérgica, que se baseia no envolvimento da dopamina (DA) na fisiopatologia da anedonia (ausência de prazer) e aumento da resposta comportamental devido ao uso continuado dos antidepressivos tricíclicos, que também atuam na neurotransmissão dopaminérgica. Finalmente, a compreensão dos mecanismos de ação dos antidepressivos complementa a hipótese das monoaminas. Atualmente, diversos estudos comprovam que hipótese das monoaminas é insuficiente para o embasamento dos mecanismos da fisiopatologia da depressão. Assim, outros neurotransmissores, incluindo o L-glutamato, neuropeptídeos como a colecistocinina e o hormônio liberador de corticotropina, também podem estar envolvidos com os transtornos depressivos (GUIZZO, 2009). Contudo, a manipulação farmacológica envolvendo a neurotransmissão das monoaminas NA, 5-HT e DA é ainda a melhor abordagem terapêutica para esta patologia.

A associação do distúrbio à deficiência das aminas biogênicas é fundamentada em resultados de exames bioquímicos que detectaram baixos níveis de norepinefrina e 5-HT no sangue, urina e líquido cefalorraquidiano de pacientes com depressão. Outro fator que corrobora essa teoria é que pode ser tratada, eficazmente, com inibidores da MAO, enzima degradadora de monoaminas e com drogas que inibem a recaptação desses neurotransmissores (CARLSON, 2001; SADOCK e SADOCK, 2007). Outro aspecto importante é a associação de baixos níveis do ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), metabólito da 5-HT, em pacientes com depressão e que possuem tendência ao suicídio (CARLSON, 2001).

1.2 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são compostos por uma cadeia de átomos de carbono aos quais estão ligados átomos de hidrogênio. Alguns ácidos graxos não possuem duplas ligações nas cadeias hidrocarbonadas, sendo classificados como saturados, enquanto outros contêm uma ou mais duplas ligações nas cadeias, os chamados ácidos graxos insaturados e poliinsaturados, respectivamente (LEHNINGER *et al.*, 1998; ROSS, 2007)

O comprimento e o grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada dos ácidos graxos determinam as propriedades físicas e as substâncias compostas pelos mesmos (LEHNINGER *et al.*, 1998; STILLWELL e WASSALL, 2003; ROSS, 2007). Desta forma, diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais são evidenciadas como consequência das diferentes posições e número de duplas ligações na cadeia hidrocarbônica dos ácidos graxos, dentre as diferentes famílias de ácidos graxos encontradas na natureza (STILLWELL e WASSALL, 2003).

Duas importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), ômega-6 (ω -6 ou n-6) e ômega-3 (ω -3 ou n-3), são caracterizadas como essenciais aos mamíferos, uma vez que estes não são capazes de sintetizar tais ácidos graxos. Como consequência, os AGPIs devem ser fornecidos pela dieta de modo a garantir um desenvolvimento adequado, além de prevenir o surgimento de certas doenças (YOU DIM *et al.*, 2000; CALDER, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002; MUSKIET *et al.*, 2006).

1.2.1 Os Ácidos Graxos e sua relação com o Sistema Nervoso

Os ácidos graxos desempenham importante papel tanto na estrutura quanto nas funções das células (WAINWRIGHT *et al.*, 1994; LEHNINGER *et al.*, 1998; ITOKAZU *et al.*, 2000; ZIMMER *et al.*, 2000; de WILDE *et al.*, 2002; BODNAR e WISNER, 2005). Os lipídios encontrados na membrana de neurônios de mamíferos têm perfil de ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa e determinam as propriedades biofísicas das membranas neuronais (JENSEN *et al.*, 1996; INNIS, 2000; BODNAR e WISNER, 2005; McNAMARA e CARLSON, 2006). Os ácidos graxos são capazes de promover alterações na função cerebral por modificarem as características físico-químicas da membrana dos neurônios, assim participando

ativamente de processos de sinalização celular por afetarem o funcionamento de receptores, a recaptação de neurotransmissores e a transmissão de sinais (FÜRST e KUHN, 2000; INNIS, 2000; de WILDE *et al.*, 2002; BODNAR e WISNER, 2005).

O ácido docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) e o ácido araquidônico (20:4n-6, AA) são AGPIs presentes nas membranas neuronais. Os precursores destes AGPIs são respectivamente os ácidos α -linolênico (18:3n-3, ALA) e linoléico (18:2n-6, LA), os quais não podem ser sintetizados *de novo* pelos mamíferos (TAKEUCHI *et al.*, 2002; SIDHU, 2003; HORROCKS e FAROOQUI, 2004). Por isso, é recomendada a adoção de uma dieta baseada numa razão de 5/1 entre LA e ALA, proporção esta longe da adotada pela maioria dos países ocidentais, os quais favorecem a ingestão de ácidos graxos n-6 (BLONDEAU e SCHNEIDER, 2006).

O DHA é o ácido graxo poliinsaturado mais comumente encontrado em sistemas biológicos. Em altas concentrações, o DHA tem sido demonstrado ser rapidamente incorporado em fosfolipídios da membrana plasmática e de mitocôndrias, e parece ter um papel vital no desenvolvimento e funcionamento destes órgãos e sistemas (SIDHU, 2003; STILLWELL, 2003). Evidências sugerem o envolvimento do DHA na regulação do estado emocional e locomotor, na atividade exploratória e em funções cognitivas em roedores (FEDOROVA e SALEM, 2006).

A presença do DHA é de extrema importância durante o desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente no último trimestre da gestação, quando da diferenciação celular e sinaptogênese ativa (BOURRE *et al.*, 1984; NEURINGER *et al.*, 1988; SCOTT e BAZAN, 1989; JUMPSEN, 1997; CARRIÉ *et al.*, 2000), e na vida pós-natal até aproximadamente os dezoito meses de idade do bebê, período em que se requer maior plasticidade anatômica (MARTINEZ e KESNER, 1991) para o rápido desenvolvimento do processo cognitivo (JENSEN *et al.*, 1996; INNIS, 2000; CARLSON, 2001; DAS, 2003; McNAMARA e CARLSON, 2006), habilidade motora (DE VRIESE, 2003; FEDOROVA e SALEM, 2006; OZIAS *et al.*, 2007) e memória espacial (CARRIÉ *et al.*, 2000).

A deficiência e a escassez de DHA podem levar a uma redução de desempenho em tarefas relacionadas à memória, acuidade visual e, ainda, a danos reprodutivos (SIDHU, 2003).

O consumo de peixe tem trazido benefícios nutricionais à saúde humana segundo dados presentes na literatura. Estudos afirmam que populações que

consomem grandes quantidades de peixe, como parte de sua dieta natural, quando comparadas com populações européias ocidentais, apresentam índices mais baixos do que o esperado de infarto do miocárdio, asma, psoríase, e diabetes, além de diminuição em doenças de proliferação celular e inflamação (FÜRST e KUHN, 2000).

Os benefícios nutricionais do consumo de peixe são devidos à presença de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos poliinsaturados essenciais, minerais (como cálcio, ferro, selênio) e vitaminas (A, B3, B6, B12, E, e D) nos tecidos dos peixes (SIDHU, 2003). Peixe ou óleo de peixe contém AGPIs da família n-3, com destaque para o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e o DHA. Dados científicos indicam que o consumo de peixe ou óleo de peixe contendo AGPIs n-3 reduz o risco de doenças cardíacas, diminui a hipertensão, e pode ainda ter papel no controle de artrite reumatóide. Além disso, o consumo de peixe ou óleo de peixe está também relacionado com o desenvolvimento apropriado dos sistemas reprodutivo, nervoso e de foto recepção (FÜRST e KUHN, 2000; SIDHU, 2003). Retardo no crescimento, sintomas neurobiológicos, lesões de pele, acuidade visual reduzida e prejuízos na capacidade de aprendizado representam sinais de dietas deficientes em AGPIs n-3 (FÜRST e KUHN, 2000).

1.2.2 Suplementação com óleo de peixe nas fases de gestação e lactação

Estudos nutricionais reportam aumento na fluidez de membrana de animais alimentados com uma dieta rica em óleo de peixe, enquanto que uma dieta pobre em DHA resultou em fluidez diminuída (STILLWELL, 2003).

Muitas pesquisas têm sido, em especial, direcionadas a investigar os efeitos da suplementação com DHA e AA, na gravidez, sobre o desenvolvimento da visão e do cérebro (DOBBING, 1997; HAMOSH e SALEM, 1998; DE VRIESE, 2003) e do sistema cognitivo e motor (JACOBSON *et al.*, 2008). Desta forma é evidenciada a importância da dieta maternal durante a gestação, uma vez que o DHA disponibilizado ao feto e ao neonato é primariamente fornecido pela mãe, através das vias transplacentária e amamentação (HOLMAN *et al.*, 1991; MAKRIDES e GIBSON, 2000; OZIAS *et al.*, 2007). A adequada disponibilidade desses ácidos graxos, em especial do DHA durante o período pré-natal e neonatal é essencial para

o ótimo desenvolvimento, função e manutenção da estrutura do sistema nervoso central (SALEM *et al.*, 2001; INNIS, 2003; INNIS, 2004; BOURRE, 2005) e plasticidade neuronal (ITOKAZU *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2008).

1.3 Serotonina, Depressão e Óleo de peixe

Quimicamente a depressão é causada por uma diminuição da quantidade de neurotransmissores liberados, como a 5-HT, responsável pela sensação de conforto e bem estar. Dessa forma, a pessoa depressiva começa a apresentar sintomas como desânimo, tristeza, falta de energia para atividades simples, entre outros (RAEDER *et al.*, 2007).

No tratamento da depressão são usados antidepressivos, que têm por objetivo inibir a recaptação dos neurotransmissores (inibidores seletivos da recaptação) e manter um nível elevado dos mesmos na fenda sináptica, além de outros antidepressivos, tricíclicos e IMAO. (BEAR *et al.*, 2008).

Pesquisadores comprovaram a interação entre baixos níveis de ácidos graxos da família ômega-3 e aumento dos índices de depressão pós-parto, sugerindo a suplementação alimentar com ômega-3 (mais especificamente o DHA) durante a gestação como método profilático para depressão pós-parto (de VRIESE *et al.*, 2002; BODNAR e WISNER, 2005). Em adição, outros estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma dieta rica em ácidos graxos poderia auxiliar na prevenção da depressão (HIBBELN, 2002; MORRIS, 2005; BOURRE, 2007). Em ratos, a ingestão prolongada de óleo de peixe demonstrou ser capaz de induzir um efeito antidepressivo com conseqüente concentração aumentada de EPA e DHA no córtex cerebral e no hipocampo (NALIWAIKO, 2004). Esses ácidos graxos, por aumentarem a fluidez de membrana, melhoram a sensibilidade dos receptores de 5-HT (BODNAR e WISNER, 2005), neurotransmissor envolvido com a gênese da depressão. Em conjunto, esses estudos suportam a relação entre os AGPIs da família ômega-3 e a depressão.

1.4 Serotonina e PCPA

A serotonina é um neurotransmissor sintetizado nos neurônios do núcleo da rafe mediana mesencefálica a partir do aminoácido triptofano. A serotonina não é

capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) por apresentar características hidrofílicas, dessa forma, é sintetizada no sistema nervoso central (SNC) Sua síntese ocorre através da captação ativa do triptofano plasmático por carreadores de aminoácidos neutros na BHE, por esta razão a variação do triptofano plasmático influencia profundamente a produção de 5-HT nos núcleos da rafe (BLUNDELL, 1992). A enzima triptofano hidroxilase, presente nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, converte o aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A seguir, o 5-HTP é descarboxilado pela enzima decarboxilase dos aminoácidos aromáticos, formando então a 5-hidroxitriptamina ou 5-HT (EATON *et al.*, 1993; AZMITIA, 1999).

A hidroxilação inicial do triptofano em 5-HTP pela enzima triptofano hidroxilase bloqueia a síntese de 5-HT O inibidor enzimático da biossíntese de 5-HT mais utilizado em trabalhos experimentais é o paraclorofenilalanina (PCPA). *In vivo*, o PCPA é inibidor reversível da enzima triptofano hidroxilase, só age dentro de um certo período de meia vida, quando incorpora-se à enzima para produzir uma proteína inativa. Esta inativação provoca depleção de estoques de 5-HT no encéfalo, tecidos periféricos e sangue (KOE e WEISSMAN, 1966; BARNES E SHARP, 1999). Seu pico de ação é alcançado rapidamente, 2-3 dias após a administração, podendo diminuir até 90% os níveis de serotonina. Ao contrario das outras drogas utilizadas para depletar a serotonina, como anfetaminas, diidroxitriptamina que são neurotoxinas, o PCPA não produz dano à inervação serotoninérgica. Mesmo com a acentuada diminuição dos níveis de 5-HT, os níveis de outras catecolaminas sofrem pouca ação desta droga (KOE, 1971).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento serotoninérgico sobre o efeito antidepressivo do óleo de peixe em ratos *Wistar* machos suplementados com óleo de peixe durante as fases de gestação e lactação e que, ao completarem 90 dias, receberam tratamento farmacológico com PCPA.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do DHA e do EPA em ratos adultos que receberam ácidos graxos ômega-3 através das mães suplementadas com óleo de peixe, através do teste de natação forçada modificado, sob o efeito do inibidor da síntese de 5-HT (PCPA);
- Avaliar, através do teste do campo aberto, possíveis implicações comportamentais do citado tratamento sobre a motricidade dos animais experimentais;
- Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do DHA e do EPA em ratos adultos que receberam ácidos graxos ômega-3 através das mães suplementadas com óleo de peixe através da dosagem dos níveis de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA no hipocampo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPR sob o número 140.

3.1 Animais

Vinte ratas fêmeas foram obtidas do biotério do Setor de Ciências Biológicas com aproximadamente 10 semanas de idade e com peso aproximado de 300g, foram mantidas em salas de pesquisa e experimentação do biotério da Universidade Federal do Paraná sob ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura ambiente controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, recebendo água e ração à vontade, e tendo a troca do cepilho e gaiolas em dias alternados.

No experimento 1, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo suplementado com óleo de peixe (OP) e grupo controle, não suplementado (C). Essas fêmeas foram utilizadas como matrizes para a obtenção de ratos *Wistar* machos, sendo 14 filhotes das matrizes do grupo OP e 14 filhotes das matrizes do grupo C. No experimento 2, outro grupo de fêmeas matrizes foi utilizado para dar origem a filhotes tanto do grupo OP quanto do grupo C (5 a 6 filhotes por grupo) para a realização de dosagem de 5-HT no hipocampo aos 90 dias de idade. Para maiores detalhes sobre o desenho experimental vide Figura 1:

Figura 1 – Desenho experimental dos grupos suplementados.

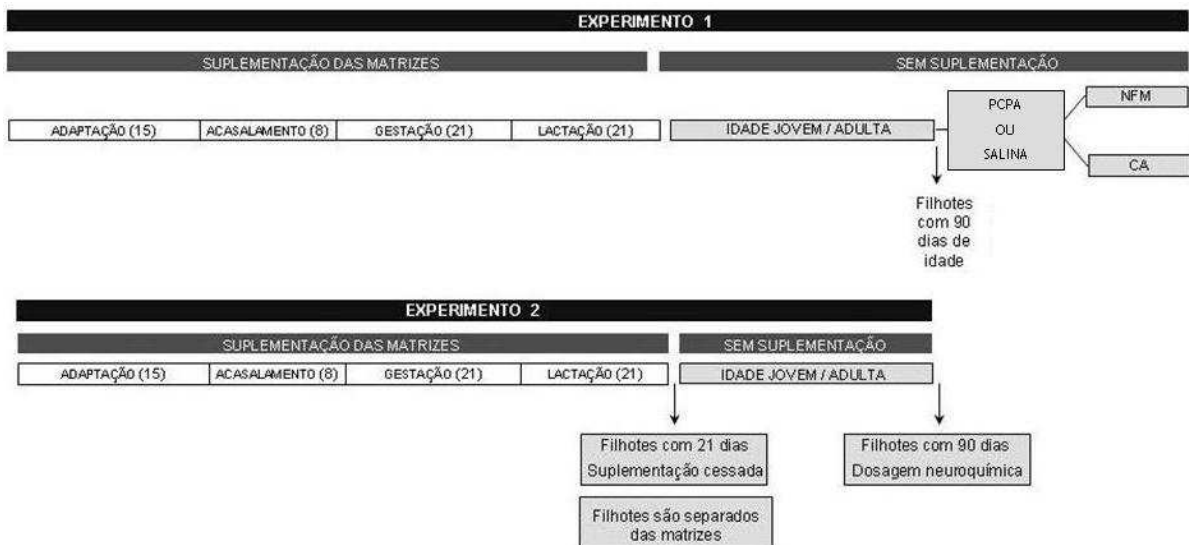


Figura 1. Linha temporal mostrando o delineamento experimental. As barras não estão representadas em escala. NFM: teste da natação forçada modificado; CA: teste do campo aberto; PCPA: paraclorofenilalanina. Número de dias correspondentes às fases da suplementação indicado entre parênteses.

3.2 Suplementação

Os animais dos grupos OP (experimentos 1 e 2) receberam, além da ração específica para animais, suplementação diária, por meio de pipeta de volume ajustável (FERRAZ *et al.*, 2008), 3,0 g/kg via oral (VO) de uma mistura de óleo de peixe composta de 12% de DHA, 18% de EPA e antioxidante tocoferol, doada pela empresa Herbarium Laboratório Botânico Ltda. O período de suplementação compreendeu uma fase de adaptação de 15 dias antes do acasalamento, e estendeu-se durante as fases de gestação e lactação até os 21 dias de vida dos filhotes. As fêmeas dos grupos C receberam apenas ração para ratos e foram suplementadas com água filtrada durante o mesmo período. Para o acasalamento foram usados ratos machos, não submetidos à suplementação, obtidos do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, os quais foram colocados com as fêmeas em gaiolas, na proporção de um macho para cada grupo de três fêmeas, onde ficaram por oito dias. Ao nascimento, foram selecionados os filhotes machos, de cada grupo, que permaneceram com as respectivas mães, no biotério, sendo amamentados normalmente até os 21 dias de vida, data em que foram desmamados, separados das mães e alojados em gaiolas, onde, a partir dessa data, passaram a receber somente ração para ratos e água à vontade, até completarem 90 dias de idade.

3.3 Tratamento Farmacológico

Após completarem 90 dias de vida, os animais do experimento 1 foram subdivididos em quatro grupos de 7 animais para o tratamento com a droga PCPA (150mg/kg i.p.).

Os grupos foram:

- C + salina (CS);
- C + PCPA (CPCPA);
- OP + salina (OPS);
- OP + PCPA (OPPCPA)

A droga PCPA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) foi preparada em solução fisiológica 0,9% com duas gotas de Tween 80. A droga ou solução salina, dependendo do grupo, foi aplicada uma vez ao dia durante 3 dias consecutivos no mesmo horário, sendo que a última injeção foi administrada 30 min antes do treino do teste da natação forçada modificado. A partir do quarto dia, os animais foram submetidos aos testes comportamentais da Natação Forçada Modificado e Campo Aberto. Imediatamente após o término dos testes comportamentais os animais foram ortotanasiados, os animais foram ortotanasiados com auxílio da guilhotina para retirada dos hipocampos, para posterior quantificação de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo de ratos suplementados ou não durante gestação e lactação.

3.4 Testes Comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados na sala de testes comportamentais do departamento de Fisiologia no período das 13 às 17 horas, respeitando-se um intervalo de cinco dias entre os testes, de modo a minimizar possíveis interferências nos mesmos.

3.4.1 Teste da Natação Forçada Modificado

O teste da natação forçada modificado foi efetuado conforme descrito por CONSONI *et al.*, (2006), modificado do método clássico proposto por PORSOLT *et al.*, (1978). Os animais foram colocados em cilindros plásticos opacos (diâmetro: 20 x altura: 50cm) preenchidos com coluna de água de 30cm, a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram submetidos a uma sessão de treino com 15 minutos de duração, e 24 horas depois do treino, passaram pelo teste com duração de 5 minutos cada animal. As sessões de testes foram gravadas via câmera posicionada sobre o cilindro para posterior análise.

Durante a sessão de teste foram mensurados os comportamentos de imobilidade (ratos que permaneceram boiando sem se movimentarem), natação (movimentos de natação através do cilindro) e escalada (movimentos para cima com as patas dianteiras sobre as paredes do cilindro). A água do aquário era trocada após os testes de cada animal, para evitar ou minimizar possíveis interferências, e

após o teste, os animais foram secados e acomodados em suas caixas de manutenção.

O teste da natação forçada tem sido usado como modelo que induz um comportamento depressivo, ou seja, o animal, ao aumentar o tempo de imobilidade neste teste, estará expressando um comportamento depressivo (CONSONI *et al.*, 2006). A análise dos comportamentos de natação e escalada nos sugerem um envolvimento serotoninérgico e noradrenérgico, respectivamente, do composto que está sendo estudado (DETKE *et al.*, 1995).

3.4.2 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena circular com 1m de diâmetro limitada por uma parede circular de 40 cm de altura, sendo a mesma iluminada por duas lâmpadas de 60 Watts. O piso é dividido em dezenove quadrantes de tamanho aproximadamente correspondente ao comprimento do animal, estando os quadrantes separados por marcas de duas áreas circulares e linhas dividindo estes círculos. A arena está circundada por uma cortina, numa tentativa de evitar que o animal veja o experimentador, o que poderia causar alterações no comportamento em andamento.

Os animais foram individualmente colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente durante cinco minutos. Durante este período, foi mensurado o número de ambulações efetuadas pelos animais, ou seja, o número de vezes que o animal transpassou as quatro patas para outro quadrante e também foi quantificado o número de explorações verticais (*rearing*), caracterizadas pelo comportamento de sustentação do animal apenas nas duas patas traseiras (CARRIÉ *et al.*, 2000; NALIWAIKO, 2004). Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10% (NAHAS, 1999; NALIWAIKO, 2004).

3.5 Avaliação Neuroquímica

Para a realização da avaliação de neurotransmissores, os animais do experimento 2 foram ortotansados por decapitação ao completarem 90 dias de idade, e seus hipocampus dissecados rapidamente sobre placa de gelo, pesados e

congelados em freezer à -80°C , até o momento de terem os níveis de 5-HT e do seu metabólito 5-HIAA, avaliados através do método de cromatografia líquida de alta precisão com detecção eletroquímica (HPLC-ED).

Estas estruturas foram homogeneizadas em 800 μL de solução contendo 0,2M de ácido perclórico, 0,1mM de EDTA (Merck) e 0,45 μM de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) como padrão interno. As mesmas foram então centrifugadas por 20 minutos a 12,000 g, e o sobrenadante foi filtrado com filtro 0,22 μm (Millex, Millipore). Deste filtrado, 10 μL de cada amostra foi injetada em auto-injetor (SIL-10 Advp; Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada por coluna de fase reversa C18 (250x4,6mm) (Shim-pack VP-ODS, 5 μm ; Shimadzu), precedida de uma coluna de proteção C18 (10x4,6mm) (Shim-pack GVP-ODS, 5 μm ; Shimadzu). A fase móvel foi preparada com água Milli-Q, 100mM de fosfato de sódio dihidrogenado, 10mM de cloreto de sódio, 0,1mM de EDTA, 0,40mM de ácido sódio-1-octanosulfônico (Sigma) e 20% metanol. O pH foi ajustado em 3,5 com ácido fosfórico. O fluxo estimado foi de 0,9mL/min, bombeado por um pistão duplo (LC-10 Advp; Shimadzu). O detector potencial foi 0,65V vs. *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Holanda). Os dados da cromatografia foram plotados usando software Class-VP (Shimadzu). O neurotransmissor 5-HT e o metabólito 5-HIAA foram identificados baseados no tempo de pico de retenção. A quantificação foi realizada por um método de padrão interno (DHBA como padrão interno) baseado na área abaixo do pico. As concentrações de 5-HT e 5-HIAA foram calculadas e expressas como ng/mg de proteína e a atividade do sistema serotoninérgico (*turnover*) foi expressa pela razão entre 5-HIAA e 5-HT.

3.6 Análise Estatística

Após a análise dos testes comportamentais, os dados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida, quando indicado, de pós-teste de Duncan. Para análise da dosagem neuroquímica foi utilizado o Teste "t" de Student. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Teste da Natação Forçada Modificado

A Figura 2 representa as frequências de imobilidade, natação e escalada dos grupos experimentais no teste da natação forçada modificado. As análises estatísticas revelam que houve uma diferença significativa entre o grupo OPS e os demais quanto ao tempo de imobilidade (Figura 2A), mostrando que a suplementação com óleo de peixe, sem a aplicação da droga PCPA, diminuiu a imobilidade desse grupo quando comparado aos demais. Sendo assim, houve um efeito da suplementação com óleo de peixe ($F(1,24)=4,68$; $p=0,04$), assim como um efeito da aplicação da droga ($F(1,24)=5,61$; $p=0,026$) e também da interação entre os dois fatores ($F(1,24)=4,68$; $p=0,04$).

Analisando a Figura 2B, nota-se que houve um aumento significativo da contagem média do parâmetro natação do grupo OPS em comparação aos demais grupos, mostrando que houve um efeito da suplementação com óleo de peixe ($F(1,24)=6,03$; $p=0,02$) assim como houve um efeito da aplicação da droga ($F(1,24)=7,04$; $p=0,01$), porém, sem nenhuma interação entre esses fatores ($F(1,24)=2,57$; $p=0,12$).

Não houve diferença significativa entre os grupos no parâmetro escalada (Figura 2C). Dessa forma, esse parâmetro não foi influenciado pela suplementação com óleo de peixe ($F(1,24)=0,70$; $p=0,79$), tampouco pela aplicação da droga ($F(1,24)=0,87$; $p=0,36$), assim como não houve interação entre esses fatores ($F(1,24)=0,70$; $p=0,79$).

Figura 2. Teste da Natação Forçada Modificado

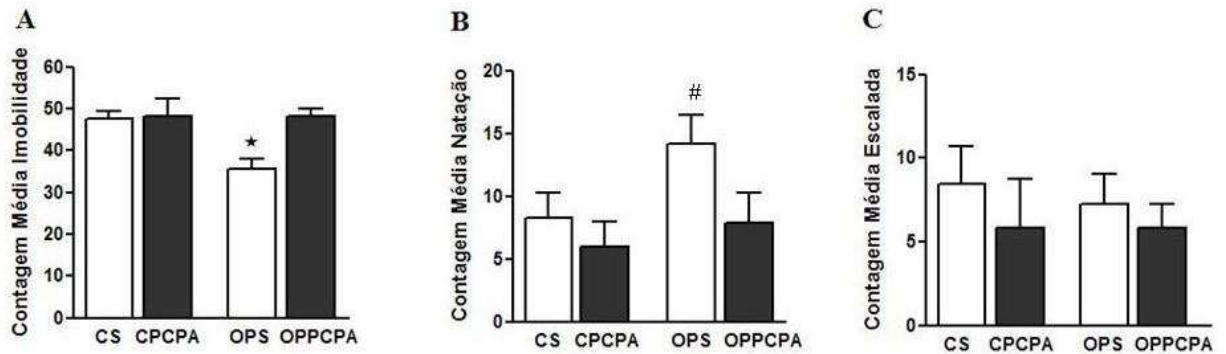


Figura 2. Efeito comportamental (frequência de imobilidade (A), natação (B) e escalada (C)) da aplicação do PCPA em animais suplementados ou não no teste da natação forçada modificado. Grupos: Controle + solução salina (CS, $n = 7$), controle + PCPA (CPCPA, $n = 7$), suplementado com óleo de peixe + solução salina (OPS, $n = 7$) e suplementado com óleo de peixe + PCPA (OPPCPA, $n = 7$). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.; * $p < 0,05$ e # $p < 0,008$ comparando o grupo OPS com os demais grupos experimentais (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

4.2 Teste do Campo Aberto

A Figura 3 apresenta a atividade locomotora (A) e exploração vertical (B) dos grupos experimentais no teste do campo aberto, mostrando que não houve diferenças estatísticas na comparação dos grupos nos dois parâmetros. A atividade locomotora não sofreu influência da suplementação com óleo de peixe ($F(1,24)=0,24$; $p=0,87$), não foi influenciada pela aplicação da droga ($F(1,24)=0,27$; $p=0,61$) e não houve interação entre os dois fatores ($F(1,24)=1,21$; $p=0,28$). A exploração vertical também não teve efeito da suplementação ($F(1,24)=0,12$; $p=0,73$), tampouco da aplicação da droga ($F(1,24)=3,03$; $p=0,09$) e também não apresentou interação entre os fatores ($F(1,24)=0,043$; $p=0,83$).

Figura 3. Teste do Campo Aberto

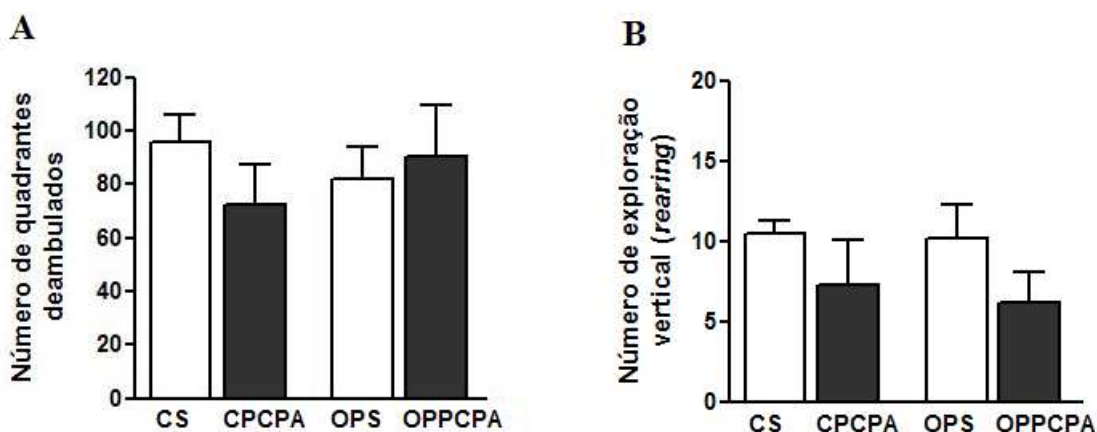


Figura 3. Efeito da aplicação do PCPA em animais suplementados ou não no teste de campo aberto. (A) representa número de quadrantes deambulados e (B) exploração vertical. Grupos: Controle + solução salina (CS, $n = 7$), controle + PCPA (CPCPA, $n = 7$), suplementado com óleo de peixe + solução salina (OPS, $n = 7$) e suplementado com óleo de peixe + PCPA (OPPCPA, $n = 7$). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

4.3 Dosagem de Serotonina

O ensaio neuroquímico do hipocampo dos animais do experimento 2 (Figura 4A) demonstrou que, em animais de 90 dias de idade, a suplementação com óleo de peixe causou um aumento da concentração de 5-HT ($t = 2,31$; $p \leq 0,04$) e uma diminuição da concentração do seu metabólito 5-HIAA ($t = 2,70$; $p \leq 0,02$).

Considerando a taxa de renovação (*turnover*) de 5-HT (Figura 4B), o óleo de peixe não causou alteração na razão 5-HIAA/5-HT ($t = 2,08$; $p \leq 0,06$).

Figura 4. Dosagem das concentrações de 5-HT e 5-HIAA (A) e *turnover* de 5-HIAA/5-HT (B) no hipocampo de animais de 90 dias de idade.

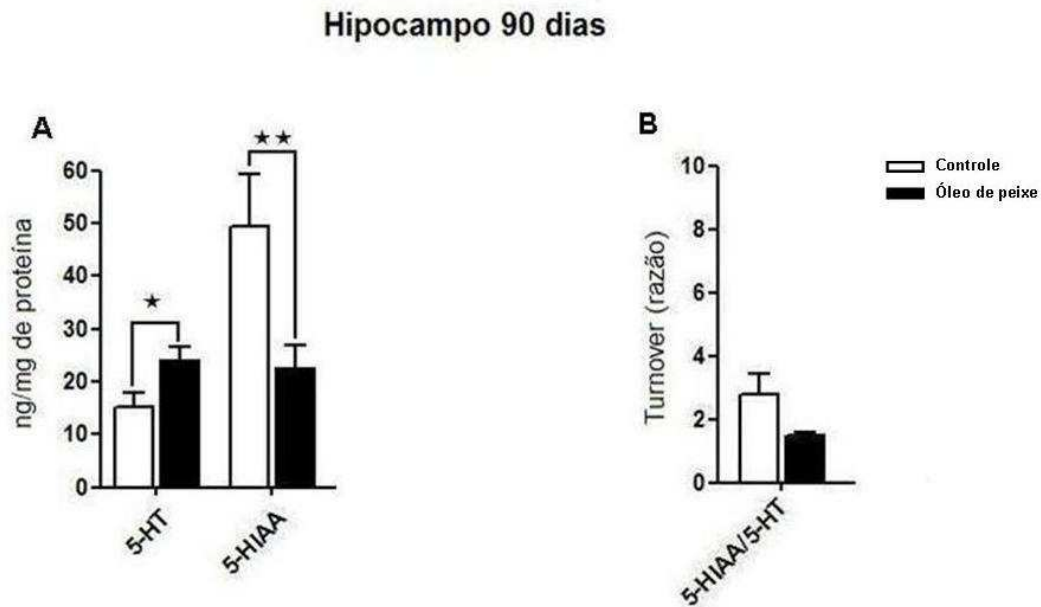


Figura 4. Avaliação neuroquímica em animais de 90 dias de vida. Neurotransmissor e seu metabólito no hipocampo (A); e sua taxa de renovação (*turnover*) (B). Teste t de Student. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M., n = 6 *p \leq 0,04; **p \leq 0,02.

5. DISCUSSÃO

A literatura aponta que o teste da natação forçada modificado (CONSONI *et al.*, 2006), é amplamente utilizado em estudos voltados à identificação de certos parâmetros característicos da depressão, pois é considerado um teste que induz um comportamento característico de imobilidade em roedores, simulando a depressão em humanos (LAKHWANI *et al.*, 2007). O teste da natação forçada modificado (NFM) pode prever a eficácia clínica de muitos antidepressivos (PORSOLT *et al.*, 1978), podendo, também, sugerir um envolvimento serotoninérgico ou noradrenérgico, respectivamente representados pelos comportamentos característicos de natação e escalada, do composto que está sendo estudado (DETKE *et al.*, 1995).

Estudo piloto realizado em nosso laboratório, com ratos suplementados e submetidos ao teste NFM, sugeriu que o efeito antidepressivo dos AGPIs n-3 envolve o sistema serotoninérgico, ao aumentar a frequência de natação. Assim, tornou-se necessário uma investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do óleo de peixe.

O óleo de peixe foi capaz de reduzir significativamente, a frequência de imobilidade, enquanto aumentou a frequência do comportamento da natação no grupo OPS comparado com os demais grupos. Esses resultados confirmam que o efeito antidepressivo do óleo de peixe está relacionado com o sistema serotoninérgico.

Os resultados do presente estudo corroboram os resultados de Hibbeln e colaboradores (2006) que sugerem que a insuficiência de ácidos graxos da família ômega-3 pode reduzir a função serotoninérgica e desenvolver comportamentos agressivos, através da disfunção do sistema límbico. Estes pesquisadores também comentam que a redução do número de neurônios e sinapses pode resultar da deficiência de ingestão de ômega-3 nos períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso central.

O neurotransmissor 5-HT está envolvido na regulação de várias funções e comportamentos do sistema nervoso central (FRAZER e HENSLER, 1999), e exerce um importante papel na regulação neural do humor (DUMAN *et al.*, 1997). Além disso, deficiências desses sistemas são relatadas em distúrbios psiquiátricos tais

como a depressão, ansiedade, doença de Alzheimer e esquizofrenia (JONES e BLACKBURN, 2002).

Os resultados demonstraram que a inibição da triptofano hidroxilase, gerada pelo PCPA, reverteu os efeitos antidepressivos atribuídos à suplementação com óleo de peixe. Analisando-se os resultados na NFM, pode-se perceber que a droga PCPA, quando aplicada ao grupo que recebeu suplementação reverteu o efeito antidepressivo apresentado pelo óleo de peixe igualando-se aos grupos controle quanto às frequências de imobilidade e natação, confirmando o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do óleo de peixe. Sugere-se, portanto que, 5-HT pode estar mais criticamente envolvida como mediador da resposta antidepressiva mediada pelo óleo de peixe.

Os resultados do teste da NFM estão de acordo com estudos anteriores, nos quais o esgotamento de 5-HT com PCPA ou destruição de neurônios serotoninérgicos com a neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina não foi capaz de alterar os valores basais em ratos submetidos ao teste da NFM (WIELAND E LUCKI, 1990; CERVO *et al*, 1991; LUCKI, 1997). Esses dados se explicam pelo fato da droga PCPA somente expressar seu efeito quando aplicada ao grupo que recebeu um antidepressivo em conjunto, como relatado em um estudo com PCPA e fluoxetina, no qual o PCPA não foi capaz de alterar os resultados dos grupos controle no teste da natação forçada, mas quando administrado em conjunto com o antidepressivo fluoxetina, expressou seu efeito (PAGE, 1999).

O teste do campo aberto foi utilizado como avaliador do nível de atividade motora dos animais, o que poderia refletir sobre o comportamento dos animais no teste da NFM. Tais resultados demonstram que o comportamento exploratório e motor dos animais não sofreu influência da suplementação prolongada com óleo de peixe, pois não houve diferenças estatísticas entre os grupos, considerando os parâmetros analisados através do teste. Desta forma, pode-se excluir a possibilidade de resultados falso-positivos no teste da NFM, validando os resultados encontrados.

Considerando os resultados da dosagem neuroquímica, sugere-se que a suplementação com óleo de peixe evitou a degradação de 5-HT nos neurônios no hipocampo de animais com 90 dias de idade, denotando a existência do efeito antidepressivo induzido pela suplementação de óleo de peixe. Os resultados

encontrados sugerem que, principalmente a neurotransmissão serotoninérgica, em detrimento da dopaminérgica ou noradrenérgica (dados não mostrados) foi modulada pela suplementação de óleo de peixe. Analogamente, os estudos envolvendo dietas deficientes em ácidos graxos poliinsaturados (durante o desenvolvimento e maturação encefálica) indicam que tal restrição pode desempenhar um papel fundamental para a disfunção do sistema serotoninérgico, que pode ter um impacto na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos (McNAMARA E CARLSON, 2006).

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos na natação e imobilidade neste estudo vêm comprovar a hipótese inicial, de que a ingestão de óleo de peixe rico em ômega-3, durante os períodos de gravidez e lactação, garante proteção contra o comportamento depressivo em ratos aos 90 dias, sugerindo que suplementação em uma fase inicial é importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Com o uso de um recurso farmacológico (PCPA) foi possível confirmar o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva do óleo de peixe, através do teste da NFM, no qual foi observado a diminuição da frequência de imobilidade e aumento da frequência de natação. Os dados corroboram e ampliam a noção de que a suplementação com AGPIs é capaz de provocar efeitos antidepressivos relacionados à inibição da degradação de 5-HT, particularmente no hipocampo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM IV – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. **American Psychiatric Press**, 4th ed. Washington, DC, 1994.

AZMITIA, E. C.. Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, 21(2s): 33S - 45S, 1999.

BARNES N.M., SHARP T.. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology** 38: 1083-1152, 1999.

BEAR, M.F.; CONNORS, BW; PARADISO, MA. Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: **ArtMed**, 3ª Edição. Cap. 22 (Transtornos Mentais), 2008.

BLONDEAU, N.; SCHNEIDER, S. M.. Les acides gras essentiels de la famille des oméga-3 et la santé de la mère et de l'enfant - Omega-3 fatty acids for mother and child health. **Nutrition clinique et métabolisme**, v. 20, p. 68–72, 2006.

BLUNDELL J.E.. Serotonin and the biology of feeding. **Am J Clin Nutr.** Jan;55(1 Suppl):155S-159S., 1992.

BODNAR, L. M.; WISNER, K. L.. Nutrition and Depression: Implications for Improving Mental Health Among Childbearing-Aged Women. **Biological Psychiatry**, v. 58, p. 679–685, 2005.

BOURRE, J.M.; PASCAL, G.; DURAND, G.; MASSOM, M.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M. Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. **Neurochem.** 43:342-348, 1984.

BOURRE, J.M. Dietary omega-3 fatty acids for women. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 105-112, 2005.

BOURRE J.M. Dietary omega-3 fatty acids for women. **Biomed. Pharmacother.** 61: 105-112, 2007.

CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, v.21, p.309-341, 2001.

CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. **Seminars in Neonatology**, 6:437-449, 2001.

CARRIÉ, I.; CLÉMENT, M.; JAVEL, D.; FRANCÈS H.; BOURRE J-M. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. **J. Lipid Res.**:41. 465-472, 2000.

CARRIE, I.; CLEMENT, M.; DE JAVEL, D.; FRANCES, H.; BOURRE, J.M.. Phospholipid supplementation reverses behavioural and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency in mice. **Journal of Lipidic Research**, v. 41, p. 473-480, 2000.

CERVO, L., GRIGNASCHI G., ROSSI C., SAMANIN R.. Role of central serotonergic neurons in the effect of sertraline in rats in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol.** 196, 217-22, 1991.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Sci. STKE.**; 5:225, 2004.

CONSONI, F.T.; VITAL, M.A.B.F.; ANDREATINI, R. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 451-458, 2006.

DAS, U.N.. Can memory be improved? A discussion on the role of ras, GABA, acetylcholine, NO, insulin, TNF-a, and long-chain polyunsaturated fatty acids in memory formation and consolidation. **Brain & Development**, v. 25, p. 251-261, 2003.

DETKE, M.J. and LUCKI, I.. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: The effects of water depth. **Behavioural Brain Research** 73: 43-46, 1995.

DOBBING, J.. Developing Brain and Behaviour. The role of lipids in infant formula. **Academic Press**, San Diego, CA Disponível em www.fcs.uga.edu/pubs/PDF/FACS01-8.pdf Acesso 15/04/2010, 1997.

DUMAN, R. S.; HENINGER, O. R.; NESTLER, E. L. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry.** 54:597-606, 1997.

EATON, M.J.; GUDEHITHLU, K.P.; QUACH, T.; SILVIA, C.P.; HADJICONSTANTINO, M. and NEFF, N.H.. Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. **J Com Neurol** 336:1-15,1993.

FEDOROVA, I.; SALEM JR., N.. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 271-289, 2006.

FERRAZ, A.C.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; NALIWAIKO, K.; PAMPLONA, J.; MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 78, p. 183-188, 2008.

FRAZER, A., HENSLER, J. G. Serotonin. In: Siegel, G. J. et al., (Eds). Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. **Lippincott. Raven Publishers, Philadelphia.**; 263-292, 1999.

FÜRST, P.; KUHN, K.S.. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? **Clinical Nutrition**, v. 19, n.1, p. 7–14, 2000.

GUIZZO, R.. Transtornos Depressivos: Uma Primeira Abordagem. INeC – Instituto de Neurociências e Comportamento, disponível em <http://www.inec-usp.org/cursos/cursolV/cursolV.htm>, 2009.

HAMOSH, M.; SALEM, N. J.. Long-chain polyunsaturated fatty acids. **Biol.Neonate**. 74:106-120, 1998.

HEIM, C.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. **Neuropsychopharmacology**. 29:641-648, 2004.

HIBBELN, J.R.. Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 69, p. 15-29, 2002.

HIBBELN, J.R.; FERGUSON, T. A; BLASBALG, T. L. Omega-3 fatty acid deficiencies in neurodevelopment, aggression and autonomic dysregulation: Opportunities for intervention. **International Review of Psychiatry**. 18(2): 107-118, April 2006.

HOLMAN, R. T.; JOHNSON, S. B.; OGBURN, P. L. Deficiency of essential fatty acids and membrane fluidity during pregnancy and lactation. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. 88: 4835-4839. jun 1991.

HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A.. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, p. 361–372, 2004.

INNIS, S.M.. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. **Developmental Neuroscience**, v.22, p.474-480, 2000.

INNIS, S.M.. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **J Pediatr**, 143: 51-58, 2003.

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

ITOKAZU, N.; IKEGAYA, Y.; NISHIKAWA, M.; MATSUKI, N.. Bidirectional actions of docosahexaenoic acid on hippocampal neurotransmissions *in vivo*. **Brain Research**, v.862, p.211-216, 2000.

JACOBSON, J. L.; JACOBSON, S. W.; MUCKLE, G.; KAPLAN-ESTRIN, M.; AYOTTE, P.; DEWAILLE, E. Beneficial effects of a polyunsaturated fatty acid on infant development: evidence from the inuit of Artic Quebec. **J Pediatr.**; 152:356-64, 2008.

JENSEN, M.M.; SKARSFELDT, T.; HOY, C.E.. Correlation between level of (n-3) polyunsaturated fatty acids in brain phospholipids and learning ability in rats. A multiple generation study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1300, p. 203-209, 1996.

JONES, B. J.; BLACKBURN, T. P. The medical benefit of 5-HT research. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 71:555-568, 2002.

JUMPSSEN, J.; LIEN, E. L.; GOH, Y. K.; CLANDININ, M. T. Small changes of dietary (n-6) and (n-3) fatty acid content ration alter phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine fatty acid composition during development of neuronal and glial cells in rats. **J. Nutr.**;127:724-31,1997.

KLERMAN, G.; WEISSMAN, M.M.; FRANK, E.; KOCSIS, J.H.; MARKOWITZ, J.C.; MONTGOMERY, S. Evaluating Drug Treatments of Depressive Disorders in: **Clinical evaluation of psychotropic drugs: principles and guidelines**. Ed R.F. Prien and D.S. Robinson. Raven Press, Ltd. New York, 1994.

KOE, B.K., WEISSMAN, A.. *p*-chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin **J. Pharmacol.** Vol. 154, no 3: 499-516,1966.

KOE, B.K. Tryptophan hydroxylase inhibitors.. **Federation Proceedings**, vol 30, no 3, 886-896, 1971.

KORF. J. & PRAAG, H.M. VAN. Amine metabolism in human brain; further evaluation of the probenecid test. **Brain Res.**, 35, 221-230, 1971.

LAKHWANI, L.; TONGIA, S. K.; PAL, V. S.; AGRAWAL, R. P.; NYATI, P.; PHADNIS, P. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in *wistar* rats. **Acta Pol Pharm.** 64(3):271-6, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Ed. Sarvier. p.179-197, 1998.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav Pharmacol.** 8, 523-32, 1997.

MAKRIDES, M.; GIBSON, R. A. Long chain polyunsaturated fatty acids requirements during pregnancy and lactation. **Am J Clin Nutr**; 71 (suppl):307S-11S, 2000.

MARTINEZ JR.; J.L.; KESNER, R.P. **Learning and Memory-A Biological View**. 2 ed. California: Academic Press, Inc., 563p, 1991.

MAZURE, C. M., MACIEJEWSKI, P. K. The interplay of stress, gender and cognitive style in depressive onset. **Arch. Womens Ment. Health.** 6:5-8, 2003.

MCNAMARA, R.K.; CARLSON, S.E.. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention

of psychopathology. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 329–349, 2006.

MORRIS, M.C.; EVANS, D.A.; TANGNEY, C.; BIENIAS, J.; WILSON, R.S.. Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. **Archives of Neurology**, v. 62, 2005.

MUSKIET, F. A. J.; VAN GOORA, S. A.; KUIPERSA, R. S.; VELZING-AARTSA, F. V.; SMITA, E. N.; BOUWSTRAB, H.; DIJCK-BROUWERA, D. A. J.; BOERSMAC, E. R.; HADDERS-ALGRAB, M.. Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 135–144, 2006.

NAHAS, T.R. O teste do campo aberto. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo:Plêiade, p.197-215, 1999.

NALIWAIKO, K.; ARAÚJO, R.L.F.; FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; FERNANDES, L.C.; MARTINS, E.F.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; CURI, R.; FERRAZ, A.C. Fish oil and central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v. 7, 91-99, 2004.

NEURINGER, M.; ANDEERSON, J.; CONNOR, W. E.. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu. Rev. Nutr.* 8:517-541,1988.

OZIAS M. K.; CARLSON, S. E.; LEVANT B. Maternal parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. **J. Nutr.** 137: 125-129, 2007.

PAGE, M. E., Detke, M. J., DALVI, A., KIRBY, L. G., LUCKI, I.. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 147, 162-7, 1999.

PORCELLI, S.; DRAGO, A.; C. FABRI; SERRETTI, A.. Mechanisms of antidepressant action: An integrated dopaminergic perspective. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 35. 1532–1543, 2011.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v.47, p. 379-391, 1978.

RAEDER, M. B.; STEEN, V. M.; VOLLSET, S. E.; BJELLAND, I.. Associations between cod liver oil use and symptoms of depression: The Hordaland Health Study. **Journal of Affective Disorders**, v. 101, 245–249, 2007

ROSS, B. M.. ω -3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 515–524, 2007.

SADOCK, B.J.; SADOCK, V.A. Kaplan, Compêndio de psiquiatria. Ciência do comportamento e psiquiatria clínica. **ARTMED**, 9ª ed Porto Alegre: 2007.

SALEM Jr, N.; LITMAN, B.; KIM, H-Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. 2001. **Lipids**, 36, 945-979, September, 2001.

SCOTT, B. L., BAZAN, N.. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86: 2903-2907, 1989.

SIDHU, K. S.. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 38, p. 336–344, 2003.

STILLWELL, W.; WASSALL, S. R.. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 1–27, 2003.

SU, K.P.; HUANG, S.Y.; CHIU, C.C.; SHEN, W.W.. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, 267-271, 2003.

TAKEUCHI, T.; FUKUMOTO, Y.; HARADA, E.. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 131, p. 193–203, 2002.

TAPIERO, H.; BA, G. N. ; COUVREUR, P.; TEW, K.D.. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215–222, 2002.

ULAK, G., MUTLU, O., TANYERI, P., KOMSUOGLU, F. I., AKAR, F. Y., ERDEN, B. F.. Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of TRIM in the rat forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav**. 95, 308-14, 2010.

de VRIESE, S.R.; CHRISTOPHE, A.B.; MAES, M.. Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: Further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. **Life Sciences**, v. 73, 3181-3187, 2003.

WAINWRIGHT, P.E.; HUANG, Y.-S.; BULMAN-FLEMING, B.; LÉVESQUE, S.; MCCUTCHEON, D.. The effects of dietary fatty acid composition combined with environmental enrichment on brain and behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 60, p. 125-136, 1994.

WIELAND, S., LUCKI I. Antidepressant-like activity of 5-HT_{1A} agonists measured with the forced swim test. **Psychopharmacology** (Berl). 101, 497-504, 1990.

de WILDE, M. C.; FARKAS, E.; GERRITS, M.; KILIAAN, A. J.; LUITEN, P. G. M.. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular

parameters in chronic cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, v. 947, p. 166–173, 2002.

YOU DIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A.. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 383-399, 2000.

ZIMMER, L.; VACANSSEL, S.D.; DURAND, G.; GUILLOTEAU, D.; BODARD, S.; BESNARD, J.C.; CHALON, S.. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3-polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 32-40, 2000.

8. ANEXO

Accepted Manuscript



Title: The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism

Authors: Aparecida Vines, Ana Marcia Delattre, Marcelo M.S. Lima, Laís Soares Rodrigues, Deborah Suchecki, Ricardo B. Machado, Sergio Tufik, Sofia I.R. Pereira, Sílvia M. Zanata, Anete Curte Ferraz

PII: S0028-3908(11)00261-9

DOI: [10.1016/j.neuropharm.2011.06.017](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.06.017)

Reference: NP 4297

To appear in: *Neuropharmacology*

Received Date: 19 April 2011

Revised Date: 14 June 2011

Accepted Date: 17 June 2011

Please cite this article as: Vines, A., Delattre, A.M., Lima, M.M., Rodrigues, S., Suchecki, D., Machado, R.B., Tufik, S., Pereira, S.I., Zanata, SílviaM., Ferraz, A.C. The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism, *Neuropharmacology* (2011), doi: [10.1016/j.neuropharm.2011.06.017](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.06.017)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.