

HÉLIDY MARIA ROSSI SALLES

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO ÓLEO DE PEIXE
EM RATOS DA GERAÇÃO F₀**

Curitiba, 21 de julho de 2004

HÉLIDY MARIA ROSSI SALLES

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO ÓLEO DE PEIXE
EM RATOS DA GERAÇÃO F₀**

Trabalho de monografia apresentado ao curso de Ciências Biológicas, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob orientação da Professora Doutora Anete Ferraz e co-orientação da Professora M. Sc. Katya Naliwaiko.

Curitiba
2004

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luís Alberto e Creusa, que me
ajudaram e apoiaram em todos os
momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a orientação e amizade das professoras Anete C. Ferraz e Katya Naliwaiko, que não mediram esforços para me ajudar e aceitaram a missão de orientar e co-orientar este trabalho.

Agradeço também ao empenho e auxílio das meninas do laboratório: Ágata, Ju e Renata. A ajuda de vocês foi de suma importância em todas as fases deste trabalho.

À colega Evelise, pelo auxílio na busca do estágio e por sempre se manter por perto, disposta a ajudar em qualquer coisa que fosse preciso.

Aos amigos Godri, Liana, Barbara e Carol que me agüentaram, em especial nesses últimos meses, e que doaram seu tempo e amizade para me ajudar, não só com a monografia, mas também com todas as outras milhões de tarefas que tivemos que realizar.

Agradeço a simples existência das minhas "primas-amigas-irmãs" Beta, Zá, Tata e Lola. À Camila, pela amizade incondicional, e ao Dhiego, pelo carinho e atenção dedicados.

Ao meu irmão, Luís Henrique, que mesmo não estando presente está sempre em meus pensamentos.

Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida, que me deram o dom da vida, carinho e amor, e que sempre estiveram presentes e dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Finalmente agradeço a Deus, por iluminar e estar sempre presente na minha vida.

*“Seremos aquilo que formos capazes
de sonhar, crer, ousar e realizar.”*
(Samuel Lago)

SUMÁRIO

RESUMO	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	12
MATERIAIS E MÉTODOS	13
1. ANIMAIS	13
2. SUPLEMENTAÇÃO	13
3. TESTES COMPORTAMENTAIS	14
3.1 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	14
3.2 - TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA.....	14
3.3 - TESTE DO CAMPO ABERTO	15
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
RESULTADOS	16
1. INCREMENTO DE MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS	16
2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	17
3. TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA	18
4. TESTE DO CAMPO ABERTO	19
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	29
1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	29

RESUMO

Os ácidos graxos são moléculas formadoras de triacilgliceróis e de outros lipídios do nosso organismo. Duas importantes famílias de ácidos graxos são o ômega-3 e ômega-6, classificadas na categoria das gorduras insaturadas. A diminuição de ômega-3 na dieta pode causar alterações na composição dos glicerofosfolipídeos cerebrais, uma vez que eles são um dos principais componentes das membranas celulares cerebrais. Trabalhos epidemiológicos foram realizados relacionando o consumo de peixes com a prevalência da depressão e esses sugeriram que em países onde há maior consumo de ácidos graxos ômega-3, através da ingestão de peixes, há diminuição considerável no quadro de pessoas com desordens depressivas. Estima-se que, aproximadamente 10% a 15% da população humana sofra atualmente de desordens de humor ou algum tipo de depressão. Este trabalho teve como objetivo principal verificar se a suplementação com óleo de peixe em ratos da geração F_0 exerce efeito antidepressivo sobre os mesmos. Após a realização de testes comportamentais como a natação forçada, labirinto em cruz elevado e campo aberto, foi possível sugerir que a suplementação crônica, com acréscimo de apenas 0,3% de ácidos graxos da família ômega-3 na alimentação, pode representar um potencial antidepressivo e, portanto, proteger os indivíduos testados ao desenvolvimento de neuropatologias, como a depressão.

Palavras chave: óleo de peixe, ômega-3, depressão

INTRODUÇÃO

Os lipídeos podem ser definidos como um grupo de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos, não possuem algum grupo funcional comum, mas são caracterizados pela sua alta solubilidade em solventes não polares e baixa solubilidade em água. Podem ser encontrados em todos os tipos de tecidos, sendo os principais constituintes das membranas das células e das mitocôndrias. Ainda como principais funções está sua utilização como material de reserva energética, atuação como isolantes térmicos e elétricos, a responsabilidade pelas interações enzimáticas e a grande importância na constituição de hormônios, na comunicação inter e intracelular e no armazenamento de vitaminas lipossolúveis (Murray et al, 1998; Marzzoco & Torres, 1990).

Apesar de ser um grupo bem particular, os lipídeos normalmente aparecem combinados com outras classes moleculares, como carboidratos ou proteínas, formando glicolipídeos ou lipoproteínas, por exemplo.

Os ácidos graxos são moléculas derivadas dos ácidos carboxílicos, formadores dos triacilgliceróis e de outros lipídios, ou gorduras, do nosso organismo. (Lehninger, 2002). Apresentam uma região polar, formada pelo grupo carboxila, e uma apolar, formada por uma cadeia de carbonos e hidrogênios ligados entre si. Essa cadeia pode ter tamanhos variados e possuir ou não dupla ligações. Quando não possuem dupla ligação são classificados como saturados, possuindo apenas uma dupla ligação chamam-se monoinsaturados, e se tiverem duas ou mais são conhecidos por poliinsaturados. Esses podem ser sub-divididos em duas famílias de acordo com a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica. A família *ômega-6* (ω -6 ou n-6), é caracterizada por apresentar a primeira insaturação no sexto carbono contando a partir do carbono ω (carbono metílico, o último da cadeia), e a família *ômega-3* (ω -3 ou n-3), por apresentar a primeira insaturação no terceiro carbono. (Harper, 1998; Murray et al, 1998; Youdim et al, 2000).

Os ácidos graxos das famílias n-3 e n-6 são formados a partir de ácidos graxos ditos precursores. Para cada família tem-se um precursor que é específico, sendo convertido em outros ácidos graxos da mesma série através de sucessivas reações enzimáticas, onde ocorre adição de novos carbonos e insaturações à cadeia original (Lehninger, 2002). O ácido α -linolênico (LNA) é o precursor da família n-3 e o ácido Linoléico (LA), da família n-6. Estes dois precursores são chamados de

essenciais, uma vez que não são sintetizados no organismo de mamíferos e devem ser adquiridos pela dieta. Devido às suas particularidades as duas famílias não podem ser interconvertidas, ou seja, um ácido graxo da série n-6 não pode ser convertido em um da série n-3, e vice-versa (Calder, 2001).

Vários estudos estão sendo realizados para se determinar qual a melhor dose de ácidos graxos essenciais é necessária para melhor função do organismo. Youdim et al (2000) diz que cerca de 0,5–1% de LNA são necessários para a síntese de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), dois ácidos graxos de cadeia longa da família n-3, muito importantes para os tecidos neurais e visuais. O DHA é o principal ácido graxo encontrado no Sistema Nervoso Central (SNC) e na retina (Youndim et al, 2000). Tanto o DHA, quanto o Ácido Araquidônico (AA), derivado da família n-6, estão associados ao glicerol formando macromoléculas denominadas fosfoglicerolipídeos, que compõem a bicamada lipídica das membranas das células do organismo. Estes ácidos graxos são importantes não só por constituírem a estrutura das membranas celulares, mas também por participarem de processos bioquímicos tais como: regulação de canais iônicos, de receptores, de atividade enzimática e de apoptose (Farooqui et al, 2000; Youdim et al, 2000).

A diminuição de n-3 na dieta pode causar alterações na composição dos glicerofosfolipídeos cerebrais, uma vez que eles são um dos principais componentes das membranas celulares cerebrais. Isso pode causar prejuízos na fluidez da membrana, afetando a liberação e a recaptação dos neurotransmissores na fenda sináptica (Murphy, 1990). Segundo Maidment (2000), essas alterações podem estar associadas com o aparecimento de doenças neurológicas como a esquizofrenia e a depressão. Edwards et al (1998) e Young & Martin (2003) relatam em seus estudos o envolvimento dos ácidos graxos com o surgimento da depressão, mostrando que pacientes depressivos apresentam diminuição dos níveis do DHA nas membranas de seus eritrócitos, o que poderia relacionar a quantidade destes no SNC.

A depressão é uma patologia de caráter abrangente, podendo, inclusive, surgir em vários quadros clínicos, como demência, esquizofrenia, doença de Parkinson e câncer (Aronson, 2001; Farooqui, 2000). Como doença pode ser relacionada como transtorno depressivo maior, melancolia, distímia (depressão crônica), depressão integrante do transtorno bipolar do tipo I e II (quando essa está associada à mania), depressão como parte da ciclotímia... (Del Porto, 1999).

A depressão caracteriza-se essencialmente por alterações do humor e do afeto, em geral acompanhadas de sintomas cognitivos, comportamentais e até físicos. O humor deprimido está presente em mais de 90% dos casos e costuma ser descrito como sentimentos de tristeza, vazio ou desesperança, que os pacientes com frequência consideram diferentes da tristeza normal. Queixas de ansiedade, irritabilidade e preocupação também são comuns, assim como desinteresse ou perda da capacidade de sentir prazer nas atividades habituais. Podem surgir sentimentos de culpa e redução da auto-estima. Além disso, cerca de 70% das pessoas com depressão apresentam redução do apetite com perda de peso e, em torno de 80% se queixam de mudanças no sono. Destes, a maioria apresenta insônia terminal, despertando horas antes do necessário (Calil & Guerra, 2004).

Estima-se que, aproximadamente 10% a 15% da população humana sofra atualmente de desordens de humor ou algum tipo de depressão, sendo que a prevalência de mulheres com a doença é de duas a três vezes maior que em homens. A Organização Mundial de Saúde estima que 121 milhões de pessoas sofram de depressão atualmente e projeta que, em 2020, a doença será a segunda causa de incapacitação física e profissional, perdendo apenas para a doença cardíaca isquemia. Hoje, a incapacitação provocada pela depressão se iguala à de doenças como hipertensão arterial, diabetes e artrite. (Young & Martin, 2003; Calil & Guerra, 2004).

Existem várias teorias que tentam explicar como a depressão ocorre, dentre elas, a mais utilizada é a chamada “Teoria monoaminérgica da Depressão” (Schildkraut, 1965; Meltzer & Lowy, 1987; Siever, 1987; Ashton, 1992), a qual foi proposta na década de 1950, quando duas substâncias (iproniazida e imipramina), anteriormente utilizadas com outras finalidades, apresentaram efeitos antidepressivos em pacientes com distúrbios de humor. Alguns neurotransmissores como a noradrenalina, a serotonina e a dopamina fazem parte dessa classe de substâncias. A teoria da monoamina está relacionada com a baixa concentração desses neurotransmissores, em especial a serotonina e a noradrenalina, em certos locais do cérebro. Apesar dessa hipótese não ser mais sustentável como esclarecimento para a depressão, pois apresenta várias lacunas na sua explicação, a manipulação farmacológica da transmissão da monoamina continua sendo a abordagem terapêutica mais utilizada e bem sucedida (Rang, 1997; Calil & Guerra, 2004).

Muitas pesquisas têm buscado novas terapias para esse tipo de enfermidade. Não é difícil encontrar medicamentos usados como antidepressivos, como os tricíclicos, o lítio, os inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRSs) e os inibidores da enzima monoamina-oxidase (IMAOs), por exemplo. Porém, a maioria desses medicamentos apresenta um alto índice de efeitos colaterais. Outros problemas com essas drogas são a tolerabilidade, o custo, e o fato de apenas 50% dos pacientes responderem a estes fármacos (Souza, 1999; Nestler et al., 2002; Calil & Guerra, 2004).

Trabalhos epidemiológicos foram realizados relacionando o consumo de peixe com a prevalência da depressão. Esses trabalhos sugerem que em países onde há maior consumo de ácidos graxos n-3, através da ingestão de peixes como o salmão ou a sardinha, por exemplo, há diminuição considerável no quadro de pessoas com desordens depressivas. Tanskanen (2001b) e Freeman (2000) sugerem em seus trabalhos que uma dieta rica em ácidos graxos da família n-3 pode auxiliar na prevenção da doença. Em países como o Japão, onde o consumo anual de peixe é de aproximadamente 68 kg por pessoa, o índice de prevalência da depressão é de 0,12%. Já na Alemanha, onde o consumo anual de peixe é menor que 13 kg por habitante, o índice de pessoas depressivas sobe para 5% (Young & Martin, 2003).

A investigação do perfil lipídico de eritrócitos em pacientes depressivos tornou-se importante ferramenta para confirmar a relação existente entre o perfil de ácidos graxos no cérebro e o desenvolvimento neuropatologias. Além dos trabalhos desenvolvidos para investigar os possíveis efeitos do óleo de peixe como agente terapêutico nas desordens de humor, muitos trabalhos vêm investigando a relação existente entre o início da depressão e possíveis alterações no perfil lipídico de pacientes depressivos (Edwards et al,1998). Inclusive, Young & Martin (2003) relatam em seu trabalho uma pesquisa em que o óleo de peixe foi utilizado como antidepressivo. Os pacientes do grupo óleo de peixe apresentaram melhoras significativas quando comparados com os do grupo controle (placebo).

Trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório sugeriram efeito antidepressivo do n-3 em ratos cronicamente suplementados durante a gestação, lactação e até atingirem a fase adulta. As progenitoras destes animais foram submetidas à suplementação com n-3 durante a gestação e a amamentação (Naliwaiko, et al., 2003a/2004). Estes trabalhos corroboram os achados de Hibbeln, (2002), Arterburn et al., (2000), Wilde et al. (2002), entre outros.

Sabendo-se que a suplementação com óleo de peixe, durante as fases de gestação, amamentação até a fase adulta representou importante suporte nutricional e comportamental, o qual pode representar possível diminuição da susceptibilidade do indivíduo desenvolver depressão, conforme os resultados obtidos em nosso laboratório (Naliwaiko et al., 2004), decidiu-se averiguar se a suplementação com n-3 apenas durante o período que compreende desde pós desmame até a fase adulta desses ratos (animais da geração F₀), poderia reproduzir os resultados encontrados anteriormente.

OBJETIVOS

- 1) Investigar o efeito antidepressivo do óleo de peixe em ratos suplementados com esse óleo, desde o desmame até a fase adulta, através do teste comportamental da natação forçada.
- 2) Avaliar possíveis alterações na função cerebral, decorrentes da suplementação com óleo de peixe no período compreendendo desmame à fase adulta, através de testes comportamentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho está vinculado ao Projeto “Efeito da Suplementação Alimentar com Óleo de Peixe Sobre a Função Cerebral em Ratos”, aprovado em 09/09/2003 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o processo 23075.35304/2003-01.

1. ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados 42 ratos Wistar obtidos no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com idade aproximada de 21 dias cada um. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, com temperatura ambiente controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob o ciclo de claro/escuro (12h/12h), com água e ração *ad libitum* dos 21 até os 90 dias de idade. Durante este período receberam suplementação específica, formando três grupos experimentais (14 animais/grupo):

- ✓ Grupo óleo de Peixe (OP) - recebeu diariamente 3.0 g/kg de composto de extratos marinhos rico em ácidos graxos n-3 (doados gentilmente pela Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A), contendo 180mg de EPA, 120mg de DHA e antioxidante tocoferol.
- ✓ Grupo gordura de coco (GC) – recebeu diariamente 3,0g/kg de gordura de coco (Gordura de coco Brasil, RMB Ltda.).
- ✓ Grupo Controle (GC) – Não recebeu qualquer suplementação, sendo alimentado com ração própria para ratos (Nuvilab CR₁ – Nuvital nutrientes S/A).

2. SUPLEMENTAÇÃO

Os ratos foram suplementados por via oral diariamente através de uma técnica semelhante à gavagem, porém, nesta era utilizada uma pipeta de volume ajustável, introduzida na boca do animal. O grupo controle (sem suplementação) foi manuseado diariamente para mimetizar o possível estresse sofrido pelos demais grupos. Também a cada dois dias os animais eram pesados em balança digital,

marca GEHAKA, modelo BG-4001. Após o tratamento, todos os grupos foram submetidos a testes comportamentais.

3. TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados no período entre 13:00h e 18:00h. Para minimizar possíveis interferências entre os testes, foi estabelecido um intervalo de até uma semana entre eles.

3.1 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado é realizado num aparelho que consiste de dois braços abertos e dois braços fechados (45 x 15cm), unidos entre si por uma região central (15x15cm), formando uma cruz. O labirinto encontra-se elevado a uma altura de 70cm do solo, numa sala com temperatura controlada e iluminada por uma lâmpada vermelha.

O comportamento dos animais é avaliado durante 5 minutos. Ele é colocado na região central do labirinto e durante esse período um observador mensura o número de entradas nos braços abertos e fechados e, com o auxílio de um cronômetro, o tempo de permanência nesses braços. Após o teste de cada animal, o aparelho é limpo com solução de etanol a 10%.

Os dados foram expressos como porcentagem de permanência nos braços abertos e fechados e como porcentagem do número de entradas nestes braços (Pellow et al, 1985). Após o teste do labirinto em cruz elevado os animais foram submetidos ao teste da natação forçada.

3.2 - TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA

Para a realização do teste da natação forçada foram utilizados aquários de vidro (20x20x40cm), preenchidos com coluna de água de 15cm, a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os animais passaram, inicialmente, por uma sessão de treino com 15 minutos de duração e 24 horas depois, a uma sessão de teste com duração de 5 minutos. Apenas os dados da sessão de teste foram analisados. Foi mensurado o tempo de imobilidade de cada animal, ou seja, quando paravam de nadar ou permaneciam

boiando sem se movimentarem. A água do aquário foi trocada após cada animal ser testado, com o objetivo de minimizar possíveis interferências. Após o teste os animais foram secos e acomodados nas caixas plásticas.

O procedimento realizado foi descrito por Benjamini et al., (1998), alterado do método proposto por Porsolt et al., (1978). Finalizando esse teste os animais foram avaliados no campo aberto.

3.3 - TESTE DO CAMPO ABERTO

A arena circular, utilizada no teste do campo aberto, possui 1m de diâmetro e o piso dividido em 19 quadrantes. Esses quadrantes são separados por marcas de duas áreas circulares e linhas dividindo esses círculos. A arena é limitada por uma parede circular de 40cm de altura, sendo iluminada por uma lâmpada branca de 60 Watts.

Os animais foram colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente durante 5 minutos. Foram avaliadas as ambulações efetuadas pelos animais durante o período de teste. Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10%.

Após a realização do último teste, os animais foram sacrificados por decapitação. Foram retirados o córtex cerebral e o hipocampo para posterior dosagem de conteúdo lipídico, de neurotransmissores e para mensuração das taxas de peroxidação lipídica.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de resultados paramétricos foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via. Os dados não paramétricos foram expressos como mediana e intervalos inter-quartís (Q25/Q75) e analisadas por Kruskal-Wallis ANOVA, seguido pelo pós teste de Dunn (Siegel, 1975). Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. INCREMENTO DE MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

A figura 1 mostra a curva de desenvolvimento da massa corpórea dos animais suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco e animais controle. A massa no dia do desmame foi considerada como sendo 100%. Não houve diferenças significativas na massa dos três grupos de animais (ANOVA de uma via: $F = 0,381$; $p = 0,6841$).

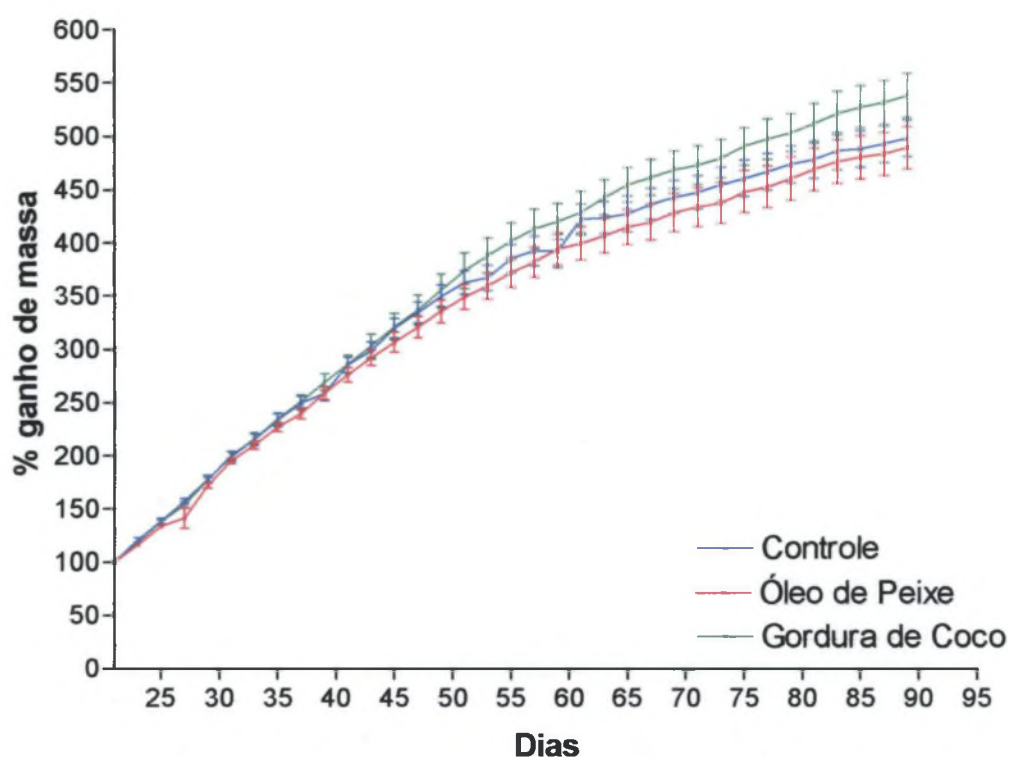


Figura 1. Aumento na massa dos animais dos grupos controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco. Os dados apresentados em porcentagem estão com média \pm Erro Padrão da Média (EPM) de 14 animais em cada grupo experimental.

2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado. Quatro variáveis foram analisadas: % do número de entradas nos braços abertos e fechados e % do tempo de permanência nesses braços. Não houve diferença significativa no comportamento dos animais suplementados com óleo de peixe quando comparados com os animais controle ou suplementados com gordura de coco em relação ao número de entradas nos braços abertos ($F= 0,1118$; $p= 0,8945$) e nos braços fechados ($F= 0,3625$; $p= 0,6982$). O mesmo acontece com o tempo despendido nos braços abertos ($F= 0,3276$; $p= 0,7226$) e fechados ($F= 0,4421$; $p= 0,6458$).

Tabela 1: COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E SUPLEMENTADOS COM GORDURA DE COCO OU ÓLEO DE PEIXE, NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.

Labirinto em Cruz Elevado					
	número absoluto de entradas nos braços fechados	% do número de entradas nos braços abertos	% do número de entradas nos braços fechados	% do tempo despendido nos braços abertos	% do tempo despendido nos braços fechados
Controle	5,8 ± 0,57	37,29 ± 5,4	62,89 ± 5,4	29,82 ± 6,3	50,87 ± 6,4
Óleo de Peixe	5,4 ± 0,80	45,54 ± 6,4	54,45 ± 6,4	37,48 ± 6,2	42,41 ± 7,6
Gordura de Coco	5,0 ± 0,63	43,42 ± 8,9	56,58 ± 8,9	33,62 ± 7,5	43,17 ± 7,3

Os resultados representam médias ± EPM para 14 animais por grupo experimental no teste do labirinto em cruz elevado.

3. TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA

Os animais suplementados com óleo de peixe, quando comparados aos animais controle e aqueles suplementados com gordura de coco, apresentaram tempo de imobilidade diminuído no teste da natação forçada (ANOVA Kruskal-Wallis $H= 11,52$; $p= 0,0016$). Ver figura 2.

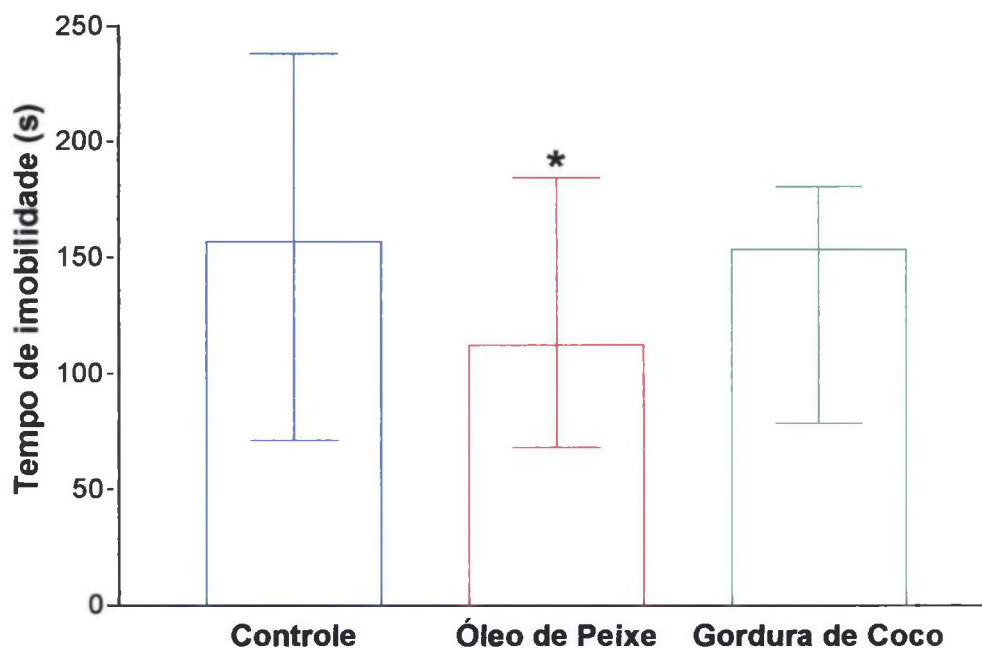


Figura 2. Tempo de imobilidade no teste da natação forçada, apresentado pelos animais do grupo controle e dos suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco. Os resultados representam as medianas e os intervalos interquartis, para 14 animais de cada grupo.

4. TESTE DO CAMPO ABERTO

Na figura 3 é possível visualizar que não houve diferença estatisticamente significativa na motilidade dos animais controle quando comparados aos animais suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco (ANOVA, $F= 0,0708$; $p= 0,9318$).

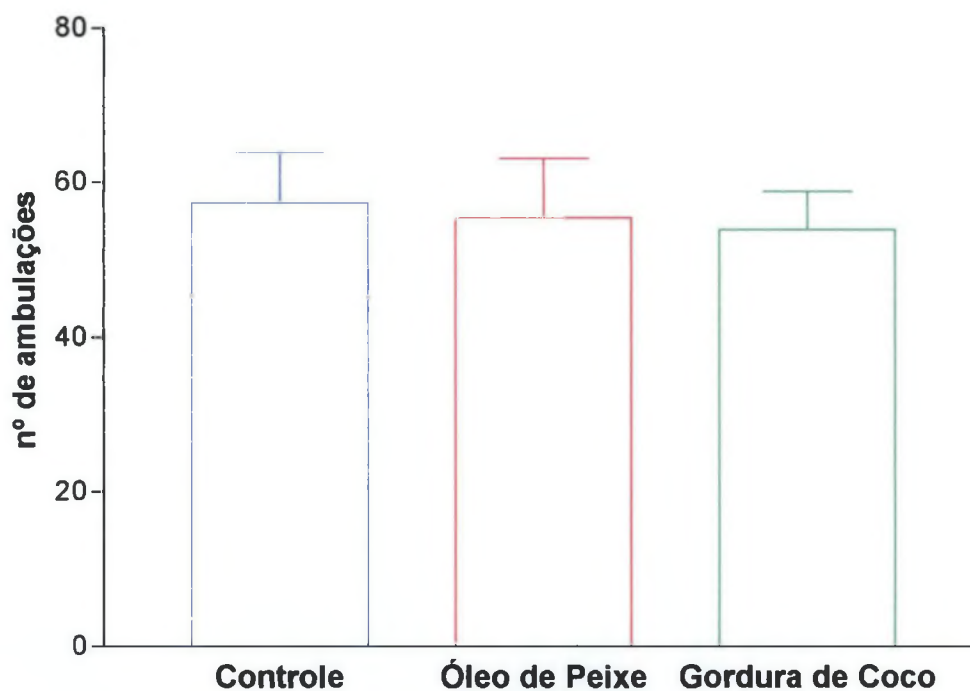


Figura 3. Ambulação dos animais do grupo controle e dos suplementados com óleo de peixe ou com gordura de coco, submetidos ao teste do campo aberto. Os dados estão apresentados como \pm EPM de 14 animais em cada grupo.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal verificar se a suplementação com óleo de peixe em ratos da geração F_0 exerce efeito antidepressivo sobre os mesmos. Para chegar aos resultados finais os animais foram divididos em três grupos distintos: óleo de peixe, gordura de coco (uma gordura saturada que possibilitaria demonstrar que é realmente o óleo de peixe que comprova o resultado) e o grupo controle.

Uma das preocupações do nosso trabalho era se a suplementação com óleo de peixe, uma gordura insaturada, causaria ou não acréscimo de massa gorda nos animais, um efeito colateral indesejado. Após os três meses de suplementação e acompanhamento da massa dos animais a cada dois dias, observou-se que não houve acréscimo de massa significativo em nenhum dos três grupos analisados (Figura 1). Os resultados obtidos com o grupo óleo de peixe e controle corroboram os achados de Naliwaiko et al. (2004).

A natação forçada é um teste idealizado por Porsolt et al. em 1978 para validar novas substâncias como potenciais antidepressivos. O modelo tenta avaliar alterações comportamentais no animal, quando esse é colocado numa situação de estresse (Lucki, 1997). Um maior tempo de imobilidade do animal indica que esse apresenta comportamento depressivo, ao ser exposto a uma situação inescapável (Cryan et al., 2002). Os resultados obtidos com esse teste (Figura 2) mostraram que os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram um menor tempo de imobilidade quando comparados aos demais grupos, indicando que a suplementação com esse óleo foi eficaz ao diminuir o comportamento depressivo dos animais, sugerindo, portanto, um efeito antidepressivo.

Sabe-se que diminuição dos níveis de AGPIs no cérebro podem ocasionar alterações no comportamento exploratório, locomotor e cognitivo de roedores em diferentes testes comportamentais (Francés et al., 1996; Carrié et al., 1999; Moriguchi et al., 2000).

Alterações da atividade locomotora poderiam sugerir resultados falso positivos para a natação forçada, pois maior atividade locomotora do animal levaria a diminuição do tempo de imobilidade do mesmo. A suplementação não foi capaz de alterar o número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (Tabela 1) e nem a ambulação dos animais durante o teste do campo aberto

(Figura 3), comprovando que a diminuição do tempo de imobilidade apresentado na natação forçada não se tratava de resultado falso positivo.

Outro dado importante constatado no teste do labirinto em cruz em elevado foi com relação à ansiedade. Nesse teste pode ser observado que em condições normais ocorre uma exploração significativamente menos intensa nos braços abertos quando comparado aos braços fechados. Se os animais recebem drogas de efeito ansiolítico ou ansiogênico há respectivamente, diminuição e aumento na frequência e no tempo de permanência nos braços fechados (Pellow et al., 1985; Fernandes et al., 1996). O tempo despendido nos braços abertos e fechados não foi diferente para nenhum dos três grupos (Tabela 1), indicando que não havia reação de ansiedade.

Todos esses resultados corroboram os encontrados por Naliwaiko et al. (2004). Seus resultados demonstraram que ratos cronicamente suplementados, filhos de mães suplementadas com óleo de peixe, na dose de 3,0g/kg/dia, desde a gestação até a fase adulta, tiveram seu comportamento depressivo reduzido. Em nosso trabalho a idéia é basicamente a mesma, porém a janela temporal é bem menor. Aqui os ratos suplementados são de geração F_0 , ou seja, não foram suplementados durante a gestação e lactação. A suplementação iniciou-se na fase pós-desmame, vindo a ocorrer até a fase adulta do animal.

A depressão é uma doença de caráter mundial. Só no Brasil cerca de 4,5% da população adulta sofre de depressão maior (Neto, 1995). Na sociedade ocidental ela está aumentando e tornando-se prevalente. Alguns pesquisadores acreditam que isso pode ter sido causado por mudanças significativas na dieta, ocorridas nos últimos 150 anos. Neste intervalo de tempo houve grande aumento na ingestão de gorduras saturadas, trans e óleos vegetais ricos em ácido linoléico (n-6) e redução dos alimentos ricos em ácido alfa-linolénico (n-3), tais como peixes e vegetais de coloração verde escuro, além da vitamina C e D (Simopoulos, 2002). Conseqüentemente, aumentou o índice de patologias associadas a essas modificações da dieta. Além disso, vários trabalhos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do planeta sugerem que lugares onde a dieta é baseada em peixes ricos em n-3, as taxas de depressão são diminutas. Isso indica que há necessidade em se alterar urgentemente o tipo e a quantidade de gordura ingerida.

Assim, de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, é possível sugerir que a suplementação crônica em ratos, com acréscimo de apenas 0,3% de ácidos graxos da família n-3 na alimentação, pode representar um potencial efeito

antidepressivo e, portanto, poderia proteger os indivíduos testados quanto ao desenvolvimento de neuropatologias, como a depressão. Não é possível transportar esses resultados para humanos, porém, futuramente, após a realização de uma série de testes, talvez possamos esclarecer os mecanismos envolvidos no surgimento da depressão e a maneira pela qual novos fármacos possam ajudar no combate e tratamento desta patologia.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a suplementação com óleo de peixe em ratos da geração F₀, com idade de 21 até 90 dias, na dose de 3g/kg/dia, exerce efeito antidepressivo sobre os mesmos.

REFERÊNCIAS

ARONSON, W.J.; GLAPSY, J.A.; REDDY, A.T.; REESE, D.; HEBER, D.; BAGGA, D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Urology**, v.58, p.283-288, 2001.

ARTERBURN, L.M.; BOSWELL, K.D. KOSKELO, A.T.; KASSNER, S.L.; KELLY, C. KYLE, D.J. A combined subchronic (90-day) toxicity and neurotoxicity study of a single-cell source of docosahaenoic acid triglycerides (DHASCO®). **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p. 35-49, 2000.

ASHTON, H. Brain systems, disorders and psychotropic drugs. **Blackwell Scientific Publications**, 1992.

BEIJAMINI, V.; SKALISZ, L.L.; JOCA, S.R.L.; ANDREATINI, R. The effect of oxocarbazepine on behavioural despair and learned haplessness. **European Journal of Pharmacology**, v.347, p.23-27, 1998.

CALDER, P.C. Omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **World Rev Nutr Diet**, v.88, p.109-16, 2001.

CALIL, H. M.; GUERRA, A. B. G. Depressão, uma doença mental? **Revista Ciência Hoje**, 201, v.34, p.28-33, 2004.

CARRIÉ, I.; CLEMENT, M.; DE JAVEL, D.; FRANCÈS, H.; BOURRE, J.M. Learning deficits in first generation OF₁ mice deficient in (n-3) polyunsaturated fatty acids do not result from visual alteration. **Neuroscience Letters**, v.266, p. 69-72, 1999.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZACORATTI, M. G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, 35: 1-11, 1994.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Pharmacological Sciences**. V.23(5), p. 238-245, 2002.

DEL PORTO, J. A. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21(1), p. 06-11, 1999.

DOS SANTOS, A. M. G. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999. v.1, p.135-158.

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**, v.48, p. 149-155, 1998.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, function, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physic of Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000.

FERNANDES, C.; FILE, S. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 54, p. 31-40, 1996.

FERRAZ, A. C.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; PEROSA, S. R.; DE CASTRO NETO, E. F.; BELLISSIMO, M. I.; OLIVEIRA, B.H.; CAVALHEIRO E. A.; NAFFAH-MAZACORATTI, M. G.; DA CUNHA, C. Amino acid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinine-induced seizures. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**.

FRANCÉS, H.; MONIER, C.; CLÉMENT, M.; LECORSIE, A.; DEBRAY, M.; BOURRE, J.M. Effect of dietary alpha-linolenic acid deficiency on habituation. **Life Science**, v.58, p.1805-1816, 1996.

FREEMAN, M.P.; Omega-3 fatty acids in psychiatry: a review. **Ann. Clinical Psychiatry**, v.12, p.159-165, 2000.

HIBBELN, J.R. Fish oil consumption and major depression. **Lancet**, v.351, p.1213, 1998.

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioral Pharmacology**, v.8, p. 523-532, 1997.

MAIDMENT, I.D.; Are fish oil an effective therapy in mental illness – an analysis of the data. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.102, p. 3-11, 2000.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

MELTZER, H. Y.; LOWY, M. T. The serotonin hypothesis of depression. *In*: MELTZER H. Y. (ed) **Psychopharmacology**. Raven Press, p.-526, 1987.

MORIGUCHI, T.; GREINER, R.S.; SALEN Jr., N. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. **Journal of Neurochemistry**, v.75, p.2563-2573, 2000.

MORRIS, R. G. M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.11, p. 47-60, 1984.

MURPHY, M.G. Dietary fatty acids and membrane protein function. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, 1: 69-79, 1990.

MURRAY, R.K.; GRANNER. D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**, São Paulo : Atheneu, 8ªed, pg. 146-148 , 1998.

NALIWAIKO, K. **Efeito Antidepressivo do Óleo de Peixe na Geração F₁ de Ratos Cronicamente Suplementados**. Curitiba, 2003. 56 f. /dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NALIWAIKO, K.; ARAÚJO R.L.F.; FONSECA, R.V. da; CASTILHO, J.C.; ANDREATTINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H; MARTINS, E.F.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Fish Oil and Central Nervous System: A potential Antidepressant Effect. **Nutritional Neuroscience**, 2004 (no prelo).

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.

NETO, M.R.L. **Psiquiatria Básica**. Porto Alegre: Artes médicas, 1995.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.

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

RANG, H.P.; DALE, M.M. - **Farmacologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 3ª edição, 1997.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis – a review of the support evidence. **Am J Psychiatry**, v.122, p.509-522, 1965.

SIEVER, L. J. Role of noradrenergic mechanisms in the etiology of the affective disorders. *In*: MELTZER H. Y. (ed) **Psychopharmacology**. Raven Press, p.393-504, 1987.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**. Vol. 56, p.365-379, 2002.

SOUZA, F. G. de M. e. Tratamento da depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, vol.21 (1), p.18-23, 1999.

TANSKANEN, A.; HIBBELN, J.R.; HINTIKKA, J.; HAATAINEN, K.; HONLALAMPIK., VIINAMÄKI, H. fish oil consumption, depression and suicidality in a general population. **Archives of General Psychiatry**, v.58, n.5, p. 512-513, 2001-b.

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.974, 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.

YOUNG, C.; GEAN, P.-W.; WU, S.-P.; LIN, C.-H.; SHEN, Y-Z. Cancellation of low-frequency stimulation- induced long-term depression by docosahexaenic acid in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, **247**: 198-200, 1998.

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

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.

ANEXOS

1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO

Nº 064

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 8662/04-93 Data de Aprovação: 15/03/04 11ª RO

Projeto de Pesquisa Título: EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO ÓLEO DE PEIXE EM RATOS DA GERAÇÃO F₀.

Autores: Anete C. Ferraz (resp.); Helidy M. Rossi Salles (acad); Katya Naliwaiko (colaboradora)

Departamento: FISILOGIA

Curitiba, 15 de março de 2004.


Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário


Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
Presidente