

**KATYA NALIWAIKO**

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE.  
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO HIPOCAMPO DE  
RATOS WISTAR PODEM EXPLICAR O EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO  
ÓLEO DE PEIXE?**

**Curitiba**

**2009**

**KATYA NALIWAIKO**

**SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE.  
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO HIPOCAMPO DE  
RATOS WISTAR PODEM EXPLICAR O EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO  
ÓLEO DE PEIXE?**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Maques Zanata  
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

**Curitiba  
2009**

Dedico este trabalho a minha mãe Lucélia Regina, meu exemplo de vida, com quem eu aprendi o real significado da palavra perseverança. Ao meu esposo Luiz Cláudio, minha eterna inspiração, minha razão de viver, por ter me permitido realizar este desejo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pela formação profissional e moral recebida nestes oito anos de estudo.

Ao CNPq, pelo investimento, financiamento e custeio deste projeto através da bolsa de estudos a mim concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, por ter aberto as portas de seu laboratório, permitindo o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal.

Ao meu esposo, Luiz Cláudio, pela incansável paciência, pelo companheirismo e dedicação. Sem sua preciosa ajuda científica e pessoal, certamente eu não teria chegado tão longe... você é a luz que ilumina meus caminhos...

Aos meus pais Lucélia Regina e Roberto, pela paciência interminável, por tantas vezes terem enxugado minhas lágrimas e por terem me ensinado a ser a pessoa forte e perseverante que sou hoje. Pelas inúmeras vezes que me socorreram e cuidaram da Duda para que eu vencesse mais esta etapa.

A minha filhinha, Maria Eduarda, por repentinamente encher a minha vida com um sentimento que eu não conhecia: o amor incondicional de uma criança.

Aos meus irmãos Karla e Roberto Filho, por serem meus fiéis escudeiros, com orelhas enooooooooooooooooormes para me ouvir contar minhas desventuras científicas.

A minha grande amiga, Maria Laura Assef, companheira e confidente, sempre disposta a me ajudar a resolver os mais variados problemas. Você sempre vai morar no meu coração.

A minha adorada amiga Fabíola lagher, por me divertir e partilhar comigo dias intermináveis calibrando o HPLC e contas mirabolantes no preparo dos padrões. Sem sua preciosa ajuda eu JAMAIS teria me metido nesta história.

A minha querida amiga Elizabeth (com z e th) de MorAEs, como diria ela. Seu carinho, compreensão e apoio nos momentos difíceis neste último ano foram imprescindíveis para mim. Volta logo do Fundão que eu estou morrrrrrendo de saudade!!

Aos meus amados amigos Aldre e Ricardo, que mesmo lá do outro lado do mundo (literalmente) estão sempre torcendo por mim.

A minha mais nova amiga Chelin Steclan, companheira, confidente, leal e destemida. Xuxu serei eternamente grata por toda sua ajuda e colaboração, pelo seu carinho e dedicação nos dias difíceis. Por desmistificar ensaios e protocolos e por me ensinar a usar saias! Você mora no meu coração!

Aos colegas do Labmetab: Ricardo, Everson, Gleisson, Danielle, Isabella, Sandro, Dalton, Gina, Adriana, Júlia e tantos outros que passaram por lá. Obrigada por todas as vezes que emprestaram seus ouvidos para me ouvir falar de qualquer coisa (política setorial, reunião de colegiado, experimentos, lamúrias, blá,blá,blá). Vocês são pessoas muito especiais.

Ao meu amigão Marcelo Kriczyck, por sempre ter feito o serviço sujo. Meu agradecimento especial por me ajudar a ortotansiar os animais de cada experimento sempre de bom humor.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia: Beatriz, Michele, Luiz, Mônica, Aline, Thiago, Márcia, Axel e todos os outros que de alguma forma compartilharam minhas batalhas e doaram seu companheirismo, tempo e amizade.

A minha amiga Sofia, por toda dedicação e paciência nas aulas de francês. Obrigada por me ajudar a realizar um sonho!

Às colegas do laboratório de Matriz Extracelular: Olga, Danielle, Valeria, Dilza e Luiza, pelo auxílio e amizade quando fui arremessada ao mundo da biologia molecular.

Ao prof. Dr. Claudio da Cunha, do departamento de Farmacologia, pelo empréstimo do vibrátomo.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki e ao Dr. Lauro Souza, pelo auxílio na determinação do perfil lipídico por GC-MS.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucélia Donatti pelo auxílio na preparação das amostras de microscopia eletrônica. Por doar seu precioso tempo capturando minhas imagens no microscópio eletrônico e pelas várias horas de conversa. Você é uma amiga fantástica!

Às minhas orientadas Juliana Forville, Larissa Flessak e Priscila Gunha. Obrigada por me ensinarem o ofício da orientação, por terem confiado em mim e pela paciência interminável com a orientadora que marcava quatro coisas diferentes no mesmo horário que deveria atender vocês. Vocês são uns amores.

Ao Sr. Herculano dos Reis Filho, o Nino, do laboratório de histotécnica pelo empréstimo do aparato de perfusão e pelas conversas no corredor da BioCel.

À equipe do laboratório de citotécnica e patologia experimental da PUC-PR, pelo auxílio na preparação do material histológico.

A Fundação Herbárium de Pesquisa e Saúde, pela doação das cápsulas de óleo de peixe utilizadas neste trabalho.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente tenham contribuído para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1. Lipídios e Ácidos Graxos Poliinsaturados	15
2. Ácidos graxos n-3 e desenvolvimento do sistema nervoso	18
3. Ácidos graxos n-3 e transdução de sinal	22
4. Dieta Moderna e Neuropatologias	24
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
1. ANIMAIS	30
2. SUPLEMENTAÇÃO	30
3. MICROSCOPIA DE LUZ	31
3.1. Processamento histológico e colorações	31
3.1.1. Hematoxilina-Eosina	32
3.1.2. Coloração de Nissl	32
3.2. Método de Golgi	32
3.3. Captura de imagem, estereologia e morfometria	33
4. MICROSCOPIA DE ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	33
5. CROMATOGRAFIA GASOSA E PERFIL LIPÍDICO	34
5.1. Metanólise e extração lipídica	34
5.2. Cromatografia gasosa	35
6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING	36
6.1. Extrato celular e determinação protéica	36
6.2. Eletroforese e Immunoblotting	36
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>1. MICROSCOPIA DE LUZ</b>	<b>40</b>
1.1. Cresil Violeta e Morfometria do hipocampo	40
1.2. Evidenciação de projeções axonais: coloração de Golgi e HE	42

<b>2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b>	<b>45</b>
2.1. Efeito da suplementação sobre a mielinização	45
2.2. Efeito da suplementação sobre o número de sinapses	47
<b>3. PERFIL LÍPIDICO</b>	<b>48</b>
<b>4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS</b>	<b>49</b>
4.1. Proteínas envolvidas com proliferação e diferenciação celular: ERK1/2, AKT e PI <sub>3</sub> K	49
4.2. Proteínas relacionadas à diferenciação neuronal: Neurofilamento médio e β-tubulina classe III	46
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AA – Ácido Araquidônico**

**A<sub>cpo</sub> – Área do campo microsópico**

**AGE – Ácido graxo essencial**

**AGPI – Ácido graxo poliinsaturado**

**AGPI-CL - Ácido graxo poliinsaturados de cadeia longa**

**AKT/PKB – proteína quinase B**

**AL – Ácido linoléico**

**ALA – Ácido  $\alpha$ -linolênico**

**C - Controle**

**CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa**

**DHA – Ácido docosaheptaenóico**

**DTT - Dithiothreitol**

**EPA – Ácido eicosapentaenóico**

**ERK<sub>1/2</sub> - Proteína quinase ativada por sinal extra celular**

**F1 – Primeira geração**

**HRP – Horseradish peroxidase**

**n-3 – Omega-3**

**n-6 - Omega-6**

**NaCl- Cloreto de sódio**

**OP – Óleo de peixe**

**PFA - Paraformaldeído**

**PI<sub>3</sub>K – Proteína fosfatidil inositol -3 kinase**

**SDS – Dodecil sulfato de sódio**

**SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio- poliacrilamida gel**

**SNC – Sistema nervoso central**

**TBST – Tampão TRIS-salina e tween**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1: Cadeia carbônica dos ácidos graxos essenciais

Figura 2: Representação esquemática da conversão de AGE em AGPI-CL e suas fontes na dieta.

Figura 3: Representação esquemática da ação da fosfolipase A2 sobre glicerofosfolipídios de membrana e os possíveis vias de ação dos produtos de ácidos graxos livres (DHA e AA)

Figura 4. Consumo de peixe e prevalência de depressão principal.

Figura 5. Aspecto geral da formação hipocampal, evidenciando as regiões CA<sub>1</sub>, CA<sub>2,3</sub> e GD.

Figura 6. Aspecto geral da formação hipocampal, evidenciando características do giro dentado (GD).

Figura 7. Número de células piramidais na subárea CA<sub>1</sub> no hipocampo de ratos

Figura 8. Número de células granulares no giro dentado do hipocampo de ratos

Figura 9. Evidenciação de axônios partindo dos corpos celulares dos neurônios piramidais de CA<sub>1</sub>

Figura 10. Arborização dendrítica evidenciada pelo método de Golgi em ratos controle.

Figura 11. Arborização dendrítica evidenciada pelo método de Golgi em ratos cronicamente suplementados.

Figura 12. Eletromicrografia de transmissão de neurônios hipocampais: mielinização

Figura 13. Número de fibras mielinizadas no hipocampo de ratos.

Figura 14. Espessura da bainha de mielina no hipocampo de ratos.

Figura 15. Eletromicrografia de transmissão de neurônios hipocâmpais: distribuição de sinapses.

Figura 16. Expressão da proteína ERK1/2

Figura 17. Expressão da proteína AKT (PKB).

Figura 18. Expressão da proteína PI<sub>3</sub>K.

Figura 19. Expressão da proteína neurofilamento médio.

Figura 20. Expressão da proteína  $\beta$ -tubulina classe III.

Figura 21: Percentual de calorias a partir de gordura na dieta humana do homem paleolítico até a atualidade.

## **TABELAS**

Tabela 1: Concentração de ácidos graxos (%) nas amostras de hipocampo de ratos.

Concentração de ácidos graxos (%) na ração e na cápsula de óleo de peixe.

## RESUMO

No último século o perfil lipídico da dieta humana sofreu severas alterações, em especial devido a industrialização dos alimentos. Estudos epidemiológicos têm relacionado fortemente o aumento da prevalência de diversas doenças crônicas degenerativas às alterações ocorridas na dieta da população humana. Recentemente, a prevalência de transtornos afetivos e outras doenças de caráter neurológico, têm aumentado significativamente em especial nas populações ocidentais e com elevado grau de industrialização. Nestas populações, o consumo de gorduras saturadas ou do tipo trans é elevado e coincidentemente a prevalência de transtornos afetivos é significativamente maior, sugerindo que os lipídios contidos na dieta pode ser fator determinante para o desenvolvimento destas patologias. Dentre os lipídios da dieta, especial atenção tem sido dada aos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPIs n-3). Devido a habilidade de modular eventos biológicos tais como fluidez de membrana, transdução de sinal e expressão gênica, nas últimas duas décadas, cresceu o número de estudos investigando o potencial nutracêutico dos AGPIs n-3 e sua aplicação clínica para o tratamento de diversas condições humanas. O óleo de peixe, composto rico em AGPIs n-3, tem sido objeto de diversos estudos envolvendo o sistema nervoso central. Embora seu potencial efeito antidepressivo tenha sido demonstrado através de modelos animais e alterações comportamentais, os mecanismos pelos quais estes lipídios exercem seus efeitos ainda não são completamente entendidos. Neste trabalho investigamos o efeito da suplementação crônica com óleo de peixe sobre alterações morfológicas e ultraestruturais no hipocampo de ratos Wistar, bem como sobre a expressão de proteínas relacionadas com estes efeitos. Ratos Wistar foram suplementados com óleo de peixe desde o desenvolvimento até a idade adulta, quando a morfologia hipocampal e ultraestrutura neuronal foram avaliadas sob microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os resultados sugerem aumento no número de células hipocampais, aumento na robustez e complexidade da arborização dendrítica e na mielinização dos axônios no grupo suplementado, sugerindo efeito positivo do óleo de peixe sobre modulação fenotípica no hipocampo de ratos adultos. A expressão de proteínas relacionadas à regulação de eventos de diferenciação, também foi alterada pela presença do óleo de peixe, nos animais suplementados. Os resultados encontrados podem ainda ser relacionados com alterações comportamentais, anteriormente descritas, sugerindo que o óleo de peixe pode atuar na melhora da função cerebral apenas por regular a neurotransmissão, mas também por modular eventos morfológicos e bioquímicos relacionados à função cerebral e comportamento.

## ABSTRACT

In the last century the lipid profile of the human diet has undergone severe changes, especially due food industrialization. Epidemiological studies have strongly linked the increasing prevalence of several chronic degenerative diseases with changes in diet of the human population. Recently, the prevalence of affective disorders and other neurological diseases, have increased significantly especially in Western populations, with a high industrialization degree. In these populations, consumption of saturated fats or trans fat is high as well as the prevalence of affective disorders suggesting that the dietary lipids can be a determining factor for the development of these disorders. Among the dietary lipids, special attention has been given to polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 PUFAs). Due its ability to modulate biological events such as membrane fluidity, signal transduction and gene expression in the last two decades, number of studies investigating the nutraceutical potential of n-3 PUFAs and their clinical application for treating various human conditions has increase. Fish oil, rich compound in n-3 PUFAs, has been the subject of several studies involving the central nervous system. Although its potential antidepressant effect has been demonstrated by animal models and behavioral alterations, the mechanisms by which these lipids exert their effects are not fully understood. In this study we investigated the effect of chronic fish oil supplementation upon morphological and ultrastructural changes in the hippocampus of rats and on expression of proteins related to these events. Wistar rats were supplemented with fish oil from development until adulthood, when the morphology and ultrastructure of hippocampal neurons were examined under light microscopy and transmission electron microscopy. The results suggest an increase in the number of hippocampal cells, increased robustness and complexity of dendritic branching and myelination of axons in the supplemented group, suggesting a positive effect of fish oil on phenotypic modulation in the hippocampus of adult rats. The expression of proteins related to regulation of differentiation events was also altered by fish oil supplementation. These results can also be related to behavioral changes, previously described, suggesting that fish oil can improving brain function not only by neurotransmission regulation, but also by modulating morphological and biochemical events related to brain function and behavior.

## **INTRODUÇÃO**

## **1. Lipídios e Ácidos Graxos Poliinsaturados**

Os lipídios são componentes essenciais da dieta, desempenhando papel fundamental no desenvolvimento, crescimento e maturação do organismo (Horrocks & Yeo, 1999). São também os principais constituintes das membranas celulares e determinam uma série de processos biológicos, tais como: comunicação celular, interações enzimáticas e atuação em cascatas bioquímicas, razão pela qual estão envolvidos na produção de respostas específicas para a ocorrência de processos fisiológicos (Broadhurst et al., 2002; Farooqui et al, 2000). Na dieta, os lipídios são usualmente encontrados na forma de triacilgliceróis, que se caracterizam pela associação de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol, sendo a principal forma de armazenamento de gorduras nos organismos (Curi, 2002).

Os ácidos graxos (AGs) são formados por uma cadeia de átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio. Quando todos os átomos de carbono (exceto os dois últimos na cadeia) encontram-se ligados a átomos de hidrogênio, a gordura é dita estar saturada. Quando dois átomos de carbono adjacentes na cadeia estão ligados a apenas um hidrogênio, uma dupla ligação (insaturação) ocorre entre os pares de carbono, o ácido graxo é dito estar insaturado. O número de insaturações encontradas na cadeia carbônica determina se o ácido graxo é mono (AGMIs) ou poliinsaturado (AGPIs). As diferentes posições e quantidade de duplas ligações ao longo da cadeia determinam à família a qual este ácido graxo pertence, bem como suas diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (Farooqui, 2009).

Com base nas características da molécula e a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica, podemos identificar diferentes famílias, onde

as duas mais importantes são classificadas como ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3). Os ácidos graxos da família n-6 apresentam a primeira insaturação entre o sexto e sétimo átomos de carbono, a contar do carbono omega (terminal metila) e são derivados do ácido graxo essencial linoléico (18:2). A família n-3 é toda derivada do ácido graxo essencial  $\alpha$ -linolênico (18:3), apresentando a primeira insaturação entre o terceiro e quarto átomos de carbono, a partir do carbono omega (Innis, 2007; Youdim et al., 2000) (figura 1).

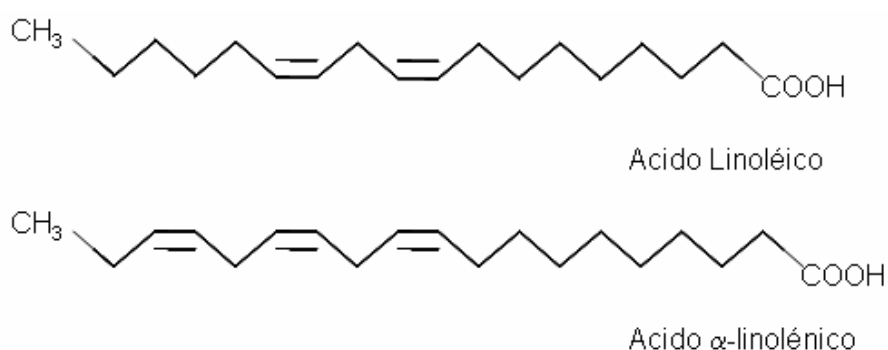


Figura 1: Cadeia carbônica dos ácidos graxos essenciais

A essencialidade dos AGs linoléico (AL) e  $\alpha$ -linolênico (ALA) deve-se ao fato de que os organismos mamíferos são incapazes de sintetizá-los. Devido a ausência das enzimas  $\Delta$ -15 e  $\Delta$ -12 dessaturases, estes organismos não convertem AGs saturados em precursores das séries n-6 e n-3, devendo estes portanto serem obtidos através da dieta (Innis, 2003).

Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais (AGE) são metabolizados por ação de um conjunto de enzimas, em que novos carbonos e insaturações são adicionados à cadeia carbônica original, produzindo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL) da mesma família (Figura 2, Innis, 2009). É importante ressaltar que uma vez que as duas famílias

competem pelo mesmo sistema enzimático, ácidos graxos das duas famílias não podem ser interconvertidos (Farooqui et al, 2007).

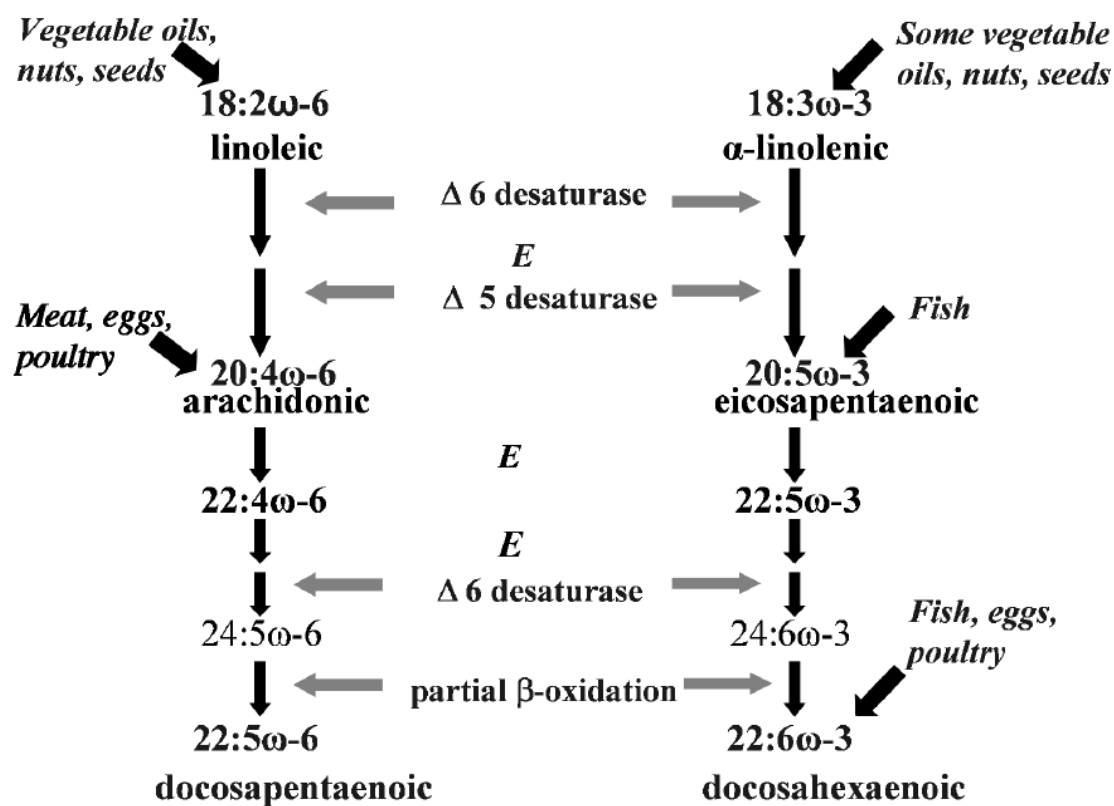


Figura 2: Representação esquemática da conversão de AGE em AGPI-CL e suas fontes na dieta. Fonte: Innis, S. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2009.

Devido ao número e as diferentes posições de duplas ligações ao longo da molécula, cada ácido graxo apresenta propriedades nutricionais, químicas e funcionais diferentes (Farooqui, 2009). Com base nas características dos diferentes AGPIs, inúmeras pesquisas têm buscado evidenciar o envolvimento dos ácidos graxos em diversas patologias crônico-degenerativas como câncer, diabetes, esquizofrenia, doenças autoimunes e depressão, entre outras (Young & Martin, 2003; Aronson et al., 2001; Calder & Yaqoob, 2009).

## **2. Ácidos graxos n-3 e sistema nervoso**

O tecido nervoso é o segundo tecido em concentração de lipídios no organismo, onde mais da metade do peso seco do cérebro é constituído por lipídios (Innis, 2008a), sendo um terço deste valor representado por AGPIs (Swingler 2008). Devido às características fisiológicas do tecido nervoso, as membranas das células neurais apresentam altas concentrações de lipídios. De maneira geral, os lipídios se acumulam nas membranas celulares dos neurônios, na forma de fosfolipídios de membrana: macromoléculas anfipáticas formadas por dois ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e a um radical nitrogenado que lhe confere polaridade (Curi et al., 2002).

As membranas das células neurais de mamíferos caracterizam-se por apresentarem constituição lipídica única, contendo grandes concentrações de AGPI-CL (Chen et al., 2008, Akbar et al., 2005). Dentre os diversos AGPIs disponíveis na dieta, o cérebro acumula preferencialmente ácido docosahexaenoico (DHA, n-3) e ácido araquidônico (AA, n-6) em suas membranas (Innis, 2007). Por ação de enzimas fosfolipases, os AGPIs esterificados em fosfolipídios de membrana, podem ser mobilizados das membranas, atuando em processos de transdução de sinal em neurônios e outros tipos celulares (figura 3) (Farooqui et al, 2009, Niemoller e Bazan, 2009).

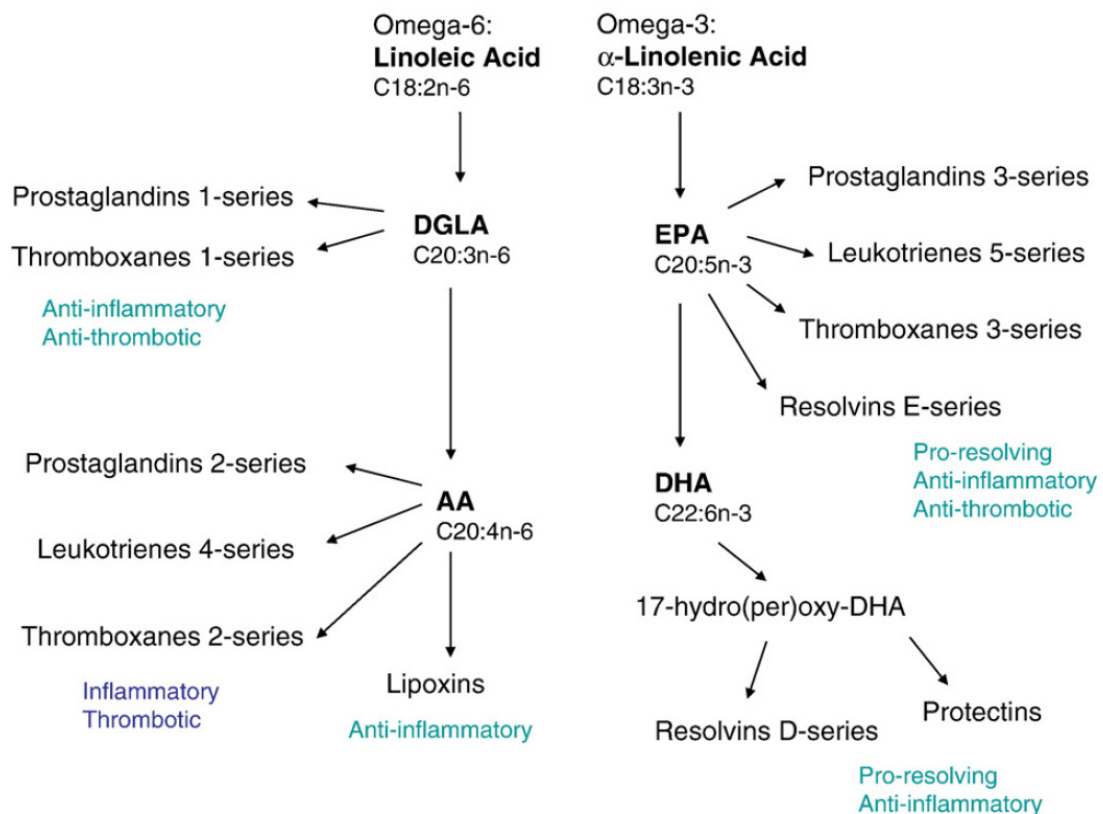


Figura 3: Representação esquemática da ação da fosfolipase A2 sobre glicerofosfolípidios de membrana e os possíveis vias de ação dos produtos de ácidos graxos livres (DHA e AA). Fonte: Gleissman, *Experimental cell research*, 2010.

Assim, os AGPIs têm sido relacionados com ativação e modulação de cascatas bioquímicas, regulação de enzimas e canais iônicos, sugerindo seu envolvimento na regulação de eventos determinantes da formação do Sistema Nervoso Central (Farooqui and Horrocks 2006).

Durante o desenvolvimento fetal em roedores, a incorporação cerebral de DHA aumenta significativamente na última semana de desenvolvimento, representando cerca de 12% dos lipídios incorporados, alcançando o platô de incorporação (20%) ao final do período de lactação (Schiefermeier & Yavin, 2002). Em humanos, os períodos de maior incorporação cerebral de DHA correspondem ao último trimestre gestacional e os primeiros dezoito meses de

vida pós-natal, períodos considerados críticos para o desenvolvimento cerebral (Cetin & Koletzko, 2008).

Durante o desenvolvimento a mãe representa a única fonte de AGPIs para o feto, que são ativamente transferidos ao feto pela circulação placentária (Innis, 2004). Neste período, DHA e outros AGPI-CL são obtidos pela conversão de AGs precursores pelo organismo materno. Durante o último trimestre da gestação, a taxa de transferência de DHA atinge cerca de 65 mg/dia (Innis, 2003) e em alguns casos, a quantidade de DHA fornecida através da síntese hepática são insuficientes para o perfeito desenvolvimento (Makrides, 2008).

Uma vez que a única fonte de DHA para a mãe é a dieta, tem sido sugerido o enriquecimento com AGPIs n-3 da dieta materna durante a gestação e amamentação, para garantir o perfeito desenvolvimento fetal e manutenção das concentrações maternas de DHA (Makrides, 2008; Innis, 2007; Colombo, 2004). Dentre as diversas fontes de ácidos graxos poliinsaturados n-3 que podemos encontrar na natureza, apenas peixes e fitoplânctons contém os ácidos graxos de cadeia longa, que são vitais para o cérebro. O consumo de hortaliças de folhagem verde escuro (i.e. espinafre, mostarda e alface romana) pode de alguma forma melhorar o *status* nutricional, uma vez que são fontes ricas em ácidos graxos essenciais parentais que podem ser convertidos em AGPI-CL pelo fígado (Rapoport et al, 2007; Williams et al., 2006).

## **2.1. Desenvolvimento do sistema nervoso central**

O desenvolvimento cerebral é um processo complexo e interativo, onde vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos figuram e interagem

para a formação do encéfalo. Os processos de proliferação, migração e diferenciação celular são etapas críticas e sensíveis do desenvolvimento, sendo, provavelmente, determinantes das capacidades intelectuais que serão desempenhadas pelo indivíduo adulto (Wainwright, 2002). Assim, alterações no ambiente celular podem alterar o equilíbrio ou comunicação entre estas etapas, levando à funcionalidade cerebral prejudicada.

Em humanos, como mencionado acima, o último trimestre gestacional e os primeiros dezoito meses de vida pós-natal são críticos para o desenvolvimento cerebral e, coincidentemente, são os períodos de maior incorporação de DHA (Cetin e Koletzko, 2008, Marzalek e Lodish, 2005). Durante estes períodos significativas alterações morfológicas ocorrem no encéfalo em maturação. É durante estas etapas que os neurônios estabelecem e fortalecem conexões, desenvolvem axônios e aumentam o número de contatos sinápticos (Rakic et al., 2009). Neste período, os processos de proliferação e hipertrofia, mielinização e formação de sinapses são inúmeras vezes mais intensos do que durante a vida adulta (Wainwright, 2002; Innis & Friesen, 2008). Suprimento nutricional adequado nestes períodos, sugere ambiente celular favorável a estes processos e conseqüentemente, desenvolvimento cerebral melhorado (van Goor et al., 2008; Almeida, 2002).

O envolvimento dos AGPIs n-3, em especial DHA, no desenvolvimento cerebral tem sido sugerido a partir de observações comportamentais em modelos animais. A utilização de modelos experimentais deficientes em AGPIs n-3 (precursor ou de cadeia longa), onde se provoca redução significativa das concentrações encefálicas de DHA, tem demonstrando a significância funcional do DHA no SNC (Yavin et al., 2009). Os efeitos da deficiência podem ser

percebidos como alterações de neurotransmissão, das capacidades cognitiva e visual (McNamara & Carlson, 2006; Kudas et al., 2004; Mitchel et al., 2001).

Estudos desenvolvidos em modelos animais, relacionando alterações nutricionais e função cerebral, têm demonstrado que dietas deprivadas ou pobres em AGPIs n-3 estão diretamente relacionadas com redução do tamanho encefálico, redução nas amplitudes de potenciais de ação, prejuízo de memória e acuidade visual reduzida (Chung et al., 2008; Yamashima, 2008). Áreas cerebrais como hipocampo e córtex pré-frontal, onde a densidade e variedade de receptores são altas, bem como a frequência de excitação destas áreas, a incorporação de DHA é mais significativa. Em modelos animais, dietas deficientes em AGPIs n-3 têm sido correlacionadas com corpos celulares menores, reduzida arborização e menor densidade de receptores em neurônios destas áreas cerebrais (Ahmad et al, 2002; Wainwright, 1998).

Nestes casos, a alteração comportamental decorrente da redução de AGPIs n-3 na dieta, está diretamente correlacionada com o perfil lipídico cerebral, sugerindo que redução na dieta provoca menor incorporação de AGPIs n-3 no tecido nervoso, comprometendo a funcionalidade do SNC no indivíduo adulto (Wainwright, 2002; Salem et al., 2001).

### **3. Ácidos graxos n-3 e transdução de sinal**

O efeito de diversos AGPIs sobre proteínas e enzimas intracelulares têm sido objeto de investigação nos últimos anos (Cao et al, 2004; Kawakita et al, 2006; Cansev & Wurtman, 2007; Wurtman, 2008). Os resultados destas pesquisas apontam os AGPIs, em especial os da família n-3, como

moduladores de diversos processos bioquímicos e fisiológicos no SNC (Yavin, 2006). Diferentes abordagens têm produzido resultados distintos dependendo do AGPIs empregados, da concentração e ferramentas utilizadas para a investigação, sugerindo assim inúmeras hipóteses a cerca de como AGPIs n-3 modulam a função cerebral. Desta forma, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de incorporação dos AGPIs n-3 para a funcionalidade adequada do SNC (Farroqui, 2009; Farroqui et al., 2007; Yavin, 2006).

A ação de AGPIs n-3 sobre neurotransmissão tem mostrado que estes AGs são capazes de aumentar a síntese e liberação de neurotransmissores como a serotonina e dopamina, modulando a funcionalidade neuronal (Kodas et al., 2004; Chalon, 2006). Estudos *in vitro* apontam que os AGPIs n-3 modulam efetivamente cascatas bioquímicas envolvidas em eventos do desenvolvimento, plasticidade e neuritogenese (Logan, 2003; Haag, 2003; Horobin, 2002).

Apesar dos efeitos do DHA serem percebidos em eventos neuronais relacionados com desenvolvimento do SNC, neurotransmissão, atividade enzimática e plasticidade sináptica, os mecanismos moleculares através dos quais o DHA exerce estes efeitos ainda são desconhecidos e pouco explorados (Farroqui et al, 2009; Saldanha et al., 2009; Glomset, 2006). Na literatura são poucos os dados disponíveis a cerca de como os AGPIs n-3, em especial o DHA, regulam a atividade de enzimas, canais iônicos e proteínas regulatórias, sendo necessárias novas abordagens para elucidar estes mecanismos (Kitajka et al., 2002).

#### **4. Dieta Moderna e Neuropatologias**

A funcionalidade do SNC é um processo estritamente dependente da comunicação neuronal, sendo necessárias sinapses adequadas e maquinarias bioquímicas específicas para tanto (Spedding et al., 2003). Alterações na comunicação neuronal, de ordem morfológica ou bioquímica, têm sido sugeridas como as responsáveis pelo surgimento de diversas neuropatologias, entre elas a depressão, doença de Alzheimer e transtornos de atenção (Ansorge et al, 2007; Nestler et al, 2002; Horroks & Yeo, 1999). Os transtornos neurológicos estão entre as enfermidades mais comuns nos países desenvolvidos, acometendo 10% da população em idade adulta (Young, 2003; Andreasen 2005).

Nos últimos cem anos ocorreram significativas mudanças no padrão lipídico da dieta. Neste período a ingestão de grãos e óleos vegetais levou ao aumento da concentração de AGPIs n-6 na dieta e conseqüentemente, redução das quantidades de AGPIs n-3 e vitaminas antioxidantes C e E (Simopoulos, 2002). Alguns pesquisadores acreditam as mudanças ocorridas na dieta ocidental, acarretaram em modificações significativas na composição lipídica dos neurônios, resultando em neuropatologias e distúrbios cognitivos (Shapiro, 2003; Youdim et al., 2000).

Em 1995, Hibbeln e Salem propuseram, pela primeira vez, que o aumento desordenado na ingestão de AGPIs n-6, e conseqüente redução na ingestão de n-3, estaria relacionado com o significativo aumento dos índices de depressão registrados no século XX. Nas últimas décadas diversos trabalhos epidemiológicos têm investigado a relação existente entre o consumo de peixes e alimentos ricos em AGPIs n-3 e a prevalência de transtornos afetivos

(Nemets et al, 2006; Tanskanen, 2001; Hibbeln, 1998). Estes estudos propõem relação inversa entre a prevalência da doença e as concentrações de ácidos graxos n-3 na dieta, em especial nas populações ocidentais (figura 4, Hibbeln, 1998).



Figura 4: Consumo de peixe e prevalência de depressão principal. Fonte: Hibbeln, *The Lancet*, 1998.

Em países como Japão, Coreia e Finlândia, onde o consumo de peixe é elevado, os índices de depressão são significativamente menores quando comparados com o de países ocidentais (Hibbeln, 2002; Tanskanen et al., 2001; Hibbeln, 1998).

No último século, a industrialização dos alimentos e adição de gorduras artificialmente produzidas aos alimentos, provocou significativa alteração do perfil nutricional das populações ocidentais (Simopoulos, 2002). Estas alterações, somadas à redução na ingestão de vitaminas e antioxidantes, têm sido amplamente correlacionadas com o surgimento de doenças crônico-degenerativas e debilidades ligadas ao sistema nervoso (Ross et al., 2007; Richardson & Ross, 2000).

Recentemente o papel dos AGPIs n-3 no tratamento de neuropatologias tem sido demonstrado (da Silva et al, 2008; Hibbeln et al, 2006) e o uso de suplementos alimentares ricos em AGPIs n-3, concomitante ou em substituição à medicação de rotina tem sido encorajado (Su et al, 2003; Timonen et al, 2004; Marangel et al, 2006). O potencial efeito antidepressivo de substâncias ricas em AGPIs n-3 foi primeiramente demonstrado por Naliwaiko et al. (2004), através do teste da natação forçada. Neste trabalho, a suplementação crônica com óleo de peixe foi hábil em reduzir (20%) o tempo de imobilidade dos animais suplementados quando comparado ao dos controles.

Com base nestes dados, o uso de suplementos alimentares ricos em AGPIs n-3 têm sido encorajados por pesquisadores no mundo todo, como forma de manter ou melhorar a funcionalidade cerebral, bem como prevenir a deterioração do cérebro frente a patologias (Grossfield et al., 2006).

Embora os dados literários acerca do emprego clínico dos AGPIs n-3 sejam concisos e o uso de abordagens em modelos animais represente potente ferramenta para identificar os efeitos dos AGPIs n-3 sobre o SNC, o exato mecanismo de ação pelo qual estes lipídios atuam no SNC, continua sendo objeto de investigação de inúmeros grupos de pesquisa no mundo.

## **OBJETIVOS**

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa n-3, presentes ricamente no óleo de peixe, incorporam-se às membranas celulares e como consequência alteram funções celulares por atuarem nos processos de transcrição de genes e transdução de sinais biológicos. Demonstramos em trabalho anterior a habilidade do óleo de peixe como agente antidepressivo, contudo o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não é conhecido. Na literatura, dados envolvendo função cerebral e AGPIs n-3 são abundantes, entretanto são escassos os trabalhos *in vivo* abordando o efeito destes ácidos graxos sobre a morfologia cerebral, bem como sobre as proteínas transdutoras de sinais biológicos que participam deste processo. Assim, este trabalho tem por objetivo investigar o efeito da suplementação crônica com óleo de peixe, rico em AGPIs n-3, sobre a morfologia e ultraestrutura cerebral e, identificar algumas proteínas intracelulares que participam na modulação destes fenômenos. Para alcançar estes objetivos serão avaliados os seguintes parâmetros:

1. Histologia do hipocampo utilizando-se técnicas de microscopia de luz;
2. Ultraestrutura neuronal da formação hipocampal, pelo emprego de microscopia eletrônica de transmissão;
3. Perfil lipídico no tecido hipocampal, pelo emprego de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS);
4. Expressão das proteínas: ERK  $\frac{1}{2}$ ; AKT; PI<sub>3</sub>K;  $\beta$ -tubulina classe III e neurofilamento médio, por Western Blotting

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas, desta Universidade.

## **1. ANIMAIS**

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, adultos, obtidos e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em ambiente com temperatura controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro/escuro (12/12 horas), tendo livre acesso à água e ração. Durante todo período de suplementação os animais foram mantidos em grupos de cinco animais por gaiola.

Para obtenção dos animais da geração F1, objeto de estudo deste trabalho, fêmeas com idade aproximada de 70 dias foram suplementadas durante 15 dias e em seguida acasaladas com machos não suplementados. Das proles obtidas, no momento do desmame separou-se os machos que foram mantidos sob o mesmo protocolo de suplementação de suas mães até atingirem noventa dias de idade.

## **2. SUPLEMENTAÇÃO**

Para este fim foram estabelecidos dois grupos experimentais:

- ◆ Grupo controle (C), alimentado com ração para ratos (Nuvilab CR<sub>1</sub> – Nuvital nutrientes S/A).
- ◆ Grupo óleo de peixe (OP): alimentado com ração para ratos (Nuvilab CR<sub>1</sub> – Nuvital nutrientes S/A) e suplementados diariamente com 1,0 g/kg de composto de extratos marinhos, rico em ácidos graxos n-3. As cápsulas de

óleo de peixe continham 180mg de EPA, 120 mg de DHA e nos foram gentilmente doadas pela Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A.

O peso corporal dos animais foi avaliado a cada 2 dias, em balança digital (GEHAKA, 350). A suplementação oral foi realizada diariamente com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável. Para as fêmeas utilizadas para obtenção dos machos da geração F1, a suplementação se estendeu durante o período que compreendeu a aclimação (15 dias), acasalamento, gestação e lactação. Sendo a suplementação suspensa e os animais descartados após o desmame das proles.

Os machos da geração F1 foram suplementados desde o desmame até a idade de 90 dias, quando foram obtidas as amostras experimentais.

### **3. MICROSCOPIA DE LUZ**

Para obtenção das amostras para microscopia de luz, os animais foram profundamente anestesiados pelo uso de tiopental (200mg/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído (PFA) a 4%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Uma vez perfundidos, os encéfalos foram processados histologicamente, segundo protocolo a seguir:

#### **3.1. Processamento histológico e colorações**

Os encéfalos foram pós-fixados em PFA 4% por 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico durante 1 hora cada, a partir de álcool 70% até o absoluto, e diafanizados em xilol. A impregnação e emblocagem foram feitas em parafina histológica à 58° C (Beçak, W. &

Paulete, J; 1976). Cortes histológicos (n=10) de 10µm de espessura, foram obtidos em micrótomo do tipo Minot, de forma escalonada com intervalo de cinco cortes entre as amostras coletadas. As coordenadas determinadas por Paxinos e Watson, determinaram o primeiro (interaural:7,08 / bregma:-1,92) e último (interaural: 3,24 / bregma:-5,76) cortes a serem coletados. Em seguida, os cortes foram desparafinados em xilol, lavados em álcool absoluto e submetidos à uma das seguintes colorações:

**3.1.1. Hematoxilina-Eosina:** os cortes foram incubados em hematoxilina da Harris (0,5%) durante um minuto e a seguir lavados com água destilada por 10 minutos. Em seguida fez-se um banho rápido das lâminas em eosina (1%), seguido do enxágüe em etanol 70% para remoção do excesso de corante.

**3.1.2. Coloração de Nissl:** A incubação em cresil violeta (0,5% em 3% de ácido acético) ocorreu a 37 °C por tempo suficiente para evidenciar os corpos celulares. O excesso de corante foi retirado em água destilada e a evidenciação da coloração se deu pela incubação em etanol-ácido acético (95%-5%, v/v) até que a intensidade de coloração desejada fosse alcançada.

Após os procedimentos de rotina, todas as lâminas foram desidratadas em séries crescentes de álcool, incubadas em xilol, sendo finalmente montadas em Entellan®.

**3.2. Coloração de Golgi:** O método para coloração de Golgi foi desenvolvido segundo Fujioka et al., 2004. O hemisfério direito de cada animal, foi incubado durante 10 dias em fixador de Golgi (cromato de

potássio 5%, dicromato de potássio 1% e cloreto de mercúrio 1%, solução aquosa). Após incubação os hemisférios foram enxaguados em água destilada até completa remoção do precipitado formado e então incubados em nitrato de prata (1% solução aquosa) por 5 dias. Todas as incubações foram feitas a 4°C e ao abrigo da luz. Terminada a impregnação, os encéfalos foram emblocados em ágar (3%) para a obtenção de cortes com 70µm de espessura (≈ 20 cortes) em vibrátomo Leica VT1000S. Laminas semipermanentes foram montadas com PFA 4% e seladas com verniz.

### **3.3. Captura de imagem, estereologia e morfometria**

De cada lâmina foram fotografados cinco campos aleratórios, em microscópio *Zeiss Axiophoto*, acoplado a sistema de captura de imagem *Case Data Manager (Applied Spectral Imaging, Vista, Califórnia, EUA)* no Laboratório de fotomicrografia e captura de imagem da Universidade Federal do Paraná. Estereologia e morfometria foram realizadas pelo emprego do *software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA)*, onde pelo emprego da ferramenta *cell count*, contou-se o número total de neurônios com nucléolo evidente, presentes em toda extensão da porção da subárea CA<sub>1</sub> observada na imagem capturada ( $A_{cpo} = 0,19 \text{ mm}^2$ ).

## **4. MICROSCOPIA DE ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Após a decapitação, os encéfalos foram dissecados em placa de gelo seco, para coleta da formação hipocampal. De todos os animais, a porção

ventral dos hipocampos foi coletada e processada para microscopia eletrônica de transmissão segundo Naliwaiko et al. (2008). Resumidamente, as amostras foram fixadas em Karnowski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2 a 4 °C) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub> 2% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2) por uma hora e contrastadas em 2% de uranila por 2 horas. O material foi desidratado, em série alcoólica crescente, seguida de um banho em acetona, impregnados e incluídos em resina Epon-812. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Sorval Porter Blum Mt-2 e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% e acetato de chumbo.

O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX II, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. Foram capturadas imagens de 150 campos microscópicos ( $A_{cpo} = 12\mu m^2$ ), onde se avaliou aspectos relacionados à mielinização de axônios, através da mensuração da espessura da bainha de mielina e da contagem do número de fibras mielizadas em cada condição experimental.

## **5. CROMATOGRAFIA GASOSA E PERFIL LIPÍDICO**

### **5.1. Metanólise e extração lipídica**

O conteúdo lipídico dos hipocampos de animais controle e suplementados, da ração e do óleo de peixe, foi determinado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) segundo Sasaki et al. (2008). As amostras de tecido hipocampal foram liofilizadas por 24 h e então submetidas à metanólise ácida. Para a

extração de ácidos graxos do óleo de peixe, este foi diluído em clorofórmio (1:10) e 100µL desta mistura foram utilizados para extração e metanólise. Ácidos graxos da ração foram extraídos pela adição de clorofórmio:metanol (1:1), seguida de incubação a 100 °C durante 2 horas e então submetidos à metanólise ácida.

Na metanólise, as amostras foram acrescidas de 100µL de clorofórmio, 100µL de metanol e 100µL de ácido clorídrico (3N) e incubadas a 100 °C durante 3 horas. Terminada a incubação, procedeu-se a extração de ácidos graxos pela adição de 500µL de hexano, por duas vezes. Os ácidos graxos contidos na fase orgânica da mistura foram coletados com auxílio de pipeta de volume ajustável, transferidos para frascos identificados e posteriormente injetados no cromatógrafo gasoso, acoplado à espectrometro de massa (GC-MS) para determinação do perfil lipídico.

## **5.2. Cromatografia gasosa**

As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso Saturn 2000R equipado com coluna capilar CP-Sil-5 CB ChrompackR, 30m x 0,25 mm de baixo sangramento. Para estimar o tempo de retenção e determinar o perfil de fragmentação dos ácidos graxos de interesse, foram feitas injeções dos padrões para AA, EPA e DHA.

Injeções de 10µL de amostras foram realizadas e a identificação dos picos feita com base nos tempos de retenção e pelo espectro de fragmentação do padrão de cada ácido graxo, obtido no espectrômetro de massa.

## **6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING: ERK1/2, AKT, PI<sub>3</sub>K, neurofilamento, β-tubulina classe III.**

Alcançada a idade de 90 dias, os animais controle e suplementados foram ortotansados por decapitação e dos encéfalos dissecou-se o tecido hipocampal em placa de gelo seco para ensaio de SDS-PAGE.

### **6.1. Extrato celular e determinação protéica**

O extrato celular foi obtido conforme descrito por Lima et al., 2008. Em resumo, hipocampos foram homogeneizados com auxílio de ultrasonicador em tampão de lise gelado, contendo 50mM TRIS (pH 8), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,25 % deoxicolato de sódio, 2mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), inibidores de proteases e fosfatases. Após incubação por 30 minutos (4 °C), as amostras foram centrifugadas a 13.000 x *g* (60 minutos, 4°C) em centrifuga refrigerada eppendorf 5810R, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C. A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

### **6.2. Eletroforese e *Imunoblotting***

Após a quantificação protéica, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli e submetidas à eletroforese pelo método SDS-PAGE. Proteínas extraídas do tecido cerebral (50 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida (7,5% para PI<sub>3</sub>K e neurofilamento médio e 10% para as demais proteínas) e em seguida eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, em aparato para transferência imersa em tampão. Terminado

o processo de transferência, as membranas foram coradas com vermelho Ponceau, para visualizar eficiência do processo.

A seguir, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão TRIS-salina contendo 0,05% de tween-20 (TBST 0,05%) por no mínimo 1 hora, para evitar ligação inespecífica dos anticorpos e então incubadas com o anticorpo primário em TBST com 5% de leite, a 4 °C com suave agitação *overnight*. Foram utilizados anticorpos policlonais comerciais para reconhecimento das seguintes proteínas: ERK<sub>1/2</sub> (1:500-Santa Cruz Biotechnology), AKT (1:1000-Cell Signaling Technology), PI<sub>3</sub>K (1:500-Santa Cruz Biotechnology), neurofilamento médio (1:1000- Milipore), β-tubulina classe III (1:400-Chemicon).

A incubação com anticorpo secundário IgG conjugado à HRP (horseradish peroxidase), específico para o anticorpo primário ocorreu à temperatura ambiente, por uma hora e a reação foi visualizada através de substrato quimioluminescente (luminol) e registrada em filme para raio-X. As imagens das bandas correspondentes à reação positiva, foram densitometradas com auxílio do *software Image J* (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA*).

Como controle da quantidade de proteína aplicada nos ensaios foi utilizado anticorpo comercial anti α-actina (1:1000- Chemicon)

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média, submetidos ao teste “*t*” de *Student*. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para  $p \leq 0,05$ . Para composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados, foi utilizado o *software* Prisma GraphPad versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA.)

## **RESULTADOS**

## 1. MICROSCOPIA DE LUZ

### 1.1. Cresil Violeta e Morfometria do hipocampo

Para análise histológica, o hipocampo foi subdividido em duas principais áreas, conforme descrito por O'Keefe & Nadel (1978): o giro denteado (GD) e a formação hipocampal propriamente dita, compreendida pelas subáreas CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> e CA<sub>3</sub> (CA, do latim *cornu ammonis*). Morfologicamente, estas subáreas apresentam neurônios muito peculiares, chamados neurônios piramidais maiores, que se organizam em uma estrutura onde uma densa camada de células é delimitada duas camadas hipodensas acima e abaixo, dando à formação hipocampal o aspecto trilaminar indicado na figura 5.

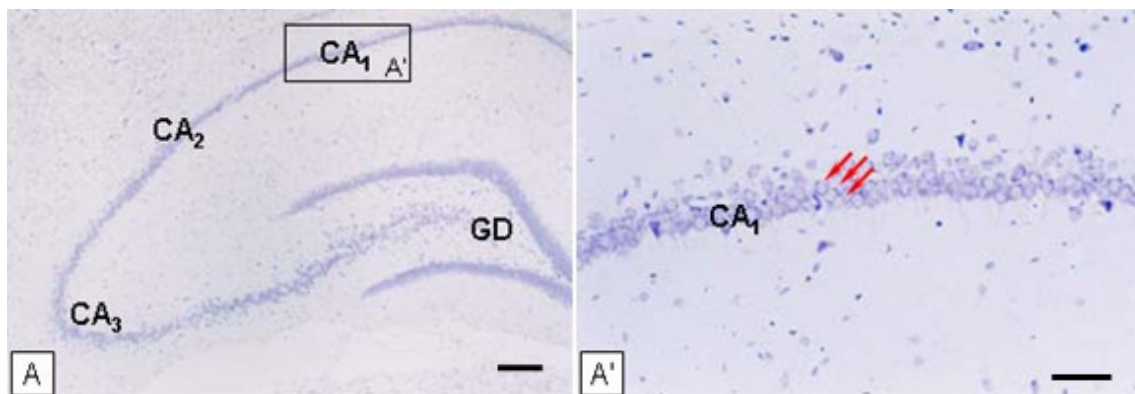


Figura 5. (A) Aspecto geral da formação hipocampal, evidenciando as regiões CA<sub>1,2,3</sub> e GD. (A') Aspecto trilaminar da formação hipocampal (subárea CA1) e suas células piramidais (setas). Cresil Violeta. Escala: 50  $\mu$ m

No GD é possível identificar neurônios piramidais menores que em microscopia de luz, apresentam-se muito semelhante àqueles de CA (núcleo com cromatina difusa e nucléolo evidente). Além disso, identificamos células que devido à granulosidade citoplasmática coram-se intensamente pelo cresil violeta, não apresentando assim, o aspecto neuronal clássico (Blaabjerg & Zimmer, 2007) (Figura 6).

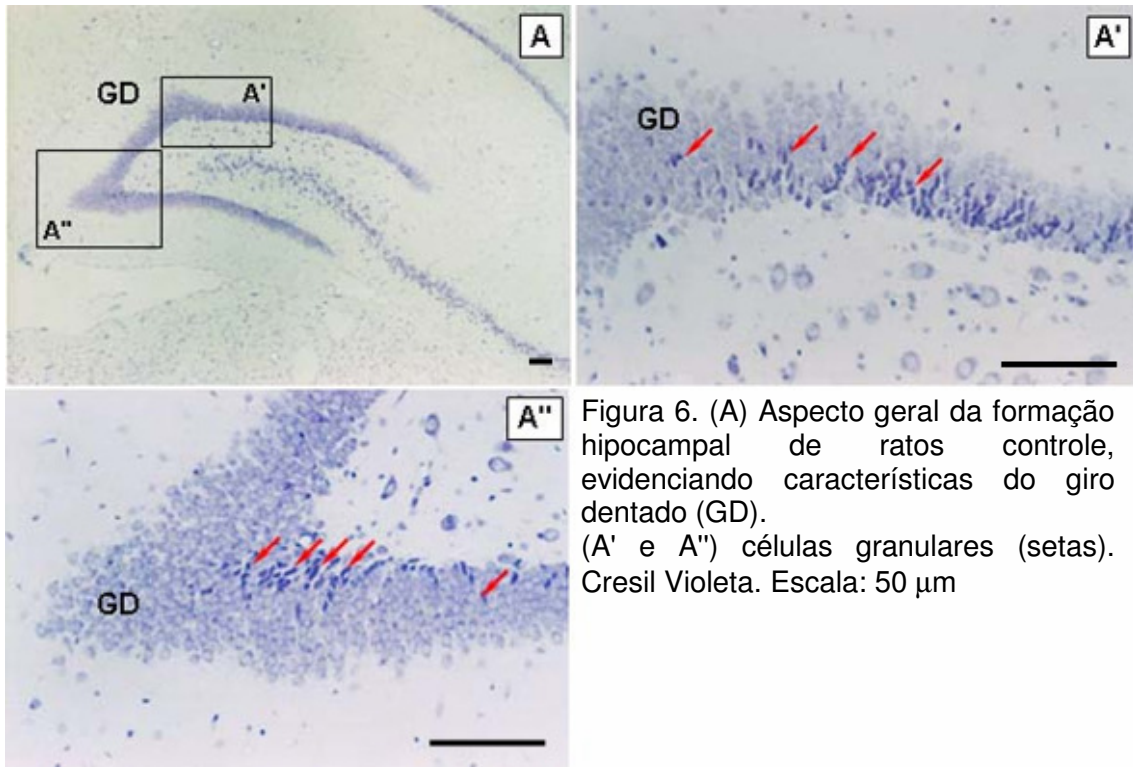


Figura 6. (A) Aspecto geral da formação hipocampal de ratos controle, evidenciando características do giro dentado (GD). (A' e A'') células granulares (setas). Cresil Violeta. Escala: 50  $\mu$ m

A análise morfométrica de CA<sub>1</sub> revelou aumento de, aproximadamente, 25% no número total neurônios piramidais nos animais cronicamente suplementados com óleo de peixe, quando comparado ao do grupo controle (figura 7 –  $t = 4.87$ ;  $p \leq 0.05$ ).

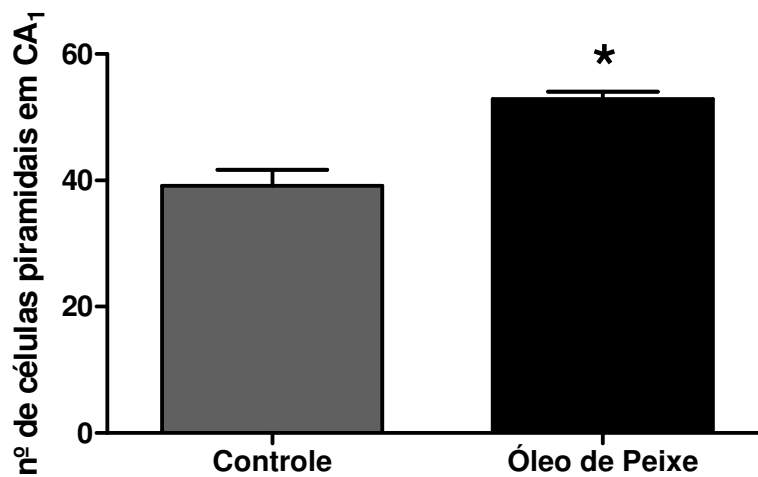


Figura 7. Número de células piramidais na subárea CA<sub>1</sub> no hipocampo de ratos controles e suplementados com óleo de peixe (n=10). Dados representam médias  $\pm$  EPM de 30 campos microscópicos aleatórios em cada grupo.  $A_{cpo}=19\text{mm}^2$ ; \*  $p \leq 0,05$ .

Assim como em CA<sub>1</sub>, a observação microscópica do GD permitiu demonstrar significativo aumento das células granulares no GD dos animais suplementado com óleo de peixe, quando comparado ao dos animais controles (figura 8 –  $t = 8.74$ ;  $p \leq 0.05$ ).

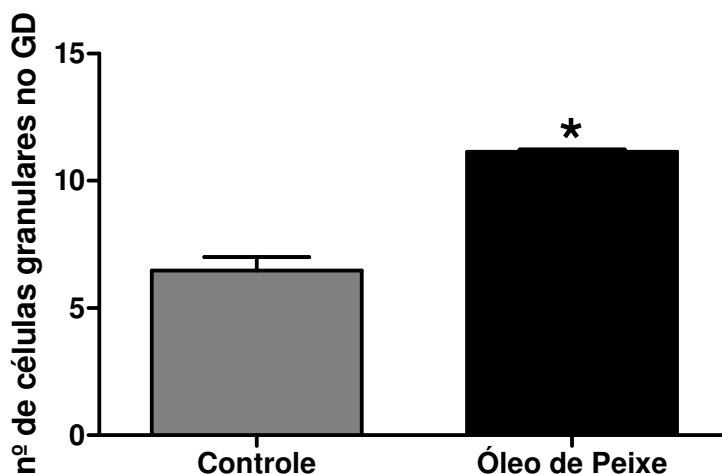


Figura 8. Número de células granulares no giro dentado do hipocampo de ratos controles e suplementados com óleo de peixe (n=10). Dados representam médias  $\pm$  EPM de 30 campos microscópicos em cada grupo. .  $A_{cpo}=19mm^2$ ; \*  $p \leq 0,05$ .

## 1.2.Evidenciação da arborização em neurônios piramidais de CA<sub>1</sub>:

### Hematoxilina-Eosina e Coloração de Golgi

A observação, em microscopia de luz das lâminas coradas por HE, sugeriu alterações no padrão de distribuição e ramificação dos dendritos apicais de neurônios piramidais em CA<sub>1</sub>, da formação hipocampal dos animais suplementados com óleo de peixe. Tais ramificações partem dos neurônios piramidais de CA<sub>1</sub> em direção ao GD, integrando as duas áreas (Figura 9).

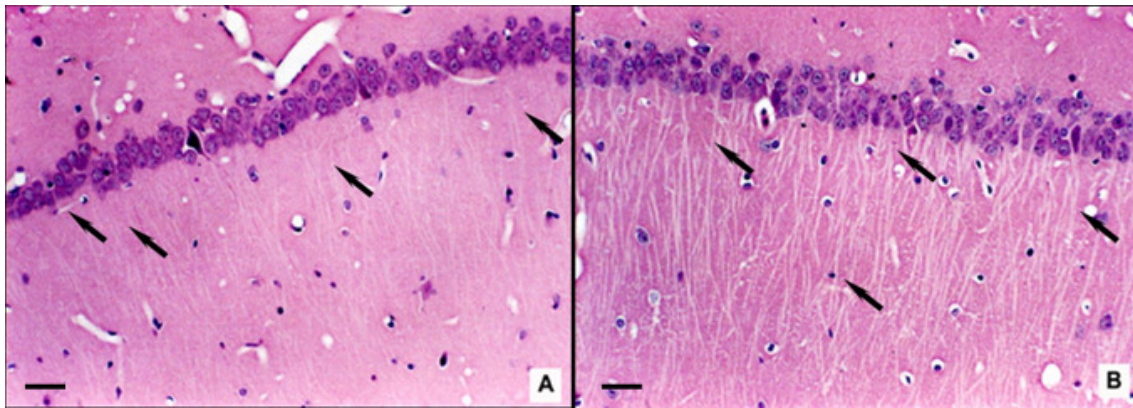


Figura 9. Evidenciação de projeções dendríticas dos neurônios de CA<sub>1</sub> (setas) em direção ao GD, constituindo uma das alça de comunicação sináptica no hipocampo. (A) Controle, (B) Óleo de peixe. HE. Escala: 50 μm

Para evidenciação das alterações morfológicas sugeridas na figura 9, foi empregada a técnica de impregnação de prata (Método de Golgi). Uma vez que a membrana dos neurônios é impregnada por nitrato de prata, aspectos tridimensionais da morfologia neuronal e da arborização dendrítica, tornam-se evidentes. A observação das lâminas impregnadas com prata sugere que a suplementação com óleo de peixe foi hábil em aumentar nível de complexidade dos dendritos apicais e dos ramos colaterais dos axônios constituintes da sub-área CA<sub>1</sub>, quando comparados com controle (Figuras 10 e 11).

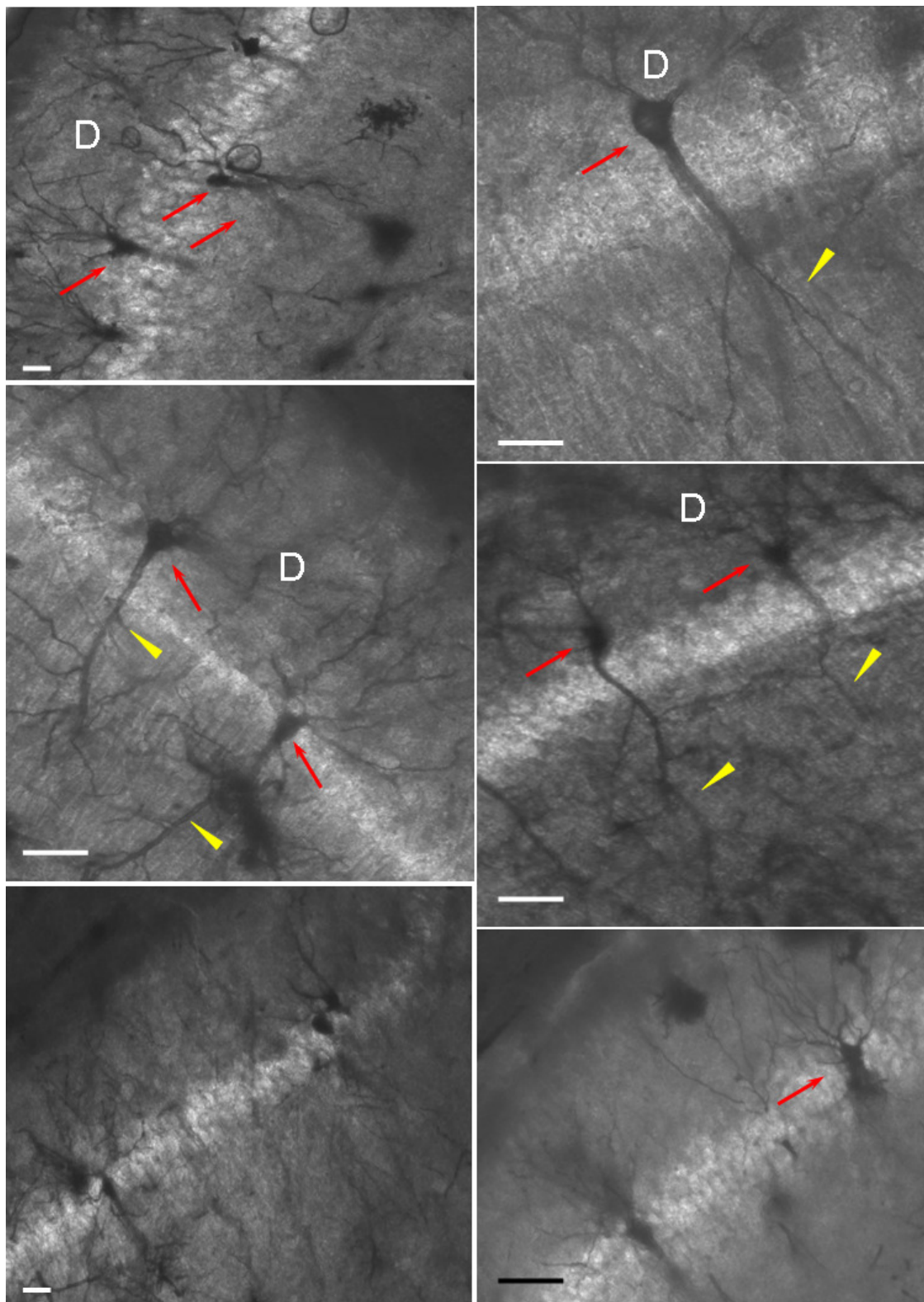


Figura 10. Arborização dendrítica (D) e projeções axonais (cabeça de seta) dos neurônios piramidais de CA<sub>1</sub> (setas) de animais controle. Método de Golgi. Escala: 20  $\mu$ m

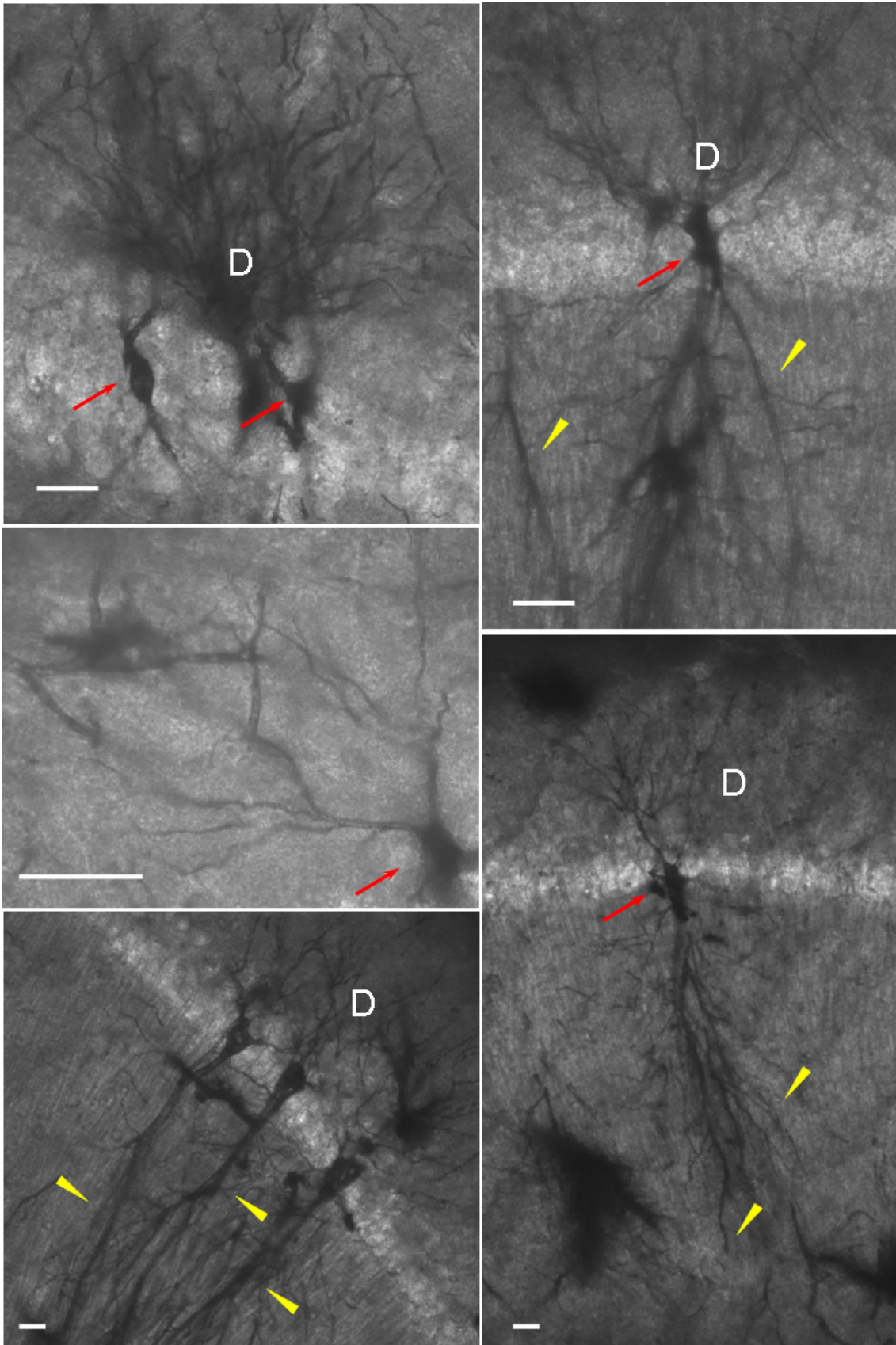


Figura 11. Arborização dendrítica (D) e projeções axonais (cabeça de seta) dos neurônios piramidais de CA<sub>1</sub> (setas) de animais suplementados com óleo de peixe Método de Golgi. Escala: 20  $\mu$ m.

## 2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

### 2.1. Efeito da suplementação sobre a mielinização

A observação do tecido hipocampal em microscopia eletrônica de transmissão revelou aumento na quantidade de fibras mielinizadas e também na espessura da bainha de mielina, no grupo suplementado com óleo de peixe quando comparadas às do grupo controle (figura 11).

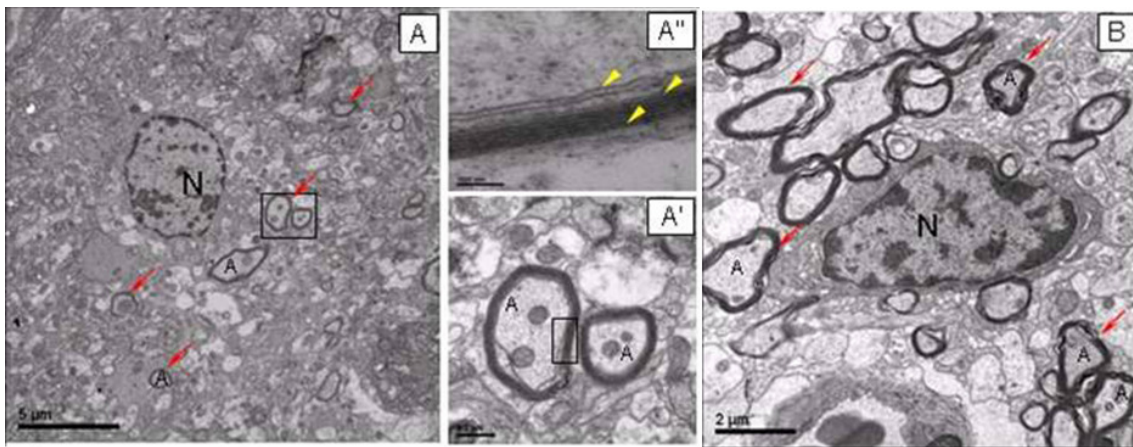


Figura 12. Eletromicrografia de transmissão de neurônios hipocâmpais. (A) Presença de fibras mielinizadas (setas) em amostra do grupo controle (A) e suplementado com óleo de peixe (B). Em A' axônios mielinizados, com mitocôndrias e microtúbulos em sua luz. Em A'' aspecto trilaminar de membrana (cabeça de seta) e as sucessivas deposições de mielina. (A- axônios, N- Núcleo)

Os resultados obtidos a partir da morfometria das eletromicrografias revelaram que a suplementação com óleo de peixe foi capaz em aumentar o número de fibras mielinizadas no hipocampo dos animais suplementados quando comparados com o do grupo controle ( $t = 4.9$ ,  $p \leq 0.0001$  - figura 13). Entretanto, este protocolo de suplementação não foi capaz de alterar a espessura destas bainhas ( $t = 0,7$ ,  $p = 0.4$  - figura 14).

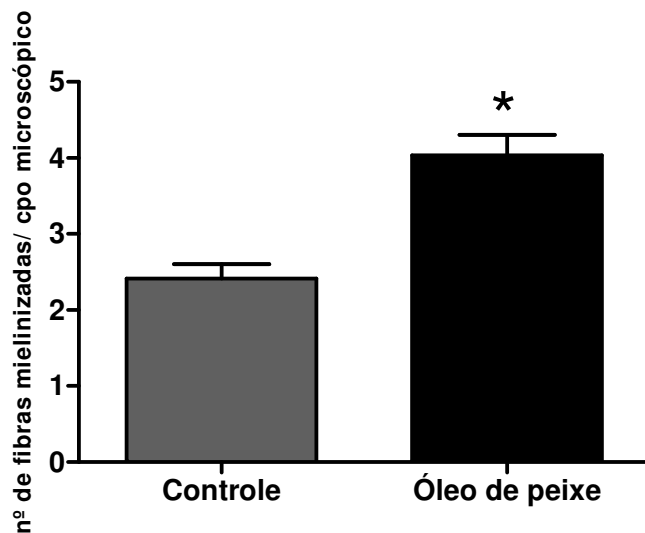


Figura 13. Número de fibras mielinizadas no hipocampo de ratos controles e suplementados com óleo de peixe (n=10). Dados representam médias  $\pm$  EPM de 100 campos microscópicos em cada grupo.  $A_{cpo} = 3,5\mu\text{m}$ ; \*  $p \leq 0.0001$

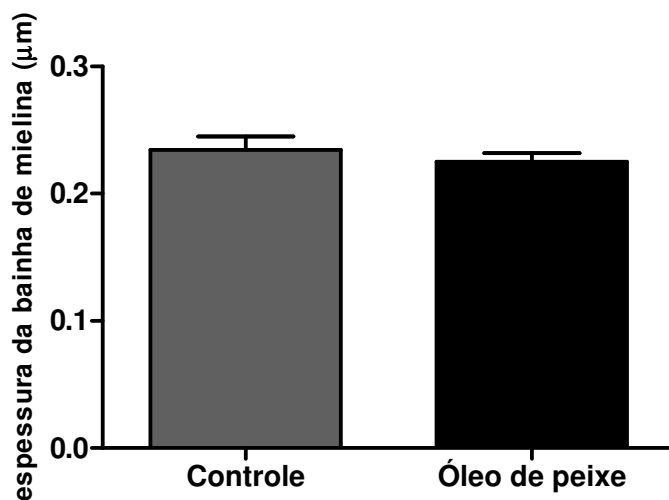


Figura 14. Espessura da bainha de mielina ( em  $\mu\text{m}$ ) no hipocampo de ratos controles e suplementados com óleo de peixe (n=10). Dados representam médias  $\pm$  EPM de 50 bainhas em cada grupo.  $A_{cpo} = 3,5\mu\text{m}$ .

## 2.2. Efeito da suplementação sobre o número de sinapses

A suplementação com óleo de peixe não teve efeito sobre a formação de sinapses, a partir da observação de eletromicrografias, quando comparada à do grupo controle (figura 15). Uma possibilidade para este achado seria a grande densidade celular encontrada no tecido de animais

adultos, o que dificultaria identificar alterações a partir de técnicas baseadas apenas em morfometria.

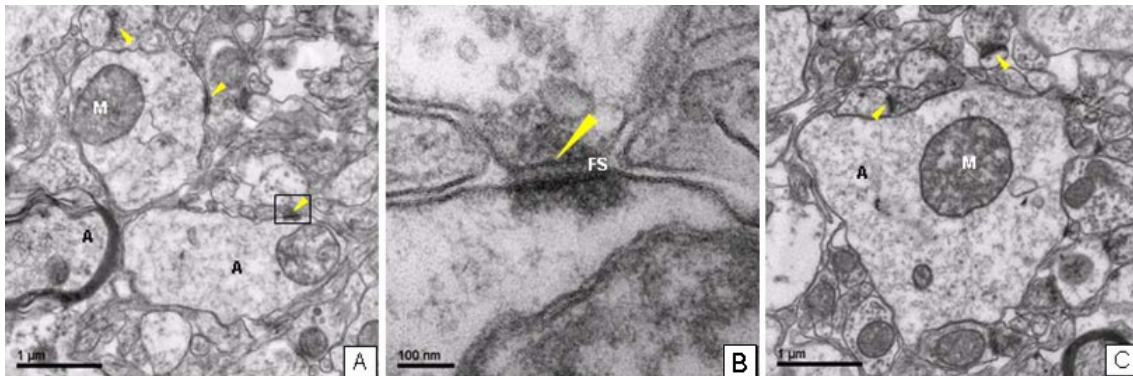


Figura 15. Eletromicrografia de transmissão de neurônios hipocâmpais. Distribuição de sinapses (setas) em amostras do grupo controle (A) e suplementado com óleo de peixe (C). (B) ultraestrutura de sinapse (FS- Fenda Sináptica; A-Axônio; Núcleo, M-Mitocôndria).

### 3. PERFIL LIPÍDICO

Pela análise cromatográfica das amostras cerebrais foi possível se determinar que a suplementação com óleo de peixe triplicou a concentração de DHA nos hipocâmpos dos animais suplementados, quando comparados ao dos controles (Tabela 1). Paralelamente, as concentrações de ácido palmítico e esteárico, ambos saturados, sofreram redução de 1,3 vezes. O índice de insaturação no grupo suplementado foi 1,5 vezes maior quando comparado ao do controle. Ainda, a razão ácido araquidônico;ácido docosahexaenóico (AA:DHA) foi de 3:1 no controle e de 1:1 no suplementado.

Tabela 1: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO DE RATOS CONTROLE E SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE PEIXE. DADOS REPRESENTAM MÉDIA  $\pm$  EPM.

Ácido Graxo	Controle (n=6)	Óleo de Peixe (n=6)
Palmítico (16:0)	16.63 $\pm$ 0.89	12.15 $\pm$ 0.17
Palmitoléico (16:1 n-7)	ND	0.41 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
Oléico (18:1 n-9)	22.25 $\pm$ 0.75	20.75 $\pm$ 0.6
Linoléico (18:2 n-6)	6.75 $\pm$ 0.48	5.1 $\pm$ 0.34
Esteárico (18:0)	27.75 $\pm$ 1.51	20.5 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>
Araquidônico (20:4 n-6)	19.43 $\pm$ 1.16	20.9 $\pm$ 0.33
DHA (22:6 n-3)	6.57 $\pm$ 0.6	20.7 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>
Razão AA:DHA	3:1	1:1
Índice de insaturação	152.9	239.16

<sup>a</sup> p < 0.05 e <sup>b</sup> p < 0.001 quando comparado ao controle.

Concentrações de ácidos graxos contidos na ração e na cápsula de óleo de peixe estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NA RAÇÃO E NA CÁPSULA DE ÓLEO DE PEIXE. DADOS REPRESENTAM MÉDIA ± EPM.

Ácido Graxo	Ração comercial (n=3)	Óleo de Peixe (n=3)
Palmítico (16:0)	11 ± 0.3	12.9 ± 0.3
Palmitoléico (16:1 n-7)	ND	12.0 ± 0.2
Oléico (18:1 n-9)	37 ± 0.2	18.7 ± 0.17
Linoléico (18:2 n-6)	49 ± 0.4	7.5 ± 0.12
Esteárico (18:0)	3 ± 0.12	ND
Araquidônico (20:4 n-6)	ND	0.7 ± 0.02
EPA (20:5 n-3)	ND	32.2 ± 0.3
DHA (22:6 n-3)	ND	12 ± 0.15 <sup>b</sup>

#### 4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Para investigar se a suplementação crônica com óleo de peixe tinha algum efeito sobre a expressão de proteínas intracelulares envolvidas nos fenômenos relatados nas sessões acima, elencamos três proteínas envolvidas na regulação de vias de proliferação celular e outras três indicadoras da diferenciação neuronal, que podem ser reguladas pelas primeiras.

##### 4.1. Proteínas envolvidas com proliferação e diferenciação celular:

##### **ERK1/2, AKT e PI<sub>3</sub>K .**

Os ensaios de western blotting realizados para ERK1/2, permitiram identificar aumento de 26% na expressão da proteína, no hipocampo dos animais

suplementados quando comparado ao dos controles ( $t = 2.52$ ;  $p \leq 0.05$  – figura 16).

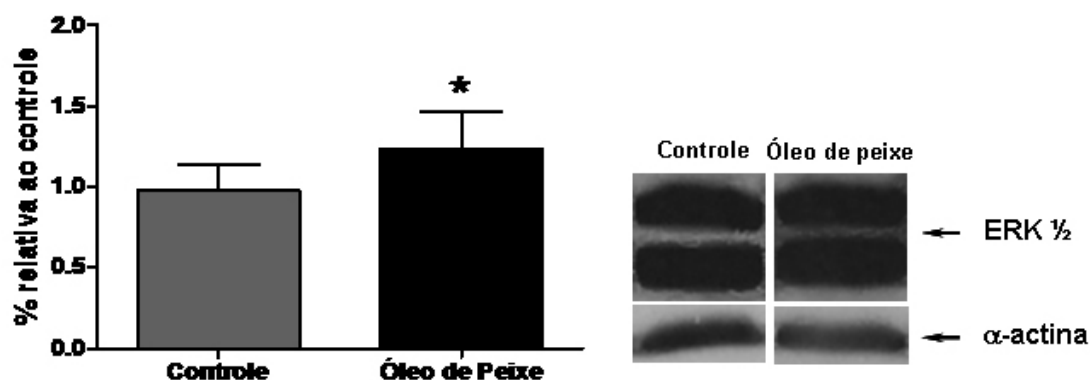


Figura 16. Expressão da proteína ERK1/2, no hipocampo de animais controle e suplementados com óleo de peixe. Dados representam média  $\pm$  DP de nove animais por grupo experimental.  $*p < 0.05$ .

De maneira semelhante, também foi identificado aumento de 42% na expressão da forma não fosforilada da proteína AKT (PKB), no hipocampo dos animais suplementados com óleo de peixe quando comparado ao dos controles ( $t = 3.92$ ,  $p \leq 0.05$  – Figura 17).

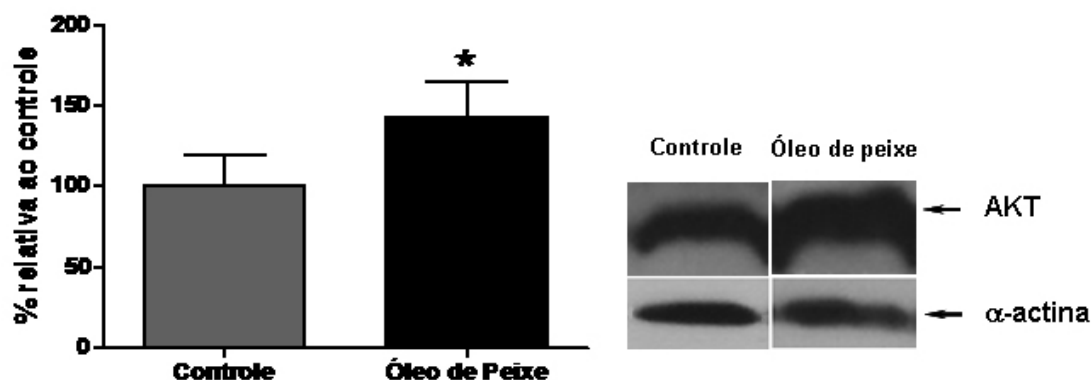


Figura 17. Expressão da forma não fosforilada da proteína AKT (PKB), no hipocampo de animais controle e suplementados com óleo de peixe. Dados representam média  $\pm$  DP de nove animais por grupo experimental.  $*p < 0.05$ .

A expressão da proteína  $PI_3K$ , aumento de 31% ( $t = 3.37$ ,  $p \leq 0.05$ ) no hipocampo dos animais suplementados com óleo de peixe quando comparado ao dos animais controle, (figura 18).

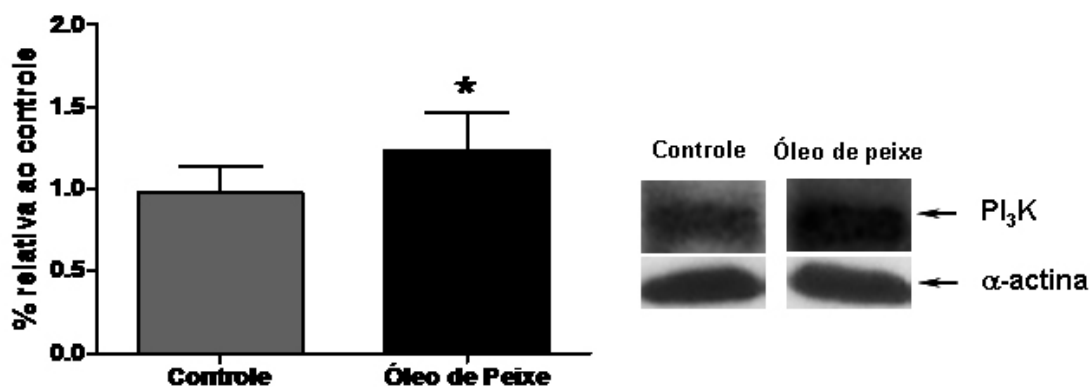


Figura 18. Expressão da forma não fosforilada da proteína PI<sub>3</sub>K, no hipocampo de animais controle e suplementados com óleo de peixe. Dados representam média  $\pm$  DP para nove animais por grupo experimental. \* $p < 0.05$ .

#### 4.2. Proteínas relacionadas à diferenciação neuronal: Neurofilamento médio e $\beta$ -tubulina classe III.

Para identificar se os resultados obtidos pela coloração de Golgi eram acompanhados de alterações na expressão de proteínas relacionadas ao citoesqueleto das células neurais, foram investigadas duas proteínas desta classe: neurofilamento médio (145 kDa) e  $\beta$ -tubulina classe III (55 kDa).

A suplementação com óleo de peixe foi capaz de aumentar em, aproximadamente, 59% a expressão da proteína neurofilamento no hipocampo dos animais suplementados quando comparados aos dos animais controles ( $t = 3.192$ ,  $p \leq 0.05$  – figura 19).

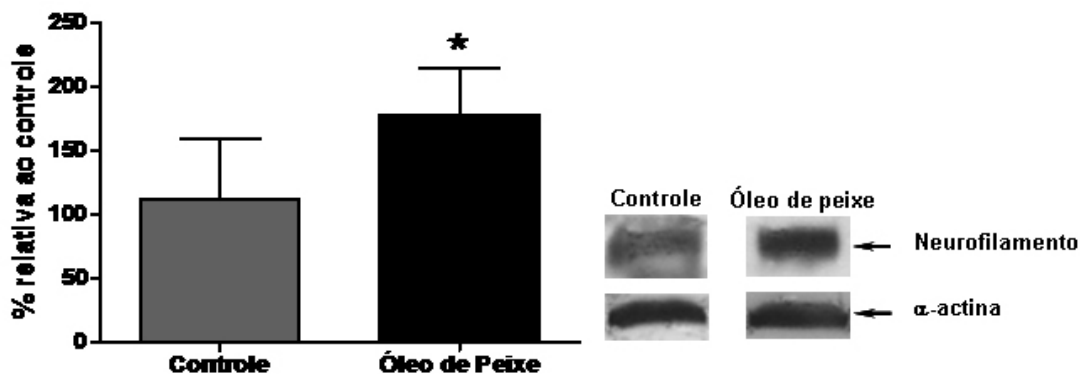


Figura 19. Expressão da proteína neurofilamento (145 kDa), no hipocampo de animais controle e suplementados com óleo de peixe. Dados representam média  $\pm$  DP de 9 animais por grupo experimental. \* $p < 0.05$ .

Por outro lado, a suplementação com óleo de peixe não alterou a expressão de  $\beta$ -tubulina classe III, outra importante proteína relacionada com diferenciação neuronal, conforme ilustrado na figura 20 ( $t= 0.621$ ,  $p=0.08$ ).

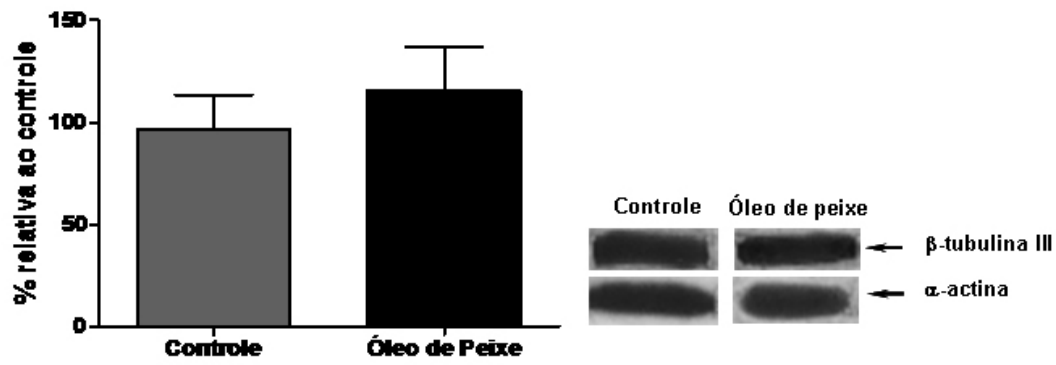


Figura 20. Expressão da proteína  $\beta$ -tubulina classe III, no hipocampo de animais controle e suplementados com óleo de peixe. Dados representam média  $\pm$  DP de 9 animais por grupo experimental.

## **DISCUSSÃO**

Durante os anos 90 e 2000, muitos pesquisadores voltaram seus interesses para os efeitos dos AGPIs n-3 e diversas condições humanas, especialmente nas populações ocidentais (Calder & Yaqoob, 2009). Nos últimos cento e cinquenta anos a dieta humana sofreu drásticas alterações. A industrialização dos alimentos provocou significativo aumento da ingestão de gorduras saturadas, AGPIs n-6 e de gorduras esterificadas artificialmente, fato este que provocou redução das concentrações de AGPIs n-3, vitaminas C e E (figura 20)(Simopoulos, 2002).

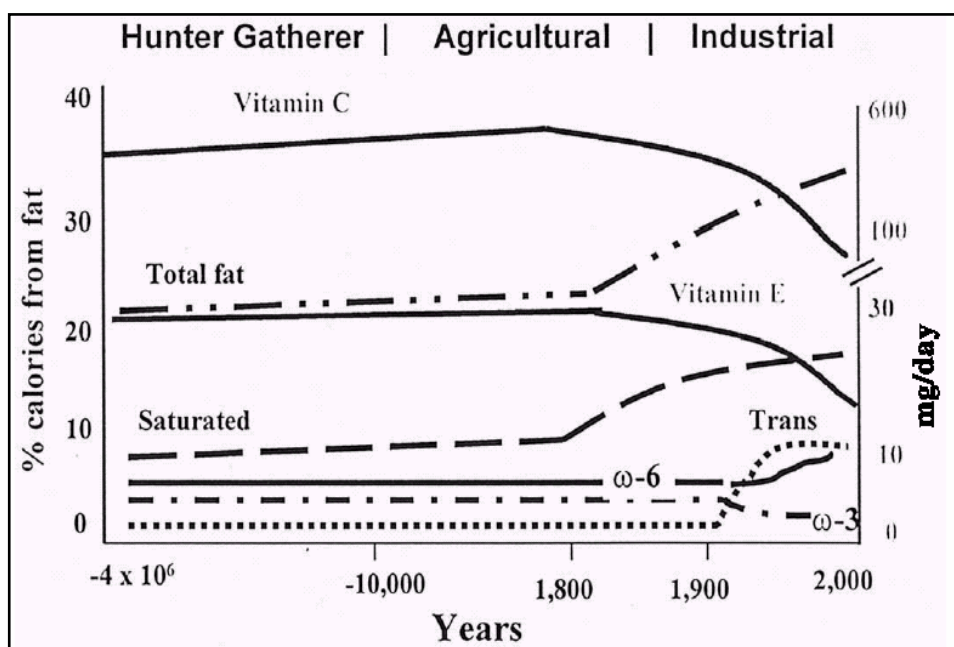


Figura 21: Percentual de calorias a partir de gordura na dieta humana do homem paleolítico até a atualidade. Na sociedade que se alimentavam de caça, na sociedade agrícola e na sociedade industrializadas. Fonte: Simopoulos – *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002.

A razão (n-6:n-3), postulada como ideal de 4:1 em sociedades ocidentais, onde o consumo de alimentos calóricos é elevado e de peixes muito reduzido, tem alcançado valores entre 20:1 até 40:1. O considerável aumento nas quantidade de AGPIs n-6 ingeridas por estas populações, acumuladas através de gerações, vem sendo correlacionado com o surgimento e aumento

da prevalência de uma série de doenças crônico degenerativa, como câncer, diabetes, cardiopatias e transtornos neurológicos (Simopoulos, 2002; 2009a).

Devido a alta concentração de AGPIs-CL da família n-3 no tecido cerebral e sua preferencial acumulação por estes AGPIs, estudos permitiram que nas últimas décadas se relacionasse o surgimento e curso de diversas neuropatologias com dietas deficientes em AGPIs n-3 (Simopoulos, 2009b; Ross et al, 2007; Innis et al. 2008a). Os resultados de inúmeras pesquisas clínicas, desde a década de 90 não deixam dúvidas sobre o efeito terapêutico destes AGs (Maes et al.; 1999; Edwards et al.; 1998; Horobin & Bennett, 1999; Peet & Horrobin, 2002; Nemets et al., 2002; Su et al., 2003). Entretanto, estudos em humanos limitam o emprego de diversas abordagens, fazendo assim com que modelos animais e abordagens *in vitro* tornem-se ferramentas de grande valia para se entender os fenômenos morfológicos, bioquímicos e mesmo gênicos que possam ser regulados pelos AGs (Naliwaiko et al.; 2004; Kudas et al., 2004; Belayev, 2009; He et al., 2009, Venna et al.; 2009).

Na década de 90, especial atenção foi dada aos efeitos dos AGPIs n-3 sobre a função cerebral, desenvolvimento e comportamento animal. Mesmo assim, apesar do grande volume de informações a cerca dos efeitos destes AGs sobre a função cerebral, pouco se esclareceu a cerca dos mecanismos pelos quais estes exercem seus efeitos, bem como sobre as alterações morfológicas ou bioquímicas que podem ser induzidas por estes lipídios.

Sob a luz destas informações, nosso modelo experimental objetivou investigar as possíveis alterações morfológicas encefálicas e de ultraestrutura neuronal decorrentes da suplementação crônica com óleo de peixe, composto rico em AGPI-CL n-3, bem como sobre a expressão de determinadas proteínas

que poderiam estar envolvidas neste efeito. Para tanto, ratos Wistar foram submetidos à suplementação com óleo de peixe desde a fase embrionária, aleitamento (via mãe) até a idade de 90 dias (por suplementação).

Ácidos graxos n-3 são determinantes do desenvolvimento cerebral, uma vez que o cérebro em desenvolvimento requer grandes quantidades de DHA durante a fase final de desenvolvimento e formação do SNC (Innis, 2008). As maiores modificações nas concentrações de DHA ocorrem durante o último trimestre de gestação e nos primeiros estágios do desenvolvimento pós-natal, quando ocorre o rápido desenvolvimento do cérebro em mamíferos (da Costa et al, 2009; Innis, 2007).

Uma vez que durante o desenvolvimento cerebral a transferência de AGs para o feto se dá exclusivamente pela mãe, através do leite e placenta, é necessária a intervenção na dieta materna para garantir ambiente enriquecido com AGs ao feto (da Costa et al., 2009). Ácidos graxos são transferidos de forma muito eficiente ao feto por estas duas vias, garantindo assim que os ácidos graxos utilizados para suplementar a dieta materna, sejam transferidos para o feto (Elias & Innis, 2001; Innis & Friesen, 2008; Naliwaiko et al., 2004). Dados desta natureza dão suporte a eficiência do protocolo de suplementação empregado em nosso trabalho, em produzir um ambiente perinatal rico em DHA.

Embora todo o encéfalo seja ávido por AGPIs n-3, em especial DHA, algumas formações recrutam maior quantidade deste AG do que outras. Regiões onde a densidade de sinapses excitatórias é maior, a frequência de estimulação e *turnover* de membranas são muito elevadas (i.e. hipocampo, núcleos da base e cortex pre-frontal), há maior mobilização de lipídios (Chalon,

2006). Além disso, é sabido que DHA e outros AGPIs podem ser mobilizados de fosfolípidios de membrana, para atuarem como segundos mensageiros, regulando diversos eventos intracelulares (Farooqui et al, 2007; Farooqui, 2009).

Em nosso estudo avaliamos a incorporação de AGs no hipocampo de ratos cronicamente suplementados com óleo de peixe, pela técnica de GC-MS e encontramos incorporação de DHA três vezes maior quando comparada à dos animais controles. O índice de insaturação nos animais suplementados também foi 1,5 vezes maior quando comparado ao do controle. Além disso, identificamos que a suplementação foi capaz de reduzir as concentrações de AG saturados no hipocampo. Nossos dados corroboram os achados de Naliwaiko, et al (2004), onde ratos submetidos ao mesmo protocolo de suplementação com óleo de peixe, apresentaram significativo aumento na concentração hipocampal e cortical de DHA.

Outro AGPI importante para o desenvolvimento cerebral é o ácido araquidônico (AA - 20:4 n-6). Dados da literatura apontam o AA como potente regulador de diversas enzimas intracelulares (fosfolipase A<sub>2</sub>, COX-2, acyl-CoAsintase), podendo através da regulação destas enzimas modular respostas à estímulos ambientais (Rapoport, 2007; Marzalek e Lodiswh, 2005). Devido às suas capacidades de regularem eventos celulares, através da ativação de cascatas independentes, AA e DHA são determinantes do desenvolvimento, competindo pela incorporação em membranas e dividindo a orquestração de diversos fenômenos celulares (Rao et al. 2006; Van Horn et al., 2005).

A suplementação com óleo de peixe não modificou o conteúdo de AA no hipocampo dos animais suplementados, mas foi capaz de alterar a razão

AA:DHA de 3:1 nos animais controle, para 1:1 nos animais suplementados, corroborando o que é postulado na literatura (Novak et al., 2009; Contreras & Rapoport, 2002). Assim, nossos achados dão suporte ao panorama funcional proposto na literatura, onde AA e DHA são imprescindíveis para correto desenvolvimento e funcionalidade do SNC (Novak et al., 2009; Rapoport, 2008; Wainwright, 2002).

Durante o desenvolvimento cerebral, eventos de proliferação, migração e diferenciação se sucedem como ondas, onde neurônios gerados em zonas proliferativas devem migrar em busca de seu sítio de diferenciação, onde frente a estímulos pertinentes se polarizam e estabelecem conexões (Rakic et al, 2009). O início do desenvolvimento cerebral é caracterizado pela alta frequência de proliferação celular em zonas germinativas, seguido por um período onde ocorre a diversificação destas células em neurônios e glia (Nowakowski & Haynes, 1999).

O perfeito desenvolvimento do cérebro compreende uma série de processos epigenéticos, onde a interação entre genes e ambiente criam alças de estimulação, que conduzem o processo de diferenciação e funcionalidade neuronal (Gottlieb, 1998). O processo de migração celular das zonas proliferativas até o destino, é importante fator na determinação da identidade neuronal. Neste processo, a sensibilização dos neurônios por sinais do ambiente, tornam-no responsivo ou refratário a determinadas informações, contribuindo para a ativação de receptores e vias metabólicas que irão caracterizá-lo funcionalmente (Wainwright, 2002).

Embora as alterações morfofisiológicas mais marcantes para o encéfalo ocorram durante o desenvolvimento, suprimento adequado de DHA na

idade adulta tem sido correlacionado com redução do risco do desenvolvimento de patologias como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, depressão e demência (Simopoulos, 2002; Milte et al, 2009; Staehelin, 2008). De maneira semelhante, muitos estudos epidemiológicos têm sugerido que o desenvolvimento de transtornos afetivos está diretamente relacionado com a redução da disponibilidade de DHA na dieta (Milde, et al.; 2009; Leung & Kaplan, 2009; Colangelo et al.2009).

Dentre as diversas hipóteses para o surgimento de sintomas relacionados com transtornos afetivos, uma delas sugere a degeneração hipocampal decorrente do desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Krishnan & Nestler, 2008). Neste caso, a exposição ao estresse crônico provoca aumento na concentração de cortisol circulante, inibindo a liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a ativação de fatores de transcrição importantes para sobrevivência dos neurônios hipocampais, que acabam por degenerar (Goldberg & Barres, 2000).

Estudos recentes utilizando técnicas de neuroimagem têm sugerido que pacientes deprimidos apresentam significativa redução no volume da formação hipocampal (MacQueen, 2009; Benedetti & Smeraldi, 2009; Rigucci et al., 2009) e que o uso de medicações antidepressivas é capaz de desencadear a neurogênese em indivíduos sob tratamento (Lanni et al, 2009).

Na literatura, o efeito do DHA sobre a neurogênese tem sido demonstrado em modelos animais, a partir de diferentes abordagens. Kawakita et al. (2006), demonstraram que ratos tratados com 300mg/kg de DHA durante cinco dias, apresentavam significativo aumento no número de neurônios “recém-nascidos” no GD. De maneira semelhante, Venna et al (2009),

demonstraram que a suplementação com 2,5g/kg de uma mistura de AGPIs contendo 70% de ALA, também foi capaz promover neurogênese no GD de camundongos suplementados durante 6 semanas. Entretanto a neurogênese nos animais suplementados não foi acompanhada de aumento da incorporação de DHA no hipocampo.

Nossos resultados relativos à microscopia de luz e posterior morfometria do hipocampo, revelaram aumento de 25% no número de neurônios piramidais da região CA<sub>1</sub> (figura 7) e de 70% nas células granulares do GD (figura 8) nos animais suplementados com óleo de peixe. Estes achados em conjunto com o aumento da incorporação de DHA no hipocampo, sugerem que este AG estaria sendo mobilizado das membranas, atuando sobre cascatas intracelulares de proliferação ou modulando a apoptose neuronal.

É sabido que AGPIs podem ser mobilizados das membranas celulares por ação de fosfolipases e que, uma vez livres no citosol, podem regular diversas cascatas de transdução de sinal, inclusive àquelas relacionadas à proliferação celular e diferenciação (Farroqui, 2009; Wu et al., 2009; Rapoport, 2008). Desta forma, assim como o DHA é capaz de modular proliferação e diferenciação *in vitro* (German et al, 2006; Wu et al., 2008; Langelier, 2005; Kim et al, 2000), o óleo de peixe, rico em DHA, poderia exercer efeito semelhante *in vivo*.

O efeito do DHA e de outros AGPIs sobre a modulação fenotípica de neurônios, também tem sido objeto de investigação recentemente. Segundo Calderon e Kim (2004), a adição de DHA às culturas de neurônios hipocampais foi capaz de aumentar o número e extensão de neuritos, após cinco dias de cultivo. Culturas primárias de neurônios corticais também apresentaram

aumento no número de neuritos após suplementação com DHA em oito dias de cultura (Cao et al. 2005).

A observação em microscopia de luz da formação hipocampal revelou que nos animais suplementados com óleo de peixe houve expressivo aumento da arborização dendrítica dos neurônios piramidais de CA<sub>1</sub> que se estendem em direção ao GD (Figura 9), contudo a coloração empregada (HE) não nos forneceu uma idéia da distribuição espacial destas ramificações. Para que pudéssemos identificar se existia aumento na quantidade de fibras e evidenciar a distribuição dos prolongamentos celulares destas células, empregamos a técnica de impregnação de prata (método de Golgi).

Embora não tenha sido empregada uma técnica morfométrica efetiva para identificar diferenças significativas entre os grupos, as figuras 10 e 11 permitem comparar o aspecto dos dendritos apicais nos dois grupos experimentais, sugerindo que a suplementação com óleo de peixe foi hábil em tornar mais complexa a arborização dendrítica apical dos neurônios piramidais da região CA<sub>1</sub>.

Se de maneira semelhante, as células em cesta (*basket cells*) desta região apresentam maior número de ramos colaterais em seus axônios, podemos sugerir o estabelecimento de conexões mais robustas nos animais suplementados quando comparados aos animais controle. Tais alterações podem ser refletidas no fortalecimento do circuito trisináptico encontrada no hipocampo (Amaral, 1993).

A maioria dos estudos investigando os efeitos do DHA sobre a diferenciação celular tem sido desenvolvida utilizando técnicas de cultivo celular. Trabalhos desta natureza se valem de células embrionárias, portanto

ainda pouco diferenciadas morfológicamente, mas demonstraram de forma clara o efeito de DHA sobre a modulação fenotípica e diferenciação em condições nutricionais bem definidas (Kan et al, 2007). Embora seja necessário considerar as diferenças existentes entre metodologias, nossos achados podem ser corroborados pelos dados disponíveis na literatura, uma vez que sugerem *in vivo*, efeitos muito semelhantes aos encontrados *in vitro*.

Dados da literatura sugerem que a incorporação de DHA durante o desenvolvimento, provoca o redirecionamento de outros lipídios, em especial aqueles saturados, para diferentes microdomínios de membrana (Farroqui et al, 2007). Assim, regiões como os terminais sinápticos, dendritos e espinhos dendríticos seriam enriquecidas com DHA (Wurtman, 2008), melhorando a fluidez de membranas nestas regiões de contatos, expondo canais e receptores e, por conseguinte, melhorando a transmissão sináptica eventos fisiológicos decorrentes desta interação (i.e. formação e consolidação de memória e acuidade visual) (Fedorova & Salem, 2006). Com o deslocamento de AGPIs para sítios de membrana fisiologicamente mais ativos, ácidos graxos saturados passam a ser incorporados em fosfolipídios de outras porções celulares ou ainda nas membranas de oligodendrócitos e células de Schwann, favorecendo o processo de mielinização (Horrocks & Farroqui, 2004).

Sabe-se que o processo de mielinização depende da deposição adequada de gorduras nas membranas dos oligodendrócitos, associada às proteínas (Haubner et al, 2007). Ácidos graxos não só alteram a quantidade e tipo de gorduras disponíveis como também são capazes de regular a síntese de proteínas relacionadas à diferenciação de neurônios e célula da glia (Salvati et al, 2008). Nossos dados corroboram os achados de Haubner et al. (2007),

onde a adição de DHA, à dieta durante o período gestacional de ratas, levou ao aumento da concentração de mielina no tecido nervoso nas proles nascidas destas ratas.

Relatos da literatura sugerem que a suplementação com AGPIs promove aumento da fluidez de membrana (Horrocks & Farroqui, 2004, Farroqui, 2009) neuritogênese *in vitro* (Calderon & Kim, 2004) e *in vivo* (Coti Bertrand et al, 2006) e formação de espinhos dendríticos (Sakamoto et al, 2007). Entretanto, apesar da presença aumentada de dendritos apicais na região CA<sub>1</sub> dos animais suplementados com óleo de peixe (Figura 11), o que poderia facilitar o estabelecimento de novas sinapses, a observação da ultraestrutura neuronal não evidenciou aumento na quantidade de sinapses formadas (figura 15). Uma possível explicação para este achado seria o fato de que em nosso trabalho foram usados animais adultos, enquanto outros autores se valem de ferramentas distintas para avaliação deste fenômeno. Em animais adultos a densidade celular e de estruturas neuronais como dendritos e axônio é infinitamente maior do que em embriões, característica tissular que prejudica o isolamento das estruturas e melhor visualização.

Como mencionado acima, AGPIs podem ser mobilizados das membranas celulares por ação de fosfolipases e que, uma vez livres no citosol, podem regular diversas cascatas de transdução de sinal, inclusive àquelas relacionadas à proliferação celular e diferenciação (Farroqui, 2009; Wu et al., 2009; Rapoport, 2008). No intuito de identificar se as alterações morfológicas encontradas neste trabalho eram acompanhadas do aumento na expressão de proteínas envolvidas com proliferação, diferenciação e sobrevivência celular,

elencamos as seguintes proteínas: ERK 1/2, AKT (PKB), PI<sub>3</sub>K, neurofilamento, β-tubulina classe III.

Na década de 90 o interesse em se desvendar o papel da ERK em eventos de proliferação, acabou por revelar seu envolvimento como proteína chave não apenas em cascatas relacionadas à proliferação celular, mas também na diferenciação e sobrevivência neuronal (Grewal, 1999). Recentemente tem sido sugerido que AKT e PI<sub>3</sub>K também podem atuar em conjunto com a ERK nos eventos de diferenciação neuronal (Niemoller & Bazan, 2009). A literatura tem sugerido o envolvimento da ERK 1/2 em processos de regeneração neural, em abordagens envolvendo os ácidos graxos. Em estudo envolvendo indução de isquemia cerebral, Pan et al. (2009) demonstraram que o emprego de DHA horas antes da indução da isquemia, promoveu aumento da taxa de fosforilação da ERK 1/2, protegendo assim neurônios da apoptose induzida por agentes inflamatórios. Os efeitos da ERK 1/2 sobre a proliferação celular são abundantes em outros tipos de células (Naliwaiko et al, 2008; Denis et al, 2002; Bousseroue, 2004) sendo ainda escassos os dados relativos as células neurais. Dados obtidos de abordagens *in vitro*, têm demonstrado que a adição de DHA a linhagens neurais ou em cultivo primário, foi capaz de aumentar a taxa de fosforilação, ou ainda aumentar a expressão basal desta proteína, regulando eventos de diferenciação ou sobrevivência (German et al, 2006; Wu et al., 2008; Langelier, 2005; Kim et al, 2000).

De maneira semelhante, tem sido postulado que a AKT, pode ter sua expressão e/ ou fosforilação regulada por ação do DHA (Akbar et al., 2005). A mobilização de DHA de fosfolipídios de membrana faz com que a AKT seja

mobilizada para o citosol e então fosforilada em seus resíduos catalíticos. Curiosamente, a proteína localizada imediatamente *up stream* e responsável pela fosforilação de AKT, é a PI<sub>3</sub>K (Sathyajit, et al. 2009; Zhao, et al. 2006). Em nosso modelo experimental, verificamos que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de induzir aumento na expressão das proteínas investigadas, conforme demonstrado nas figuras 16, 17 e 18. Estes achados, somados aos de incorporação, corroboram os resultados de Akbar et al. (2005) e sugerem que em nosso modelo experimental o DHA incorporado às membranas neuronais possa atuar pelos mesmos mecanismos.

A interação entre moléculas do meio interno cerebral e receptores de membrana é responsável pela modulação de diversos fatores relacionados à polarização neuronal (da Silva & Doti, 2002). Durante a diferenciação celular, várias proteínas são recrutadas ao longo do processo, entre elas as moléculas do citoesqueleto (Demir et al, 2009; da Silva & Doti, 2002). Em nosso trabalho, avaliamos a expressão de neurofilamento médio e  $\beta$ -tubulina, duas moléculas de citoesqueleto relacionadas à polarização e diferenciação neuronal. A partir dos resultados obtidos nos ensaios de *western blotting*, identificamos que a suplementação com óleo de peixe resultou no aumento a expressão de neurofilamento, mas não de  $\beta$ -tubulina III (figuras 18 e 19). Embora, seja grande o envolvimento da proteína neurofilamento e outros filamentos intermediários no desenvolvimento correto dos neurônios e que recentemente tenham sido correlacionadas com inúmeras neuropatologias (Perrot & Eyer, 2009), não existem relatos literários relacionando o efeito do DHA sobre a expressão de neurofilamento médio, sendo nosso trabalho pioneiro a relacionar expressão de neurofilamento médio com a diferenciação induzida por DHA.

Classicamente, estudos *in vitro* avaliam a expressão de  $\beta$ -tubulina classe III como indicador da diferenciação neuronal. Com base nessa informação, nossos resultados corroboram os de Cansev & Wurtman (2007), onde a administração crônica de DHA não foi capaz de alterar a expressão  $\beta$ -tubulina em gerbils, embora outras proteínas relacionadas à sinapse tivessem sua expressão aumentada.

Assim, podemos sugerir que embora nossa abordagem se baseie num modelo animal onde os processos não são direcionados de maneira pontual, mas resultam da somatória de interações, os neurônios dos animais suplementados com óleo de peixe foram gerados em ambiente enriquecido em DHA, mimetizando efeitos (*in vitro e in vivo*) relatados na literatura.

## **CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a suplementação crônica com óleo de peixe:

- foi hábil em aumentar o número de neurônios nas subáreas do hipocampo de ratos suplementados;
- foi capaz de alterar o padrão de distribuição e ramificação de axônios da região CA<sub>1</sub> do hipocampo de ratos suplementados;
- foi capaz de alterar o padrão de mielinização no hipocampo dos animais suplementados;
- promoveu aumento da incorporação lipídica na área cerebral estudada;
- foi capaz de alterar a expressão de proteínas relacionadas à proliferação e diferenciação celular no hipocampo de ratos suplementados.

Estes dados em conjunto sugerem que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de induzir alterações na expressão de proteínas importantes no cenário da formação cerebral e que estas alterações podem estar relacionadas às alterações morfológicas e ultraestruturais. Ainda, se extrapolados para as abordagens clínicas, nossos dados sugerem que as alterações aqui encontradas, podem ser responsáveis pela ação antidepressiva do óleo de peixe, previamente por nós demonstrado.

Em resumo, nossos dados vêm de encontro ao que é postulado na literatura em trabalhos *in vitro* e *in vivo*, embora seja o primeiro a demonstrar, histologicamente, este tipo de alteração em animais adultos.

## **REFERÊNCIAS**

AHMAD A, MURTHY M, GREINER RS, MORIGUCHI T, SALEM N JR .A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. **Nutritional Neuroscience**, v.5, n.2, p.103-113, 2002

AKBAR M, CALDERON F, WEN Z, KIM HY. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. **Proceedings National Academic Science USA**, v.102; n. 10858–10863, 2005.

ALMEIDA SS, DUNTAS LH, DYE L, NUNES ML, PRASAD C, ROCHA JB, WAINWRIGHT P, ZAIA CT, GUEDES RC. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, p.311–320, 2002

AMARAL, D.G. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. **Current opinion in neurobiology**, v.3, p. 25-229, 1993.

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

ANSORGE, M.S; HEN, R.; GINGRICH, JA. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. **Current opinion in pharmacology**, v7, p. 8-17, 2007.

ARONSON, W.J.; GLAPSY, J.A.; REDDY, A.T.; REESE, D.; HERBER, 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.

BEÇAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1976.

BELAYEV L, KHOUTOROVA L, ATKINS KD, BAZAN NG. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. **Stroke**, v.40, n. 9, p.3121-3126.2009

BENEDETTI F, SMERALDI E. Neuroimaging and genetics of antidepressant response to sleep deprivation: implications for drug development. **Curr Pharm Des.** ,v.15, n.22, p.2637-49, 2009.

BLAABJERG M, ZIMMER J. The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. **Prog Brain Res**, v.163, p.85-107, 2007.

BOUSSEROUEL S, RAYMONDJEAN M, BROUILLET A, BÉRÉZIAT G, ANDRÉANI M. Modulation of cyclin D1 and early growth response factor-1 gene expression in interleukin-1beta-treated rat smooth muscle cells by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. **Eur J Biochem**, v.271, n. 22, p.4462-4473, 2004.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BROADHURST, C.L.; WANG, Y.; CRAWFORD, M.A.; CUNNANE, S.C.; PARKINTONG, J.E.; SCHIMIDT, W.F. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African *Homo sapiens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.131, n.4, p.653-673, 2002.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated Fatty acids. **Postgraduated Medicine**, v.121, n.6, p. 148-57, 2009.

CALDERON, F.; KIM, H-Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v.90, p.979-988, 2004.

CANSEV M, WURTMAN R.J. Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils. **Neuroscience**, v.148, p.421-431, 2007.

CAO D, XUE R, XU J, LIU Z. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. **J Nutr Biochemistry**, v.16, n.9, p.538-546, 2005.

CETIN I, KOLETZKO B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.11, n.3, p.297-302, 2008.

CHALON,S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, n.4-5, p. 259-69, 2006.

CHUNG JW, NOH EJ, ZHAO HL, SIM JS, HA YW, SHIN EM, LEE EB, CHEONG CS, KIM YS. Anti-inflammatory activity of prosapogenin methyl ester of platycodin D via nuclear factor-kappaB pathway inhibition. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v.31, v.11, p.2114-2120, 2008.

CHEN, T.C.; GREEN, J.T.; ORR, S. K.; BAZINET, R.P. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 79, p. 85-91, 2008.

COLANGELO LA, HE K, WHOOLEY MA, DAVIGLUS ML, LIU K. Higher dietary intake of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids is inversely associated with depressive symptoms in women. **Nutrition.**, v.25, n.10, p. 1011-9, 2009

COLOMBO J, KANNASS KN, SHADDY DJ, KUNDURTHI S, MAIKRANZ JM, ANDERSON CJ, BLAGA OM, CARLSON SE. Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. **Child Development**, v.74, n.4, p.1254-1267, 2004.

CONTRERAS MA, RAPOPORT SI. Recent studies on interactions between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in brain and other tissues. **Curr Opin Lipidology**, v.13, n.3, p. 267-72, 2002.

COTI BERTRAND, P., O'KUSKY, J.R, INNIS, S.I. Maternal Dietary (n-3) Fatty Acid Deficiency Alters Neurogenesis in the Embryonic Rat Brain. **J. Nutr**, v.136, p.1570-1575, 2006.

CURI, R; POMPEIA, C; MIYASAKA, C K; ARAÚJO FILHO, J P. **Entendendo a Gordura. Os Ácidos Graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.

DA COSTA KA, RAI KS, CRACIUNESCU CN, PARIKH K, MEHEDINT MG, SANDERS LM, POTTINGER AM, ZEISEL SH. Dietary docosahexaenoic acid supplementation modulates hippocampal development in the Pemt <sup>-/-</sup> mouse. **J Biol Chem**, v. 4, 2009.

DA SILVA TM, MUNHOZ RP, ALVAREZ C, NALIWAIKO K, KISS A, ANDREATINI R, FERRAZ AC. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J Affect Disord**, v.111, p.351-359, 2008.

DA SILVA, J.S.; DOTTI, D.G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nature Review Neuroscience**, v.3, n.9, p.694-704, 2002.

DEMIR O, SINGH S, KLIMASCHEWSKI L, AKSAN KURNAZ I. From Birth Till Death: neurogenesis, Cell Cycle, and Neurodegeneration. **Anat Rec** v.26, n. 292, f.12, p.1953-1961,2009.

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

ELIAS, S.L; INNIS, S.M. Newborn infant plasma trans, conjugated linoleic, n-6 and n-3 fatty acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation and birth weight and length. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.807-814, 2001.

FAROOQUI AA, HORROCKS LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly.**Neuroscientist**, v. 12, n.3, p. 245-60. Review. 2006.

FAROOQUI, A.A. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling and association with neurological disorders. **Neuroscientist**, v.4, p.392-407, 2009.

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

FAROOQUI, A.A.; ONG, W-Y.; HORROCKS, L.A.; CHENG, P.; FARROQUI, T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: The battle of the titans. **Brain Research Review**, v.56, p. 443-471, 2007.

FEDOROVA, I.; SALEM N.Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids**, v. 75, n.4-5, p. 271-289, 2006.

FUJIOKA, A.; FUJIOKA, T., ISHIDA, Y., MAEKAWA, T.; NAKAMURA, S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 141, n.2, p. 907-915, 2006.

GERMAN OL, INSUA MF, GENTILI C, ROTSTEIN NP, POLITI LE. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. **J Neurochem.**, v. 98, n.5, p. 1507-20, 2006.

GLEISSMAN, H.; JOHNSEN, J.I.; KOGNER, P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? **Experimental cell research**, v. 316; p. 1365–1373, 2010.

GLOMSET, J.A. Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v.321, n.7, 2006.

GOLDBERG, J.L.; BARRES, B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. **Annual review of neuroscience**, v.23, p. 579-612, 2000.

GOTTLIEB, G. Normally occurring environmental and behavioral influences on gene activity: from central dogma to probabilistic epigenesis. **Psychological review**, v. 105, p.792-802, 1998.

GREWAL, S.S.; YORK, RD; STORK, PJS. Extracellular-signal-regulated kinase signaling in neurons. **Current opinion in neurobiology**, v.9, p.544-553, 1999.

GROSSFIELD A, FELLER SE, PITMAN MC. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**.v.103, n.13, 2006.

HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Canadian Journal of Psychiatry**, v.48, n.3, p.195-203, 2003.

HAUBNER L, SULLIVAN J, ASHMEADE T, SASTE M, WIENER D, CARVER J. The effects of maternal dietary docosahexaenoic acid intake on rat pup myelin and the auditory startle response. **Dev Neurosci.**, v.29, n.6, p. 460-7, 2007.

HE, C.; QU, X.; CUI, L.; WANG, J.; KANG, J.X Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. **PNAS**, p.1-6, 2009

HIBBELN JR, FERGUSON TA, BLASBALG TL. Omega-3 fatty acid deficiencies in neurodevelopment, aggression and autonomic dysregulation: opportunities for intervention. **Int Rev Psychiatry**. v. 18, n.2, p.107-118, 2006.

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. Fish consumption and major depression. **The Lancet**, v.351, p.1213, 1998.

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

HORROBIN. D.F. A new category of psychotropic drugs: neuroactive lipids as exemplified by ethyl eicosapentaenoate (E-E). **Progress in Drug Research**, v.59, p.171-199, 2002.

HORROBIN. D.F.; BENNETT, C.N. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acids and metabolism and diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.60, p. 217-234, 1999.

HORROCKS LA, FAROOQUI AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n.4, p:361-372, 2004.

HORROCKS, L.A.; YEO, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, v.40, n.3, p. 211-225, 1999.

INNIS, S.M.; FRIESEN, R.W.; Essential n-3 fatty acids among pregnant women and early visual maturation in term infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p.548-557, 2008

INNIS SM. Omega-3 Fatty Acids and Neural Development to 2 Years of Age: Do We Know Enough for Dietary recommendations? **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v.48, p.S16 –S24, 2009.

INNIS SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, v. 1237, p.35-43, 2008.

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

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

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

KAN, I.; MELAMED, E.; OFFEN, D.; GREEN, P. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid are fundamental supplements for the induction of neuronal differentiation. **Journal of lipid research**, v.48, n. 3, p.513-517, 2007

KAWAKITA E, HASHIMOTO M, SHIDO O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v. 139, n.(3), p.: 991-997, 2006.

KIM, H-Y.; AKBAR, M.; LAU, A.; EDSAL, L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.45, p.35215-35223, 2000.

KITAJKA, K.; PUSKÁS, L.G.; ZVARA, A.; HACKLER JR., L.; BARCELÓ-COBLIJN, YEO, Y.K. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. **PNAS**, v.99, n.5, p.2619-2624, 2002.

KODAS, E.; GALINEAU, L.; BODARD, S.; VANCASSEL, S.; GULLOTEAU, D.; BESNARD, J-C.; CHALON, S. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. **Journal of Neurochemistry**, v.89, p.695-702, 2004.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v.455, p.894-902, 2008.

LANGELIER B, ALESSANDRI JM, PERRUCHOT MH, GUESNET P, LAVIALLE M. Changes of the transcriptional and fatty acid profiles in response to n-3 fatty acids in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Lipids**, v.40, n.7, p.719-28, 2005.

LANNI C, GOVONI S, LUCHELLI A, BOSELLI C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. **Cell Mol Life Sci.**, v. 66, n.18, p.2985-3008,2009.

LEUNG BM, KAPLAN BJ. Perinatal depression: prevalence, risks, and the nutrition link--a review of the literature. **J Am Diet Assoc.**, v. 109, n.9, p.1566-75, 2009.

LIMA M.M.S.; ANDERSEN, M.L.; REKSIDLER, A.B.; SILVA, A.; ZAGER, A.; ZANATA, S.M.; VITAL, M.A.F.; TUFIK, S. Blockage of dopaminergic D<sub>2</sub> receptor produces decrease of REM but not slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. **Behavioural Neuroscience Research**, v.188, p.406-411, 2008.

LOGAN, A.C. Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. **Alternative Medicine Review** v.8, n.4, p.410-425, 2003.

MACQUEEN GM. Magnetic resonance imaging and prediction of outcome in patients with major depressive disorder. **J Psychiatry Neurosci.** , v.34, n.5, p.343-9, 2009.

MAES, M. CHRISTOPHE, A.; DELANGHE, J.; ALTAMURA, C.; NEELS, H.; MELTZER, H.Y. Lowered omega-3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. **Psychiatry Research**, v.85, p.275-291, 1999.

MAKRIDES, M. Outcomes for mothers and their babies: Do n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and sea food make a difference? **Journal of American dietetic association**, v.108, n. 10, p.1622-1626, 2008.

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

MARZALEK,J.R.; LODISH, H. F. Docosahexaenoic Acid, Fatty Acid–Interacting Proteins, and Neuronal function: Breastmilk and Fish Are Good for You. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21; p.:633–657, 2005

MCNAMARA RK, CARLSON SE .Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. v.75; n:4-5, p.329-349, 2006.

MILTE CM, SINN N, HOWE PR..Polyunsaturated fatty acid status in attention deficit hyperactivity disorder, depression, and Alzheimer's disease: towards an omega-3 index for mental health? **Nutr Rev.**, v. 67, n.10, p.573-90, 2009

MITCHELL, D.C.; NIU, S-L.; LITMAN, B.J. DHA-rich phospholipids optimize g-protein-coupled signaling. **The Journal of Pediatrics**, v.143, p.S80-S86, 2003.

NALIWAIKO K, LUVIZON AC, DONATTI L, CHAMMAS R, MERCADANTE AF, ZANATA SM, NAKAO LS. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. **Chem Biol Interact**, v.173, n. 2, p. 122-128, 2008.

NALIWAIKO, K.; FONSECA, R.V.; ARAUJO, R.L.F.; CASTILHO, J.C.; OLIVEIRA, B.H.; BELLISSIMO, M.I.; MARTINS, E.F.; ANDREATINI, R.; CURTI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Fish oil and nervous system: a new potetial antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v.7, n.2, p.91-99, 2004.

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

NESTLER, E. BARROT, M.; DiLEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*, v.34, n.1, p.13-25, 2002.

NIEMOLLER, T.D.; BAZAN, N.G. Docosahexaenoic acid neurolipidomics. **Prostaglandins and other lipid mediators**, *in press*, 2009.

NOVAK EM, DYER RA, INNIS SM.High dietary omega-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Research*, v.1237, p.136-45, 2009.

NOVAKOSKI R.S.; HAYES, N.L. CNS development: an overview. **Development and Psychopathology**, v.11, p.395-417, 1999.

O'KEEFE J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**, Oxford University Press, 1978.

PAN H.C., KAO T.K., OU Y.C., YANG D.Y., YEN Y.J., WANG C.C., CHUANG Y.H., LIAO S.L., RAUNG S.L., WU C.W., CHIANG A.N., CHEN C.J. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *Nutr Biochem*, v.20, n.9, p. 715-25, 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6<sup>a</sup> ed. Boston: Elsevier, 2007.

PEET, M.; HORROBIN, D. A dose-ranging exploratory study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with persistent schizophrenic symptoms. *Journal of Psychiatry Research*, v. 36, p. 7–18, 2002.

PERROT, R.; EYER, J. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Research Bulletin*, v. 80 282–295,2009.

RAKIC, P.; AYOUB, A.E.; BREUNIG, J.J.; DOMINGUEZ, M.H. Decision by division: making cortical maps. *Trends in neuroscience*, v.32, n.5, p.291-301, 2009.

RAO JS, ERTLEY RN, DEMAR JC JR, RAPOPORT SI, BAZINET RP, LEE HJ. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry*, v.12, n.2, p151-157, 2006.

RAPOPORT S.I., RAO J.S., IGARASHI M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 77, n.5, p. 251-61, 2007.

RAPOPORT, S. Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascade are selectively altered by drugs, diet and disease. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 153-156, 2008

RICHARDSON AJ, ROSS MA. Fatty acid metabolism in neurodevelopmental disorder: a new perspective on associations between attention-deficit/hyperactivity disorder, dyslexia, dyspraxia and the autistic spectrum. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 63, n.1, p.1-9, 2000.

RIGUCCI S, SERAFINI G, POMPILI M, KOTZALIDIS GD, TATARELLI R. Anatomical and functional correlates in major depressive disorder: The contribution of neuroimaging studies. **World J Biol Psychiatry**, v. 9, p.1-16, 2009.

ROSS, B.M. ; SEGUIN, J.; SIESWERDA, L.E. Omega-3 fatty acids as treatment for mental illness: which disorder and which fatty acid? **Lipids in health and disease**, v.6, n.21, p1-19, 2007.

SAKAMOTO T, CANSEV M, WURTMAN RJ. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. **Brain Res.** , v.28, n.1182, p.50-59, 2007.

SALDANHA LG, SALEM N JR, BRENNAN JT. Workshop on DHA as a required nutrient: overview. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.81, n.2, p.233-236, 2009.

SALEM N. Jr.; LITMAN, B.; KIM, H.Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v.36, n.9, p. 945-959, 2001.

SALVATI S, NATALI F, ATTORRI L, DI BENEDETTO R, LEONARDI F, DI BIASE A, FERRI F, FORTUNA S, LORENZINI P, SANCHEZ M, RICCIERI L, VITELLI L. Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. **J Neurosci Res**.v. 86, n.4, p.776-84, 2008.

SASSAKI, GL; SOUZA, LM; SERRATO, RV; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v.1208, p.215-222, 2008.

SATHYAJIT S. BANDARU, KRISTEN LIN, STEPHANIE L. ROMING, RAMANA VELLIPURAM, JACOB P. HARNEY. Effects of PI3K inhibition and low docosahexaenoic acid on cognition and behavior. **Physiology & Behavior**, v. 100, n.3, p. 231-244, 2010.

SCHIEFERMEIER ,M.; YAVIN, E. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. **Journal of lipid research**, v.43, n.1, p.124-131, 2002.

SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct action on the nervous system? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, p.219-224, 2003.

SIMOPOULOS AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. **World Rev Nutr Diet**, v. 100, p.1-21, 2009a.

SIMOPOULOS AP. Omega-3 fatty acids, the brain and retina. Preface. **World Rev Nutr Diet**, v.99, p.7-12, 2009b.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.56, p. 365-379, 2002.

SPEDDING, M.; NEAU, I.; HARSING, L. Brain plasticity and pathology in psychiatric disease: sites of action for potential therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, p.33-40, 2003.

STAEHELIN HB .Neuronal protection by bioactive nutrients. *Int J Vitam Nutr Res*, v78, n.6, ;p.282-5, 2009

SU, K.P.; HUANG, S.Y.; CHIU, C.C.; SHEN, W.W. Ômega-3 fatty acids in major depressive disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. **European Neuro-Psychopharmacology**, v.13, n.4, p. 267-271, 2003.

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

TANSKANEN, A.; HIBBELN, J.R.; TUOMILEHTO, J.; UUTELA, A.; HAUKALA, A.; VIINAMÄKI, H.; LETONEN, J.; VARTIAINEN, E. Fish oil consumption and depression in the general population in Finland. **Psychiatry Service**, v.52, n.4, 2001.

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

VAN GOOR SA, DIJCK-BROUWER DA, FOKKEMA MR, VAN DER IEST TH, MUSKIET FA. Maternal and fetal brain contents of docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) at various essential fatty acid (EFA), DHA and AA dietary intakes during pregnancy in mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 78, n.3, p.159-69, 2008.

VAN HORN CG, CAVIGLIA JM, LI LO, WANG S, GRANGER DA, COLEMAN RA. Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. **Biochemistry**, v.44, n.5, p.1635-42, 2005

VENNA VR, DEPLANQUE D, ALLET C, BELARBI K, HAMDANE M, BORDET R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and

molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p.199-211, 2009

WAINWRIGHT, PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.61, p.61-69, 2002.

WILLIAMS CM, BURDGE G. Long-chain n-3 PUFA: plant versus marine sources. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.65, p.42-50, 2006.

WU H, ICHIKAWA S, TANI C, ZHU B, TADA M, SHIMOISHI Y, MURATA Y, NAKAMURA Y. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neurogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochim Biophys Acta.** , v.1791, n.1, p.8-16, 2009.

WURTMAN, R.J. Synaptic dormation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.57, s.2, p. 6-10, 2008.

YAVIN, E. Docosahexaenoic acid: a pluripotent molecule acting as a membrane fluidizer, a cellular antioxidant and modulator of gene expression. **Nutrition and Health**, v.18, p.262-262, 2006.

YAVIN, E.; HIMOVICHI, E.; EILAM, R. Delayed cell migration in the ceveloping rat brain following maternal omega-3 alpha linolenic acid dietary deficiency. **Neuroscience**, v.162, p.1011–1022, 2009.

YAMASHIMA, T. A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampla neurons for memory. **Progress in neurobiology**, v.84, n.2, p.105-115, 2008.

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

ZHAO, H.; SAPOLSKI, R.M.; STEINBERG, G.K. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicates in neuron survival after stroke.