

PRISCILA CAROLINE GUNHA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS
POLIINSATURADOS DAS FAMÍLIAS (n-3) e (n-6) SOBRE O SISTEMA
NERVOSO DE RATOS WISTAR**

CURITIBA

2009

PRISCILA CAROLINE GUNHA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS
POLIINSATURADOS DAS FAMILIAS (n-3) e (n-6) SOBRE O SISTEMA
NERVOSO DE RATOS WISTAR**

**Trabalho apresentado para obtenção de grau
de bacharel em Biologia, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Co-orientadora: Katya Naliwaiko, B.Sc.; M.Sc.

CURITIBA

2009

Aos meus pais, Marcos A. Gunha e Jocélia R. Prestes, pelo amor e carinho incondicional e por terem permitido que essa fosse uma realização conjunta, vocês foram fundamentais e essenciais para que mais esse sonho se concretizasse.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram para a realização e concretização desse projeto, em especial:

Aos meus orientadores Luiz Cláudio Fernandes e Katya Naliwaiko pela credibilidade, pela oportunidade concedida. Katya o meu muito obrigado! Em todos os momentos deste trabalho você esteve presente e me proporcionou tamanha ajuda, me direcionando e motivando. Sou muito grata pela sua cumplicidade, amizade e competência. Ao professor Luiz Cláudio, pela recepção e por conceder o espaço em seu laboratório, pelas observações feitas desde quando iniciei no laboratório, pelo empenho, competência e carinho que deposita ao LABMETAB, estagiários e mestrandos. Vocês foram de suma importância para que esse trabalho se realizasse. Minha total admiração e respeito!

A minha mãe Jocélia Ribeiro Prestes e meu pai Marcos Alfredo Gunha, que me proporcionam todas as condições para que eu concluísse o curso. Obrigada pela educação, por me incentivarem sempre, pela perseverança e dedicação, pela compreensão em todos os momentos em que eu estive ausente e nervosa. Amo muito vocês!

A minha família: minha avó e avô queridos, tios, tias, irmãos, primos e primas.

Aos meus avos paternos, *in memorian*, eu não só agradeço, mas dedico esse trabalho.

A minha amiga Jane, que apesar do pouco tempo de convivência sei que posso contar com você em todos os momentos. Obrigada por seu apoio e carinho!

As minhas amigas da graduação, Juliana Forville, Caroline Grisbach e Juliana Vieira pela ajuda e colaboração na suplementação dos ratos, pelos feriados, sábados, véspera de natal e ano novo que passamos suplementando. Sempre se

colocando a disposição, pela companhia e amizade, vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Ju F., Ju V. e Carol: Obrigada por tudo!

As meus colegas da graduação, Ingrid, Kamilla, Maicon, Ruth, Tomas , Carlos, Fernanda Serena, Raquel e Fernanda Fadel por todos os momentos de descontração, todas as risadas, as aulas, os passeios e afins. Foi muito bom ter vocês do meu lado durante esse tempo!

Ao pessoal do LABMETAB, muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas brincadeiras, pelas descontrações, pelo referencial teórico e pratico que levo e o aprendizado que sem duvida foi muito gratificante.

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

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

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

"... Hoje entendo bem meu pai. Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou tv. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver. “

(“ Mar sem fim” Amyr Klink).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. ACIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS n-3 e n- 6.....	3
3.2. ACIDOS GRAXOS ESSENCIAIS: ÁCIDOS LINOLÉICO E ALFA-LINOLÊNICO.....	4
3.3 SISTEMA NERVOSO E ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	5
3.3.1 ACIDO DOCOSAEXAENOICO (DHA).....	7
3.3.2 ACIDO ARAQUIDONICO (AA).....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 ANIMAIS.....	9
4.2 SUPLEMENTAÇÃO.....	9
4.3TESTES DE COMPORTAMENTO.....	10
4.3.1 TESTE CAMPO ABERTO.....	10
4.3.2 TESTE NATAÇÃO FORÇADA.....	10
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
6.1. TESTE DO CAMPO ABERTO E HABITUAÇÃO	11
6.2 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA	13
7. CONCLUSÃO	15
8. REFERÊNCIAS	16

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Competição metabólica entre as séries ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3).

FIGURA 2 – Cadeia carbônica dos ácidos graxos precursores. Fonte: Naliwaiko, 2004.

FIGURA 3 – atividade locomotora dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro-inca ou óleo de girassol do desmame a idade de 90 dias.

FIGURA 4 – N° de elevações nas patas traseiras (*rearing*) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro-inca ou óleo de girassol do desmame a idade de 90 dias.

FIGURA 5 – Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro-inca ou óleo de girassol do desmame a idade de 90 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido Araquidônico

AGs- Ácidos Graxos

AGEs- Ácidos graxos essenciais

AGPIs- Ácidos Graxos Poliinsaturados

AGPIs-CL- Ácidos Graxos Poliinsaturados de cadeia longa

AL- Ácido Linoléico

ALA- Ácido α -linolênico

ANOVA- Análise de Variância

C- Controle

DHA- Ácido docosahexaenóico

EPA- Ácido Eicosapentaenóico

GC- Gordura de Coco

n-3 – Ômega 3

n-6- Ômega 6

OP- Óleo de Peixe

RESUMO

Existem duas famílias de ácidos graxos poliinsaturados. A série *ômega 6* (n-6) e a *ômega 3* (n-3). O n-3 é representado pelo precursor o ácido α -linolênico e seus principais produtos são o EPA e o DHA. Do mesmo modo o n-6 possui um precursor o ácido linoléico. O processo de metabolização utiliza à mesma enzima tornado as famílias competitivas. Vários autores relatam a importância de se alterar a proporção desses ácidos graxos na dieta, hoje essa razão nos países ocidentais é de 10 a 25 de *ômega 6* para 1 de *ômega 3*. Baixos índices de n-3 na dieta podem causar alterações na composição de componentes das membranas cerebrais, além de diminuir a concentração de DHA no cérebro. Dietas deficientes ou com desequilíbrio na razão n-6: n-3 podem provocar prejuízos da função cerebral e dos níveis de cognição e acuidade visual. Países onde o consumo de peixe é alto são encontrados baixos índices de depressão. As dietas podem ser de origem marinha, principalmente peixes de águas frias como: salmão, cavala, sardinha, sendo os precursores ALA representados por óleos vegetais: de linhaça, nozes, vegetais de folhas verdes, Oro-Inka® e LA por óleos vegetais: milho, açafraão, gergelim e girassol. Uma vez que a função cerebral pode estar vinculada às taxas de ácidos graxos disponíveis ao sistema nervoso central e que diferentes AGPIs podem atuar de maneira distinta sobre a função cerebral, este trabalho tem por objetivo investigar e comparar o efeito de diferentes AGPIs, sobre o sistema nervoso central. Sendo que ácidos graxos de diferentes famílias podem ter efeitos diferentes sobre o sistema nervoso, investigou-se e se comparou neste trabalho os efeitos da suplementação com diferentes ácidos graxos poliinsaturados, sobre o SNC, através de observação comportamental em ratos Wistar.

1. INTRODUÇÃO:

Os lipídios constituem mais da metade do peso seco de todo o tecido nervoso e desempenham papel fundamental na estrutura e funcionalidade deste tecido, no crescimento neuronal, transdução de sinais e excitabilidade das membranas neurais, e na expressão de genes que regulam a diferenciação celular e o crescimento (Rapoport et al, 2007).

Os lipídios do cérebro, especificamente, são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) que se distribuem abundantemente na massa cinzenta e também na retina de mamíferos, tais ácidos graxos são subdivididos em duas famílias de acordo com a primeira insaturação da cadeia carbônica e são representados neste estudo por ácido docosaexaenóico (DHA, 22:6 n-3) e araquidônico (AA, 20:4 n-6) (Lukin & Basan, 2008). Estes são formados a partir de seus precursores, o ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3 n-3) e linoléico (LA, 18:2 n-6) respectivamente, através de uma série de dessaturações e conseqüente alongação da cadeia. Estes dois ácidos graxos precursores são denominados essenciais e devem ser fornecidos pela dieta, uma vez que, mamíferos não são capazes de sintetizá-los, apresentando papel fundamental como componentes estruturais integrais das membranas (Farooqui et al. 2007)

No organismo humano, o metabolismo dos ácidos graxos (n-3) influencia a concentração dos (n-6) e vice-versa (Park et al. 1997; BNF 2000). Este fato decorre da competição que existe entre os ácidos graxos dessas duas famílias pelas enzimas (dessaturases e alongases) envolvidas em sua bioconversão no organismo humano, modulando a biosíntese de membranas, eicosanóides derivados destes AGPIs, conforme vias metabólicas indicadas na figura 1.

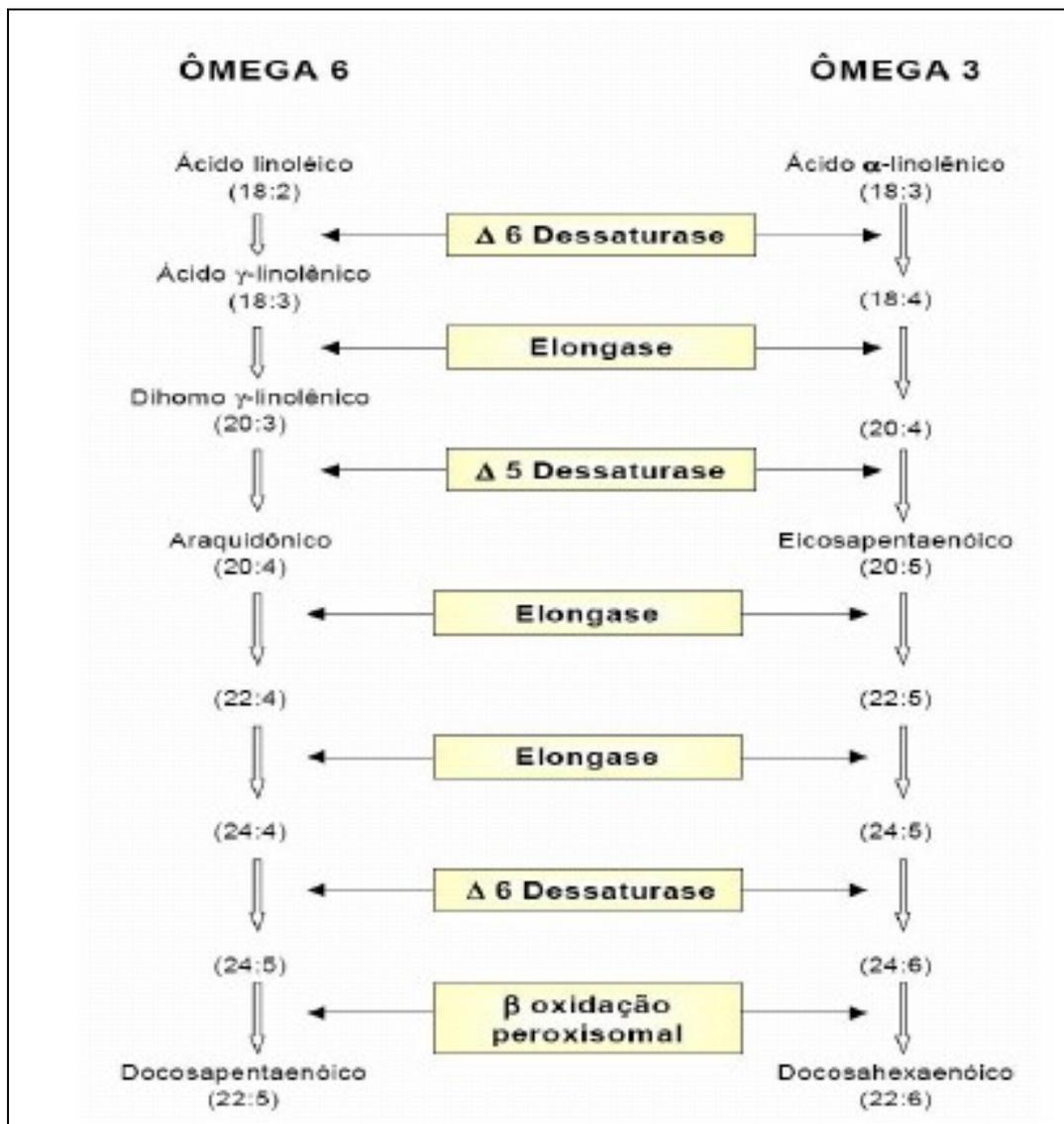


Figura 1: competição metabólica entre AGPIs das séries n-6 e n-3 (Salem, 1999)

Deficiências crônicas de ácidos graxos, particularmente desses precursores ditos ácidos graxos essenciais (AGE), têm sido relacionadas com modificações na composição lipídica das membranas neurais, distúrbios visuais e de comportamento. (CURI et al., 2002). O impacto de doenças neurodegenerativas na saúde e no bem estar das pessoas é um problema crescente. A literatura atual vêm evidenciando o papel que os AGPIs de cadeia longa (AGPI-CL) da famílias (n-3) e (n-6) podem desempenhar sobre estrutura e função cerebral durante os processos de crescimento e desenvolvimento.

Dietas deficientes ou com desequilíbrio na razão n-6:n-3 ,podem provocar prejuízos da função cerebral e dos níveis de cognição e acuidade visual. Uma vez

que a função cerebral pode estar vinculada às taxas de ácidos graxos disponíveis ao sistema nervoso central e que diferentes AGPIs podem atuar de maneira distinta sobre a função cerebral, este trabalho tem por objetivo investigar e comparar o efeito de diferentes AGPIs, sobre o sistema nervoso central.

Para atingir tal objetivo nos valem da observação do comportamento animal e metodologias que permitiram observar o potencial efeito destes lipídios sobre o sistema nervoso central, comparando as famílias n-3 vs. n-6, bem como AGE vs AGPI-CL.

2. OBJETIVOS:

Tendo em vista as considerações expostas, o objetivo deste projeto é investigar e comparar os efeitos da suplementação com diferentes ácidos graxos poliinsaturados, sobre o SNC, através de observação comportamental em ratos Wistar.

Os objetivos específicos:

- Investigar o potencial efeito antidepressivo dos óleos utilizados;
- Avaliar o efeito das diferentes suplementações sobre comportamento exploratório e habituação;
- Observar sob aspectos comportamentais, a ação dos diferentes AGs utilizados (n-6 vs n-3; AGE vs AGPI-CL) e a eventual correlações ente estes efeitos
- Identificar potenciais equivalências entre a suplementação com AGEs e AGPIs-CL.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

3.1 ACIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS n-3 e n-6:

Os ácidos graxos são classificados como saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da estrutura química e do comprimento de sua cadeia, que pode variar de 12 a 26 ligações de carbono. O número de

insaturações encontradas na cadeia carbônica determina se o ácido graxo é mono ou poliinsaturado. As diferentes posições e quantidade de duplas ligações ao longo da cadeia determinam diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais aos diferentes ácidos graxos (Curi et al., 2002).

Com base nas características da molécula e a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica, podemos identificar duas importantes famílias de AGPIs conhecidas como ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3). A família n-6 é caracterizada por apresentar a primeira insaturação no sexto carbono da cadeia a contar do carbono que está ligado ao radical metila (carbono- ω) e é toda originada do ácido linoléico. A família n-3 apresenta a primeira insaturação no terceiro carbono a contar do carbono ω e é obtida a partir do ácido α -linolênico (Farooqui et al, 2007). (Figura 2).

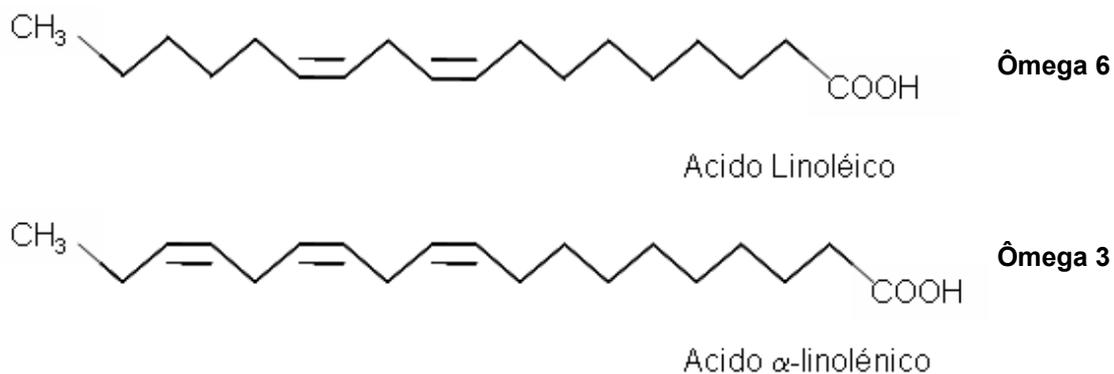


Figura 2: Cadeia carbônica dos ácidos graxos precursores.
Fonte: Naliwaiko, 2004.

Os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico e alfa linolênico, por ação das enzimas alongase e dessaturase. As alongases são responsáveis pela adição de dois átomos de carbono à cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis*.

3.2 OS ACIDOS GRAXOS ESSENCIAIS: ÁCIDOS LINOLÉICO E ALFA-LINOLÊNICO

Embora os ácidos graxos das séries n-3 e n-6 sejam imprescindíveis para funcionalidade adequada do organismo, mamíferos não podem sintetizar AGs

destas famílias endogenamente, por isso são chamados de ácidos graxos essenciais. Assim, todo e qualquer AGPIs destas famílias precisa ser sintetizado a partir de seus precursores: os ácidos linoléico (LA 18:2 n-6) e ácido alfa-linolênico (ALA 18:3 n-3). Por ação de enzimas específicas, estes AGs são alongados e dessaturados no fígado até dar origem aos ácidos graxos de cadeia longa (AGPI-CL) (Haag, 2003).

As duas famílias são metabolizadas pelas mesmas enzimas (dessaturase), o que as faz competir pelo mesmo sistema enzimático (Simopoulos 1999). Assim modificações na disponibilidade de AGPIs das duas famílias, podem provocar alterações significativas nas quantidades e qualidade de AGs de cadeia longa que serão incorporadas aos tecido (Rapoport et al, 2007). A competição entre LA e ALA é determinada pela afinidade da enzima delta-6-dessaturase (MADSEM *et al.*, 1999). Excesso de ácido LA reduz e até bloqueia a conversão de ALA em seus derivados EPA e DHA, acarretando aumento das concentrações de n-6 nos tecidos, sendo o oposto verdadeiro, com um menor consumo do ácido LA haverá uma diminuição da formação do ácido araquidônico (AA). Portanto, é necessário equilíbrio entre o aporte dos dois ácidos graxos através da dieta (SALEM, 1999).

O ácido linoléico (LA 18:2 n-6) é reconhecido como nutriente essencial há bastante tempo (Burr & Burr, 1929; Hensen et al., 1962). Este ácido graxo é amplamente encontrado em óleos vegetais como óleo de girassol, cártamo, milho, soja e algodão. Pela ação da cascata enzimática, é convertido em ácido araquidônico (AA 20:4 n-6) muito abundante nos fosfolipídios das membranas celulares e desempenha importante papel imunológico, dando origem a mediadores inflamatórios como os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (Marszalek & Lodish, 2005).

O ácido graxo alfa-linolênico (ALA 18:3 n-3) somente foi reconhecido como nutriente essencial há poucas décadas (Heird & Lapillonne, 2005). Ele está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e outros vegetais. Deste ácido graxo derivam o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5 n-3) e ácido docosaexaenóico (DHA 22:6 n-3), estando estes últimos presentes nos óleos de peixes, como salmão, sardinha, atum e cavalinha. São encontrados compondo

fosfolipídios de membranas e desempenham papéis diferentes no organismo. (Marszalek & Lodish, 2005).

3.3 SISTEMA NERVOSO E ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

O sistema nervoso possui a segunda maior concentração de lipídios do organismo (CURI, *et al* 2002). Um terço do cérebro é constituído de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), n-3 e n-6, perfazendo 20% do peso seco do cérebro (SWINGLER, 2008).

A utilização de AGPIs pelo cérebro pode promover alterações na função cerebral, pois quando incorporados à membrana dos neurônios alteram suas características físico-químicas (Yavin, 2006), podendo assim participar ativamente dos processos de sinalização celular, transmissão sináptica e regulação da atividade enzimática e de canais iônicos (Youdim et al., 2000). Os ácidos graxos são constituintes estruturais do cérebro, uma vez que incorporam-se às membranas neuronais em altas concentrações. Tipos muito particulares de ácidos graxos e lipídios incorporam-se de maneira específica e seletiva no tecido nervoso, especialmente sinapses e bainha de mielina. Aproximadamente 50% da membrana neuronal é composta por ácidos graxos, enquanto na bainha de mielina os lipídios constituem aproximadamente 70% (Farroqui & Horrocks, 2005). A incorporação aumentada de AGPIs nas membranas neuronais é responsável por alterações na fluidez da membrana, que pode estar correlacionadas aos processos de transmissão sináptica e função cognitiva (Youdim et al., 2000), facilitando assim a plasticidade sináptica e a formação de espinhos dendríticos, melhorando a funcionalidade cerebral (Carrié et al., 2002).

O processo de mielinização também é dependente da disponibilidade de AGPIs que podem modular a deposição da bainha de mielina, sua espessura e processos regenerativos. Estudos recentes enfatizam que ácidos graxos essenciais (AGE) estão correlacionados às funções normais da mielina, sendo importantes na fase ativa da síntese de mielina, especialmente durante o desenvolvimento (Innis, 2008). Nesta fase, a disponibilidade insuficiente de AGE pode prejudicar severamente a deposição de mielina, provocando mielinização

aberrante. Além disso, a deficiência na disponibilidade de AGs durante o período pós-natal pode provocar prejuízos cognitivos, motores, visuais e auditivos (REFERENCIA).

Existem dois períodos na vida onde os ácidos graxos são primordiais - na infância e na senescência. Durante o desenvolvimento e a infância, dietas deficientes em AGE podem resultar em atrasos no desenvolvimento neuronal, e função cerebral prejudicada (YEHUDA, 2005). Em humanos, o último trimestre gestacional e os primeiros dezoito meses de vida pós-natal são críticos para o desenvolvimento cerebral e, coincidentemente, são os períodos de maior incorporação de DHA (CETIN & KOLETZKO, 2008). Durante estes períodos significativas alterações morfológicas ocorrem no encéfalo em maturação. É durante estas etapas que os neurônios estabelecem e fortalecem conexões, desenvolvem axônios e aumentam o número de contatos sinápticos. A deficiência de DHA durante desenvolvimento neuronal será refletida em longo prazo nas funções cerebrais (falhas cognitivas e comportamentais).

3.3.1 ACIDO DOCOSAEXAENOICO (DHA):

O ácido docosaexaenóico (DHA 22:6 n-3) é o ácido graxo mais abundante no sistema nervoso central, tanto no cérebro como na retina (Marszalek & Lodish, 2005). O crescimento cerebral humano, que ocorre do terceiro trimestre de gestação até o 18º mês de vida e tem sido amplamente correlacionado com a incorporação de DHA nos fosfolipídios das membranas neuronais (Lauritzen et AL., 2001). Durante a formação das membranas, o DHA se deposita principalmente em frações que contêm fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, e nos plasmogênios, compostos que são correlacionados à prevenção de processos de estresse oxidativo (André et al., 2005; Farooqui & Horrocks, 2001).

O fornecimento insuficiente de DHA durante o desenvolvimento pré e pós-natal diminui sua concentração nos tecidos neuronais com um aumento recíproco de ácidos graxos da família (n-6) (Schiefermeier & Yavin, 2002), acarretando em alterações visuais, olfatórias, cognitivas e comportamentais em modelos animais (Lim et AL., 2005; Lim et AL., 2005); Niu et al., 2004; Moriguchi et al., 2000).

Estudos clínicos sugerem que alteração na concentração de DHA cerebral pode estar correlacionada a vários transtornos neurológicos como demência, doença de Parkinson, doença de Alzheimer (AD), depressão e transtornos bipolares. Recentemente, ensaios clínicos relatam que o DHA parece impedir a perda de função cognitiva em idosos, sugerindo que DHA pode atuar inclusive sobre o sistema nervoso maduro.

O DHA é essencial para o desenvolvimento dos sistemas visual e nervoso, sendo o conteúdo deste AG no cérebro e na retina é muito mais alto que em outros órgãos. Durante o crescimento do cérebro, há grande incorporação deste AG sugerindo papel importante no funcionamento das membranas celulares do Sistema Nervoso Central (SNC) (LAURITZEN et al., 2001).

3.3.2 ACIDO ARAQUIDONICO (AA):

Uma das mudanças mais importantes no campo investigativo a respeito de AGPIs é a ligação entre o índice do ácido araquidônico (AA) e a função cerebral. O nível de AA no cérebro é comparável ao de DHA (Innis, 2007). Estudos recentes demonstraram que o AA da dieta parece influenciar a plasticidade e preservar a fluidez da membrana hipocampal e pode fornecer alguma proteção ao estresse oxidativo. Além disso, mostrou-se que o AA, assim como DHA, ativa a sintaxina -3 um fator crítico no crescimento e na regeneração dos neurônios (Yavin, 2006). Embora o AA seja tipicamente mencionado dentro de um contexto negativo porque é o precursor dos eicosanóides bioativos, tem certamente sua importância fisiológica no cérebro. Entretanto, até recentemente, o impacto do metabolismo do AA no cérebro tem sido correlacionado diretamente às desordens neurológicas (Mukherjee, 2007).

Tais conceitos enfatizam que ambas as famílias de AGPIs, (n-6 e n-3), são desempenham papel importante na funcionalidade cerebral, cada uma com propriedades originais e capacidade de modular a saúde neurológica (Bazan, 2007).

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos abordando o efeito dos ácidos graxos sobre o sistema nervoso central e suas funções. Tem sido demonstrado que os efeitos encontrados não se restringem apenas a um tipo ou

família de AGPIs, podendo cada um deles atuar de maneira distinta sobre as funções neurais (Innis, 2007; Haag, 2003). Uma vez que AGs, essenciais ou de cadeia longa, tem efeito abrangente sobre o sistema nervoso, podendo exercer efeitos distintos, torna-se importante investigar o efeito de diferentes AGPIs das famílias n-3 e n-6 sobre sistema nervoso.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Para as abordagens experimentais foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em ambiente com temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro/escuro (12/12 horas) com água e alimentação à vontade. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, a saber:

- Grupo óleo de peixe (OP) recebeu diariamente 1,0 g/kg de composto de extratos marinhos rico em ácidos graxos n-3 de cadeia longa, contendo 180mg de EPA, 120mg de DHA por cápsula e antioxidante tocoferol.
- Grupo óleo oro inca (OI) recebeu diariamente 1,0g/kg de óleo vegetal obtido de *Plukenetia volubili*, L., contendo 50mg/ml de ácido α -linolênico, precursor da série n-3.
- Grupo óleo de girassol (OG) recebeu diariamente 1g/kg de óleo de girassol (*Helianthus annus*, L.) contendo 60mg/ml de ácido linoléico, precursor da série n-6.
- Grupo controle (C), não recebeu nenhum tipo de suplementação, sendo alimentado com ração para ratos (Nuvilab CR₁ – Nuvital nutrientes S/A).

4.2 SUPLEMENTAÇÃO

A suplementação foi realizada diariamente, por via oral com o auxílio de pipeta de volume ajustável. Os óleos foram fornecidos de acordo com a massa corporal dos animais, que foi avaliada a cada 2 dias em balança digital (GEHAKA, 350). O intervalo de suplementação para todos os grupos limitou-se em aproximadamente 70 dias, perdurando desde 21 até os 90 dias de idade. O óleo de peixe utilizado foi gentilmente doado pela Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A e o óleo oro inca pela Alimentos Latinos Ltda. O óleo de girassol (Bunge alimentos S/A) por fim, foi obtido no comércio local.

4.3 TESTES DE COMPORTAMENTO

Uma vez alcançada a idade de 90 dias, os animais foram submetidos aos testes de comportamento para avaliação do efeito das diferentes suplementações sobre a função cerebral.

4.3.1 Teste do campo aberto

Para avaliação da atividade locomotora e habituação, a atividade exploratória dos animais foi avaliada em um arena cilíndrica branca ($\varnothing=100$ cm), delimitada por paredes de 30 cm de altura. A arena é subdividida em 19 quadrantes mais uma área central circular, onde o animal é colocado no momento de início do teste. A atividade do animal foi registrada, através de uma câmera de vídeo acoplada ao teto do aparato, permitindo avaliar-se o animal sem que este fosse inibido pela presença do experimentador. Durante 5 minutos avaliou-se a atividade locomotora do animal e frequência do comportamento de exploração de levanta-se nas patas traseiras (rearing), durante quatro dias consecutivos.

4.3.2 Teste da natação forçada

O procedimento realizado foi descrito por Porsolt et al., (1978), modificado por Benjamini et al (1998). Neste teste foi avaliado o potencial efeito antidepressivo das diferentes suplementações, a partir da avaliação do tempo de imobilidade do animal, quando colocado em um aquário de onde ele não poderá

escapar. Para o teste foram utilizados cilindros de PVC ($\varnothing=30\text{cm}$; $h=50\text{cm}$), com coluna d'água de 15 cm. Na sessão de treino os animais foram expostos ao paradigma por 15 minutos, e 24 horas após a primeira exposição, avaliou-se o tempo de imobilidade do animal durante a sessão de teste com duração de 5 minutos. Os animais foram expostos ao paradigma isoladamente, utilizando um cilindro por animal de cada vez para minimizar possíveis interferências. Após o teste de natação forçada os animais foram ortotansados e os hipocampus e córtices foram recolhidos para posterior determinação do perfil lipídico.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos experimentos foram tabulados e analisados por ANOVA seguidos de pós testes de Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significativas, quando $p \leq 0,05$. Para composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados, utilizou-se o *software* Prism GraphPad versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. TESTE DO CAMPO ABERTO E HABITUAÇÃO

A observação da atividade locomotora de animais expostos ao teste do campo aberto durante quatro dias consecutivos, é uma das ferramentas utilizadas

para avaliar a capacidade de habituação do animal a um novo ambiente, caracterizando assim um tipo de aprendizado.

A atividade locomotora dos animais controle e suplementados com diferentes AGPIs não foi diferente ao longo dos dias como demonstrado na figura 3.

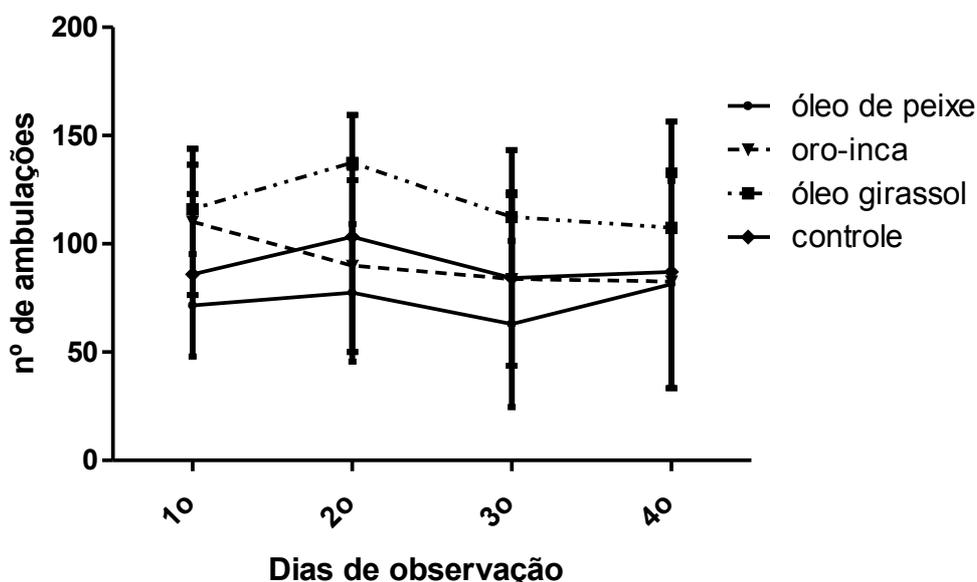


Figura 3 – atividade locomotora dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro inca ou óleo de girassol do desmame à idade de 90 dias. Dados representam média \pm EPM (n=10).

De maneira semelhante, o número de elevações nas patas traseiras, comportamento tipicamente exploratório, não foi diferente entre os animais controles ou suplementados, como ilustrado na figura 4. Ao longo dos dias, foi possível identificar redução no número de vezes que os animais realizaram este comportamento, o que sugere a ocorrência de habituação. Entretanto, nenhum dos AGPIs empregados neste modelo experimental foi capaz de alterar o padrão de resposta quando comparados ao grupo controle.

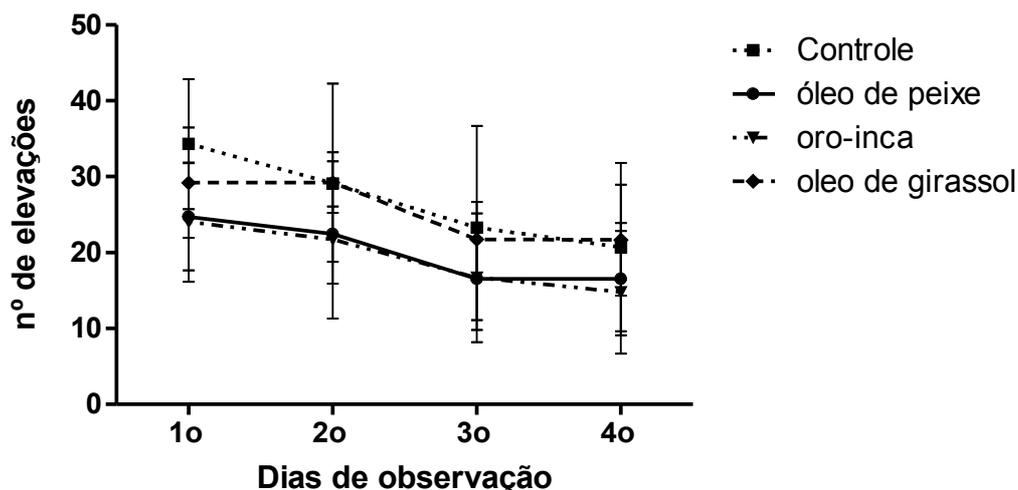


Figura 4 – N° de elevações nas patas traseiras (*rearing*) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro inca ou óleo de girassol do desmame à idade de 90 dias. Dados representam média \pm EPM (n=10).

O efeito de ácidos graxos de diferentes famílias sobre aprendizado e eventos de memória tem sido objeto de diversos autores (Winwraight, & Colombo, 2006; Carrié, 2000; Coluccia, 2009), entretanto os resultados utilizando habituação como ferramenta de investigação não tem produzido resultados conclusivos.

Possivelmente as diferenças observadas na literatura se devam à grande variabilidade de protocolos empregados (Fedorova & Alen, 2006), o que pode explicar de alguma maneira os resultados encontrados neste trabalho. Outra justificativa para os resultados encontrados na habituação é que, embora seja sugerido que o emprego de AGE possa alterar padrões do comportamento, muitas vezes estes resultados são obtidos em modelos experimentais que se valem de concentrações elevadas destes AG (Venna et al, 2008, Fedorova et al, 2007). Neste trabalho, as concentrações empregadas à suplementação representam incremento de apenas 1% no percentual total de lipídios da dieta.

6.2 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA

O potencial efeito antidepressivo dos ácidos graxos n-3 vem sendo demonstrado na literatura tanto experimental quanto clinicamente nas últimas décadas. Variações do tipo de AGPIs, quantidades e fornecimento têm produzido resultados distintos, mas que ajudam a elucidar o papel dos lipídios na funcionalidade cerebral (Fedorova & Salen, 2006).

Neste trabalho, o emprego do teste de natação forçada permitiu comparar o possível efeito dos diferentes AGs empregados identificando óleos com composições distintas como potenciais terapêuticos. Entre nossos grupos experimentais, apenas a suplementação com óleo de peixe foi hábil em reduzir o tempo de imobilidade dos animais (Figura 5). Os valores de imobilidade encontrados para os outros grupos de suplementação, não diferiram daqueles encontrados no grupo controle, sugerindo que ácidos graxos essenciais não são capazes de deflagrar resposta semelhante àquela encontrada na suplementação com AGPIs –CL.

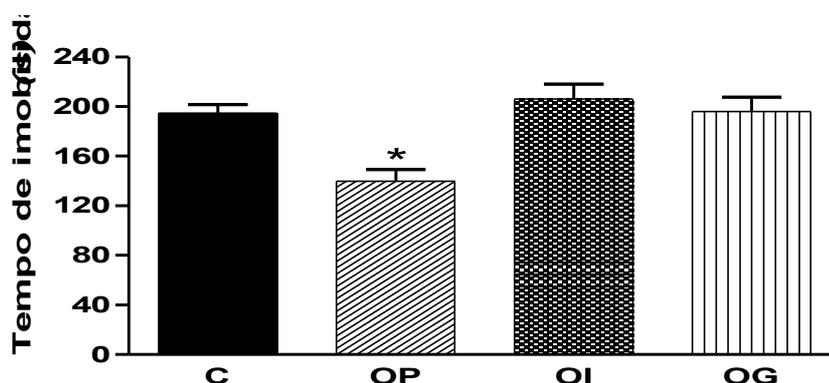


Figura 5 – Tempo de imobilidade (s) dos animais controle, suplementados com óleo de peixe, oro inca ou óleo de girassol do desmame à idade de 90 dias. Dados representam média ± EPM (n=10). *p ≤ 0.05

Dentre os AGPIs o cérebro acumula preferencialmente aqueles de cadeia longa. Na falta de AGPIs-CL, o fornecimento ao cérebro se dá pela conversão hepática de AGEs. Neste sentido, o fornecimento de AGPIs pré-formados pode produzir efeito mais rápido ou mais satisfatório do que o fornecimento de seus precursores (Innis, 2007). Os resultados obtidos no teste da natação forçada, reforçam o que é postulado na literatura, uma vez que a suplementação com óleo de oro inca, rico em ALA precursor da família n-3, não foi capaz de produzir efeito comparável ao obtido com óleo de peixe.

Os valores obtidos para o grupo suplementado com óleo de girassol, corroboram dados da literatura que apontam os AGs n-6 como substâncias com efeito distinto daqueles observados na família n-3 (Whelan, 2008; Lukwin & Bazan, 2008, Innis, 2007, Fedorova & Salen, 2006).

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados literários e resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir:

- Dentre os óleos utilizados apenas o óleo de peixe foi capaz de produzir efeito antidepressivo;
- Dentre os AGs empregados, nenhum deles foi capaz de alterar o comportamento de habituação dos animais suplementados;
- Ácidos graxos de natureza e estruturas químicas distintas, não são capazes de produzir efeitos semelhantes;
- A suplementação com AGE, no período de tempo empregado, não foi hábil em produzir efeito semelhante aquele obtido a partir da suplementação com AGPIs-CL;

8. REFERÊNCIAS

- CURI R., et al. *Entendendo a gordura – Os ácidos graxos*. Manole, 2002.
- SCHMIDT, M. A. *GORDURAS INTELIGENTES*, Como as gorduras e os óleos afetam as inteligências mental, física e emocional. Roca, 2000.
- FELTES, M. M. C. Estudo da Síntese Química e Enzimática de Triglicerídios Estruturados a partir do Óleo de Peixe. 19-22, 2006.
- VENNA, V. R.; DEPLANGUE, D.; ALLET, C.; BELARBI, K.; HAMDANE, M.; BORDET, R. *Psychoneuroendocrinology*, PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus, CD-ROM, vol.34, nº 02, ISSN 0306-4530.
- WURTMAN, R. J. *Metabolism Clinical and Experimental*, Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents, 57: S6–S10, 2008.
- ROSS, B. M.; SEGUIN, J.; SIESWERDA, L. E. *Lipids in Health and Disease*, Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? 6:21, 2007.
- WAINWRIGHT, P. E.; XING, H. C.; MUTSAERS, L.; MCCURTCHEON, D.; KYLE, D. *The Journal of Nutrition*, Arachidonic Acid Offsets the Effects on Mouse Brain and Behavior of a Diet with a Low (n-6):(n-3) Ratio and Very High Levels of Docosahexaenoic Acid, vol.127, nº01, janeiro, 1997.
- WAINWRIGHT, P. *Journal of Nutrition*, Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function, CD-ROM, Bangladesh, vol.24, nº01, março, 2006, ISSN 1606-0997.
- RAPOPORT S. I., Arachidonic Acid and the Brain1–3, *The Journal of Nutrition* 138: 2515–2520, 2008.

RAPOPORT, S. I. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease, CD-ROM, Scotland, Vol. 79, 2008. ISSN: 0952-3278.

INNIS S. M. *Brain Research*, Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain, CD-ROM, Amsterdam, vol.22, nº5-6, março, 2000, ISSN: 0378-5866.

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

NOVAK, E. M.; DYER, R. A.; INNIS, S. M. *BRAIN RESEARCH*, High dietary w-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth, CD-ROM, Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS, vol. 1237, 2008. ISSN 0006-8993.

YEHUDA, S.; RSBINOVITZ, S.; MOSTOFISKY, D. J. *Neurobiology of aging*, Essential fatty acids and the brain: From infancy to aging, CD-ROM, Elsevier Science, London, ROYAUME-UNI, vol. 26, 2005. ISSN 0197-4580.

WHELAN, J. *Revista de Nutrição*, (n-6) and (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and the Aging Brain, CD-ROM, São Paulo, 19, nº06, novembro - dezembro, 2006. ISSN 1415-5273.

UAUYAB, R.; HOFFMAN, D. R.; PEIRANO, P.; BIRCH, D. G.; BIRCH, E. E. *Lipids Revue*, Essential Fatty Acids in Visual and Brain Development, CD-ROM, Springer, Heidelberg, ALLEMAGNE, vol. 36, nº 9, September, 2001. ISSN 0024-4201.