

ÁGATA KISS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE
A MEMÓRIA DE RATOS**

**Monografia apresentada à disciplina de Estágio,
Curso de Ciências Biológicas, Departamento de
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

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

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

CURITIBA

2004

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
INTRODUÇÃO	1
1. ÁCIDOS GRAXOS	1
2. OS ÁCIDOS GRAXOS E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA NERVOSO	1
3. MEMÓRIA	3
OBJETIVOS	8
MATERIAIS E MÉTODOS	9
1. ANIMAIS	9
2. SUPLEMENTAÇÃO	10
3. TESTES COMPORTAMENTAIS	10
3.1 CAMPO ABERTO	10
3.2 HABITUAÇÃO	11
3.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	12
3.3.1 TESTE DE MEMÓRIA OPERACIONAL	12
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Incremento de massa corpórea dos animais controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco14
- FIGURA 2 - Atividade locomotora dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco16
- FIGURA 3 - Atividade exploratória dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco17
- FIGURA 4 - Desempenho dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco no labirinto aquático de Morris18

INTRODUÇÃO

1. ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos, ou seja, são compostos por uma cadeia de átomos de carbono aos quais estão ligados átomos de hidrogênio. Alguns ácidos graxos não possuem duplas ligações nas cadeias hidrocarbonadas, sendo por isso classificados como saturados; outros contêm uma ou mais duplas ligações nas cadeias, os chamados ácidos graxos insaturados (Lehninger et al., 1995).

As propriedades físicas dos ácidos graxos e das substâncias compostas pelos mesmos são determinadas pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada dos mesmos (Lehninger et al., 1995). Desta forma, diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais são evidenciadas como consequência das diferentes posições e número de duplas ligações na cadeia hidrocarbônica dos ácidos graxos (Naliwaiko, 2003).

Duas importantes famílias de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), n-6 ou ômega-6 e n-3 ou ômega-3, são essenciais aos mamíferos, uma vez os mesmos não serem capazes de sintetizar tais ácidos graxos. Como consequência, estes devem ser fornecidos pela dieta (Calder, 2001; Youdim et al., 2000).

2. OS ÁCIDOS GRAXOS E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA NERVOSO

Encontrados em gorduras e óleos naturais, os ácidos graxos são componentes fundamentais das membranas celulares, desempenhando importante

papel tanto na estrutura quanto nas funções das células (Itokazu et al., 2000; Zimmer et al., 1999; Lehninger et al., 1995; Wainwright et al., 1994).

Os lipídios encontrados na membrana de neurônios de mamíferos têm perfil de ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa (AGPI-CL) (Innis, 2000; Jensen et al., 1996). Estes são capazes de promover alterações na função cerebral por alterarem as características físico-químicas da membrana dos neurônios, assim participando ativamente de processos de sinalização celular (de Wilde et al., 2002; Innis, 2000; Füst & Kuhn, 2000).

Além disso, os AGPIs, quando incorporados em grandes quantidades pelas membranas celulares, são capazes de facilitar o crescimento neuronal e a formação de especializações pós-sinápticas, os espinhos dendríticos, considerados locais estratégicos de alterações morfológicas que podem armazenar a memória (Carlson, 2001; Wainwright et al., 1994; Dudai, 1989). O número de espinhos dendríticos, o padrão dos ramos dendríticos e a distribuição de sinapses nos dendritos são diretamente afetados pelo meio ao qual o organismo está exposto. O ambiente, então, altera a quantidade e a qualidade das conexões neuronais, as quais, por sua vez, refletem-se no comportamento do organismo (Martinez & Kesner, 1991).

Neurônios em desenvolvimento exibem grande plasticidade anatômica; mudanças morfológicas e funcionais ocorrem nos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Tal plasticidade pode ser detectada através do número e do padrão de conexões sinápticas, e a mesma ocorre principalmente durante um período no qual o organismo também exhibe rápido aprendizado. O sistema nervoso, dessa forma, exhibe períodos críticos durante os quais são necessários estímulos ambientais para estabelecer ou manter certas conexões (Martinez & Kesner, 1991).

Os ácidos graxos poliinsaturados desempenham papel ativo no desenvolvimento e plasticidade neuronal (Itokazu et al., 2000). Os primeiros dezoito meses após o nascimento são de extrema importância para a incorporação de AGPIs nas membranas cerebrais, um período crítico para o desenvolvimento cerebral e cognitivo (Das, 2003b; Innis, 2000; Jensen, 1996). Apenas uma pequena quantidade do ácido graxo precursor da família n-3 (α -linolénico) encontra-se disponível no estoque de gordura da criança. Logo, receber suprimento adequado de ácidos graxos essenciais após o nascimento passa a ser de grande importância para garantir quantidade adequada de ácidos graxos n-3, fundamental para o desenvolvimento e crescimento cerebral. Quantidades inadequadas dos precursores nos períodos de formação e amadurecimento do sistema nervoso central podem resultar em prejuízos da função cognitiva, dificuldades de aprendizado e debilidade da função neuronal (Das, 2003b; Simopoulos, 2002; Carlson, 2001; Innis, 2000).

3. MEMÓRIA

O aprendizado resulta na formação de novas sinapses envolvidas na codificação permanente da memória, ou seja, em alterações no circuito dos sistemas cerebrais nos quais a memória é armazenada. Assim, circuitos de neurônios formam o substrato neuronal da memória (Martinez & Kesner, 1991). Memória é a retenção das representações internas dependentes de experiência ao longo do tempo (Dudai, 1989), e seria evidenciada exatamente pela alteração do comportamento em função dessa experiência prévia (Nahas, 1999). Certos comportamentos dependem do funcionamento de específicas regiões do cérebro; a memória, assim como o acesso à mesma, deve-se a mudanças nas conexões e funcionamento destas regiões

cerebrais (Martinez & Kesner, 1991).

Os neurônios são dotados de plasticidade estrutural e funcional. Estudos estabelecem que os mesmos podem alterar suas propriedades integrativas, comunicativas e, portanto, provavelmente, computacionais e representacionais com o tempo. A plasticidade celular nos neurônios tem conseqüências fisiológicas únicas, já que altera a representação da informação nos sistemas neuronais. Tal noção de plasticidade neuronal levanta a questão da relação entre aprendizado e desenvolvimento. Os dois processos estão intimamente relacionados; a aprendizagem é freqüentemente considerada como uma ontogênese progressiva do sistema nervoso (Das, 2003b; Dudai, 1989). Mudanças na conectividade neuronal conseqüentemente determinam diretamente a competência comportamental (Martinez & Kesner, 1991).

O processo de formação de memórias envolve mecanismos neurais e ocorre em etapas características conhecidas como aquisição, consolidação e evocação. A aquisição, processo inicial de formação de memória, se dá no momento em que, sob a forma de estímulos, as informações chegam aos sistemas sensoriais visual, tátil, auditivo, olfativo e/ou gustativo. Uma vez adquiridas, as mesmas são processadas em memórias de durações diferentes. A memória operacional, de formação imediata, fornece armazenamento temporário mantendo a informação disponível enquanto ela está sendo percebida ou processada. Tal memória não deixa traços, dependendo exclusivamente da atividade neuronal naquele momento. A memória operacional fornece a possibilidade de manipulação da informação necessária para tarefas cognitivas complexas como aprendizado e raciocínio. Estudos comprovam o envolvimento do córtex pré-frontal com essa espécie de memória (Ferraz, 1999).

As memórias que deixam traços denominam-se memória de curta duração e

memória de longa duração, armazenadas em separado no cérebro de mamíferos. Na formação de memórias de curta duração, as informações são armazenadas por poucos segundos ou minutos. A consolidação da memória, por sua vez, caracteriza-se por processos de formação de traços estáveis de memória através do processamento de informações na forma de uma memória de longa duração. Após realizada a consolidação, o traço de memória armazenado permanece estável, menos susceptível a novas influências, podendo durar horas ou a vida inteira no cérebro. Na evocação de uma memória, a informação armazenada volta a ser vivenciada de forma consciente pelo sujeito que pode expressá-la na forma de um comportamento (Das, 2003b; Ferraz, 1999).

Uma grande quantidade de estudos sugere que o hipocampo, amígdala e septo medial atuam em uma etapa inicial da consolidação da memória, enquanto o córtex entorrinal é importante para uma fase posterior da consolidação. As fases de aquisição e consolidação dependem de mecanismos que ocorrem no hipocampo, enquanto o armazenamento de longa duração passa, com o tempo, a ser independente destas regiões cerebrais (Izquierdo, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados buscando estabelecer um paralelo entre as alterações na composição lipídica cerebral, a suplementação com AGPIs n-3 e alterações de comportamento. Estudos de Itokazu et al. (2000) sugerem a interação direta de AGPIs, em especial o Ácido Docosahexaenóico (DHA), sobre a transmissão sináptica. Jensen et al. (1996) demonstraram melhor desempenho em ratos que receberam dieta rica em AGPIs n-3 no teste do labirinto aquático de Morris quando comparados ao grupo que recebeu dieta baseada apenas em ração. Ratos que receberam dieta deficiente em AGPIs n-3 apresentaram deficiência de aprendizado no teste de memória olfativa e no teste do labirinto aquático de Morris

quando comparados ao grupo que recebeu dieta adequada em ácidos graxos n-3 (Greiner et al., 1999). Gamoh et al. (1999) encontraram uma melhora na memória de ratos suplementados cronicamente com DHA em relação ao grupo controle deficiente em AGPIs n-3 frente ao labirinto radial de oito braços. Ratos jovens com dieta rica em AGPIs-CL n-3 apresentaram efeitos positivos na habilidade de aprendizagem (Carrié et al., 2000).

Alguns resultados discrepantes, entretanto, ainda levantam dúvidas em relação aos efeitos da suplementação com AGPIs n-3 sobre a composição cerebral de ácidos graxos e aprendizagem em ratos. Wainwright et al. (1994) alimentaram ratos com composições dietéticas variadas em AGPIs. Os animais suplementados com ácidos graxos n-3 e n-6 não exibiram diferença de aprendizado quando comparados com os resultados de animais mantidos em dieta deficiente em AGPIs n-3, tanto no teste do labirinto aquático de Morris quanto no teste de campo aberto. Estudos de Frances et al. (1996) com camundongos demonstraram que uma dieta restrita em ácidos graxos n-3 não altera a atividade locomotora e exploratória dos animais, mas reduz a habilidade de aprendizagem dos mesmos na habituação. Ratos suplementados com Ácido Araquidônico (AA) e DHA não apresentaram desempenho diferente no labirinto aquático de Morris quando comparados com ratos suplementados com ácidos graxos saturados ou com dieta padrão (Wainwright et al., 1999). Estudos de de Wilde et al. (2002) utilizaram ratos suplementados com AGPIs n-3 e, de modo a mimetizar demência, realizaram cirurgia de hipoperfusão nos animais. Os animais suplementados não demonstraram diferenças comportamentais quando comparados ao grupo placebo frente aos testes de labirinto em cruz elevado ("plus maze") e esquivas ativa. Entretanto, a suplementação com ácidos graxos n-3 provou ser eficiente no teste do labirinto aquático de Morris.

A literatura apresenta dados discrepantes não somente em se tratando de incorporação de ácidos graxos às membranas neuronais, como também de alterações funcionais refletidas em processos de memórias. Logo, devido à variabilidade de modelos e testes comportamentais utilizados e aos diferentes resultados encontrados, entendemos que um maior número de estudos neste tema se torna cada vez mais necessário. Nosso objetivo neste trabalho, portanto, é investigar se ratos suplementados com óleo de peixe, rico em AGPIs n-3, desde a fase pós-desmame até os 90 dias de idade, período durante o qual ocorre a maturação do Sistema Nervoso Central, sofrem alterações na formação de memória a partir dos testes de habituação e labirinto aquático de Morris.

OBJETIVOS

1. Investigar os possíveis efeitos da suplementação crônica com óleo de peixe sobre a memória de ratos através dos testes de habituação e labirinto aquático de Morris;
2. Avaliar possíveis alterações no comportamento exploratório decorrentes da suplementação crônica através do teste de campo aberto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto desta monografia foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

1. ANIMAIS

Quarenta e dois ratos Wistar machos foram obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas com vinte e um dias de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central sob ciclo claro/escuro (12/12 horas) em ambiente com temperatura controlada de $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Com água e alimentação a base de ração Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S/A) à vontade, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais:

- 1 Grupo 1 – óleo de peixe: 3,0g/kg/dia de composto de extratos marinhos rico em ácidos graxos n-3 (Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa S/A), contendo 180mg de Ácido Eicosapentaenóico (EPA n-3), 120mg de DHA e antioxidante tocoferol por cápsula.
- 2 Grupo 2 – gordura de coco: 3,0g/kg/dia de gordura de coco rica em ácido graxo saturado (Gordura de Coco Brasil, RMB Ltda).
- 3 Grupo 3 – controle: não suplementado, porém também manipulado e sob o mesmo grau de estresse.

2. SUPLEMENTAÇÃO

Os animais foram alimentados e suplementados até a idade de noventa dias, quando considerados adultos. A suplementação diária com óleo de peixe ou gordura de coco se deu via oral, utilizando-se pipeta de volume ajustável. A cada dois dias, os animais foram pesados em balança digital da marca GEHAKA, modelo BG-4001. Após setenta dias, apenas o processo de suplementação foi interrompido e os animais passaram então a ser avaliados em testes comportamentais.

3. TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados no período das 13 às 17 horas. Um intervalo de dez dias entre os testes foi estabelecido de modo a minimizar possíveis interferências entre os mesmos.

3.1 CAMPO ABERTO

No teste do campo aberto, uma arena circular com 1m de diâmetro era limitada por uma parede circular de 40cm de altura, sendo a mesma iluminada por duas lâmpadas de 60 Watts. O piso encontrava-se marcado por dezenove quadrantes de tamanho aproximadamente correspondente ao comprimento do animal, estando os quadrantes separados por marcas de duas áreas circulares e linhas dividindo estes círculos. A arena estava circundada por uma cortina, numa tentativa de se evitar que o animal visse o experimentador, o que poderia causar alterações no comportamento em andamento (Naliwaiko, 2004; Nahas, 1999).

Os animais foram individualmente colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente durante cinco minutos. Durante este período, foram mensurados o número de secções do ambiente transpassadas pelo animal (quadrantes), o comportamento de levantar-se nas patas posteriores (“rearing”), assim como o comportamento de imobilidade (“freezing”) e de autolimpeza (“grooming”) (Carrié et al., 2000; Nahas, 1999). Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10% (Naliwaiko, 2004; Nahas, 1999).

3.2 HABITUAÇÃO

O teste da habituação foi realizado no mesmo aparelho do teste de campo aberto, mantendo-se as mesmas condições e características previamente descritas. Durante cinco minutos, por quatro dias consecutivos, os animais foram individualmente colocados na região central do aparelho e deixados explorar o ambiente. Ao longo do período de teste foram avaliados comportamentos que levam a uma ampliação das informações obtidas pelo animal acerca do novo ambiente. A atividade locomotora foi mensurada através da contagem do número de quadrantes transpassados pelos animais e a atividade exploratória foi quantificada através do comportamento de “rearing” (Naliwaiko, 2004; Carrié et al., 2000; Nahas, 1999).

Após cada animal testado, o campo aberto foi lavado com solução de etanol 10%. Um período de 24 horas entre testes foi mantido por conveniência e por evitar complicações em relação ao ritmo circadiano do animal, que também tem grande influência sobre os comportamentos mensurados (Naliwaiko, 2004; Nahas, 1999).

3.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

O teste de memória foi desenvolvido no labirinto aquático de Morris, o qual consiste em uma piscina circular de cor preta (1,6 m de diâmetro e 0,4 m de altura) com água a $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 0,32 m de profundidade. O labirinto aquático encontrava-se em uma sala com temperatura controlada. Cartazes com figuras geométricas estavam fixados às paredes da sala e puderam ser usados como dicas distais pelos animais quando colocados dentro do labirinto. Quatro diferentes posições de partida (leste, oeste, norte e sul) foram estabelecidas a partir da borda da piscina. A partir destas, quatro quadrantes foram imaginariamente demarcados, e no centro de cada um foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (11 x 14 x 30 cm) submersa a 2 cm da superfície da água (Naliwaiko, 2003). O desempenho dos animais foi avaliado pela medida de latência (i. e., intervalo de tempo para completar a tarefa) desde sua liberação até o momento em que estes encontram a plataforma, utilizando-se apenas um cronômetro. Este é o parâmetro mais utilizado na literatura para representar os resultados (dos Santos, 1999).

3.3.1 TESTE DE MEMÓRIA OPERACIONAL

A estratégia do teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris consistiu em alterar a localização da plataforma de acrílico a cada novo treinamento. Sendo assim, os animais desconheciam a localização da plataforma na primeira tentativa, mas nas tentativas seguintes puderam valer-se das informações coletadas na primeira tentativa para alcançar a plataforma. A cada dia a plataforma foi colocada submersa em um determinado quadrante (oeste, sul, norte ou leste). Os

animais foram treinados quatro vezes em posições diferentes. O tempo que o animal despendeu para encontrar a plataforma em cada treino foi anotado. O animal que não encontrou a plataforma em 60 segundos (tempo de latência) foi conduzido manualmente e deixado na plataforma por 30 segundos. Após este tempo os animais foram colocados diretamente em uma nova posição de largada (dos Santos, 1999). Durante os quatro dias, a mesma seqüência de procedimentos tomados no primeiro dia foi repetida, alterando-se diariamente a posição da plataforma de modo aleatório.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida, quando indicado, de pós-teste de Duncan. Resultados não paramétricos estão representados como mediana e intervalos inter-quartis (Q25/Q75) e submetidos a Kruskal-Wallis ANOVA. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. INCREMENTO DE MASSA CORPÓREA

A figura 1 representa a curva de evolução da massa corpórea dos animais controle e dos suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco ao longo de setenta dias. A massa dos animais no dia do desmame foi considerada 100%. A curva de ganho de massa não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,102)=0,52$; $p=0,59$). A alteração na dieta de ratos cronicamente suplementados não exerceu influência sobre o ganho de peso dos animais.

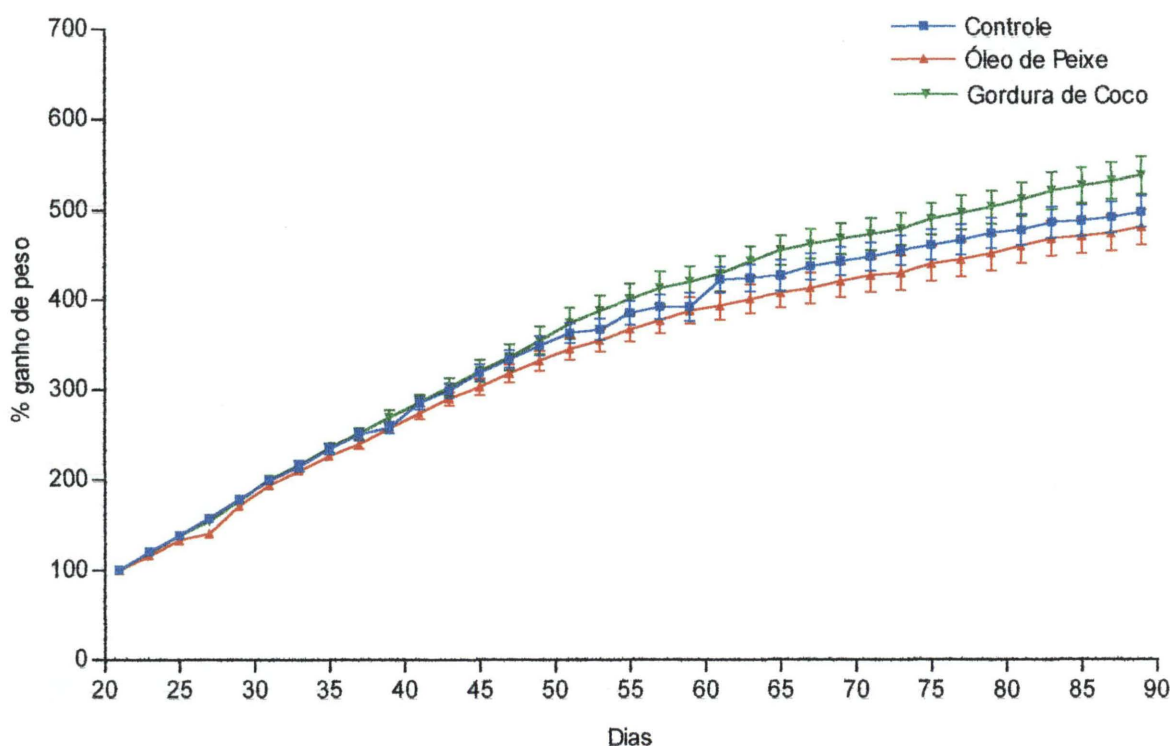


FIGURA 1. Curva de evolução da massa corpórea dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco. Os dados estão expressos como média \pm EPM de 14 animais em cada grupo.

2. CAMPO ABERTO

A tabela 1 apresenta o comportamento dos animais suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco e do grupo controle frente ao teste de campo aberto. A atividade locomotora dos animais não foi significativamente diferente entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(2,40)=0,11$; $p=0,93$), o mesmo sendo observado em relação ao comportamento de “rearing” (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(2,42)=2,47$; $p=0,29$), tempo de “grooming” (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(2,42)=1,85$; $p=0,39$) e de “freezing” (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(2,42)=0,99$; $p=0,61$).

TABELA 1. Comportamento dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco quando expostos ao teste de campo aberto.

GRUPO	QUADRANTES	“REARING”	“GROOMING”	“FREEZING”
Controle	61,0±5,8	31(17/38)	12(8/17)	13,5(6/25)
Óleo de Peixe	55,4±7,7	37(33/51)	19(9/25)	10(5/16)
Gordura de Coco	53,9±4,8	33(25/42)	10(8/16)	9,5(6/19)

Os dados de número de quadrantes estão expressos como média ± EPM. Os dados de “rearing”, de tempo de “grooming” e de “freezing” estão representados na forma de mediana e intervalos inter-quartis (Q25/Q75). Os resultados compreendem 14 animais em cada grupo experimental.

3. HABITUAÇÃO

3.1 ATIVIDADE LOCOMOTORA

A atividade locomotora dos animais suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco e do grupo controle está representada na figura 2. No primeiro dia de exposição, os grupos não apresentaram diferença no comportamento exploratório (ANOVA de uma via, $F(2,38)=0,45$; $p=0,63$). Nos dias subsequentes, entretanto, os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram uma diminuição significativa no número de cruzamentos realizados em relação aos animais do grupo controle e suplementados com gordura de coco (ANOVA de uma via, $F(4,78)=0,3$; $p \leq 0,05$, seguida por pós-teste de Duncan).

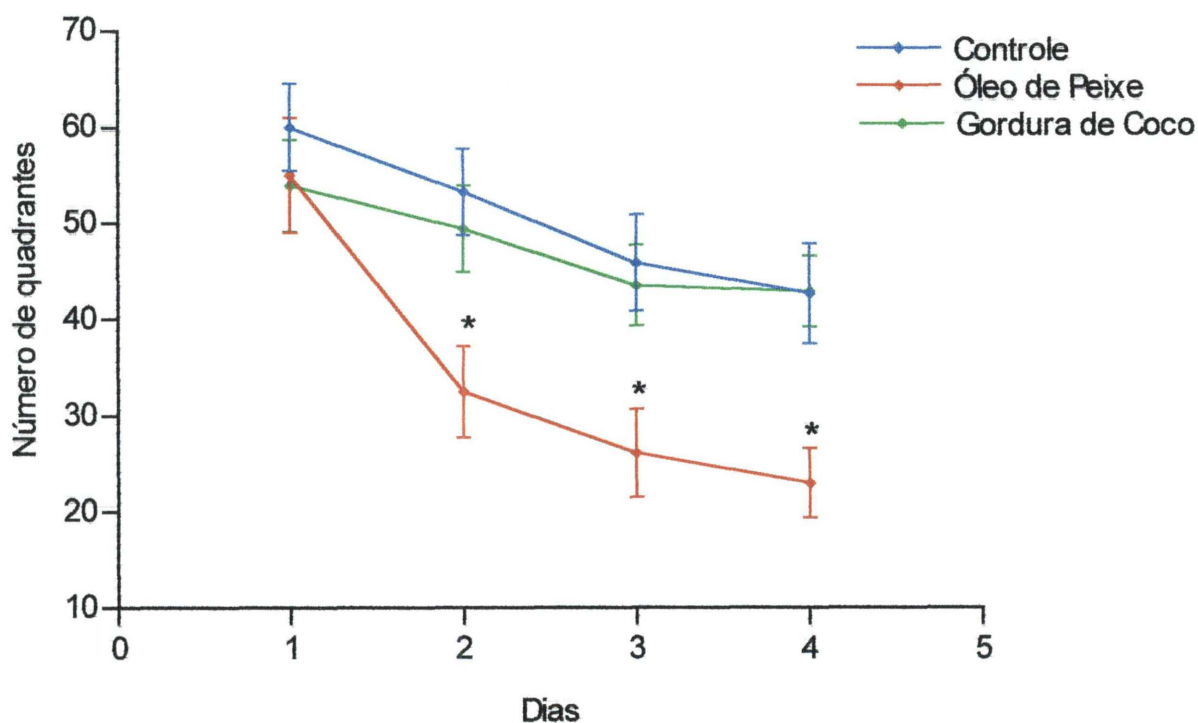


FIGURA 2. Atividade locomotora dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco quando submetidos ao teste de habituação. Os resultados expressam a média \pm EPM para 14 animais em cada grupo experimental. *significativamente diferente quando comparado ao grupo controle e suplementado com gordura de coco ($p \leq 0,05$).

3.2 ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

A figura 3 representa a atividade exploratória dos animais suplementados com gordura de coco ou óleo de peixe e grupo controle com base no comportamento de “rearing”. Os animais não apresentaram desempenho estatisticamente diferente entre os grupos ao longo dos quatro dias de exposição (Kruskal-Wallis ANOVA, $H(2,42)=2,47$; $p=0,29$).

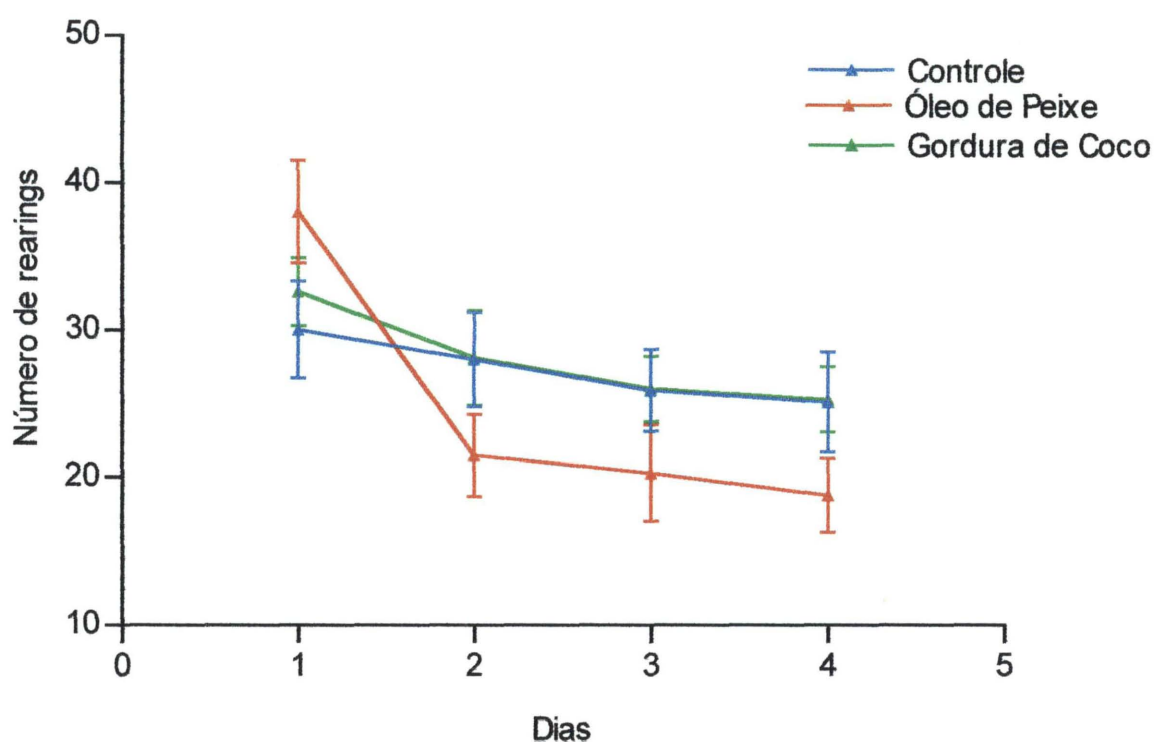


FIGURA 3. Atividade exploratória dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco quando submetidos ao teste de habituação. Os dados estão expressos como mediana e intervalos inter-quartis (Q25/Q75) de 14 animais em cada grupo experimental.

3. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

3.2 TESTE DE MEMÓRIA OPERACIONAL

Quando submetidos ao labirinto aquático de Morris, os animais suplementados com gordura de coco ou óleo de peixe não tiveram desempenho diferente daquele observado nos animais controle (Figura 4). (ANOVA de duas vias, $F(6,117)=1,63$; $p=0,14$).

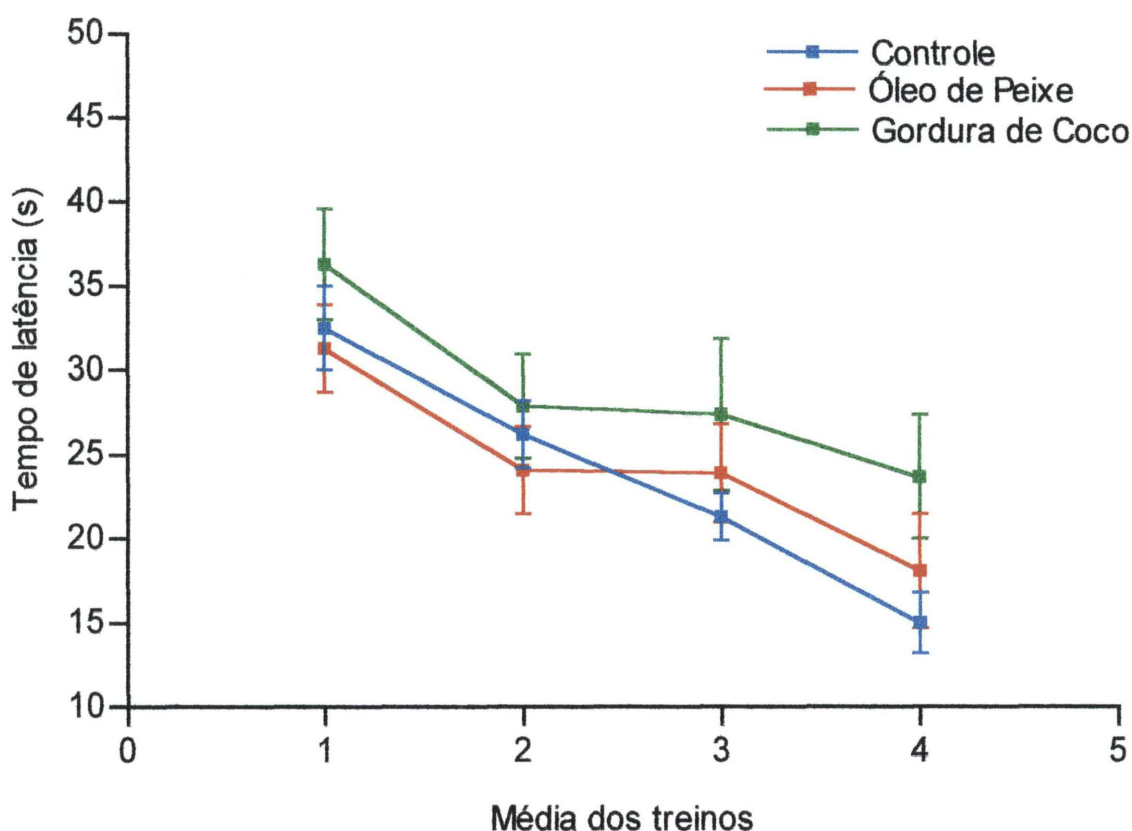


FIGURA 4. Desempenho dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco quando submetidos ao teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 14 animais em cada grupo.

DISCUSSÃO

Na literatura encontramos resultados indicando que o consumo de peixe, ou de óleo de peixe, ricos em AGPIs n-3, acarreta em vários benefícios à saúde. Vários estudos comprovaram que a ingestão de peixe ou de óleo de peixe reduz o risco de doenças cardíacas, diminui a hipertensão e os níveis de colesterol e triglicerídios, previne certas arritmias cardíacas e morte súbita. Além disso, a suplementação com óleo de peixe tem sido associada a uma baixa incidência de diabetes mellitus, ao controle de artrite reumatóide e à prevenção ao câncer de colon (Roynette et al., 2004; Suresh & Das, 2003; Sidhu, 2003; Fürst & Kuhn, 2000).

Os AGPIs n-3 desempenham papel vital no desenvolvimento apropriado do sistema nervoso. O desenvolvimento neurológico e as funções fisiológicas do cérebro dependem de incorporação adequada desses ácidos graxos, em especial o DHA, durante períodos específicos na maturação da membrana neural. Logo, a suplementação com AGPIs n-3 garante não apenas um ótimo desenvolvimento mental, como também melhora o aprendizado e a memória (Das, 2003b; Sidhu, 2003; Fürst & Kuhn, 2000). Animais suplementados com AGPIs-CL n-3 têm demonstrado aumento da capacidade de aprendizagem e melhora de memória (de Wilde et al., 2002). Com base nestes dados, aumenta-se o interesse em investigar o papel do óleo de peixe nas áreas envolvidas com a memória.

Sabe-se que a relação existente entre o conteúdo de AGPIs no cérebro e sua função pode ser constatada a partir de experimentos comportamentais e testes de memória. A neurobiologia do aprendizado e da memória requer ferramentas para quantificar o rendimento comportamental, assim como métodos comportamentais únicos à pesquisa (Dudai, 1989). Para identificar as bases anatômicas ou

fisiológicas da aprendizagem e memória, devem ser medidas alterações anatômicas, bioquímicas ou fisiológicas nas específicas regiões cerebrais envolvidas na aprendizagem e na lembrança de uma tarefa específica (Martinez & Kesner, 1991).

O teste do campo aberto vem se mostrando de grande importância em estudos sobre cognição animal, principalmente pelo fato dos procedimentos de tal teste permitirem não somente a investigação das propriedades dos sistemas de memória, como também a avaliação das condições sob as quais se é possível induzir a atividade exploratória nos animais testados. A tabela 1 apresenta o comportamento dos animais suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco e do grupo controle frente ao teste de campo aberto. As atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do meio são usadas como medida de comportamento exploratório e do nível de excitabilidade, uma vez que a atividade locomotora e o comportamento de levantar-se nas patas posteriores (“rearing”) freqüentemente se correlacionam com outras atividades como autolimpeza corporal (“grooming”) e completa ausência de atividade exploratória (“freezing”). A atividade locomotora dos animais não foi significativamente diferente entre os grupos, o mesmo sendo observado em relação ao comportamento de “rearing”, tempo de “grooming” e de “freezing”. Tais resultados demonstram que tanto o comportamento exploratório quanto a emocionalidade dos animais não sofreram influência da suplementação crônica com óleo de peixe. Estudos de Naliwaiko et al. (2004) com ratos suplementados com óleo de peixe ou gordura de coco não demonstraram diferenças de atividade locomotora entre os grupos no teste do campo aberto. Ratos adultos suplementados com óleo de peixe não apresentaram aumento na atividade locomotora e exploratória quando comparados com ratos em dieta equilibrada em AGPIs n-6 e n-3. Entretanto, tais diferenças foram encontradas em ratos jovens

(Carrié, et al., 2000). Animais suplementados com ácidos graxos n-3 e n-6 não exibiram diferença de aprendizado no teste de campo aberto quando comparados com os resultados de animais mantidos em dieta deficiente em AGPIs n-3 (Wainwright et al., 1994). Estudos de Frances et al. (1996) com camundongos demonstraram que uma dieta restrita em ácidos graxos n-3 não modifica a atividade locomotora e exploratória dos animais frente ao teste de campo aberto. Logo, o teste do campo aberto serve como ferramenta ao representar o padrão geral de comportamento dos animais testados (Eilam, 2003).

O uso de um maior número de tentativas no teste de campo aberto pode trazer vantagens relacionadas à possibilidade de investigar habituação e aprendizagem (Nahas, 1999). Quando expostos ao teste de habituação, os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram uma queda na atividade locomotora ao longo dos dias, quando comparados com os animais dos grupos controle e suplementados com gordura de coco (Figura 2). A diminuição de respostas ao longo dos dias sugere a ação do óleo de peixe sobre a formação da memória no teste de habituação, uma forma de aprendizagem não associativa caracterizada pelo gradual declínio de determinada resposta a um estímulo repetido (Dudai, 1989; Martinez & Kesner, 1991). Estudos de Frances et al. (1996) com camundongos demonstraram que uma dieta restrita em ácidos graxos n-3 reduz a habilidade de aprendizagem dos mesmos na habituação. Carrié et al. (2000), porém, não encontraram interação entre dieta e habituação, já que tanto o grupo controle quanto o suplementado por óleo de peixe diminuíram a atividade locomotora. Em relação ao comportamento de "rearing", os animais suplementados com óleo de peixe não apresentaram desempenho estatisticamente diferente quando comparados com os grupos controle e suplementado com gordura de coco (Figura

3). No entanto, o protocolo e os parâmetros utilizados no presente trabalho diferem dos utilizados por Frances et al. e Carrié et al., os quais utilizaram apenas a atividade locomotora dos animais como medida. Os resultados encontrados no teste de habituação são suportados pelos dados do teste do campo aberto na medida em que este comprova que as diferenças encontradas ao longo dos dias não são oriundas de outras alterações comportamentais, evitando-se assim a possível evidência de resultados falsamente positivos entre os testes.

Dentre os variados procedimentos e aparelhos desenvolvidos para avaliar o desempenho de animais em labirintos, o teste do labirinto aquático de Morris vem se destacando nos estudos sobre a neurobiologia da memória. Através de manipulações simples no labirinto aquático, é possível criar diferentes procedimentos comportamentais que permitem estudar alguns sistemas de memória, entre eles a memória operacional (dos Santos, 1999). Quando submetidos ao labirinto aquático de Morris, os animais suplementados com gordura de coco ou óleo de peixe não tiveram desempenho diferente daquele observado nos animais controle (Figura 4). Alguns dados da literatura também sugerem que dietas enriquecidas em AGPIs n-3 não demonstram efeito sobre o aprendizado no labirinto aquático de Morris. Animais suplementados com ácidos graxos n-3 e n-6 não exibiram diferença de aprendizado quando comparados com os resultados de animais mantidos em dieta deficiente em AGPIs n-3 (Wainwright et al., 1994). Ratos suplementados com DHA não apresentaram desempenho diferente quando comparados com ratos suplementados com ácidos graxos saturados ou com dieta padrão (Wainwright et al., 1999). Naliwaiko et al., (2004) não encontraram efeito da dieta enriquecida em AGPIs n-3 sobre o aprendizado no labirinto aquático, assim como Carrié et al. (2000).

Outros trabalhos, contudo, apresentam resultados discrepantes. Ratos que receberam dieta rica em AGPIs n-3 demonstraram um melhor desempenho no teste do labirinto aquático de Morris quando comparados ao grupo que recebeu dieta baseada apenas em ração (Jensen et al., 1996). A suplementação com AGPIs n-3 também provou ser eficiente no teste do labirinto aquático de Morris em estudos de de Wilde et al. (2002). Tais experimentos, porém, avaliaram os animais expostos ao labirinto aquático ao longo de nove e seis dias respectivamente, em contraste com quatro dias de teste aplicado no presente trabalho e nos estudos previamente citados. Dessa forma, a duração do teste pode não ter sido suficiente para se evidenciar algum efeito da suplementação com AGPIs n-3. Em estudos de Greiner et al., (1999), ratos que receberam dieta pobre em AGPIs n-3 apresentaram deficiência de aprendizado no teste do labirinto aquático de Morris quando comparados com o grupo controle. Como não se trata de efeitos da suplementação com AGPIs n-3, mas sim da deficiência destes, este dado torna-se difícil de ser comparado ao nosso estudo.

Inúmeros estudos têm avaliado a ação de AGPIs-CL sobre o comportamento. No entanto, os trabalhos apresentam grande diferença entre porcentagem de ácido graxo utilizada, via de administração, modelos e protocolos de testes empregados para evidenciar diversos comportamentos, além de diferenças entre espécies estudadas. Devido a essa ampla variabilidade, os resultados encontrados passam a ser de difícil comparação. Sendo assim, mesmo a suplementação com óleo de peixe ter sugerido um efeito sobre a memória, um maior número de estudos nesta área ainda se torna necessário.

CONCLUSÃO

Considerando os dados encontrados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que o óleo de peixe, quando avaliado pelo teste de habituação, foi hábil em melhorar o aprendizado dos animais cronicamente suplementados, evidenciando seu efeito sobre a memória. No entanto, quando avaliado pelo teste do labirinto aquático de Morris, o óleo de peixe não demonstrou ação sobre a memória dos animais suplementados.

Assim, este estudo permitiu constatar a capacidade da suplementação crônica com óleo de peixe em promover alterações comportamentais, incrementando a resposta à habituação, dessa forma demonstrando seu efeito sobre a memória dos animais suplementados. A suplementação crônica com óleo de peixe aparenta ter ação específica em diferentes regiões cerebrais envolvidas na aprendizagem e na lembrança de uma determinada tarefa.

REFERÊNCIAS

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

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

CARRIÉ, I.; GUESNET, P.; BOURRE, B-M.; FRANCÈS, H. Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice. **British Journal of Nutrition**, v.83, p.439-447, 2000.

DAS, U.N. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of brain and memory. **Nutrition**, v.19, p.62-65, 2003.

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

DUDAI, Y. **The Neurobiology of Memory-Concepts, Findings, Trends**. Oxford: University Press, 1989, 340p.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v.142, p.53-62, 2003.

FERRAZ, A.C. **Estudo dos efeitos fisiológicos do alcalóide ricinina, um estimulante do sistema nervoso central extraído da planta *Ricinus communis*.** Porto Alegre, 1999. 163 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FRANCES, H.; MONIER, C.; CLEMENT, M.; LECORSIER, A.; DEBRAY, M.; BOURRE, J.-M. Effect of dietary α -linolenic acid deficiency on habituation. **Life Sciences**, v.58, n.21, p.1805-1816, 1996.

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

GAMOH, S.; HASHIMOTO, M.; SUGIOKA, K.; HOSSAIN, M.S.; HATA, N.; MISAWA, Y.; MASUMURA, S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. **Neuroscience**, v.93, n.1, p.237-241, 1999.

GREINER, R.S.; MORIGUCHI, T.; HUTTON, A.; SLOTNICK, B.M.; Jr. SALEM, N. Rats with low levels of brain docosahexaenoic acid show impaired performance in olfactory-based and spatial learning tasks. **Lipids**, v.34, p.239-243, 1999.

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

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

IZQUIERDO, I. Os labirintos da memória. **Ciência Hoje**, v.25, n.148, p.38-43, 1999.

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. p.179-197.

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

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

NALIWAIKO, K. **Efeito antidepressivo do óleo de peixe na geração F1 de ratos cronicamente suplementados**. Curitiba, 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NALIWAIKO, K.; ARAÚJO, R.L.F.; DA FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; MARTINS, E.F.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Effects of Fish Oil on the Central Nervous System: A New Potential Antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, no prelo, 2004.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v.23, p.139–151, 2004.

dos SANTOS, A.M.G. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

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

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

SURESH, Y.; DAS, U.N. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Chemically Induced Diabetes Mellitus: Effect of ω -3 Fatty Acids. **Nutrition**, v.19, p.213–228, 2003.

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

WAINWRIGHT, XING, H.C.; WARD, G.R.; P.E.; HUANG, BOBIK, E.; AUESTAD, N.; MONTALTO, M. Water maze performance is unaffected in artificially reared rats fed diets supplemented with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. **Nutritional Neurosciences**, v.129, p.1079-1089, 1999.

de WILDE, M.C.; FARKAS, E.; GERRITS, M.; KILIAAN, A.J.; LUITEN, P.G.M. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, v.947, p.166-173, 2002.

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

ZIMMER, L.; DURAND, G.; GUILLOTEAU, D.; CHALON, S. n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and dopamine metabolism in the rat frontal cortex. **Lipids**, v.14, p.251, 1999.