



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MÉDICO-CIRÚRGICAS

LUIZ BARBOSA DA SILVA NETO

AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEITE E DE LEITE COM MISTURA DE
ÓLEOS ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE CAMUNDONGOS DURANTE A MEIA
IDADE

FORTALEZA

2019

LUIZ BARBOSA DA SILVA NETO

**AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEITE E DE LEITE COM MISTURA DE
ÓLEOS ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE CAMUNDONGOS DURANTE A MEIA
IDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Coorientadora: Profa. Dra. Daniele Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S581a Silva Neto, Luiz Barbosa.
Ação da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre camundongos durante a meia idade : Estudo experimental / Luiz Barbosa Silva Neto. – 2019.
110 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.
Coorientação: Profa. Dra. Daniele Macêdo Gaspar .
1. Envelhecimento. 2. Neurônio. 3. Nutracêuticos. 4. Ácidos Graxos. 5. Inflamação. I.
Título.

CDD 617

LUIZ BARBOSA DA SILVA NETO

**AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEITE E DE LEITE COM MISTURA DE
ÓLEOS ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE CAMUNDONGOS DURANTE A MEIA
IDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Daniele Macêdo Gaspar (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Radamés Bezerra Melo
Faculdade Paulo Picanço - FACPP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cleuza e Clairton pelo exemplo de força, trabalho, superação com que conduziram suas vidas, e principalmente por todo o amor que recebi em meu ceio familiar, cultivado pela paz e harmonia, que foi o fundamental alicerce em minha formação como cidadão e homem de bem.

Aos meus irmãos Andréa, André, Anderson e Andrielle pelo cuidado, zelo e amor que sempre tiveram com o irmão caçula, e pelos exemplos de vida e superação.

Aos meus cunhados (as) Hans, Paula, Isabella e Sidney por estarem ao lado dos meus irmãos e irmãs construindo uma família sólida e feliz.

Aos meus sobrinhos Caio, Ana, Yasmim, Felipe, Arthur, Cecília, Yan, Kauan e Kaique por serem a alegria de nossa família.

Ao meu companheiro Lourrany Borges pelo amor, exemplo de dedicação ao trabalho, apoio e incentivo em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo exemplo de profissionalismo, orientação, disponibilidade e oportunidade a mim concedida.

A minha Coorientadora PROFA. DRA. DANIELE MACÊDO GASPAR, Coordenadora do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo exemplo de profissionalismo, disponibilidade, pelas valorosas contribuições e por ter me recebido de forma tão solícita no laboratório.

Ao amigo ADRIANO JOSÉ MAIA CHAVES FILHO, pesquisador do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade e pelo inestimável auxílio na execução dos testes comportamentais e neuroquímicos.

Às senhoras MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA E MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, secretárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio constante, solicitude e atenção dispensada no decorrer de toda a pós-graduação.

Ao senhor BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo zelo, ajuda e atenção durante o experimento.

Aos acadêmicos de Medicina GABRIEL PINHEIRO FURTADO, da Universidade Federal do Ceará, e ISAAC PRADO RAMOS, da Universidade de Fortaleza, pela valorosa contribuição durante todo o experimento.

RESUMO

POSSÍVEL EFEITO NEUROPROTETOR DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 NO ENVELHECIMENTO EM CAMUNDONGOS.

LUIZ BARBOSA DA SILVA NETO. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Junho, 2019. Orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão Vasconcelos. Coorientadora Profa. Dra. Daniele Macêdo Gaspar.

As doenças neurodegenerativas estão entre as principais afecções associadas ao envelhecimento. Nestas, a inflamação crônica de baixo grau pode resultar em neurodegeneração. A gestão dessa inflamação poderia retardar o aparecimento dessas doenças. Neste trabalho foi ofertado diariamente *ad libitum* aos camundongos leite com um mix de óleos, fornecendo ômega 3, 6 e 9 (GT2). Os grupos controle (GC) e teste 1 (GT1) receberam água e leite desnatado, respectivamente. Após 280 dias (t1) (início da meia-idade) e 400 dias (t2) (final da meia-idade) foram realizados os testes. Foi demonstrado que com o envelhecimento ocorre diminuição da memória de trabalho no teste do labirinto em Y: média intergrupos t2 [57,99 (51,79 - 64,19)] menor que t1 [67,10 (63,37 - 70,83)] ($p=0,003$). Também houve aumento do comportamento depressivo no teste do nado forçado: GC t2 [101,70 (62,30 - 141,11)] maior que t1 [38,51 (1,39 - 75,63)] ($p=0,007$). Já a suplementação crônica do leite com o mix de óleos promoveu menor comportamento do tipo depressão nos animais de meia-idade mais velhos: GT2 t2 [55,30 (30,70 - 79,91)] menor que t1 [113,06 (80,52 - 145,60)] ($p=0,024$). A ingestão do leite com ou sem a mistura dos óleos protegeu contra o comportamento anedônico associado ao envelhecimento no teste de preferência a sacarose: GT1 t2 [100,00 (100,00 - 100,00)] e GT2 t2 [100,00 (100,00 - 100,00)] maior que GC t2 [50,00 (30,84 - 69,16)]. O leite com ou sem o mix de óleos proporcionou efeito neuroprotetor nos animais de meia-idade mais novos (t1), pela menor peroxidação lipídica (TBARS) nos tecidos do córtex pré-frontal GT1 [102,87 (89,45 - 116,29)] e GT2 [114,86 (90,59 - 139,14)] menores que GC [175,51 (139,98 - 211,03)], $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente, do hipocampo GT1 [266,88 (154,88 - 378,88)] e GT2 [210,02 (173,71 - 246,33)] menores que GC [388,43 (292,74 - 484,13)], $p<0,001$, em ambos, e do corpo estriado GT1 [186,72 (165,22 - 208,21)] e GT2 [173,50 (161,23 - 185,78)] menores que GC [256,96 (232,19 - 281,74)], $p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente. O mix de óleos promoveu nos animais de meia-idade mais velhos menor nível de peroxidação lipídica no corpo estriado: GT2 t2 [98,09 (85,67 - 110,51)] menor que GC [130,69 (105,53 - 155,84)] ($p=0,04$). O leite acrescido do mix de óleos provocou aumento da atividade de MPO nos animais de meia-idade mais velhos no córtex pré-frontal: GT2 t2 [0,21 (0,15 - 0,27)] maior que GC [0,12 (0,09 - 0,15)] ($p=0,024$), no hipocampo: GT2 [0,25 (0,22 - 0,28)] maior que GC [0,14 (0,11 - 0,17)] ($p<0,001$) e maior que GT1 [0,14 (0,10 - 0,18)] ($p<0,001$), e no corpo estriado: GT2 [0,28 (0,17 - 0,40)] maior que GC [0,08 (0,03 - 0,12)] ($p<0,001$) e maior que GT1 [0,10 (0,07 - 0,13)] ($p<0,001$), sem promover aumento da peroxidação lipídica neste grupo nos homogenatos estudados. Palavras chave: Envelhecimento. Neurônio. Nutracêuticos. Ácidos Graxos. Inflamação.

ABSTRACT

POSSIBLE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE SUPPLEMENTATION OF ÔMEGAS 3, 6 AND 9 IN AGING IN MICE.

LUIZ BARBOSA DA SILVA NETO. Dissertation (Master's degree) of the *Stricto Sensu* Postgraduate Program in Medical-Surgical Sciences, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. June, 2019. Advisor Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos. Coordination Dr. Daniele Macêdo Gaspar.

Neurodegenerative diseases are one of the main diseases associated with aging. In these cases, low-intensity chronic inflammation may result in neuronal loss in the brain. The management of this inflammation could delay the onset of these diseases. In the current work, milk added with a mixture of omega 3, 6 and 9 oils was given to daily *ad libitum* to mice (GT2). The control group (GC) and test 1 group (GT1) received water and skim milk, respectively. After 280 days (t1) (beginning of mice middle age) and 400 days (t2) of experiment (late mice middle age), tests were performed to the groups. It was shown there is a decrease in working memory with aging in the Y labyrinth test: mean intergroups t2 [57.99 (51.79 – 64.19)] lower than t1 [67.10 (63.37-70.83)] ($p = 0.003$). There was also an increase in depressive behavior in the forced swim test: GC t2 [101.70 (62.30 – 141.11)] greater than t1 [38.51 (1.39 – 75.63)] ($p = 0.007$). Chronic supplementation of milk with the oil mix promoted a lower depression behavior in older middle-aged animals: GT2 t2 [55.30 (30.70 - 79.91)] lower than t1 [113.06 (80.52 - 145.60)] ($p = 0.024$). Ingestion of milk with or without the oils mix protected against the anhedonia behavior associated with aging in the sucrose preference test: GT1 t2 [100.00 (100.00 - 100.00)] and GT2 t2 [100.00 (100.00 - 100.00)] greater than GC t2 [50.00 (30.84 - 69.16)]. Milk with or without the oils mix provided a neuroprotective effect in the younger middle-aged animals (t1): less lipid peroxidation (TBARS) in pre-frontal cortex tissues, GT1 [102,87 (89,45-116, 29)] and GT2 [114.86 (90.59 - 139.14)] lower than GC [175.51 (139.98 - 211.03)], $p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively; in the hippocampus, GT1 [266.88 (154.88 - 378.88)] and GT2 [210.02 (173.71 - 246.33)] lower than GC [388.43 (292.74 - 484.13)], both $p < 0.001$; and in the striatum, GT1 [186.72 (165.22 - 208.21)] and GT2 [173.50 (161.23 - 185.78)] lower than GC [256.96 (232.19) - 281.74], $p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively. The oils mix promoted a lower level of lipid peroxidation in the striatum of older animals: GT2 t2 [98.09 (85.67 - 110.51)] lower than GC [130.69 (105.53 - 155, 84)] ($p = 0.04$). Milk with oils mix caused an increase in MPO activity in older middle-aged animals in the pre-frontal cortex: GT2 t2 [0.21 (0.15 - 0.27)] greater than GC [0.12 (0.09-0.15)] ($p = 0.024$); in the hippocampus: GT2 [0.25 (0.22-0.28)] greater than GC [0.14 (0.11-0.17)] ($p < 0.001$) and greater than GT1 [0.14 (0.10-0.18)] ($p < 0.001$); and in the striatum: GT2 [0.28 (0.17-0.40)] higher than GC [0.08 (0.03-0.12)] ($p < 0.001$) and greater than GT1 [0.10 (0.07-0.13)] ($p < 0.001$), without promoting increased lipid peroxidation in this group of brain homogenates.

Keywords: Aging. Neuron. Nutraceuticals. Fatty acids. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expectativa de vida ao nascer, 1980 a 2050.	17
Figura 2: Possível sequência de lesão inflamatória do tecido cerebral no curso da neurodegeneração em doenças inflamatórias primárias do SNC.	19
Figura 3: Possível sequência de lesão inflamatória do tecido cerebral no curso da neurodegeneração em doenças degenerativas primárias do SNC.	19
Figura 4: Estrutura e nomenclatura de ácidos graxos de 18 carbonos.	22
Figura 5: Resumo dos papéis dos ácidos graxos na função celular.	24
Figura 6: Grupos Experimentais.	31
Figura 7: Estágios da vida de camundongos em comparação com seres humanos.	33
Figura 8: Desenho do estudo.	34
Figura 9: Representação gráfica do teste de reconhecimento de objetos.	35
Figura 10: Representação gráfica do teste labirinto em Y.	36
Figura 11: Representação gráfica do teste do nado forçado.	37
Figura 12: Representação gráfica do teste preferência por sacarose.	38
Figura 13: Representação gráfica do teste campo aberto.	39
Figura 14: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste de reconhecimento de objetos. ...	42
Figura 15: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do labirinto em Y.	43
Figura 16: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do nado forçado.	44
Figura 17: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste da preferência por sacarose.	46
Figura 18: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de cruzamentos.	47
Figura 19: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de levantamentos de patas.	48

Figura 20: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - tempo de levantamentos de patas.	49
Figura 21: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de cruzamentos no centro.	50
Figura 22: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - tempo de permanência no centro.	51
Figura 23: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal	53
Figura 24: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no hipocampo	54
Figura 25: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no corpo estriado	56
Figura 26: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutatona reduzida no córtex pré-frontal	57
Figura 27: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutatona reduzida no hipocampo	59
Figura 28: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutatona reduzida no corpo estriado	60
Figura 29: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no córtex pré-frontal	61
Figura 30: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo	63

Figura 31: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no corpo estriado.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela: Média e IC de 95% da medida NOR, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	42
Tabela 2: Média e IC de 95% da medida Y-maze, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	43
Tabela 3: Média e IC de 95% da medida tempo de imobilidade, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	44
Tabela 4: Média e IC de 95% da medida consumo de sacarose, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	45
Tabela 5: Média e IC de 95% da medida cruzamentos, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	46
Tabela 6: Média e IC de 95% da medida número de levantamentos de patas, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	48
Tabela 7: Média e IC de 95% da medida tempo de levantamento de patas, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	49
Tabela 8: Média e IC de 95% da medida número de cruzamentos no centro, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	50
Tabela 9: Média e IC de 95% da medida tempo de permanência no centro, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	51
Tabela 10: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	52
Tabela 11: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	54
Tabela 12: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no corpo estriado, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	55

Tabela 13: Média e IC de 95% da medida de glutathiona reduzida no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	57
Tabela 14: Média e IC de 95% da medida da glutathiona reduzida no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	58
Tabela 15: Média e IC de 95% da medida de glutathiona reduzida no corpo estriado, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	60
Tabela 16: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way.....	61
Tabela 17: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	62
Tabela 18: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μL – Microlitro

μmol – Micromol

AA – Ácido araquidônico

AcO – Ácido oleico

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DHA – Ácido docosaexaenoico

EPA – Ácido eicosapentaenoico

et al. – E colaboradores

GC – Grupo controle

GSH – Glutathiona reduzida

GT1 – Grupo teste 1

GT2 – Grupo teste 2

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

LABCEX – Laboratório de Cirurgia Experimental

mg – Miligrama

Min – Minutos

MPO – Mieloperoxidase

MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados

Nm – Nanômetros

PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados

Rpm – Rotações por minuto

SFA – Ácidos graxos saturados

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superoxidodesmutase

TBARS – Substâncias reativas ao Ácido tiobarbitúrico

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UFC – Universidade Federal do Ceará

UHT – *Ultra High Temperature*

ω -3 – Ômega 3

ω -6 – Ômega 6

ω -9 – Ômega 9

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

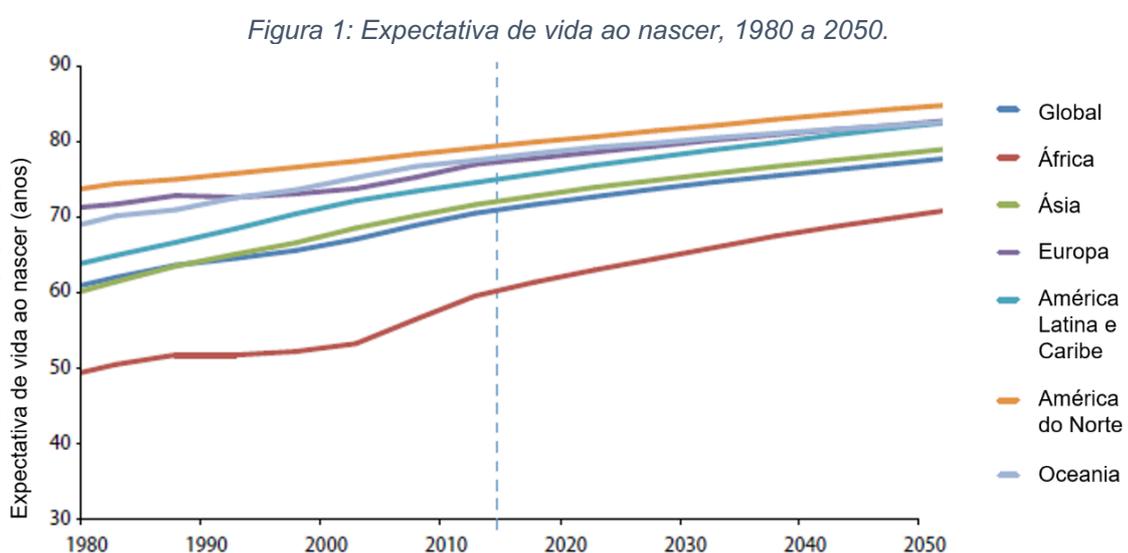
1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Envelhecimento e Neurodegeneração.....	17
1.2.	Nutracêuticos	20
1.3.	Ácidos graxos.....	22
1.3.1.	Biossíntese dos ácidos graxos monoinsaturados e suas funções metabólicas.....	23
1.3.2.	Biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados e suas funções metabólicas.....	24
2.	JUSTIFICATIVA.....	27
3.	OBJETIVO	29
3.1.	Objetivo Geral	29
3.2.	Objetivos Específicos.....	29
4.	MÉTODO	30
4.1.	Aspectos Éticos.....	30
4.2.	Animais	30
4.3.	Nutracêutico	30
4.4.	Delineamento Experimental.....	31
4.4.1.	Fluxograma Experimental.....	31
4.4.2.	Testes Comportamentais.....	35
4.4.3.	Testes Bioquímicos	39
4.4.4.	Análise Estatística	41

5.	RESULTADOS	42
5.1.	Reconhecimento de Objetos (NOR)	42
5.2.	Labirinto em Y (Y-maze)	43
5.3.	Nado Forçado	44
5.4.	Preferência por Sacarose	45
5.5.	Campo Aberto	46
5.5.1.	Cruzamentos	46
5.5.2.	Número de levantamentos de patas	47
5.5.3.	Tempo de levantamentos de patas	48
5.5.4.	Número de cruzamentos no centro	49
5.5.5.	Tempo de permanência no centro	51
5.6.	Peroxidação Lipídica (TBARS)	52
5.6.1.	Córtex Pré-frontal	52
5.6.2.	Hipocampo.....	53
5.6.3.	Corpo Estriado.....	55
5.7.	Glutathiona Reduzida (GSH)	56
5.7.1.	Córtex Pré-frontal	56
5.7.2.	Hipocampo.....	58
5.7.3.	Corpo Estriado.....	59
5.8.	Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	60
5.8.1.	Córtex Pré-frontal	60
5.8.2.	Hipocampo.....	62
5.8.3.	Corpo Estriado.....	63
6.	DISCUSSÃO.....	65
7.	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE A – TESTES COMPORTAMENTAIS (DADOS BRUTOS)	93
	APÊNDICE B – TESTES BIOQUÍMICOS (DADOS BRUTOS)	103
	ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento e Neurodegeneração

Ganhos significantes na expectativa de vida foram alcançados nos últimos anos. Globalmente, a esperança de vida ao nascer aumentou 3 anos entre 2000 e 2015, de 67 para 70 anos. O Brasil, a quinta nação mais populosa do mundo, com mais de 200 milhões de habitantes, está passando por um dos mais rápidos processos de envelhecimento demográfico do mundo, uma tendência que se acelerará ainda mais durante o século 21 (ONU, 2015) (Figura 01).



Fonte: Adaptado de United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects 2015 – Data Booklet (ST/ESA/SER.A/377).

De acordo com projeções recentes, a população idosa triplicará no Brasil e aumentará de 19,6 milhões conforme dados de 2010, para 66,5 milhões em 2050, tornando-se a sexta maior população idosa do mundo (CASTRO-COSTA *et al.*, 2018). Estudos recentes têm mostrado que nessa população a multimorbidade, caracterizada pela presença de mais de 2 ou mais doenças crônicas, é frequente, afetando pelo menos mais da metade dos idosos (NUNES *et al.*, 2018). Sendo assim, a multimorbidade é um importante problema de saúde pública devido à sua alta frequência, principalmente por sua associação com a mortalidade, declínio funcional e baixa qualidade de vida, além da dificuldade de

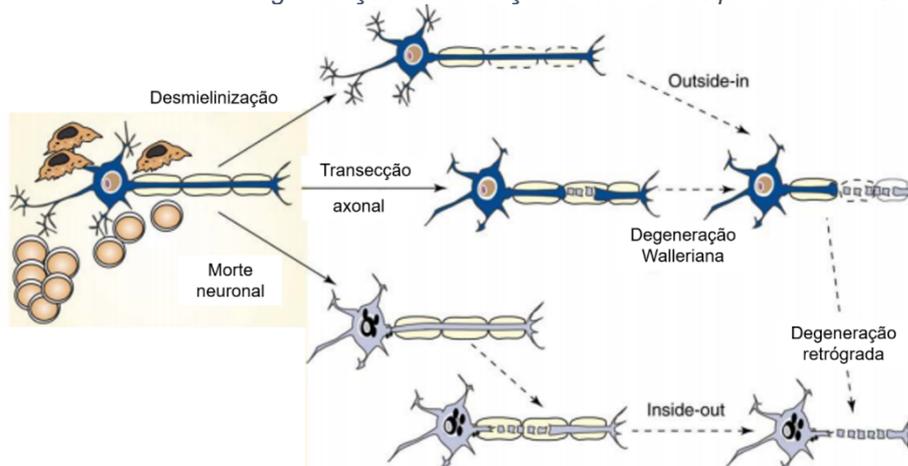
manejo adequado pelos serviços de saúde (FORTIN *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2016; RYAN *et al.*, 2015).

Dentre as principais doenças relacionadas ao envelhecimento, as doenças neurodegenerativas representam desafios importantes ainda não contempladas com intervenções terapêuticas preventivas clinicamente eficazes. Estas perturbações surgem a partir de uma lesão primária inflamatória, neurodegenerativa, metabólica ou isquêmica (ZIPP; AKTAS, 2006). Essas doenças interrompem a conectividade dentro dos circuitos cerebrais, afetando os contatos neuronais, neuronais-gliais e glias-gliais (HENEKA; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY, 2010).

Os gatilhos iniciais para o desenvolvimento das doenças neurológicas podem diferir consideravelmente. Contudo, apesar dos diferentes eventos iniciais, evidências crescentes indicam que mesmo em doenças clinicamente heterogêneas, podem haver vias imunológicas comuns, que surgem da interface da resposta imune e da homeostase neuronal, resultando em neurotoxicidade (ZIPP; AKTAS, 2006).

As figuras abaixo mostram uma possível sequência de lesão inflamatória do tecido cerebral no curso da neurodegeneração. Nas doenças inflamatórias primárias do sistema nervoso central (SNC) (ex. Esclerose múltipla), as células imunitárias ativadas, principalmente macrófagos, microglia e linfócitos, atacam um antígeno comum do cérebro, tipicamente partes da bainha de mielina (figura 2). Durante o ataque imune, pode ocorrer desmielinização, transecção axonal ou morte direta do neurônio. No curso da doença, a desmielinização pode levar à transecção axonal secundária (outside-in). A morte do axônio ou do neurônio pode resultar em desmielinização secundária (inside-out). Alguns desses mecanismos também podem fazer parte da patologia de doenças como a Doença de Alzheimer (ZIPP; AKTAS, 2006).

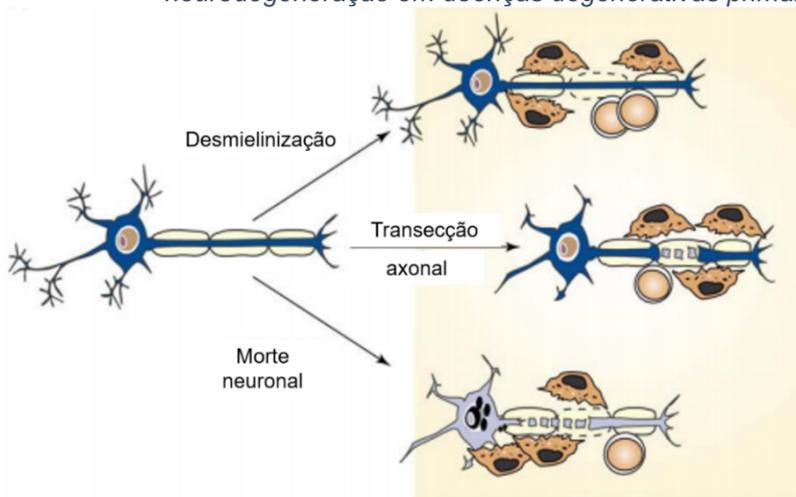
Figura 2: Possível seqüência de lesão inflamatória do tecido cerebral no curso da neurodegeneração em doenças inflamatórias primárias do SNC.



Fonte: (Zipp, 2006)

Já em doenças degenerativas primárias do SNC (ex. adrenoleucodistrofia e a doença de Alzheimer), e no acidente vascular cerebral, o evento inicial é uma lesão não mediada pelo sistema imune do SNC (Figura 3). No entanto, células imunes, predominantemente microglia local e macrófagos, e sob certas condições linfócitos, se envolvem durante os processos degenerativos e provocam uma reação inflamatória secundária, que define o ritmo da lesão neuronal progressiva. Esta seqüência de eventos também pode ocorrer em determinados estágios da esclerose múltipla (ZIPP; AKTAS, 2006).

Figura 3: Possível seqüência de lesão inflamatória do tecido cerebral no curso da neurodegeneração em doenças degenerativas primárias do SNC.



Fonte: (Zipp, 2006)

Em um cenário de lesão ou estresse agudo, os patógenos, agregados de proteínas ou neurônios danificados ativam as células da microglia, gerando um processo inflamatório e, apropriadamente, elas assumem a morfologia dos macrófagos ativados para remover a ameaça. Nesses casos, a resposta inflamatória da microglia é autocontrolada, resolvendo-se assim que o estímulo de estresse é finalizado (KHANDELWAL; HERMAN; MOUSSA, 2011).

Por outro lado, a inflamação crônica de baixo grau no cérebro (ativação microglial crônica) pode contribuir para a patologia de doenças neurodegenerativas em curso (por exemplo, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla) (AKIYAMA *et al.*, 2014). Diversos mediadores pró-inflamatórios estão aumentados nos cérebros de pacientes com desordens neurológicas e têm sido mostrado experimentalmente em modelos animais. Estes fatores inflamatórios são responsáveis pelos danos locais e pela consequente morte neuronal (GLASS *et al.*, 2010).

A persistência de um estímulo inflamatório ou a incapacidade de resolver a inflamação sustentada pode resultar em doença, portanto, os mecanismos que combatem a inflamação são indispensáveis (KHANDELWAL; HERMAN; MOUSSA, 2011). Uma vez que a inflamação crônica de baixa intensidade pode resultar em perda de neurônios no cérebro, uma hipótese é que a prevenção ou gestão dessa inflamação precoce poderia retardar o aparecimento ou reduzir os sintomas das doenças neurodegenerativas, dentre elas às relacionadas ao envelhecimento. Uma das alternativas seria o uso de substâncias antiinflamatórias e antioxidantes na gestão dessa neuroinflamação, como determinados nutracêuticos.

1.2. Nutracêuticos

Numerosas classes de compostos encontrados em alimentos naturais ou processados têm efeitos benéficos na saúde e bem-estar humano, sendo conhecidos como nutracêuticos, como por exemplo; vitaminas, carotenóides, flavonóides, curcuminóides, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídeos, fibras alimentares, oligossacarídeos. e minerais (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; MCCLEMENTS *et al.*, 2009). O termo nutracêutico

derivou da fusão entre os termos "nutrição" e "farmacêutico", e pode ser definido como um alimento (ou parte de um alimento) que fornece benefícios médicos ou de saúde adicionais, incluindo a prevenção e / ou tratamento de uma doença (BROWER, 1998).

No entanto, os potenciais benefícios de muitos destes nutracêuticos não são idealmente realizados por causa de sua biodisponibilidade oral relativamente baixa e / ou variável (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; PATEL; VELIKOV, 2011; REIN et al., 2013). A baixa biodisponibilidade de nutracêuticos pode ser o resultado de vários processos físico-químicos e / ou fisiológicos: liberação restrita da matriz alimentar (MOELANTS et al., 2012), baixa solubilidade em fluidos gastrintestinais (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007; POUTON; PORTER, 2008), formação de complexos insolúveis com outros componentes no trato gastrointestinal (RIMBACH et al., 2008), baixa permeabilidade através da camada de muco ou células do epitélio (ACTIS-GORETTA et al., 2013; FLEISHER et al., 1999; MARTINEZ; AMIDON, 2002) e / ou transformações moleculares no trato gastrointestinal (D'AMBROSIO; CLUGSTON; BLANER, 2011; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; HURST et al., 2007).

Ocorre que a biodisponibilidade de muitos componentes bioativos depende da natureza da matriz alimentar associada a eles. Tanto a composição como a estrutura de uma matriz alimentar podem influenciar a biodisponibilidade desses nutracêuticos (AARAK et al., 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013a, 2013b). A dependência da biodisponibilidade oral nas propriedades da matriz alimentar significa que os alimentos podem ser especificamente projetados para melhorar a atividade biológica nutracêutica (MCCLEMENTS, 2013; MCCLEMENTS; XIAO, 2014). Por exemplo, alimentos funcionais ou alimentos de excipiente podem ser projetados para aumentar a biodisponibilidade oral de nutracêuticos presentes dentro deles ou correlacionados com eles (MCCLEMENTS; XIAO, 2014).

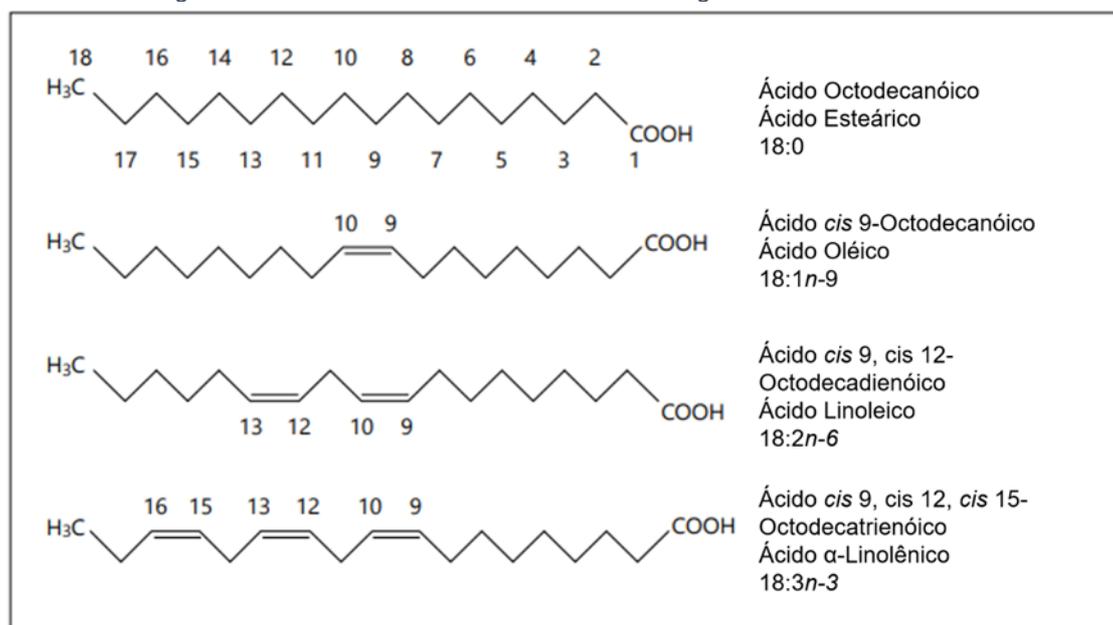
Nesse contexto foi utilizado nesse estudo um leite desnatado do tipo UHT (*Ultra High Temperature*), sem lactose, acrescido de uma mistura de óleos (canola, peixe e girassol), fornecendo assim ômega 3 (ω -3), ômega 6 (ω -6) e ômega 9 (ω -9) como Nutracêuticos (CAVALCANTE, 2014).

1.3. Ácidos graxos

Os lipídios são um grupo heterogêneo de moléculas que compartilham as propriedades comuns de serem predominantemente hidrofóbicos e solúveis em solventes orgânicos. Essas moléculas são formadas por cadeias de hidrocarbonetos de vários comprimentos e graus de insaturação (a presença de ligações duplas), com um grupo carboxila em uma extremidade e um grupo metila na outra. Os carbonos são normalmente numerados do grupo carboxila para o grupo metilo (ω ou n) (GURR, FRAYN, HARWOOD, 2002).

As espécies de ácidos graxos são classificadas por seus diferentes graus de saturação em três classes principais: ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Os SFA são formados por uma cadeia de carbono com ligações simples que, portanto, não contém ligações duplas. Já os MUFA contêm uma ligação dupla e os PUFA apresentam cadeias de carbono contendo duas ou mais ligações duplas (Figura 4). As diferenças na posição das duplas ligações e na estrutura química dessas diferentes classes podem levar a diferentes efeitos fisiológicos (DIMOPOULOS et al., 2006; SIRIWARDHANA et al., 2012).

Figura 4: Estrutura e nomenclatura de ácidos graxos de 18 carbonos.



Fonte: (Burdge, 2015)

1.3.1. Biossíntese dos ácidos graxos monoinsaturados e suas funções metabólicas

Os mamíferos são capazes de sintetizar os MUFA ω -9. A dessaturação desses ácidos graxos ocorre principalmente no retículo endoplasmático por enzimas dessaturases, sendo o ácido oléico (AcO) um dos MUFA mais representativos (BURDGE; CALDER, 2015). Durante o desenvolvimento, a regulação positiva da enzima estearil-coenzima A dessaturase-I, responsável pela síntese de AcO no SNC, demonstrou aumentar as concentrações de proteína básica de mielina (BREUER et al., 2004), sugerindo um papel central para este ácido graxo na função neuronal.

Os MUFA também conferem proteção contra a peroxidação lipídica, mas de maneira diferente dos PUFA. O uso de formulações ricas em lipídios na forma monoinsaturada, comparado ao uso de polinsaturados culminou com menor resposta inflamatória e menor produção de radicais livres com a fórmula rica em monoinsaturados (CURI et al., 2002). Foi observado que as membranas celulares que são ricas em MUFA são menos susceptíveis à peroxidação por radicais livres do que as membranas ricas em PUFA, possivelmente pelo menor número de duplas ligações presentes nos MUFA, conferindo menor probabilidade de ataque pelas espécies reativas de oxigênio (MELO et al., 2014).

A ingestão dietética enriquecida de MUFA ω -9 foi associada à redução da raiva e irritabilidade (KIEN et al., 2013). Além disso, a adesão a uma dieta mediterrânea rica em AcO demonstrou reduzir a dor em pacientes com artrite inflamatória (BERBERT et al., 2005; SALES; OLIVIERO; SPINELLA, 2013). O AcO também melhorou a dor orofacial em um modelo animal experimental (VAHIDY et al., 2006). Cappa e colaboradores (2012) mostraram que a ingestão de uma mistura de ácidos graxos incluindo AcO melhorou os potenciais evocados somatossensitivos em portadoras de adrenoleucodistrofia ligada ao X (doença desmielinizante hereditária rara) (CAPPA et al., 2012).

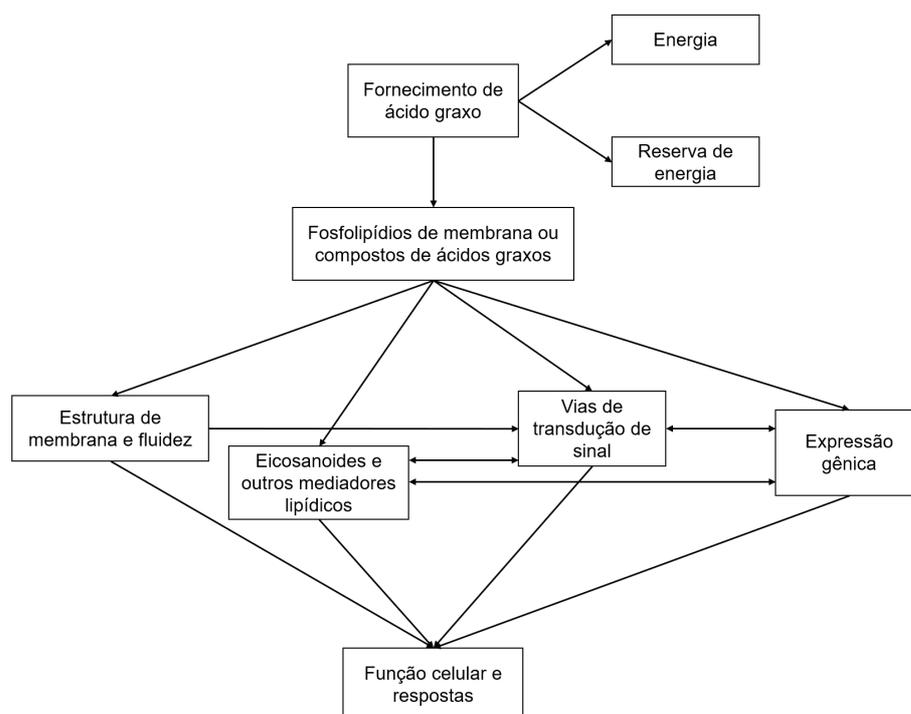
Além disso, o ácido eicosatrienóico, um metabólito do AcO, é um potente inibidor da síntese do leucotrieno B₄ (JAMES, 2004), que por sua vez é conhecido por mediar a sensibilização central a estímulos nocivos (TRANG et al., 2004) e modular a nocicepção mecânica e térmica (MARTIN et al., 2017).

1.3.2. Biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados e suas funções metabólicas

Para a biossíntese de PUFA são necessárias enzimas dessaturases, que introduzem ligações duplas às cadeias de ácidos graxos. Os tecidos vegetais e animais apresentam diferenças importantes na especificidade dessas enzimas. Os mamíferos, por exemplo, carecem de dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, responsáveis pela síntese dos ácidos linoleico e α -linolênico (BURDGE; CALDER, 2015). Uma vez que estes ácidos graxos são requeridos pelas células, e não são produzidos pelo organismo, são denominados ácidos graxos essenciais e devem ser então consumidos na dieta.

Em um nível celular, os ácidos graxos não são importantes apenas na sua estrutura, como o principal componente dos fosfolipídeos, ou como fonte energética, esses lipídeos também têm uma função importante em vários processos metabólicos, como ligação a receptores, neurotransmissão, transdução de sinal e a síntese de metabólitos ativos (eicosanoides), os quais regulam a inflamação, o estresse oxidativo e as respostas imunológicas, dentre outros processos (Figura 5) (BURDGE; CALDER, 2015; PAWEŁCZYK et al., 2015).

Figura 5: Resumo dos papéis dos ácidos graxos na função celular.



Fonte: (Burdge, 2015)

As famílias de PUFA ω -3 e ω -6 utilizam o mesmo sistema enzimático de dessaturases, ocorrendo uma competição por cada enzima (DYERBERG, 1986). Esta competição altera todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os eicosanóides oriundos do metabolismo dos PUFA ω -6 são mediadores pró-inflamatórios, enquanto os oriundos do metabolismo dos PUFA ω -3 são antiinflamatórios (BURDGE; CALDER, 2015).

Os ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) são principais PUFA ω -3, sendo encontrados em peixes gordurosos e certas plantas (BOUSQUET; CALON; CICCHETTI, 2011; HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009). Esses PUFA detêm um relevante papel no SNC, sendo necessários para o desenvolvimento normal desse sistema, e sua deficiência pode tanto prejudicar as funções cerebrais como alterar o desenvolvimento do cérebro (ECKERT; LIPKA; MULLER, 2013; SUPHIOGLU et al., 2010).

Evidências mostram o envolvimento de PUFA ω -3 em muitos processos, como a manutenção das propriedades da bicamada lipídica nas membranas celulares (LEDESMA; MARTIN; DOTTI, 2012; RUIPÉREZ; DARIOS; DAVLETOV, 2010), ação anti-apoptótica e anti-inflamatória (ELLULU et al., 2015; HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009; SUPHIOGLU et al., 2010), participação na transdução de sinal e na atividade biodinâmica de membranas neuronais (ECKERT; LIPKA; MULLER, 2013), regulação de canais iônicos e receptores (MITCHELL; HATCH, 2011; ORR; TRÉPANIER; BAZINET, 2013) e transcrição gênica (YAMASHIMA, 2012).

Outros trabalhos sugerem que uma ingestão dietética adequada de PUFAs ω -3 pode prevenir o declínio cognitivo e atenuar os distúrbios fisiológicos do cérebro que estão associados com o envelhecimento, incluindo desordens neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (BOUSQUET; CALON; CICCHETTI, 2011; CARDOSO et al., 2014; DENIS et al., 2013; FOTUHI; MOHASSEL; YAFFE, 2009; WANG et al., 2015). Michael-Titus e Priestley mostraram que os PUFAs ω -3 apresentaram um potencial terapêutico em neurotrauma, onde a administração aguda de ω -3 após a lesão ou sua inclusão alimentar melhorou diversos resultados neurológicos. Os mecanismos envolvidos incluíram diminuição da neuroinflamação e do estresse oxidativo,

suporte neurotrófico e ativação de vias de sobrevivência celular (MICHAEL-TITUS; PRIESTLEY, 2014).

Com relação aos PUFA ω -6, o Ácido Araquidônico (AA) medeia a pró-inflamação e através da biossíntese de eicosanoides por enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). Derivados de AA incluem os leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas, moléculas que levam à inflamação, produção de radicais livres, vasoconstrição e agregação plaquetária e deterioração neurológica (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2007). Em contraste, outros derivados do AA, como as lipoxinas, desempenham um papel benéfico no sistema nervoso. Especificamente a Lipoxin A4 (LXA4) através da ativação de seu receptor ALXR em mastócitos, reduz danos cerebrais após uma lesão cerebral traumática e diminui a liberação de citocinas pró inflamatórias, incluindo o $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ (LUO et al., 2013).

No presente estudo o mix de óleos adicionado ao leite forneceu ω -3, ω -6 e ω -9 nas proporções ω -6: ω -3 de 1,4:1,0 e ω -9: ω -6 de 3,7:1,0, conferindo assim propriedade anti-inflamatória e antioxidante, respectivamente (CAVALCANTE, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento da expectativa de vida quando combinado com as quedas acentuadas nas taxas de fertilidade, levam ao rápido envelhecimento das populações em todo o mundo. Contudo, a progressão da longevidade depende de um fator crucial: saúde. A maioria dos problemas de saúde enfrentados por pessoas mais velhas são associados a condições crônicas, principalmente doenças não transmissíveis, incluindo as afecções neurodegenerativas que podem ocorrer durante o envelhecimento. Muitas dessas doenças podem ser prevenidas ou retardadas pela exposição a comportamentos saudáveis. Já outros problemas de saúde podem ser controlados de maneira eficaz, principalmente se forem detectados cedo o suficiente. O envelhecimento da população, portanto, demanda uma resposta abrangente da saúde. Nesse contexto a alimentação adequada é um dos pilares fundamentais para o estabelecimento e manutenção do organismo saudável.

É sabido que a ingestão adequada de ácidos graxos é fundamental tanto para o desenvolvimento normal como para a manutenção das funções metabólicas. Vários ácidos graxos parecem desempenhar papéis diretos na sinalização celular, influenciando assim a expressão gênica, e vários desses ácidos graxos servem como substratos para a biossíntese de mediadores lipídicos biologicamente ativos, incluindo prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e resolvinas. Através destas muitas ações, a mistura de lipídios complexos e seus ácidos graxos constituintes no ambiente de células e tecidos modifica a capacidade de resposta e funcionalidade dessas células e tecidos. Este fenômeno é bem descrito para respostas metabólicas e para função inflamatória, imunológica, plaquetária, cardíaca e neurológica. Portanto, a modificação do ambiente lipídico pode levar a alterações das respostas metabólicas e da função celular e tecidual, abrindo caminho para que tais modificações do ambiente lipídico sejam utilizadas para fins terapêuticos.

As diferentes misturas de óleos disponíveis para consumo humano ou suplementação apresentam uma grande variedade de composições de ácidos graxos, variando grandemente nas proporções de ácidos graxos saturados de

cadeia média, saturados de cadeia longa, monoinsaturados, poliinsaturados n-6 e poliinsaturados n-3.

Dado que estas diferentes classes de ácidos graxos têm papéis e funções biológicas diferentes, é provável que uma mistura lipídica de ω 3, 6 e 9, com proporção entre os óleos que garanta característica anti-inflamatória e antioxidante à mistura, possa ter efeitos benéficos sobre a função celular e tecidual, podendo influenciar de forma positiva o metabolismo e, conseqüentemente, a promoção da saúde do organismo.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor dos óleos ômega 3, ômega 6 e ômega 9, durante o envelhecimento de camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito do envelhecimento e da suplementação dos óleos sobre a memória declarativa e de trabalho dos camundongos, por meio dos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y, respectivamente.
2. Estudar o efeito do envelhecimento e da suplementação dos óleos sobre o comportamento tipo depressão nos camundongos, pelos testes do nado forçado e pela preferência por sacarose.
3. Estudar o efeito do envelhecimento e da suplementação dos óleos sobre a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos camundongos pelo teste do campo aberto.
4. Verificar o efeito do envelhecimento e da suplementação dos óleos sobre os parâmetros oxidativos no cérebro dos camundongos, por meio da análise dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de glutatona reduzida (GSH) e da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em áreas do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado.

4. MÉTODO

4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi de caráter experimental, com uso de animais vivos e controle intra-indivíduo, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal no. 6.638, de 08 de maio de 1979.

O modelo do estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo sido aprovado pelo protocolo de número 63/2013 em 26 de setembro de 2013.

Foram utilizados animais de laboratório advindos do Biotério do Departamento de Cirurgia, Seção de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pertencente à UFC. Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As condições, desde o alojamento até o bem-estar geral dos animais, foram controladas pela direção do Biotério e os procedimentos se basearam nos princípios das 3R's (Replacement, Redution and Refinement).

4.2. Animais

Foram utilizados 72 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) procedentes do Biotério Central da UFC, mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) da universidade.

Os camundongos selecionados para o experimento tinham entre 19 e 21 dias de nascido e peso entre 15 e 20g, aptos para o desmame. Os animais foram randomicamente alojados em número de 6 por gaiola de policarbonato padrão (42 x 20,5 x 20 cm) e mantidos nas condições ambientais ($23 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade de $60 \pm 5\%$), com ciclos de dia (12 horas) e noite (12 horas).

4.3. Nutracêutico

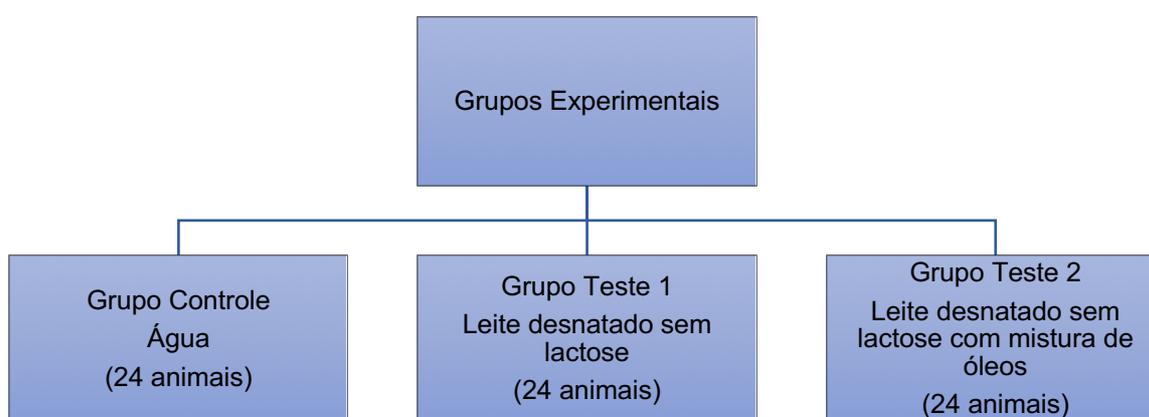
Mistura de óleos de canola, de peixe e de girassol, fornecendo ômega 3, 6 e 9, nas proporções ω -6: ω -3 de 1,4:1,0 e ω -9: ω -6 de 3,7:1,0. O mix de óleos foi adicionado a leite desnatado, do tipo *Ultra High Temperature* (UHT), sem lactose, perfazendo uma concentração de 3%. As fontes de ω -3 forneceram 35%

de ácido α -linolênico (ALA), 39% de ácido eicosapentaenoico (EPA) e 26% de ácido docosahexaenóico (DHA) (CAVALCANTE, 2014).

4.4. Delineamento Experimental

Animais com idade entre 19 e 21 dias de nascido (tempo de desmame) foram distribuídos igualmente em 3 grupos: grupo controle (Água), grupo teste 1 (Leite desnatado sem lactose) e grupo teste 2 (Leite desnatado sem lactose com a mistura de óleos) (figura 6).

Figura 6: Grupos Experimentais.



4.4.1. Fluxograma Experimental

Os 72 camundongos foram distribuídos igualmente em número e de forma randômica em 12 gaiolas (6 animais por gaiola), contendo água filtrada e ração padrão (NUVILAB CR1-Nuvital®) ad libitum. Após um período de adaptação de 7 dias, as gaiolas foram identificadas em três grupos: grupo controle (GC), grupo teste 1 (GT1) e grupo teste 2 (GT2), sendo 4 gaiolas por grupo, perfazendo um total de 24 camundongos em cada grupo (Figura 7).

Todos os animais continuaram recebendo ração padrão ad libitum, como alimentação sólida. Como oferta hídrica *ad libitum*, os animais do grupo GC continuaram recebendo água filtrada, os animais do grupo GT1 passaram a receber leite desnatado sem lactose UHT, e os animais do grupo GT2 passaram a receber leite desnatado sem lactose UHT enriquecido com a mistura de óleos a 3% de ω -3, ω -6 e ω -9.

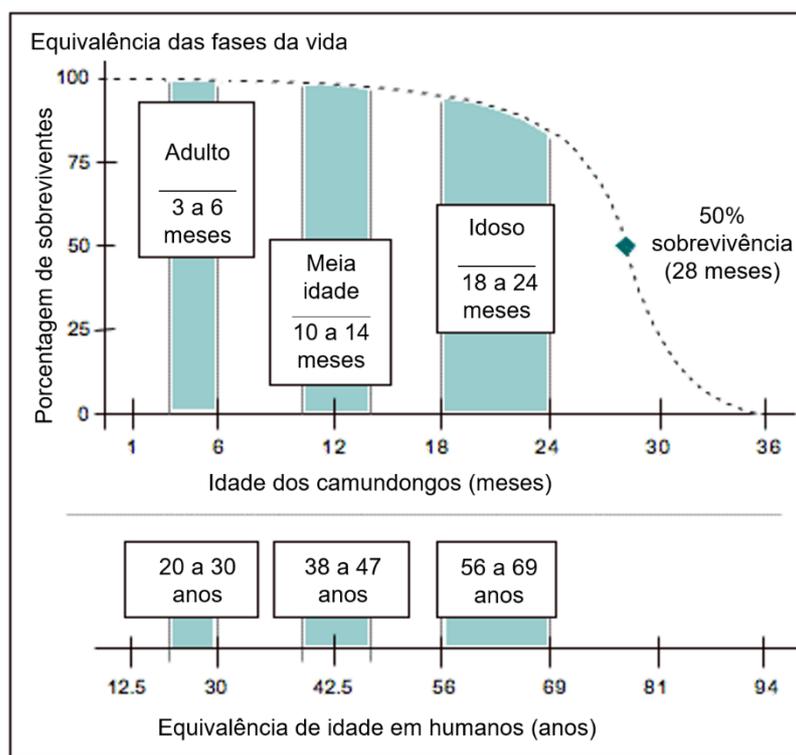
Os leites dos grupos GT1 e GT2 foram processados em planta UHT pela Companhia Brasileira de Laticínios e acondicionados em embalagens Tetra Pak de 200ml. Para o leite GT2, a adição da emulsão lipídica ao leite deu-se na mesma empresa onde o produto foi processado, devido à tecnologia necessária empregada, e a seguir foi submetido ao processo UHT. As caixas de leite foram acondicionadas sob refrigeração no laboratório.

Todos os líquidos foram ofertados em bebedouro. O leite foi utilizado como veículo de administração da mistura de óleos, uma vez que possui características hidro e lipofílicas, sendo possível a dissolução total dos lipídeos. Outro método de administração dos óleos seria por gavagem diária, contudo, optou-se por minimizar todas as formas de estresse aos animais, uma vez que o experimento teria longa duração. O leite acrescido ou não da mistura de ômega possuía adequada palatabilidade o que ensejou aderência necessária à sua ingestão.

A cada 12 horas todos os bebedouros eram trocados. As caixas de leites eram abertas e imediatamente todo o seu conteúdo (200ml) dispensado nos bebedouros esterilizados. Após término do ciclo de 12 horas, os líquidos residuais eram descartados, e os bebedouros enviados para autoclavagem. Para o grupo GC, o mesmo procedimento de troca era realizado, contudo, utilizando-se água potável como líquido (200 ml). Todos os animais receberam ração padrão *ad libitum*.

Após 280 dias (T1) e, a seguir, 400 dias (T2) do início do tratamento, 12 animais (2 gaiolas) de cada grupo foram selecionados para realização dos testes. Os tempos de 280 dias e 400 dias foram utilizados uma vez que, somados à idade do animal no início do experimento, correspondem ao tempo de vida de 10 e 14 meses de idade, respectivamente. Este período corresponde à meia-idade nos camundongos, correlacionando-se ao período de 38 a 47 anos em humanos (Figura 7).

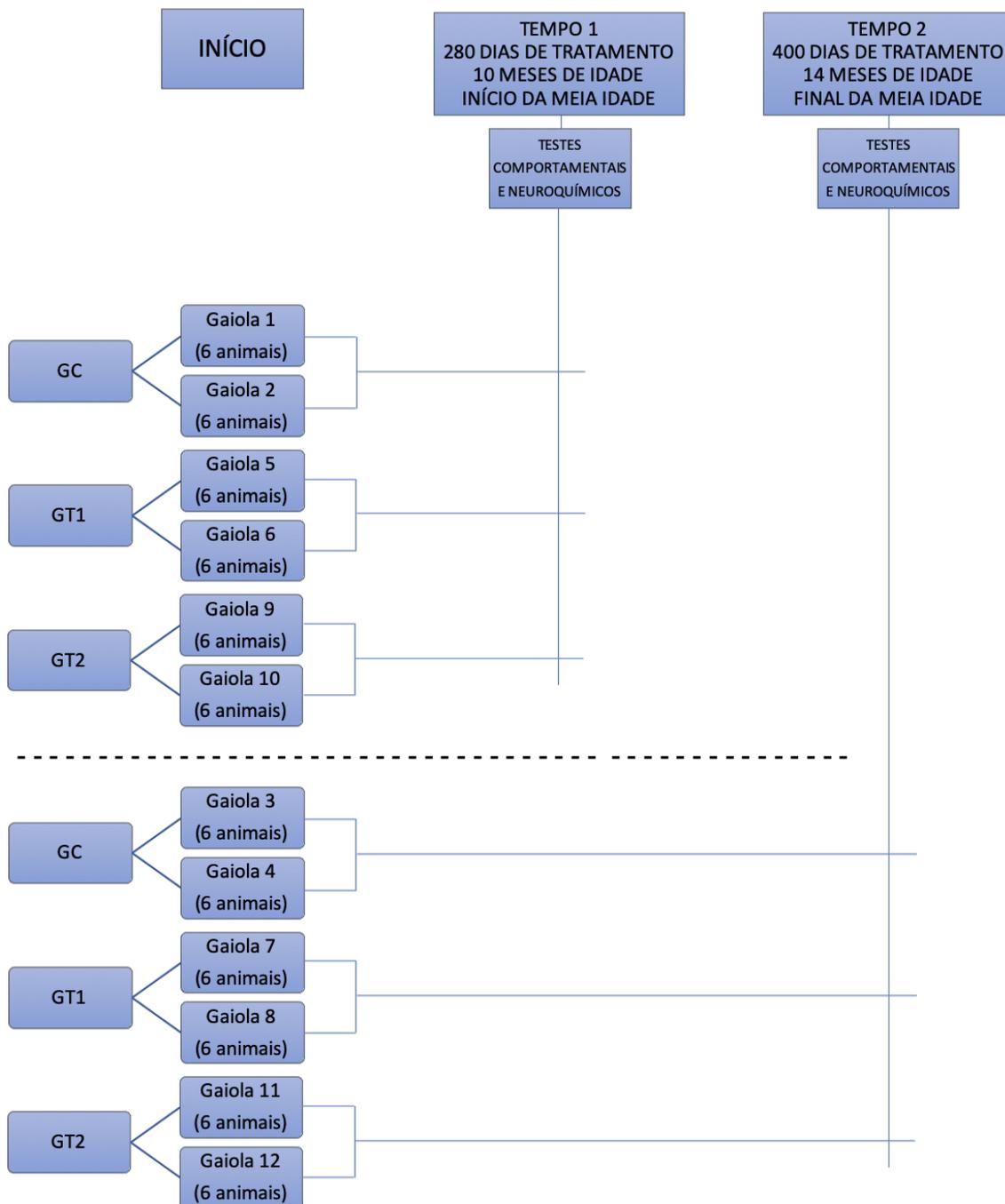
Figura 7: Estágios da vida de camundongos em comparação com seres humanos.



Fonte: Adaptado da Figura 20-3: Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. 2007. *The Mouse in Aging Research*. In *The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition*. Fox JG, et al, editors. American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier), Burlington, MA. pp. 637–672).

Nos referidos tempos de 280 e 400 dias foram realizados testes comportamentais e posterior sacrifício dos animais para realização dos testes bioquímicos (Figura 8).

Figura 8: Desenho do estudo.

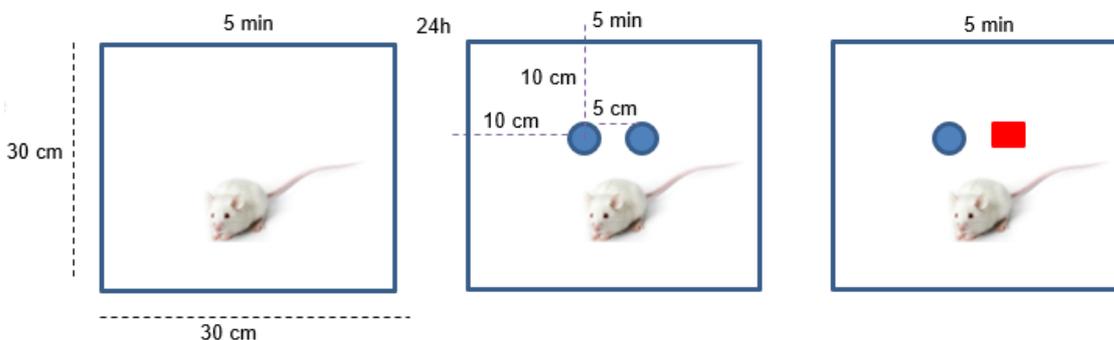


4.4.2. Testes Comportamentais

4.4.2.1. Reconhecimento de Objetos

Esse teste é utilizado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos e objetos já conhecidos, como forma de avaliar a memória declarativa dependente do hipocampo (LUEPTOW, 2017). Antes do experimento, para a habituação, o animal foi colocado na caixa e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto (Figura 9). A seguir foi devolvido à sua gaiola. Após 24 horas, na sessão de teste, o animal foi colocado na caixa, onde estavam dois objetos exatamente iguais (peças de brinquedo Lego), paralelos, espaçados a 5 cm entre si e a 10 cm das paredes laterais, sendo deixados por 5 minutos para a exploração do ambiente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado para análise posterior. A seguir, foi testada a memória de curta duração, onde foi retirada uma das peças e substituída por outra de formato diferente. Novamente foram cronometrados o tempo de exploração do novo objeto e o tempo de exploração do objeto antigo. Para a análise dos resultados foi utilizado o índice de reconhecimento que é calculado pela fórmula: $TB1 - TA1 / TE$, onde TA1 é o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto antigo, TB1 é o tempo gasto para explorar o objeto novo, e TE é o tempo da exploração total, calculado pela somatória do tempo de exploração do animal no objeto antigo e novo. Antes de colocar o animal no aparato, a arena foi limpa com solução de água-etanol 5% para eliminar o possível viés devido ao odor que poderia ser deixado pelos animais anteriores.

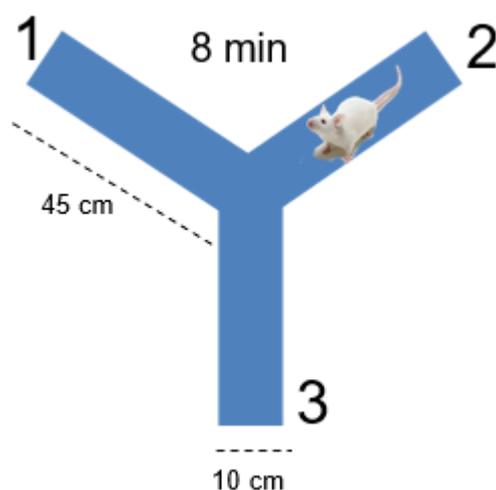
Figura 9: Representação gráfica do teste de reconhecimento de objetos.



4.4.2.2. Labirinto em Y (Y-maze)

Este teste foi utilizado para avaliar a memória de trabalho espacial, ou seja, o comportamento cognitivo exploratório, através da percepção de uma performance de alternância espontânea (MAURICE; LOCKHART; PRIVAT, 1996). Este teste comportamental mede a disposição dos roedores em explorar novos ambientes. O aparato utilizado no teste consta de um labirinto de acrílico, construído em formato de Y, com 3 braços idênticos de 45,0 cm de comprimento, 35,0 cm de altura e 10, cm de largura cada convergindo a um ângulo igual de 120° (Figura 10). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2; exemplo de alternância incorreta: 1,2,1 ou 3,1,3). O número máximo de alternâncias foi o total de número de entradas nos braços menos dois ($n - 2$) e a porcentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre: (número de alternâncias corretas/ número máximo de alternâncias) x 100 (DALL'IGNA et al., 2007). Antes de colocar o animal no aparato, a arena foi limpa com solução de água-etanol 5% para eliminar o possível viés devido ao odor que poderia ser deixado pelos animais anteriores.

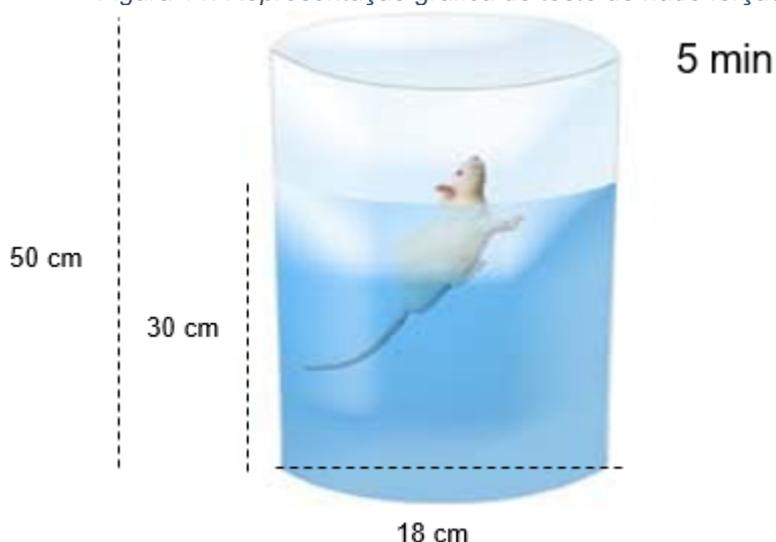
Figura 10: Representação gráfica do teste labirinto em Y.



4.4.2.3. Nado Forçado

Nesse teste os animais foram submetidos a uma sessão de nado forçado, com duração de 5 minutos. Para isso, eles foram colocados individualmente em cilindros de acrílico (50 cm de altura, 18 cm de diâmetro) contendo 30 centímetros de profundidade de água à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) (Figura 11). A altura da coluna de água foi para garantir que nenhum camundongo atingisse o fundo do recipiente com as patas ou a cauda. Após um período de habituação de 1 minuto, o tempo de imobilidade dos animais, em segundos, foi contado durante 5 minutos de teste. A imobilidade foi definida como o animal flutuando na água sem lutar e fazendo apenas movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água, com ausência de comportamento de escape direcionado, como nadar, saltar, levantar, cheirar ou mergulhar. Um aumento na duração da imobilidade é um indicativo de comportamento tipo depressão ou de depressão associada a sintomas negativos tipo esquizofrenia (NODA et al., 1995). Qualquer animal que mostrou ter problemas em manter a cabeça fora da água foi removido do cilindro e excluído da análise. Neste estudo, dois avaliadores experientes, cegos para o grupo de tratamento, avaliaram independentemente o comportamento dos animais. Terminada a sessão, os camundongos eram secos com uma toalha e imediatamente levados de volta para suas gaiolas.

Figura 11: Representação gráfica do teste do nado forçado.

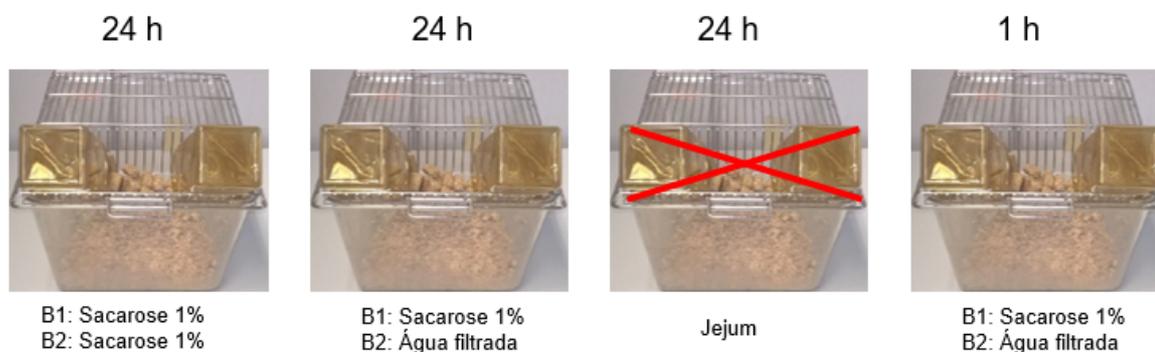


4.4.2.4. Preferência por Sacarose

Este teste avalia a diminuição da capacidade de sentir prazer sendo usado como um indicador de anedonia (MAO et al., 2014), que representa um dos principais sintomas da depressão. Resumidamente, 72 horas antes do teste, os animais receberam, através de dois bebedouros, uma solução de sacarose a 1% (p/v) (Figura 12). 24 h depois, um dos frascos foi substituído por um bebedouro com água filtrada. Após 24 horas, os camundongos foram privados de comida e água por mais 24 horas. Após esse período, os animais foram alojados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso a dois frascos contendo: um 100 ml de solução de sacarose 1% (p/v) e outro 100 ml de água filtrada. Após 1 h, os volumes de solução de sacarose e água consumida foram registrados e, a seguir, o consumo de sacarose foi calculado pela seguinte fórmula e registrado em porcentagem:

Preferência de sacarose = (consumo de sacarose 100%) / (consumo de sacarose + consumo de água).

Figura 12: Representação gráfica do teste preferência por sacarose.

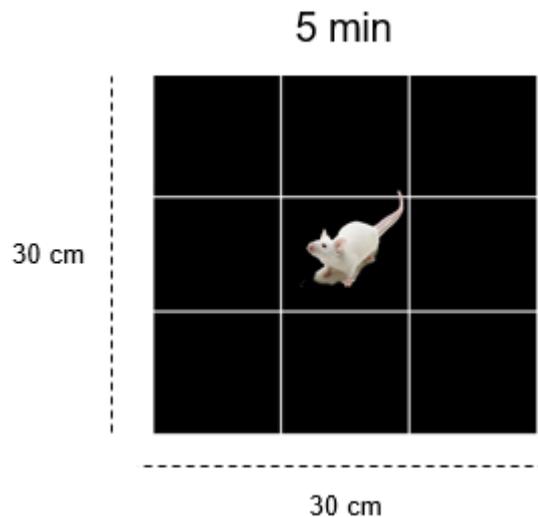


4.4.2.5. Campo Aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar o efeito de drogas sobre a atividade locomotora e exploratória do animal (ARCHER, 1973). Esse teste sobre o comportamento exploratório também é de grande relevância por permitirem medir a emocionalidade dos animais (HALL, 1941). O aparato utilizado nesse teste era feito de uma caixa de acrílico (30 x 30 x 15 cm), com paredes transparentes e piso pintado com tinta de cor preta fosca (Figura 13). O chão da caixa foi dividido por duas linhas verticais e duas linhas horizontais,

igualmente espaçadas, pintadas em tinta de cor branca, demarcando assim o espaço de 9 quadrados de áreas iguais. Os animais foram colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 minuto (período de habituação), seguidos de mais 5 minutos (período do teste). Os seguintes parâmetros foram observados: o número de entradas na zona central, o tempo total de permanência na zona central em segundos (comportamento ansioso), o número de cruzamentos entre as linhas (locomoção espontânea), o número de levantamento de patas e o tempo total de levantamento de patas em segundos (comportamento exploratório). Antes de colocar o animal no aparato, a arena foi limpa com solução de água-etanol 5% para eliminar o possível viés devido ao odor que poderia ser deixado pelos animais anteriores.

Figura 13: Representação gráfica do teste campo aberto.



4.4.3. Testes Bioquímicos

4.4.3.1. Áreas Cerebrais

No presente experimento foram analisadas as áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Após a realização dos testes comportamentais foi realizado o sacrifício dos animais. O sacrifício foi realizado por decapitação em guilhotina. Não foi utilizada droga sedativa ou anestésica com efeito em sistema nervoso central, pois poderia acrescentar viés importante nos resultados, uma vez que o experimento visou estudar o tecido nervoso dos

animais. Após o sacrifício, o cérebro foi imediatamente removido e dissecado sobre placa de Petri forrada por papel alumínio e mantida sobre gelo, sendo colhidas amostras dos tecidos cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. As amostras foram acondicionadas em microtubos e identificados. A seguir, os mesmos foram mantidos em freezer a -70°C até o dia dos ensaios.

4.4.3.2. Peroxidação Lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: thiobarbituric acid reactive substances -TBARS) nos homogenatos como uma medida de produção de espécies reativas de oxigênio (DRAPER et al., 1993). Para isso, o teor de malondialdeído (MDA) é calculado no tecido. As amostras foram homogenizadas com tampão de fosfato de potássio monobásico (pH 7,4). 63 μL do homogenato foi misturado a 100 μL de ácido perclórico 35% e centrifugado a 7000 rpm por 15 min. A seguir, 150 μL do sobrenadante foi retirado e misturado com 50 μL de ácido tiobarbitúrico a 1,2% e, em seguida, aquecido em banho de água fervente por 30 minutos. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorbância a 535 nm e foi expressa como μmol de malonaldeído (MDA) / mg de proteína (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.4.3.3. Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB) com grupos tiol livres (SEDLAK JOZEF AND LINDSAY RAYMOND, 1968). As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% p / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido. As amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como μg de GSH/mg de proteína.

4.4.3.4. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima altamente oxidativa. A atividade extracelular dessa enzima fornece uma estimativa do estresse oxidativo em condições inflamatórias (PULLI et al., 2013). Para essa análise, os homogenizados foram feitos usando uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 (1 mL / 50 mg de tecido) e centrifugado a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. Tampão fosfato (50 mM, pH 6) contendo 0,167mg / ml de dicloridrato de 9-dianisidina e peróxido de hidrogênio 0,0005% foram adicionados a 30 µl do sobrenadante. A absorbância foi determinada a 450 nm em dois tempos, 0 e 3 min, para estimar a atividade de MPO (U MPO / min / mg de tecido).

4.4.4. Análise Estatística

Utilizou-se o Excel para digitação dos dados e o software SPSS versão 24 para confecção das tabelas a gráficos, bem como produzir as análises dos dados. Para resumir os dados usou-se a média acrescido de seu intervalo de 95% de confiança. Os resumos dos dados estão dispostos em tabelas e em gráficos, que facilita a visualização das comparações. O gráfico apresenta todas as combinações entre as duas categorias do tempo e as três categorias do grupo, totalizando seis barras. Aplicou-se a metodologia ANOVA 2-way para verificação dos efeitos de interação, tempo e grupo no estudo. Havendo resultados significantes nos efeitos fez-se pós teste utilizando a correção via *Bonferroni*, a fim de comparar quais médias diferem entre si. Adotou-se 5% como nível de significância no estudo, ou seja, quando p-valor for menor que 0,05 há evidências de diferenças estatisticamente significantes, caso contrário não há evidências.

5. RESULTADOS

5.1. Reconhecimento de Objetos (NOR)

A análise ANOVA não detectou efeito significativo neste teste, interação ($p=0,211$), tempo ($p=0,129$) e grupo ($p=0,534$) (Tabela 1). Houve, portanto, o mesmo desempenho no índice de reconhecimento dos grupos teste em comparação ao controle, em ambos os períodos estudados (Figura 14).

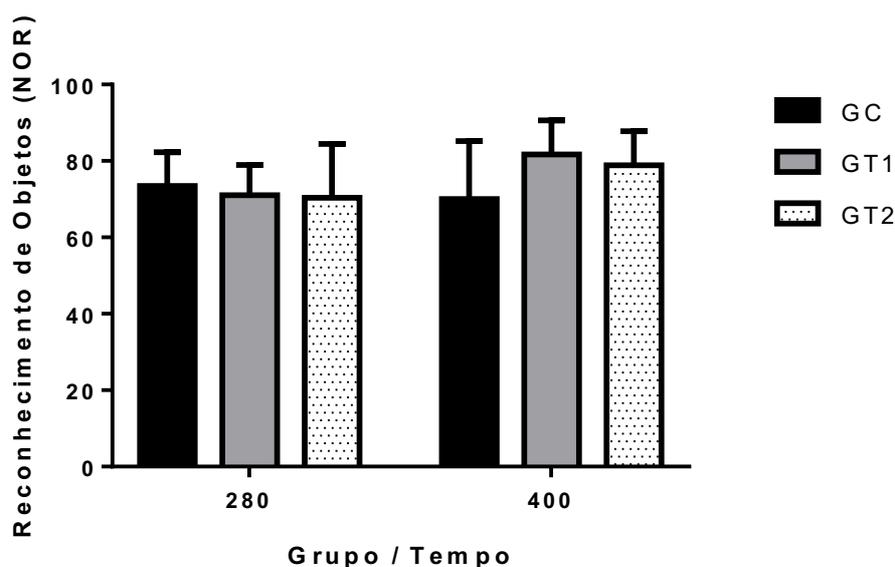
Tabela 1: Tabela: Média e IC de 95% da medida NOR, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	73,44 (64,62 - 82,27)	70,02 (54,87 - 85,17)	71,89 (65,23 - 78,54)
GT1	71,07 (63,20 - 78,93)	81,73 (72,85 - 90,60)	76,40 (70,40 - 82,39)
GT2	70,38 (56,30 - 84,46)	78,88 (69,99 - 87,78)	74,63 (67,27 - 81,99)
Média intergrupos	71,63 (66,86 - 76,40)	77,28 (71,97 - 82,60)	-

p -valor: Interação = 0,211; Tempo = 0,129; Grupo = 0,534

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 14: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: Dados da pesquisa

5.2. Labirinto em Y (Y-maze)

A análise ANOVA não detectou significância nesse teste para efeito de interação ($p=0,153$) e grupo ($p=0,058$). Contudo, parece que há evidência de efeito entre os dois tempos estudados ($p=0,003$), mostrando que houve diminuição significativa da média das porcentagens de alterações corretas no tempo 400 [57,99 (51,79 - 64,19)] em relação ao 280 [67,10 (63,37 - 70,83)] (Tabela 2) (Figura 15).

Tabela 2: Média e IC de 95% da medida Y-maze, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

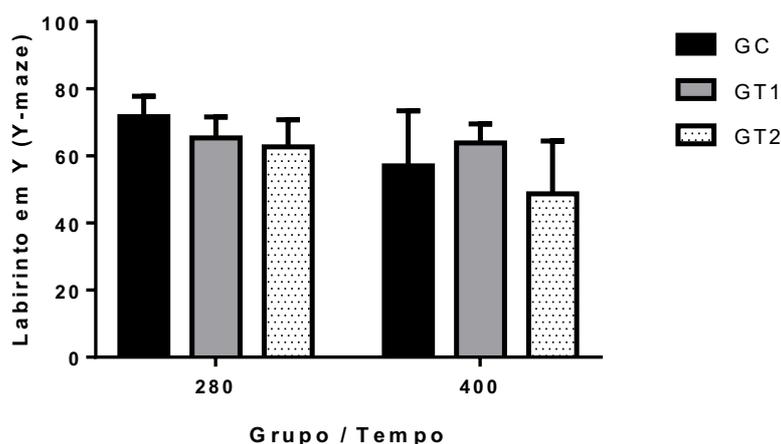
Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	71,71 (65,62 - 77,80)	57,08 (40,71 - 73,45)	66,32 (59,28 - 73,36)
GT1	65,34 (59,02 - 71,66)	63,85 (58,17 - 69,54)	64,60 (60,81 - 68,39)
GT2	62,71 (54,62 - 70,79)	48,71 (32,96 - 64,46)	57,71 (50,27 - 65,15)
Média intergrupos	67,10 ^A (63,37 - 70,83)	57,99 ^B (51,79 - 64,19)	-

p -valor: Interação = 0,153; Tempo = 0,003; Grupo = 0,058

A, B: diferença significativa entre os valores encontrados

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 15: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do labirinto em Y.



Fonte: Dados da pesquisa

5.3. Nado Forçado

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,003$) (Tabela 3). Nessa conjectura, a análise pós teste evidenciou que o tempo de imobilidade do GT2, no corte 280 [113,06 (80,52 – 145,60)], foi significativamente maior que do GC [38,51 (1,39 – 75,63)] ($p=0,004$). Mostrou-se também que relacionando o mesmo grupo nos dois cortes de tempo, o GC no corte 400 [101,70 (62,30 – 141,11)] teve maior tempo médio de imobilidade que no corte 280 [38,51(1,39 – 75,63)] ($p=0,007$). Já no GT2 o tempo médio de imobilidade no corte 400 [55,30 (30,70 – 79,91)] foi menor do que no corte 280 [113,06 (80,52 – 145,60)] ($p=0,024$) (Figura 16).

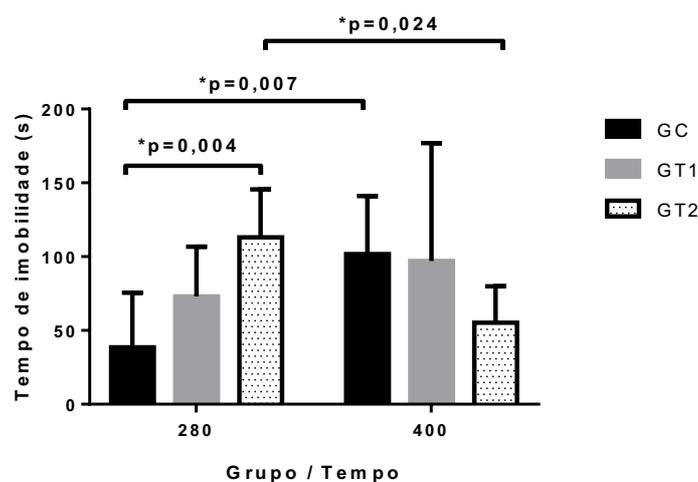
Tabela 3: Média e IC de 95% da medida tempo de imobilidade, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	38,51 (1,39 - 75,63)	101,70 (62,30 - 141,11)	68,00 (38,55 - 97,45)
GT1	73,10 (39,48 - 106,72)	97,08 (17,22 - 176,94)	82,32 (52,29 - 112,35)
GT2	113,06 (80,52 - 145,60)	55,30 (30,70 - 79,91)	90,85 (64,71 - 116,98)
Média intergrupos	74,89 (53,68 - 96,09)	86,70 (62,29 - 111,10)	-

p -valor: Interação = 0,003; Tempo = 0,481; Grupo = 0,592

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 16: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do nado forçado.



IC 95% Tempo de imobilidade em segundos. Código de significância: * $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

5.4. Preferência por Sacarose

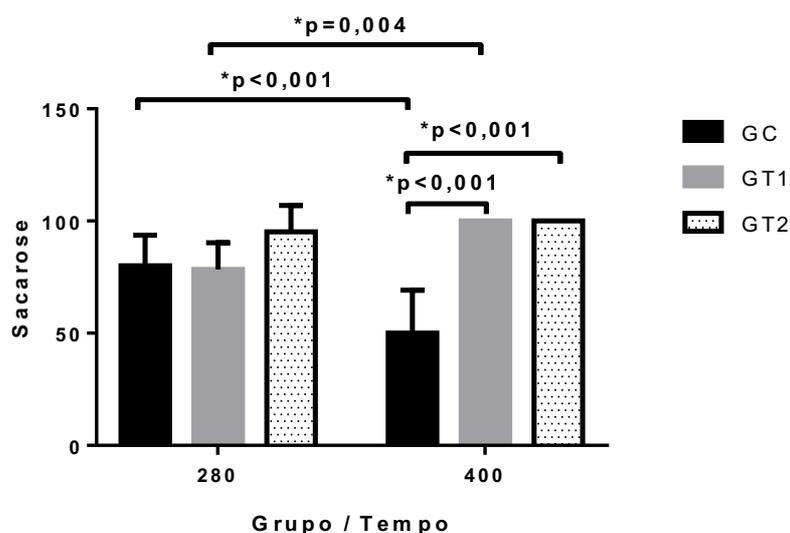
A análise ANOVA mostrou que, nesse teste de avaliação de comportamento sugestivo de anedonia, houve diferença estatística significativa para efeito de interação ($p=0,001$) (Tabela 4). Assim, nas comparações pós teste para diferenças entre tempo e grupo, via método de Bonferroni, evidenciou-se que, no tempo 400, os animais pertencentes ao GT1 [100,00 (100,00 – 100,00)] e o GT2 [100,00 (100,00 – 100,00)] tiveram um consumo de solução de sacarose estatisticamente significativa maior que os animais do GC [50,00 (30,84 – 69,16)]. No tempo 280, observa-se um consumo da solução maior no GT2 [95,24 (83,59 – 106,89)] em relação ao GT1 [78,47 (66,67 – 90,26)], com p-valor igual 0,052, próximo à significância estatística ($p<0,05$). Relacionando o mesmo grupo nos dois cortes de tempo, mostrou-se que no GC no tempo 400 [50,00 (30,84 – 69,16)] houve menor consumo de solução de sacarose em relação ao tempo 280 [80,06 (66,41 – 93,71)] no ($p<0,001$). Já no GT1 houve um aumento significativo do consumo da solução no tempo 400 [100,00 (100,00 – 100,00)] em relação ao tempo 280 [78,47 (66,67 – 90,26)] ($p=0,004$). No GT2 não houve diferença estatística em relação ao consumo da solução nos dois tempos estudados: tempo 280 [95,24 (83,59 – 106,89)] e tempo 400 [100,00 (100,00 – 100,00)], ($p>0,05$) (Figura 17).

Tabela 4: Média e IC de 95% da medida consumo de sacarose, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	80,06 (66,41 - 93,71)	50,00 (30,84 - 69,16)	67,18 (54,14 - 80,22)
GT1	78,47 (66,67 - 90,26)	100,00 (100,00 - 100,00)	87,69 (78,95 - 96,44)
GT2	95,24 (83,59 - 106,89)	100,00 (100,00 - 100,00)	97,44 (91,85 - 103,02)
Média intergrupos	84,12 (77,31 - 90,94)	83,33 (70,31 - 96,36)	-

p-valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,761; Grupo = 0,001**
 Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste da preferência por sacarose.



IC 95% Preferência por sacarose. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.5. Campo Aberto

5.5.1. Cruzamentos

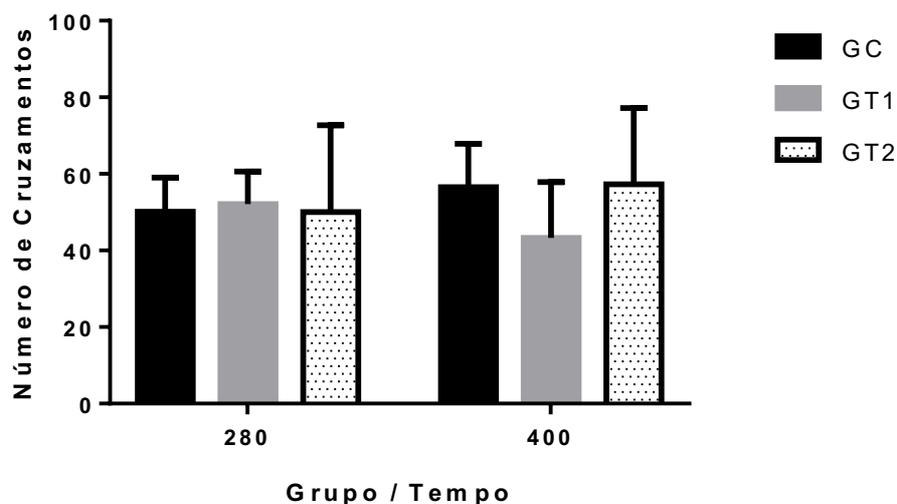
A análise ANOVA não detectou efeito significativo nesse teste, interação ($p=0,236$), tempo ($p=0,715$) e grupo ($p=0,451$), portanto não foi necessário avaliar efeitos pós teste (Tabela 5) (Figura 18). Houve, portanto, o mesmo desempenho no índice de reconhecimento dos grupos teste em comparação ao controle, em ambos os períodos estudados.

Tabela 5: Média e IC de 95% da medida cruzamentos, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	50,13 (41,24 - 59,01)	56,50 (45,14 - 67,86)	52,25 (46,04 - 58,46)
GT1	52,14 (43,69 - 60,59)	43,25 (28,59 - 57,91)	48,91 (42,34 - 55,48)
GT2	50,00 (27,31 - 72,69)	57,25 (37,28 - 77,22)	53,22 (41,30 - 65,15)
Média intergrupos	50,80 (45,28 - 56,32)	52,33 (45,23 - 59,44)	-

p -valor: Interação = 0,236; Tempo = 0,715; Grupo = 0,451
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 18: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de cruzamentos.



Fonte: Dados da pesquisa

5.5.2. Número de levantamentos de patas

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,001$) (Tabela 6). A análise pós teste evidenciou que, em relação ao tempo 400, há evidências de diminuição significativa do número de levantamentos do GT1 [11,20 (6,13 – 16,27)] em relação aos outros GC [29,50 (18,06 – 40,94)] ($p<0,001$) e GT2 [32,00 (29,52 – 34,48)] ($p<0,001$). Em relação à comparação do desempenho em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de aumento significativo do número de levantamentos no tempo 400 em relação ao tempo 280 no GC [29,50 (18,06 – 40,94)] versus [12,50 (9,78 – 15,22)] e no GT2 [32,00 (29,52 – 34,48)] versus [17,83 (12,63 – 23,03)] ($p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente) (Figura 19).

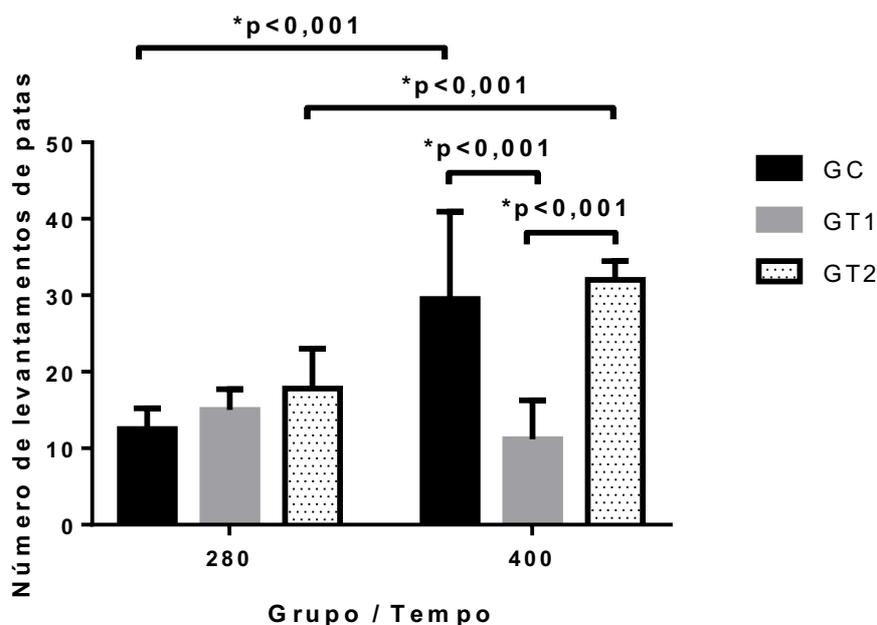
Tabela 6: Média e IC de 95% da medida número de levantamentos de patas, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	12,50 (9,78 - 15,22)	29,50 (18,06 - 40,94)	19,30 (12,22 - 26,38)
GT1	15,00 (12,28 - 17,72)	11,20 (6,13 - 16,27)	13,42 (10,99 - 15,85)
GT2	17,83 (12,63 - 23,03)	32,00 (29,52 - 34,48)	24,27 (18,71 - 29,84)
Média intergrupos	15,11 (13,16 - 17,05)	23,86 (17,66 - 30,05)	-

p -valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de levantamentos de patas.



IC 95% Número de levantamentos de patas. Código de significância: * $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

5.5.3. Tempo de levantamentos de patas

A análise ANOVA não detectou significância nesse teste para efeito de interação ($p=0,093$) e grupo ($p=0,088$), portanto não foi necessário avaliar efeitos pós teste (Tabela 7). Contudo, parece que há evidência de efeito entre os dois tempos estudados ($p=0,019$), mostrando que houve aumento significativo da

média intergrupos dos tempos de levantamento no tempo 400 em relação ao 280 (Figura 20).

Tabela 7: Média e IC de 95% da medida tempo de levantamento de patas, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

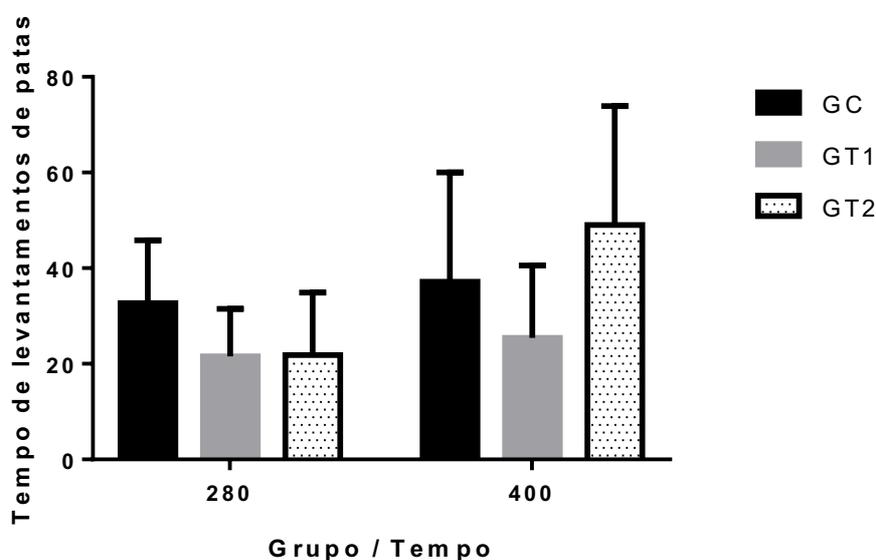
Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	32,73 (19,64 - 45,81)	37,18 (14,35 - 60,02)	34,35 (25,16 - 43,53)
GT1	21,56 (11,63 - 31,50)	25,41 (10,24 - 40,57)	23,27 (16,83 - 29,71)
GT2	21,80 (8,67 - 34,93)	49,06 (24,25 - 73,87)	33,92 (19,46 - 48,37)
Média intergrupos	26,23 ^A (19,92 - 32,54)	37,22 ^B (27,19 - 47,24)	-

p-valor: Interação = 0,093; Tempo = 0,019; Grupo = 0,088

A, B: diferença significativa entre os valores encontrados

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 20: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - tempo de levantamentos de patas.



Fonte: Dados da pesquisa

5.5.4. Número de cruzamentos no centro

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,007$) (Tabela 8). A análise pós teste evidenciou que, em relação ao tempo 280, há evidências do aumento significativo do número de

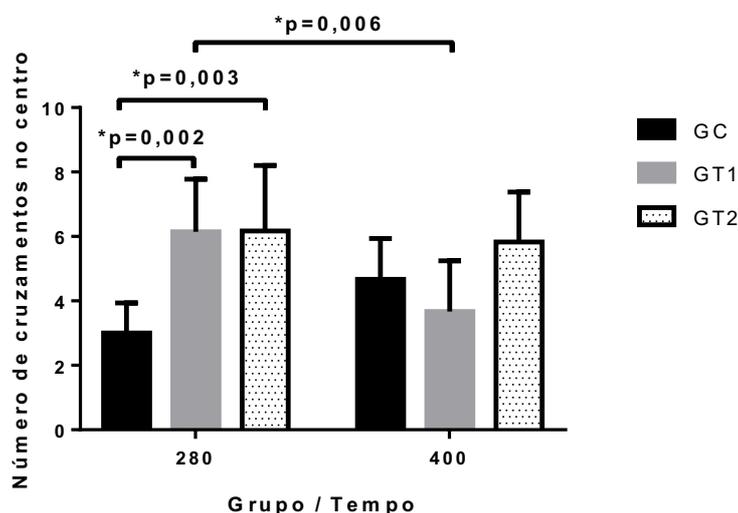
cruzamentos no centro do GT1 [6,14 (4,50 – 7,78)] ($p=0,002$) e GT2 [6,17 (4,13 – 8,20)] ($p=0,003$) em relação ao GC [3,00 (2,06 – 3,94)]. Em relação à comparação do desempenho em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de diminuição significativa do número de cruzamentos no centro do GT1 no tempo 400 [3,67 (2,09 – 5,25)] em relação ao tempo 280 [6,14 (4,50 – 7,78)] ($p=0,006$) (Figura 21).

Tabela 8: Média e IC de 95% da medida número de cruzamentos no centro, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupos
	280	400	
GC	3,00 (2,06 - 3,94)	4,67 (3,40 - 5,94)	3,83 (2,98 - 4,68)
GT1	6,14 (4,50 - 7,78)	3,67 (2,09 - 5,25)	5,00 (3,77 - 6,23)
GT2	6,17 (4,13 - 8,20)	5,83 (4,29 - 7,38)	6,00 (4,95 - 7,05)
Média intergrupos	5,16 (4,13 - 6,19)	4,72 (3,93 - 5,52)	

p -valor: Interação = 0,007; Tempo = 0,451; Grupo = 0,006
Fonte: Dados gerados pelo autor

Figura 21: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - número de cruzamentos no centro.



IC 95% Número de cruzamentos no centro. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.5.5. Tempo de permanência no centro

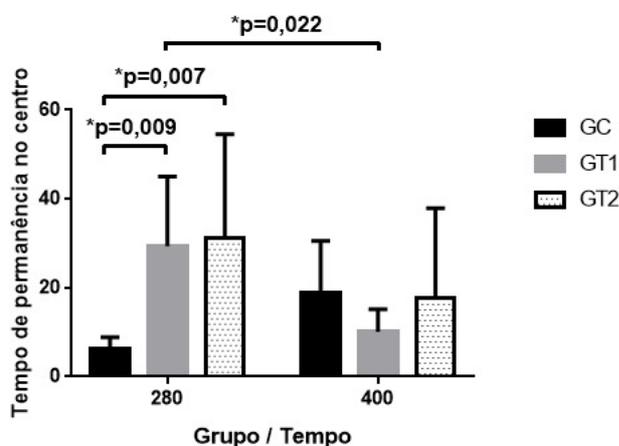
A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,011$) (Tabela 9). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 280, houve aumento significativo do tempo de permanência no centro nos GT1 [29,31 (13,61 – 45,00)] ($p=0,009$) e GT2 [31,17 (7,82 – 54,52)] ($p=0,007$), em relação ao GC [6,21 (3,52 – 8,89)]. Em relação à comparação do desempenho em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de diminuição significativa do número de cruzamentos no centro do GT1 no tempo 400 [10,10 (5,02 – 15,18)] em relação ao tempo 280 [29,31 (13,61 – 45,00)] ($p=0,022$) (Figura 22).

Tabela 9: Média e IC de 95% da medida tempo de permanência no centro, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	6,21 (3,52 - 8,89)	19,02 (7,52 - 30,52)	12,61 (6,19 - 19,04)
GT1	29,31 (13,61 - 45,00)	10,10 (5,02 - 15,18)	21,62 (10,87 - 32,38)
GT2	31,17 (7,82 - 54,52)	17,58 (-2,71 - 37,87)	25,13 (12,06 - 38,20)
Média intergrupos	21,70 (12,79 - 30,61)	16,06 (10,24 - 21,88)	-

p -valor: Interação = 0,011*; Tempo = 0,146; Grupo = 0,103
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 22: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos no teste do campo aberto - tempo de permanência no centro.



IC 95% Tempo de permanência no centro. Código de significância: * $p < 0,05$
Fonte: Dados gerados da pesquisa

5.6. Peroxidação Lipídica (TBARS)

5.6.1. Córtex Pré-frontal

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,001$) (Tabela 10). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 280, há evidências de valores significativamente menores de TBARS no córtex pré-frontal no GT1 [102,87 (89,45 – 116,29)] e GT2 [114,86 (90,59 – 139,14)] em relação ao GC [175,51 (139,98 – 211,03)], $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente. Em relação à comparação dos níveis de TBARS no córtex pré-frontal em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências da diminuição significativa no GC no tempo 400 [93,49 (62,96 – 124,02)] em relação ao 280 [175,51 (139,98 – 211,03)] ($p<0,001$) (Figura 23).

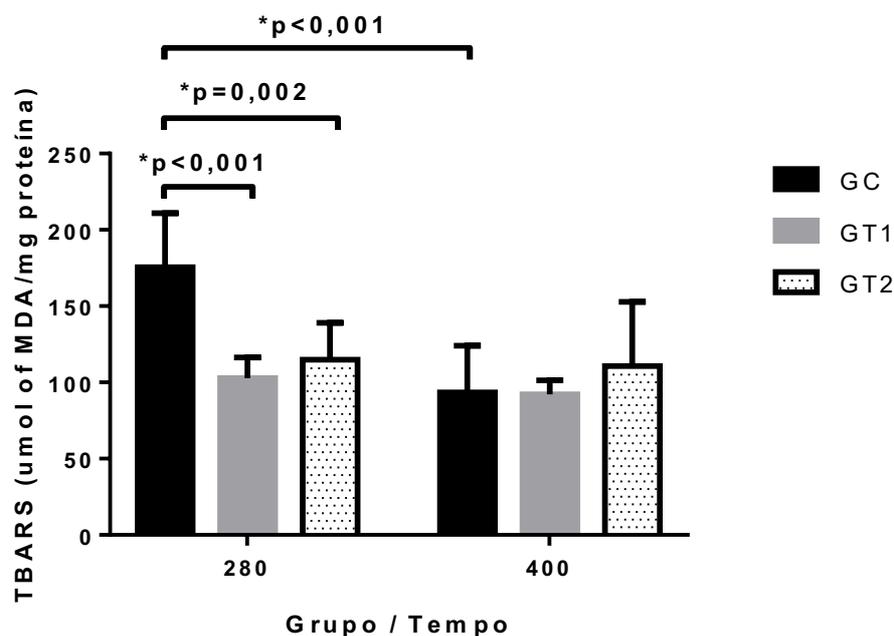
Tabela 10: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	175,51 (139,98 - 211,03)	93,49 (62,96 - 124,02)	126,30 (91,03 - 161,56)
GT1	102,87 (89,45 - 116,29)	92,15 (82,85 - 101,45)	97,02 (89,75 - 104,30)
GT2	114,86 (90,59 - 139,14)	110,71 (68,50 - 152,91)	112,49 (94,26 - 130,72)
Média intergrupos	130,08 (106,77 - 153,39)	97,29 (85,22 - 109,36)	-

p-valor: Interação = 0,001*; Tempo = 0,001*; Grupo = 0,002*

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 23: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal



95% CI Peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré-frontal. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.6.2. Hipocampo

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p = 0,001$) (Tabela 11). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 280, há evidências de valores significativamente menores de TBARS no hipocampo no GT1 [266,88 (154,88 – 378,88)] e GT2 [210,02 (173,71 – 246,33)] em relação ao GC [388,43 (292,74 – 484,13)], $p < 0,001$, em ambos. Contudo, parece que esse efeito não é tão evidente no GC e GT1, devido à sobreposição das barras de IC (Gráfico 7). Em relação à comparação dos níveis de TBARS no hipocampo em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências da diminuição significativa no tempo 400 em relação ao 280 no GC [87,29 (78,08 – 96,51)] versus [388,43 (292,74 – 484,13)], GT1 [118,85 (100,28 – 137,42)] versus [266,88 (154,88 – 378,88)] e GT2 [210,02 (173,71 – 246,33)], $p < 0,001$ em todos os grupos (Figura 24).

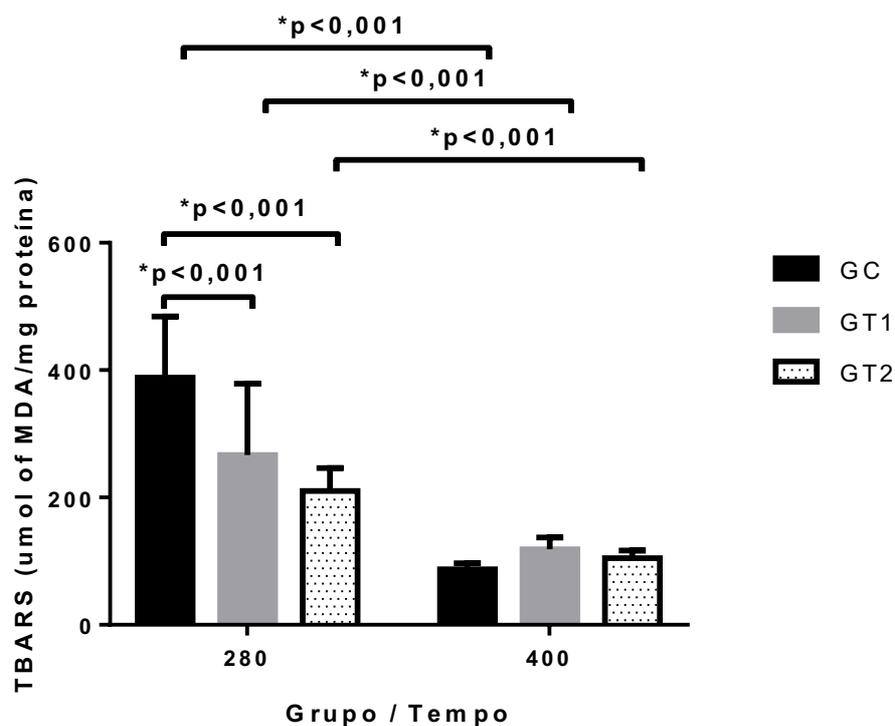
Tabela 11: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	388,43 (292,74 - 484,13)	87,29 (78,08 - 96,51)	212,77 (109,81 - 315,73)
GT1	266,88 (154,88 - 378,88)	118,85 (100,28 - 137,42)	163,26 (108,62 - 217,90)
GT2	210,02 (173,71 - 246,33)	104,83 (93,11 - 116,55)	151,58 (107,33 - 195,83)
Média intergrupos	298,57 (236,75 - 360,40)	103,54 (94,12 - 112,95)	-

P-valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 24: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ôegas 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no hipocampo



95% IC Peroxidação lipídica (TBARS) no hipocampo. Código de significância: * $p < 0,05$.

Fonte: dados da pesquisa

5.6.3. Corpo Estriado

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,015$) (Tabela 12). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 280, há evidências de valores significativamente menores de TBARS no corpo estriado no GT1 [186,72 (165,22 – 208,21)] e GT2 [173,50 (161,23 – 185,78)] em relação ao GC [256,96 (232,19 – 281,74)], $p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente. Já em relação ao tempo 400, há evidências de valores significativamente menores somente no GT2 [98,09 (85,67 – 110,51)] em relação ao GC [130,69 (105,53 – 155,84)] ($p=0,04$). Em relação à comparação dos níveis de TBARS no corpo estriado em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências da diminuição significativa no tempo 400 em relação ao 280 no GC [130,69 (105,53 – 155,84)] versus [256,96 (232,19 – 281,74)], GT1 [114,14 (85,88 – 142,40)] versus [186,72 (165,22 – 208,21)] e GT2 [98,09 (85,67 – 110,51)] versus [173,50 (161,23 – 185,78)], com $p<0,001$ em todos os grupos (Figura 25).

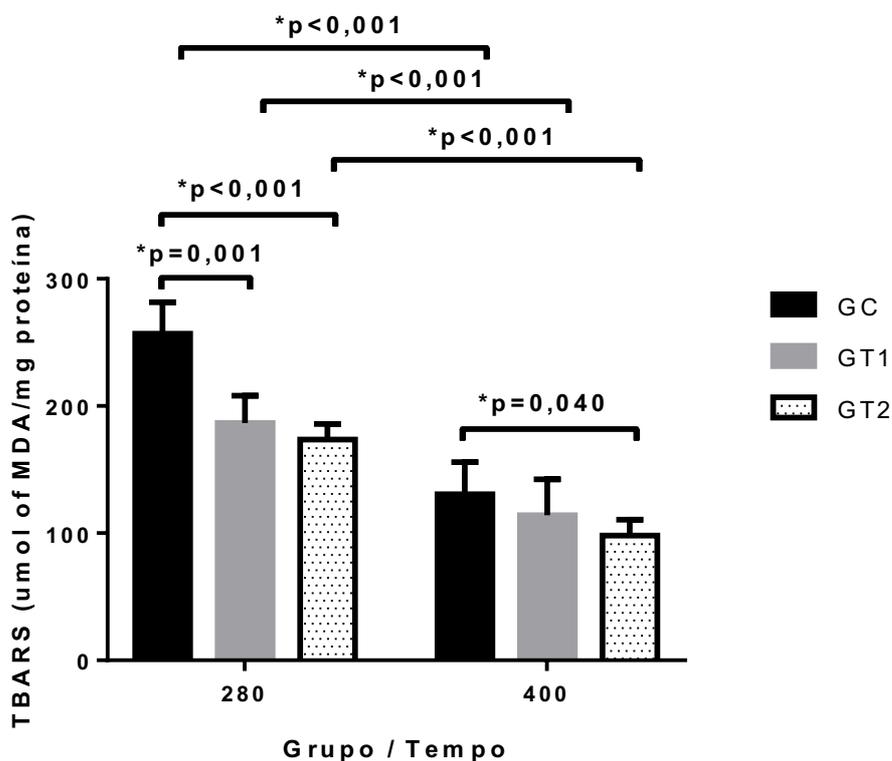
Tabela 12: Média e IC de 95% da medida de peroxidação lipídica no corpo estriado, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	256,96 (232,19 - 281,74)	130,69 (105,53 - 155,84)	183,30 (139,39 - 227,21)
GT1	186,72 (165,22 – 208,21)	114,14 (85,88 - 142,40)	135,92 (105,00 - 166,83)
GT2	173,50 (161,23 - 185,78)	98,09 (85,67 - 110,51)	128,25 (99,51 - 157,00)
Média intergrupos	211,58 (184,58 - 238,59)	115,12 (102,33 - 127,90)	-

p-valor: Interação = 0,015; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 25: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da peroxidação lipídica no corpo estriado



95% IC Peroxidação lipídica (TBARS) no corpo estriado. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.7. Glutathiona Reduzida (GSH)

5.7.1. Córtex Pré-frontal

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,001$) (Tabela 13). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 400, há evidências de que os níveis de GSH no córtex pré-frontal são significativamente maiores no GT1 [906,83 (201,05 – 1612,61)] em relação aos outros GC [428,12 (414,77 – 441,47)] ($p < 0,001$) e GT2 [357,85 (347,64 – 368,06)] ($p < 0,001$). Em relação à comparação dos níveis de GSH no córtex pré-frontal em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de aumento significativo do tempo 400 em relação ao 280 no GT1 [906,83 (201,05 – 1612,61)] versus [335,41 (322,79 – 348,02)] ($p < 0,001$). Contudo, não podemos concluir que há de fato efeitos significantes no GT1, devido à grande variação do IC desde grupo no tempo 400 em relação aos demais grupos, provavelmente ocasionado por valores aberrantes (Figura 26).

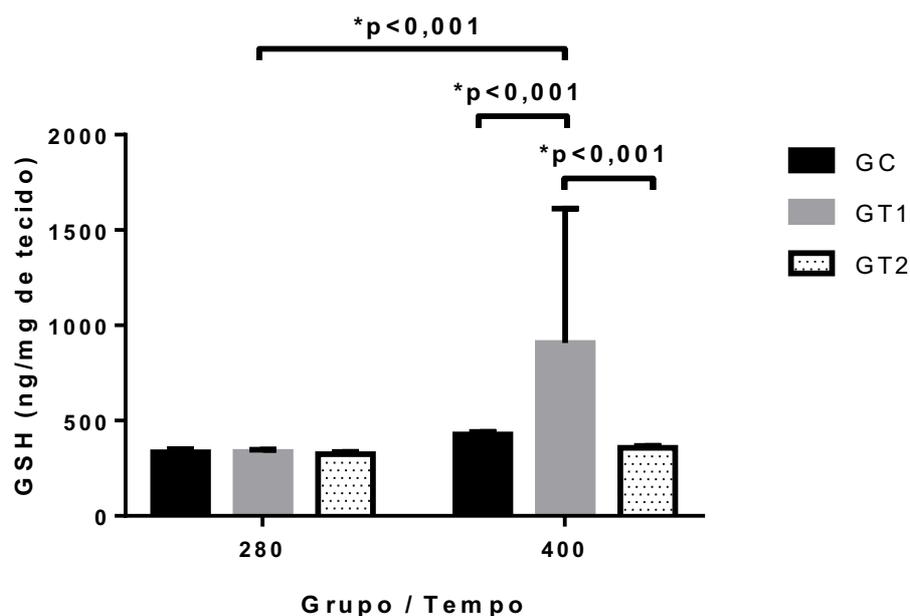
Tabela 13: Média e IC de 95% da medida de glutaciona reduzida no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupos
	280	400	
GC	334,24 (318,40 - 350,08)	428,12 (414,77 - 441,47)	359,84 (328,48 - 391,21)
GT1	335,41 (322,79 - 348,02)	906,83 (201,05 - 1612,61)	525,88 (294,20 - 757,56)
GT2	323,93 (312,35 - 335,52)	357,85 (347,64 - 368,06)	340,89 (328,80 - 352,98)
Média intergrupos	331,51 (324,59 - 338,43)	529,76 (340,45 - 719,07)	-

P-valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados gerados pelo autor

Figura 26: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutaciona reduzida no córtex pré-frontal



95% CI Glutaciona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal. Código de significância: * $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

5.7.2. Hipocampo

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,001$) (Tabela 14). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 400, há evidências de que os níveis de GSH no hipocampo foram significativamente maiores no GT1 [1476,16 (1129,48 – 1822,83)] em relação ao GC [995,61 (713,89 – 1277,32)] ($p=0,001$) e ao GT2 [777,88 (359,42 – 1196,34)] ($p<0,001$). Em relação à comparação dos níveis de GSH no hipocampo em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de aumento significativo no tempo 400 em relação ao 280 em todos os grupos: GC [995,61 (713,89 – 1277,32)] versus [356,94 (323,85 – 390,02)] ($p<0,001$), GT1 [1476,16 (1129,48 – 1822,83)] versus [352,40 (281,65 – 423,14)] ($p<0,001$) e GT2 [777,88 (359,42 – 1196,34)] versus [398,83 (304,92 – 492,74)] ($p=0,004$). Comparando os valores de IC dos tempos 400 e 280 nos respectivos grupos, observa-se que não houve sobreposições do gráfico de barras (Figura 27). Esses dados em conjunto sinalizam que o resultado é robusto.

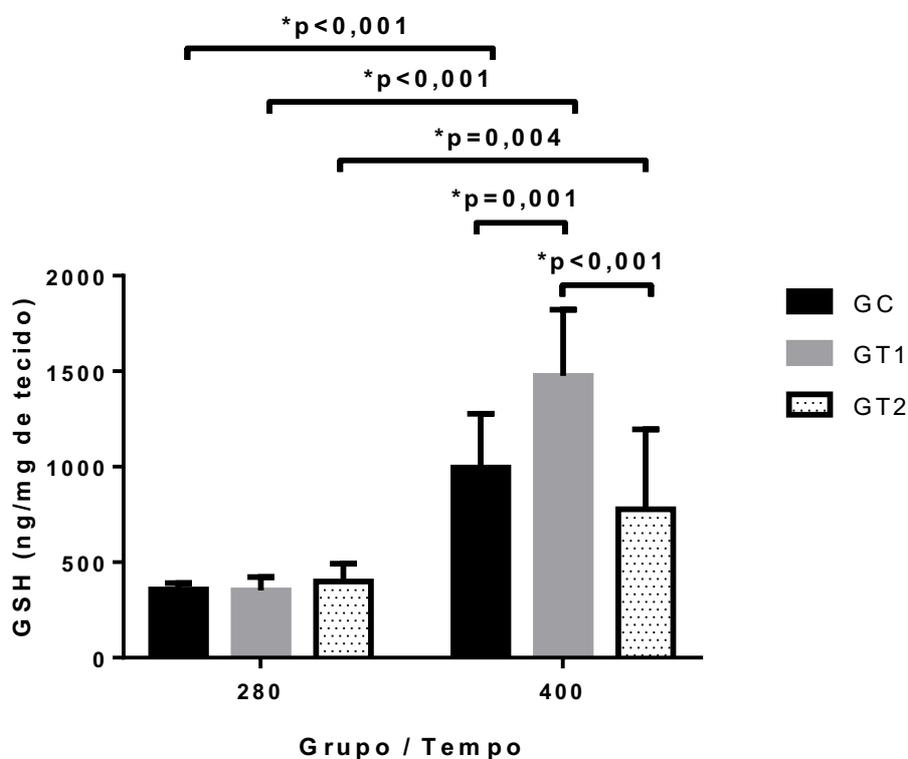
Tabela 14: Média e IC de 95% da medida da glutatona reduzida no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	356,94 (323,85 - 390,02)	995,61 (713,89 - 1277,32)	654,98 (440,99 - 868,98)
GT1	352,40 (281,65 - 423,14)	1476,16 (1129,48 - 1822,83)	914,28 (469,33 - 1359,22)
GT2	398,83 (304,92 - 492,74)	777,88 (359,42 - 1196,34)	544,62 (371,51 - 717,73)
Média intergrupos	371,82 (336,30 - 407,33)	1072,91 (865,13 - 1280,68)	-

P-valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados gerados pelo autor

Figura 27: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutathiona reduzida no hipocampo



95% CI Glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.7.3. Corpo Estriado

A análise ANOVA não detectou significância nesse teste para efeito de interação ($p=0,294$), portanto não foi necessário avaliar efeitos pós teste (Tabela 15) (Figura 28). Contudo, parece que há evidência de efeito entre os dois tempos estudados ($p=0,001$), mostrando que houve aumento significativo da média intergrupos do nível de GSH no corpo estriado no tempo 400 [1300,74 (1076,11 – 1525,36)] em relação ao 280 [461,85 (376,22 – 547,49)].

Tabela 15: Média e IC de 95% da medida de glutatona reduzida no corpo estriado, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

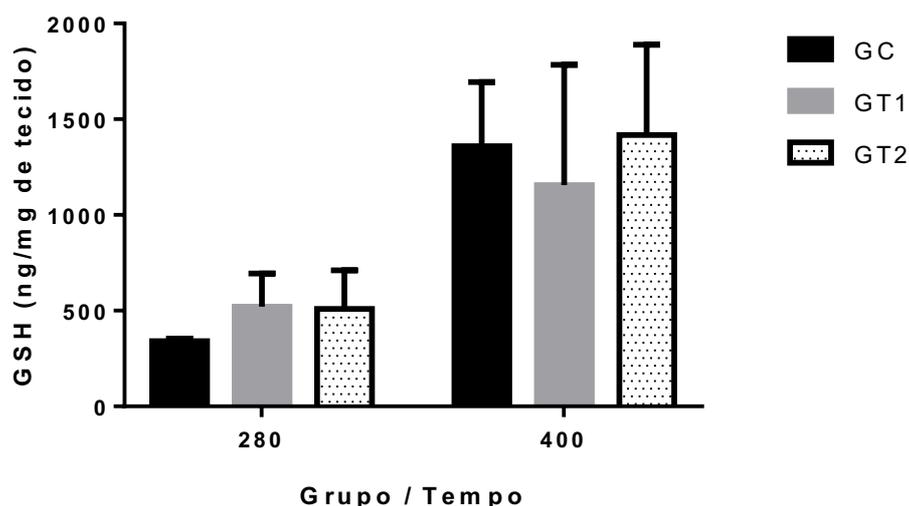
Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	341,22 (327,61 - 354,84)	1358,71 (1023,70 - 1693,72)	849,97 (513,60 - 1186,34)
GT1	520,45 (346,54 - 694,36)	1155,10 (525,68 - 1784,53)	792,44 (493,60 - 1091,28)
GT2	508,81 (306,07 - 711,55)	1417,73 (947,13 - 1888,34)	811,78 (486,84 - 1136,73)
Média intergrupos	461,85 ^A (376,22 - 547,49)	1300,74 ^B (1076,11 - 1525,36)	-

p-valor: Interação = 0,294; Tempo = 0,001*; Grupo = 0,594

A, B: diferença significativa entre os valores encontrados

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 28: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da glutatona reduzida no corpo estriado



95% CI Glutaciona reduzida (GSH) no corpo estriado. Código de significância: * $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

5.8. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

5.8.1. Córtex Pré-frontal

A análise ANOVA não detectou significância nesse teste para efeito de interação ($p=0,668$), mas foi possível detectar efeito intragrupo ($p=0,019$) (Tabela 16). Aplicando a análise pós teste foi possível encontrar, no tempo 400, efeito superior do GT2 [0,21 (0,15 – 0,27)] em relação ao GC [0,12 (0,09 – 0,15)] ($p=0,024$). Comparando o GT2 [0,21 (0,15 – 0,27)] em relação ao GT1 [0,11 (0,05

– 0,16)] o p-valor do teste foi de 0,083, muito próximo de um resultado significativo (Figura 29).

Tabela 16: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no córtex pré-frontal, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

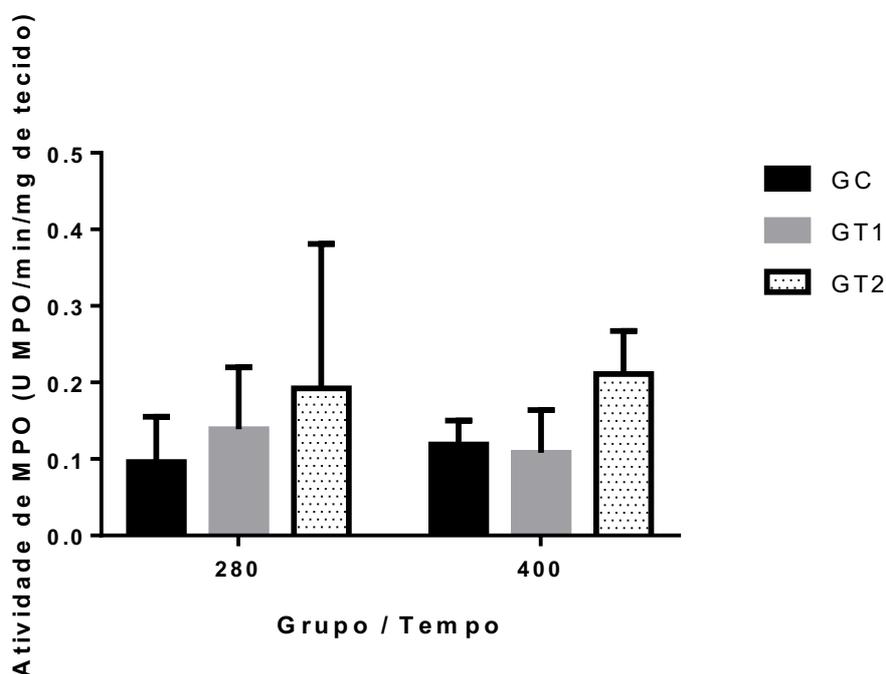
Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	0,10 (0,04 - 0,16)	0,12 (0,09 - 0,15)	0,11 ^A (0,08 - 0,13)
GT1	0,14 (0,06 - 0,22)	0,11 (0,05 - 0,16)	0,12 (0,08 - 0,16)
GT2	0,19 (0,00 - 0,38)	0,21 (0,15 - 0,27)	0,20 ^B (0,13 - 0,28)
Média intergrupos	0,14 (0,09 - 0,20)	0,14 (0,11 - 0,18)	-

p-valor: Interação = 0,668; Tempo = 0,898; Grupo = 0,019

A, B: diferença significativa entre os valores encontrados

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 29: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no córtex pré-frontal



95% CI Atividade da mieloperoxidase (MPO) no córtex pré-frontal. Código de significância: *
p<0,05.

Fonte: Dados da pesquisa

5.8.2. Hipocampo

A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,001$) (Tabela 17). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 400, há evidências de aumento significativa da atividade da MPO no hipocampo no GT2 [0,25 (0,22 – 0,28)] em relação ao GC [0,14 (0,11 – 0,17)] ($p<0,001$) e ao GT1 [0,14 (0,10 – 0,18)] ($p<0,001$). Em relação à comparação da atividade da MPO no hipocampo em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências de aumento significativo no tempo 400 em relação ao 280 nos GC [0,14 (0,11 – 0,17)] versus [0,05 (0,03 – 0,07)] ($p<0,001$), GT1 [0,14 (0,10 – 0,18)] versus [0,09 (0,03 – 0,14)] ($p=0,009$) e GT2 [0,25 (0,22 – 0,28)] versus [0,06 (0,04 – 0,08)] ($p<0,001$). Parece que esse efeito não é tão evidente no grupo teste 1, devido a sobreposição das barras do IC (Figura 30). Contudo, comparando os valores de IC do GC e GT2, observa-se que não houve sobreposições do gráfico de barras. Esses dados em conjunto sinalizam que o resultado é robusto para GC e GT2.

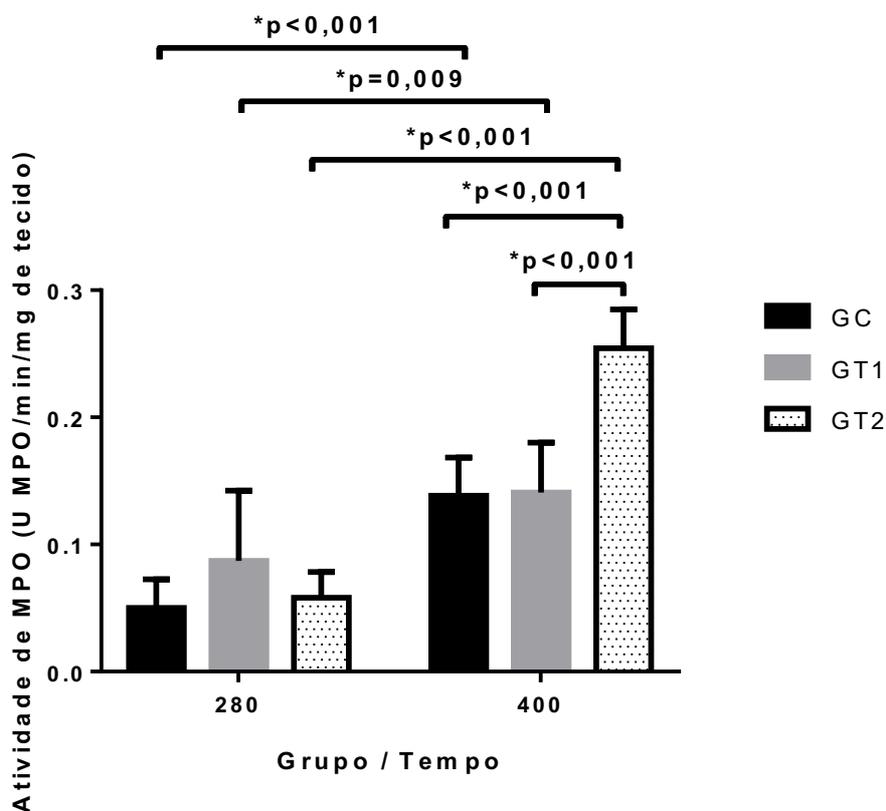
Tabela 17: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupo
	280	400	
GC	0,05 (0,03 - 0,07)	0,14 (0,11 - 0,17)	0,10 (0,06 - 0,14)
GT1	0,09 (0,03 - 0,14)	0,14 (0,10 - 0,18)	0,11 (0,08 - 0,15)
GT2	0,06 (0,04 - 0,08)	0,25 (0,22 - 0,28)	0,19 (0,11 - 0,27)
Média intergrupos	0,07 (0,05 - 0,09)	0,18 (0,15 - 0,22)	-

p-valor: Interação = 0,001; Tempo = 0,001; Grupo = 0,001

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 30: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo



95% CI Atividade da mieloperoxidase (MPO) no hipocampo. Código de significância: * $p < 0,05$.
Fonte: Dados da pesquisa

5.8.3. Corpo Estriado

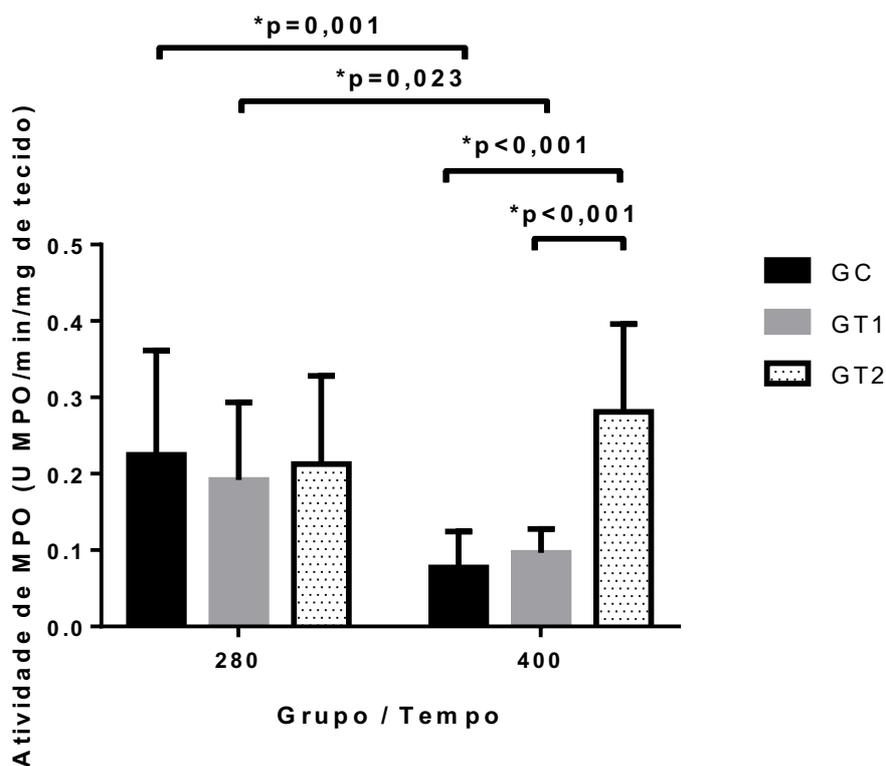
A análise ANOVA mostrou que nesse teste, ao nível de 5%, houve efeito da interação ($p=0,004$) (Tabela 18). A análise pós teste evidenciou que em relação ao tempo 400, há evidências de aumento significativo da atividade da MPO no corpo estriado do GT2 [0,28 (0,17 – 0,40)] em relação ao GC [0,08 (0,03 – 0,12)] ($p < 0,001$) e ao GT1 [0,10 (0,07 – 0,13)] ($p < 0,001$). Em relação à comparação da atividade da MPO no corpo estriado em cada grupo nos dois tempos estudados, há evidências da diminuição significativa no tempo 400 em relação ao 280 nos GC [0,08 (0,03 – 0,12)] versus [0,22 (0,09 – 0,36)] ($p=0,001$) e GT1 [0,10 (0,07 – 0,13)] versus [0,19 (0,09 – 0,29)] ($p=0,023$). Contudo, parece que esse efeito não é tão evidente nesses grupos, devido à sobreposição das barras de IC (Gráfico 13). Não houve efeito dos tempos no GT2 ($p=0,123$).

Tabela 18: Média e IC de 95% da medida da atividade da mieloperoxidase no hipocampo, comparando entre os fatores grupo e tempo, com resultado do teste ANOVA 2-way

Grupo	Tempo		Média intragrupos
	280	400	
GC	0,22 (0,09 - 0,36)	0,08 (0,03 - 0,12)	0,14 (0,07 - 0,22)
GT1	0,19 (0,09 - 0,29)	0,10 (0,07 - 0,13)	0,13 (0,09 - 0,18)
GT2	0,21 (0,10 - 0,33)	0,28 (0,17 - 0,40)	0,25 (0,18 - 0,31)
Média intergrupos	0,21 (0,17 - 0,25)	0,14 (0,08 - 0,19)	-

p-valor: Interação = 0,004; Tempo = 0,022; Grupo = 0,003
 Fonte: Dados gerados pelo autor

Figura 31: Efeito da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 em camundongos na medida da atividade da mieloperoxidase no corpo estriado



95% CI Atividade da mieloperoxidase (MPO) no corpo estriado. Código de significância: *
 $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

6. DISCUSSÃO

O envelhecimento leva à diminuição do desempenho cognitivo, mesmo na ausência de uma condição de doença (D.C. et al., 2006; FERRAZ et al., 2011) As alterações mais frequentes englobam alguns componentes da memória e funções executivas, havendo maior dificuldade para realizar novas aprendizagens e lentidão no processamento das informações (FONSECA et al., 2016; SALTHOUSE, 2013; SANCHES YASSUDA; LASCA; NERI, 2005). Nesse contexto, visando avaliar o impacto do envelhecimento no desempenho cognitivo dos camundongos e o possível efeito nootrópico dos ômega-3, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos.

No presente trabalho houve o mesmo desempenho no índice de reconhecimento dos objetos dos grupos teste em comparação ao controle em ambos os períodos estudados, portanto não houve efeito significativo da suplementação de ômega-3 sobre a memória dos camundongos. Contudo, estudos têm demonstrado o efeito benéfico do ω -3 em relação a memória e aprendizado (FERRAZ et al., 2011; PAN et al., 2011; V. STAZIAKI et al., 2013). Ferraz et al. (2011) descreveram que a suplementação com óleo de peixe (3,0 g/kg de peso corporal, com emulsão lipídica contendo 12% de EPA e 18% de DHA), a partir das fases iniciais do desenvolvimento, preveniu a ocorrência de déficits de memória e aprendizado em animais submetidos a um modelo animal em estresse de contenção. Nesse modelo de estresse, os ratos foram retirados de suas gaiolas e colocados em um tubo transparente (diâmetro interno de 5 cm) que os mantinham em pé e com leve compressão do corpo por um período de 20 minutos por dia (FERRAZ et al., 2011).

Já Vishaldeep e colaboradores (2016) mostraram que a suplementação com ω -3 reverteu a deficiência induzida pelo envelhecimento de proteínas envolvidas na transmissão sináptica. A redução de duas destas proteínas foi revertida, elevando-se o nível de DHA no cérebro pela utilização de uma dieta suficiente de ômega-3 durante 2 meses em animais idosos. Os animais que tiveram a depleção de DHA corrigida, a memória de reconhecimento foi melhorada. Sugeriu-se então um papel potencial do DHA em aliviar o declínio cognitivo associado ao envelhecimento, compensando a perda de proteínas

sinápticas reguladoras da neurotransmissão envolvidas na função sináptica (SIDHU et al., 2016).

No presente trabalho também não foi observada diferença significativa entre os grupos, suplementados ou não, quando comparados em um mesmo período, em outro teste que avaliou a memória de trabalho espacial, ou seja, o comportamento cognitivo exploratório; o teste do labirinto em Y (Y-maze) (MAURICE; LOCKHART; PRIVAT, 1996). Contudo, foi observado que houve diminuição significativa da média global das porcentagens de alterações corretas no tempo 400 em relação ao 280. Demonstrando que com o envelhecimento houve diminuição geral da memória de trabalho.

Loef e Walach (2013) realizaram uma revisão sistemática abrangendo estudos que relataram a associação entre a relação ω -6 / ω -3 e demência ou declínio cognitivo. Em 13 estudos a razão dietética ω -6 / ω -3 mostrou afetar a composição cerebral, o curso da doença de Alzheimer (DA) e o comportamento. Em 14 estudos realizados em seres humanos forneceram-se evidências, embora limitadas, apoiando uma associação entre a alta relação ω -6 / ω 3, e o declínio cognitivo e incidência de demência (LOEF; WALACH, 2013).

Outros estudos mostram que o DHA melhora significativamente a memória de trabalho em ratos submetidos a modelos de DA (ARSENAULT et al., 2011; HOOIJMANS et al., 2009; LEBBADI et al., 2011). A suplementação da dieta com DHA por um período de três meses (PEREZ et al., 2010) ou uma dieta com uma razão ω -6 / ω -3 baixa (LEBBADI et al., 2011; OKSMAN et al., 2006) diminuiu a razão ω -6 / ω -3 no cérebro e baixou os níveis cerebrais de peptídeo beta amiloide e proteína tau insolúvel, principais marcadores patológicos da DA. Os resultados descritos sugerem que uma baixa razão ω -6 / ω -3 na dieta obtida através de um maior consumo de ω -3, ou um menor aporte relativo de ω -6 pode ter efeitos benéficos importantes na manutenção da função cognitiva e prevenção da demência (LEBBADI et al., 2011; OKSMAN et al., 2006).

Os presentes achados talvez podem ser explicados pelo fato de que os animais não foram submetidos a estresse, nem a privação de ácidos graxos pela dieta. A ração que foi utilizada *ad libitum* pelos camundongos (NUVILAB CR1-Nuvital®) é balanceada em macro e micronutrientes, oferecendo um aporte

adequado de ácidos graxos essenciais. Portanto, não houve, provavelmente, deficiência de ácidos graxos nos grupos estudados, nem benefício adicional com a suplementação de ômega no desempenho cognitivo.

Em geral, os efeitos mais fortes da suplementação com PUFA são observados em condições de deficiência (LUCHTMAN; SONG, 2013). Estudos experimentais em animais mostraram que dietas sem PUFA ω -3 levam a distúrbios substanciais na função neural, que na maioria das circunstâncias pode ser restaurada pela inclusão de PUFA ω -3 na dieta (SINCLAIR et al., 2007). Este pode não ter sido o cenário do atual estudo uma vez que todos os camundongos receberam *ad libitum*, durante todo o experimento, ração padrão, balanceada nutricionalmente. Pode-se concluir que a oferta de quantidade extra de ômega não conferiu benefício adicional na preservação da memória de trabalho em animais de meia-idade adequadamente alimentados.

Em pacientes idosos o fardo emocional das experiências negativas acumuladas pode levar ao humor deprimido, que embora possa ser apenas uma reação normal a eventos como o luto, também pode ser uma característica da depressão (MAERCKER et al., 2008). O desenvolvimento de sintomas depressivos no envelhecimento tem sido minuciosamente investigado e é unanimemente aceito que a depressão é o problema de saúde mental mais prevalente e mais tratável na velhice (FERRAZ et al., 2011). Além de seu maior impacto emocional, a depressão também pode causar atipicamente sintomas somáticos, como a fadiga (SMITH et al., 2012), interferindo negativamente na qualidade de vida dessa população.

No presente trabalho, para avaliar o efeito da suplementação de ômega na depressão associada ao envelhecimento, foi realizado o teste do nado forçado. Como dito anteriormente, esse teste é usado para induzir um comportamento característico de imobilidade em ratos, que se assemelha a depressão em humanos até certo ponto (NODA et al., 1995).

De fato, o presente experimento mostrou que com envelhecimento há uma tendência ao comportamento depressivo, como observado pelo maior tempo de imobilidade nos animais de meia-idade mais velhos comparados aos animais de meia-idade mais novos no grupo controle. Já no grupo suplementado

com a mistura de óleos houve maior tempo de imobilidade no primeiro corte de tempo em relação ao GC. Contudo, também foi evidenciado que nesse grupo a suplementação crônica dos ômega-3 foi associada a redução do tempo de imobilidade nos animais de meia-idade mais velhos em relação aos mais novos, caracterizando assim menor comportamento tipo depressivo nos animais de meia-idade mais velhos em comparação aos mais novos no grupo que recebeu leite suplementado com os ômega-3.

Corroborando com esses resultados, Lakhwani e colaboradores (2007), avaliando o efeito dos PUFA ω -3 isoladamente e comparando com a terapia antidepressiva padrão com fluoxetina, mostrou que quando ofertado cronicamente, os PUFA ω -3 afetam significativamente o comportamento de imobilidade e natação quando comparados com o controle, sendo que a eficácia da combinação de PUFA ω -3 e fluoxetina é significativamente maior do que a fluoxetina sozinha na alteração da atividade comportamental de ratos nesse teste. Levando a conclusão de que os PUFA ω -3 têm atividade antidepressiva *per se* (LAKHWANI et al., 2007).

Huang et al. (2008) também evidenciaram que ratos alimentados com dieta rica em PUFA ω -3, durante seis semanas, comparados a animais alimentados com ração padrão, apresentaram menor tempo de imobilidade e aumentaram o tempo de natação e de escalada durante o teste de nado forçado (HUANG et al., 2008). Já Park, Moon e Kim (2012) em estudo experimental com ratos, mostraram que os animais alimentados com uma dieta rica em PUFA ω -3 contendo 0,5% e 1% de EPA e DHA, respectivamente, em relação ao valor energético total, comparados com animais que ingeriram dieta contendo 0% de EPA + DHA, tiveram o tempo de imobilidade significativamente diminuído e o tempo de subida significativamente aumentado em relação ao controle (PARK; MOON; KIM, 2012).

Também foi demonstrado o efeito antidepressivo a partir do tratamento com PUFA ω -3 durante as fases iniciais do desenvolvimento (FERRAZ et al., 2008). Neste experimento, o tratamento durante os períodos iniciais do desenvolvimento resultou em uma redução do tempo de imobilidade no teste de natação forçada. Este efeito antidepressivo foi observado de maneira semelhante em animais que foram tratados este com PUFA ω -3 a partir do 21º

dia de nascimento até a realização do teste (90° dia), mostrando assim a longa duração dos efeitos positivos deste tratamento no início da vida (FERRAZ et al., 2008).

Uma meta-análise recente de estudos clínicos evidenciou que suplementos contendo EPA $\geq 60\%$ do total de EPA + DHA, em um intervalo de dose de 200 a 2.200 mg/d, foram eficazes contra depressão primária. Também foi relatado que quanto mais grave a depressão, maior a probabilidade de que a suplementação de PUFA ω -3 reduza os sintomas depressivos. (SUBLETTE et al., 2011).

Níveis elevados de raiva, hostilidade e irritabilidade parecem ser características comuns de depressão em uma proporção significativa de pacientes com transtorno de depressão maior (FAVA et al., 1997; FISHER et al., 2015). Em estudo clínico, Kien e colaboradores (2013) mostraram que ingestão de dieta do tipo mediterrâneo, com elevada proporção de MUFA ω -9 esteve associada à redução da raiva e irritabilidade, quando comparados à dieta ocidental, rica em ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico (KIEN et al., 2013). De fato, estudos in vitro têm ligado o ácido palmítico (mas não ácido oléico) a um aumento da secreção de TNF- α (COLL et al., 2008; WEN et al., 2011), e, por sua vez, o TNF- α tem sido associado a sentimentos de raiva e hostilidade (LOTRICH et al., 2010; SUAREZ; LEWIS; KUHN, 2002). Assim, a relação ácido palmítico / ácido oléico celular também pode estar diretamente relacionada aos sentimentos de raiva por causa da secreção de TNF- α pelos monócitos do sangue periférico ou, talvez, pela síntese dentro do cérebro, o que implicaria um processo inflamatório central (CINTRA et al., 2012).

Fisher e colaboradores (2015) mostraram que pacientes deprimidos com raiva ou hostilidade demonstraram um nível maior de gravidade da doença e taxas de resposta depressiva menores do que pacientes com menos raiva ou hostilidade, sugerindo que a depressão associada a esses sentimentos pode resultar em desfechos desfavoráveis ao tratamento adjuvante (FISHER et al., 2015).

Neste trabalho não foram realizados testes específicos para raiva, hostilidade ou irritabilidade, contudo, como visto anteriormente, pode haver

conexão entre esses sintomas e a depressão. Assim como há um possível efeito benéfico do maior consumo de ácido oleico como modulador desses sintomas. Portanto, pode-se aferir uma provável correlação entre a oferta de ácido oleico por meio da suplementação dos óleos no leite e a melhora do comportamento tipo depressão nos camundongos. Os efeitos benéficos relacionados à melhora da depressão podem, então, estar relacionados tanto à suplementação de PUFA ω -3 como de MUFA ω -9.

A mistura de lipídeos utilizada no experimento possui baixa relação ω -6 / ω -3, o que confere uma característica anti-inflamatória para a mistura, e uma elevada proporção ω -9 / ω -6, o que confere uma característica antioxidante. Essa mistura, portanto, poderia atuar diminuindo inflamação crônica de baixo grau, e conseqüentemente melhorando os sintomas depressivos.

De fato, em trabalho de revisão, Husted e Bouzinova (2016) mostraram a provável correlação entre a elevada proporção ω -6/ ω -3, a inflamação de baixo grau e a depressão. Evidenciou-se que as citocinas pró-inflamatórias, aumentadas pela elevada proporção ω -6/ ω -3, induziram sintomas depressivos, ativaram o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e finalmente, juntamente com o cortisol, reduziram a disponibilidade dos precursores da serotonina, indicando que a inflamação desempenha um importante papel causal no desenvolvimento da depressão (HUSTED; BOUZINOVA, 2016).

O estudo da anedonia também é bastante utilizado em ensaios sobre depressão, uma vez que há evidências de sua manifestação nessa doença e da sua utilidade na previsão de uma resposta antidepressiva (RUTERING et al., 2016). Tradicionalmente, a anedonia tem sido definida como uma “perda de prazer” (MARTINOTTI et al., 2013), uma definição que enfatiza o aspecto consumo / prazer da função de recompensa. Entretanto, a avaliação da anedonia de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª Edição, da Associação de Psiquiatria Americana, reflete uma conceituação mais ampla que inclui tanto o interesse, quanto o prazer consumatório (KINDERMAN, 2013).

Apesar da medição da anedonia na depressão ser um processo complexo, pois engloba aspectos da personalidade, aprendizagem e preconceitos (RUTERING et al., 2016), o teste do consumo de sacarose é amplamente utilizado em testes experimentais como preditor de anedonia (MAO et al., 2014). Nessa perspectiva, no presente trabalho foi realizado o teste da preferência por sacarose, para avaliação de anedonia nos animais. Constatou-se que os camundongos do grupo controle de meia-idade mais velhos tiveram menor consumo da solução de sacarose quando comparados aos animais de meia-idade mais novos, caracterizando o comportamento anedônico associado ao envelhecimento.

De fato, alterações neuroendócrinas do envelhecimento também podem estar relacionadas ao desenvolvimento de anedonia como demonstrado por Herrera-Pérez, Martínez-Mota e Fernández-Guasti (2008). Em seu experimento ratos Wistar machos jovens e velhos (de 3 a 5 e 12 a 15 meses, respectivamente) foram expostos a um esquema de estresse crônico variável por 3 semanas. O estresse produziu anedonia, indicada por uma redução na ingestão de uma solução de sacarose (1%), em 8 de 23 (35%) ratos jovens e em 19 de 26 (73%) ratos idosos, o que implica que os animais velhos são mais suscetíveis ao estresse e a desenvolver mais anedonia do que animais jovens. Nenhuma condição patológica significativa foi detectada em animais velhos, sugerindo que a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de anedonia em ratos machos poderia estar associada a alterações neuroendócrinas decorrentes do envelhecimento (HERRERA-PÉREZ; MARTÍNEZ-MOTA; FERNÁNDEZ-GUASTI, 2008).

Comparando-se agora os grupos testes, observou-se que o grupo suplementado com a mistura de óleos (GT2) teve desfecho superior ao grupo que recebeu somente o leite desnatado (GT1), uma vez que os animais do GT2 consumiram maior volume da solução de sacarose nos dois tempos analisados (280 e 400 dias), diferentemente do GT1 onde o consumo elevou-se somente no segundo tempo analisado (400 dias). É factível propor então que a suplementação de ômega 3, 6 e 9, nas proporções contidas na presente mistura, protege precocemente contra o comportamento anedônico associado ao envelhecimento, mantendo essa proteção mesmo com o passar do tempo.

Todos esses resultados mostram que os PUFA ω -3 e a mistura de lipídeos com baixa proporção ω -6 / ω -3 e alta proporção ω -9 / ω -6 têm um efeito benéfico na prevenção do desenvolvimento de comportamentos semelhantes aos da depressão em animais.

Diversas modificações morfofisiológicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento, como o aumento do peso corporal e da proporção de gordura versus massa magra, a diminuição da massa muscular e a diminuição da densidade óssea, estão relacionadas à diminuição da capacidade funcional do idoso (MATSUDO et al., 1830) (MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS NETO, 2001). Nessa perspectiva no presente estudo foi realizado o teste do campo aberto (ARCHER, 1973), como ferramenta válida para análise do efeito do envelhecimento e da suplementação dos ômega na atividade locomotora e exploratória do animal.

No presente trabalho, em relação à avaliação da atividade locomotora, realizada pela contagem do número de cruzamentos totais, os resultados não demonstraram padrões diferentes entre os grupos teste e o controle, estando em concordância com os estudos prévios (COLUCCIA et al., 2009; FERRAZ et al., 2008). Coluccia, Borracci e Renna (2009) mostraram que o tratamento com o ω -3 não influenciou nos resultados da atividade motora no teste do campo aberto, porém estes autores observaram benefícios relacionados a coordenação motora, propondo que o tratamento com o ω -3 poderia apresentar efeitos benéficos no desenvolvimento do cerebelo, influenciando a organização dos circuitos cerebelares relacionados com a percepção motora, isto sem alterar a atividade motora (COLUCCIA et al., 2009).

Já em relação à avaliação do comportamento exploratório, realizado pela contagem do número de levantamento de patas, o atual trabalho mostrou que os animais que receberam o leite acrescido da mistura de lipídeos tiveram melhor desempenho quando comparado aos animais que receberam somente leite. Contudo, não houve diferença de desempenho entre o grupo suplementado com a mistura de óleos em relação ao grupo controle. Com relação ao tempo de levantamento de patas, houve somente aumento da média intergrupos dos animais de meia-idade mais velhos versus os mais novos.

Backman e cols (2006) mostraram que o comportamento de levantar-se está associado à motivação e à excitabilidade a explorar novos ambientes, sendo prejudicado com o envelhecimento (BÄCKMAN et al., 2006). Resultado divergente foi observado no presente estudo, uma vez que os animais do grupo controle tiveram o número de levantamentos aumentados com o envelhecimento.

Estudos sobre comportamento exploratório também são de grande relevância por permitirem medir a emocionalidade dos animais (HALL, 1941). A avaliação da atividade locomotora associada à emocionalidade pode ser realizada através da observação do número de cruzamentos no centro e do tempo de permanência no centro no teste do campo aberto. No atual trabalho, ambos os resultados relacionados ao número de cruzamentos e ao tempo de permanência no centro mostraram que a ingestão crônica da mistura de óleos promoveu melhor atividade locomotora, em relação ao comportamento exploratório, bem como a manutenção do nível dessa atividade com o avanço da idade.

Além dos testes comportamentais utilizados para avaliação do efeito do envelhecimento e do mix de óleos sobre a memória, o comportamento tipo depressão, a atividade locomotora e o comportamento exploratório, no presente trabalho também foi estudado o efeito da suplementação da mistura de óleos sobre os parâmetros oxidativos no cérebro dos camundongos.

A partir do desenvolvimento de novas técnicas especializadas de pesquisa em neurofisiologia e em neuroimagem, mais recentemente, vem-se ampliando o conhecimento acerca do Sistema Límbico (SL). Sabe-se que há uma profunda integração entre os processos emocionais, os cognitivos e os homeostáticos. As áreas cerebrais envolvidas no controle motivacional, na cognição e na memória fazem conexões com diversos circuitos neurais, os quais, através de seus neurotransmissores, promovem respostas fisiológicas que relacionam o organismo ao meio externo e interno, importantes à homeostasia (BARRETO; PONTE E SILVA, 2010). O SL tem como estruturas principais: os giros corticais, os núcleos de substância cinzenta e tratos de substância branca dispostos nas superfícies mediais de ambos os hemisférios e em torno do terceiro ventrículo (HEIMER; VAN HOESEN, 2006).

No presente experimento foram analisadas as áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. O córtex pré-frontal constitui o principal centro de organização e de planejamento de ações, orquestrando inclusive as reações emocionais. O hipocampo tem íntima relação topográfica e funcional do corpo amigdalóide, vinculando o processo de armazenamento de memórias com os seus respectivos coloridos emocionais (HEIMER; VAN HOESEN, 2006). Já o corpo estriado em sua porção central é composto pelo núcleo accumbens, que forma uma parte da via de recompensa, que está relacionada ao prazer, impulsividade e comportamento maternal (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006).

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como uma medida de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DRAPER et al., 1993), nos homogenatos do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Como dito anteriormente, essas estruturas fazem parte do sistema límbico. O córtex pré-frontal constitui o principal centro de organização e de planejamento de ações, inclusive as emocionais, hipocampo está vinculando o processo de armazenamento de memórias com os seus respectivos coloridos emocionais (HEIMER; VAN HOESEN, 2006), e o corpo estriado está associado ao sistema de recompensa, que está relacionada ao prazer, impulsividade e comportamento maternal (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006).

A formação excessiva de ERO pode causar oxidação proteica em mitocôndrias cerebrais, oxidação no DNA e RNA, disfunção neuronal e morte (YILDIZ et al., 1999). A maior parte das ERO é produzida pela respiração mitocondrial. Cerca de 1-2% da molécula de oxigênio consumida durante a respiração fisiológica normal é convertida em radicais superóxido. A redução de um elétron da molécula de oxigênio produz uma molécula relativamente estável, o ânion superóxido, que serve como precursor de muitas ERO (ANDREYEV; KUSHNAREVA, 2005). Radicais hidroxil, alcoxil, nitrito e peroxil, bem como outras moléculas que não são radicais livres, mas podem levar a sua produção por meio de reações químicas, como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, fazem parte também destas ERO (PRATICÒ et al., 2001).

Os efeitos deletérios resultantes da formação das ERO são, em grande maioria, impedidos por vários sistemas antioxidantes (SUN; OBERLEY; U', 1988) que inclui os enzimáticos, como SOD e catalase, e defesas celulares não-enzimáticas como GSH, ascorbato (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E). Entretanto, as vezes, a produção das ERO pode ultrapassar a capacidade da célula para removê-las, resultando no desequilíbrio oxidativo, levando ao estresse oxidativo (PRATICÒ et al., 2001). Portanto, a formação de grandes quantidades de ERO pode iniciar a peroxidação lipídica, além de que o aumento na peroxidação lipídica também pode ser devido a uma insuficiência no sistema antioxidante (RADI et al., 1991).

No presente estudo foi observado que os animais de meia-idade mais novos que receberam leite (com ou sem a mistura de óleos) tiveram menores concentrações de TBARS, portanto menor nível de peroxidação lipídica, que os animais do grupo controle, nos três homogenatos (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado). Já os animais de meia-idade mais velhos tiveram o mesmo nível de peroxidação lipídica nos homogenatos do córtex pré-frontal e do hipocampo nos três grupos estudados (GC, GT1 e GT2). Contudo, nesses animais mais velhos houve menor nível de peroxidação lipídica no corpo estriado no grupo que recebeu o leite suplementado com ômegas, em relação ao grupo controle.

O leite, além de seu papel nutricional fundamental, está sendo amplamente estudando em relação ao seu potencial biofuncional. Grande parte da sua bioatividade pode ser atribuída às proteínas do leite e seus peptídeos constituintes (MURRAY; FITZGERALD, 2007). Esses peptídeos são inativos ou criptografados dentro da seqüência da proteína nativa, mas a hidrólise enzimática pode liberar peptídeos ativos. Eles podem ter um efeito benéfico em uma variedade de sistemas biológicos, incluindo os sistemas cardiovascular, gastrointestinal, imunológico e nervoso (MURRAY; FITZGERALD, 2007). Descobriu-se que vários peptídeos derivados do leite possuem atividade antioxidante (PIHLANTO, 2006).

Sun e colaboradores (2009) mostraram que indivíduos com síndrome metabólica submetidos a uma dieta com maior ingestão de laticínios (aproximadamente 3,5 porções por dia), por 7 dias, apresentaram diminuição da pressão arterial e dos marcadores de estresse oxidativo, incluindo MDA e

colesterol LDL oxidado, de inflamação, como o fator de necrose tumoral- α (SUN et al., 2009).

Em um estudo randomizado cruzado em adultos saudáveis com sobrepeso e obesos, Sun e colaboradores (2010) mostraram que *shakes* à base de laticínios, mas não batidos à base de soja, reduziram significativamente os biomarcadores circulantes do estresse oxidativo (malondialdeído e 8-isoprostano F₂ α) e inflamação [fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6, proteína quimiotática de monócitos 1 e proteína C-reativa (PCR)] e provocaram o aumento de adiponectina (SUN et al., 2009).

É factível propor então que, no presente estudo, o leite *per si*, acrescido ou não da mistura de ômega, proporcionou efeito neuroprotetor em camundongos de meia-idade mais novos, evidenciado pela menor peroxidação lipídica nos tecidos cerebrais desses animais, provavelmente relacionado aos peptídeos lácteos.

Foi também observado que nos animais de meia-idade mais velhos, que receberam o leite acrescido da mistura de ômega, essa neuroproteção em relação ao estresse oxidativo se manteve no corpo estriado, evidenciado pela menor peroxidação lipídica nesse grupo, em comparação ao grupo controle. Contudo, não houve diferença significativa entre o grupo suplementado e o grupo que recebeu somente leite, nem entre este e o grupo controle. Porém, como observado em outros trabalhos, a menor peroxidação encontrada, no grupo suplementado em relação ao controle, pode ter sido relacionada à oferta suplementar de ômega 3 e 9, que conferem proteção contra a peroxidação lipídica (MELO et al., 2014; MICHAEL-TITUS; PRIESTLEY, 2014).

É sabido que, com envelhecimento, ocorre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (KREGEL; ZHANG, 2007), o que pode causar aumento da peroxidação lipídica. Contudo, resultado divergente foi encontrado no atual trabalho, observado pelo menor nível de TBARS nos tecidos estudados em animais de meia-idade mais velhos, em relação a animais de meia-idade mais novos, no grupo controle. Esse achado pode ser explicado pelos maiores níveis de glutathione (GSH) nos homogenatos do hipocampo e corpo estriado nos animais de meia-idade mais velhos em relação aos mais novos nesse grupo, apesar de que seria esperado que com o envelhecimento ocorresse uma

diminuição nas concentrações plasmáticas e celulares de antioxidantes, como o GSH (GILCA et al., 2007).

O GSH, um tripeptídeo contendo tiol (Cisteína-Glutâmico-ácido-Glicina; Cys-Glu-Gly), é sintetizado predominantemente no fígado a partir dos substratos amino e está presente no fígado em concentrações entre 5 e 7 mM. A função AO mais importante da GSH é eliminar as ERO. Pode interagir diretamente com radicais por transferência de átomos de hidrogênio. Ele também atua como um substrato para a glutathione peroxidase, que catalisa a remoção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzindo a glutathione oxidada (GSSG). O GSH também tem um papel na redução de alguns radicais derivados de outros AO dentro da célula, incluindo o radical da vitamina E e o radical semidi-hidroascorbato, reciclando assim as vitaminas E e C, respectivamente. O GSH pode ser regenerado a partir da GSSG pela GSH redutase (POWERS; JACKSON, 2010).

Proteínas, peptídeos e aminoácidos também contribuem para a defesa AO do corpo (WAYNER et al., 1987). Alguns estudos avaliaram a eficácia de proteínas / peptídeos AO utilizando modelos animais. McIntosh e colaboradores (1995) demonstraram que proteínas lácteas intactas protegem contra tumores intestinais em ratos machos. Os ratos alimentados com uma dieta de whey protein (proteína do soro do leite) ou caseína tiveram menos tumores e uma massa tumoral reduzida em comparação com animais alimentados com carne vermelha ou soja. A massa tumoral foi menor nos animais alimentados com whey protein. O efeito protetor da proteína foi atribuído a concentrações intracelulares (em hepatócitos) de GSH que foram significativamente superiores em ratos alimentados com whey e caseína (MCINTOSH G et al., 1995).

Gad e colaboradores (2011) demonstraram que ratos submetidos a um modelo de dano hepático (tratados com tetracloreto de carbono de hepatotóxina) (CCl₄) apresentaram melhoria dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e no perfil histológico hepático nos animais que receberam whey protein concentrado (50mg/d) e spirulina (50mg/d) por 30 dias. A atividade AO do whey foi atribuída ao conteúdo de cisteína e à capacidade de elevar a GSH celular, já a atividade AO da spirulina foi relacionada ao seu conteúdo de β-caroteno, tocoferol e ficocianina (GAD et al., 2011).

Por sua vez Ebaid e colaboradores (2011) mostraram que a suplementação com proteína de soro de leite (100 mg / kg durante 15 dias pré e

pós ferida) reduziu significativamente o tempo de cicatrização de feridas em ratos diabéticos. A suplementação com proteína whey restaurou as citocinas inflamatórias (IL 1b, TNFa), necessárias para iniciar os estágios iniciais da cicatrização, em níveis semelhantes aos dos animais controle. Ratos diabéticos também apresentam aumento do estresse oxidativo. A suplementação proteica de soro do leite reduziu o estresse oxidativo nestes animais, uma vez que diminuiu os níveis de MDA, ERO, NO e aumentou os níveis de GSH no tecido lesado (EBAID et al., 2011).

Em consonância com a literatura, no atual experimento ocorreu aumento nos níveis de GSH nos homogenatos do córtex pré-frontal, hipocampo e do corpo estriado nos animais de meia-idade mais velhos tratados com leite. Entretanto somente no hipocampo o resultado foi robusto, uma vez que não houve sobreposição dos intervalos de confiança.

Sabe-se que o envelhecimento se associa intimamente com o aumento das condições de pró-inflamação. A “hipótese da inflamação molecular do envelhecimento” foi proposta para destacar a mudança relacionada à idade no equilíbrio redox celular para o estado pró-inflamatório (CHUNG et al., 2002). A estimulação sustentada de ERO, espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de cloreto causam inflamação crônica, que é caracterizada pela infiltração de várias células inflamatórias migratórias, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos (HALLIWELL, GUTTWERIDGE, 2015).

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima que pertence à família das oxidoredutases, é um dos componentes do sistema antibacteriano em neutrófilos e monócitos, denominado sistema mieloperoxidase, que participa da resposta inflamatória em múltiplos locais no corpo, através da produção de oxidantes potentes, incluindo ácido hipocloroso, radical tirosil e dióxido de nitrogênio, que atuam como um sistema bactericida contra organismos invasores (DELPORTE et al., 2014). No entanto, a formação descontrolada desses compostos oxidantes leva à oxidação de proteínas (HAZELL et al., 1996; WOODS; LINTON; DAVIES, 2003) e à peroxidação lipídica (CARR; FREI, 2001; KOSTYUK et al., 2003) que, por sua vez, causam danos em células e tecidos. A atividade da MPO se eleva durante o envelhecimento e pode ser causada pelo aumento do recrutamento de células inflamatórias ativadas em locais

inflamatórios ou pelo aumento da atividade da MPO nas células recrutadas (SON et al., 2005).

As ERO estão envolvidas no mecanismo aeróbico de morte celular por neutrófilos e monócitos, portanto a mieloperoxidase pode aumentar o estresse oxidativo e, assim, afetar a atividade antioxidante dos fluidos corporais (POKORSKA et al., 2017).

Por outro lado, Taeho (2018) mostrou que uma menor quantidade ou a falta de MPO também pode provocar um aumento no metabolismo de oxigênio e, portanto, uma produção maior que o normal de espécies reativas de oxigênio (TAEHO, 2018). Marchett e colaboradores (2004) determinaram que, em humanos, uma falta parcial ou total de MPO causa uma maior suscetibilidade à infecção e aumenta o risco de câncer (MARCHETTI et al., 2004).

No presente estudo houve aumento da atividade de MPO no hipocampo e corpo estriado dos camundongos de meia-idade mais velhos que, receberam o leite acrescido da emulsão lipídica de ômega, em relação aos camundongos que receberam leite ou água. Houve também aumento da atividade de MPO no córtex pré-frontal desses camundongos em relação aos animais do grupo controle. É importante observar que, conforme descrito anteriormente, através da medida de TBARS, não houve aumento da peroxidação lipídica neste grupo nos homogenatos estudados. Portanto o aumento da atividade da MPO nos camundongos de meia-idade mais velhos que receberam leite acrescido da emulsão lipídica não foi associado ao aumento da peroxidação lipídica nesse grupo.

Os achados do aumento da MPO com o envelhecimento também foram reportados por Son e colaboradores (2005). Os autores evidenciaram que tanto a atividade como o nível proteico de MPO foram aumentados em ratos alimentados com ração ad libitum durante o envelhecimento (SON et al., 2005). Em consonância com a literatura, também foi observado o aumento da MPO nos homogenatos do hipocampo nos animais de meia-idade mais velhos em relação aos animais de meia-idade mais novos, no grupo controle. Contudo, resultado contraditório foi observado no homogenato do corpo estriado, onde observou-se diminuição da atividade da MPO nos animais de meia-idade mais velhos em comparação aos de meia-idade mais novos nesse grupo.

Os neutrófilos são geralmente as primeiras células a serem recrutadas para o local da inflamação onde exercem funções importantes, incluindo fagocitose e morte de microrganismos invasores (AMULIC; HAYES, 2015). Os neutrófilos são também uma importante fonte de mediadores lipídicos, incluindo ácido araquidônico (lipoxinas, leucotrieno B₄, prostaglandina D₂, prostaglandina E₂, prostaglandina F₂ e ácidos hidroxicicosatetraenóico), EPA (ie resolvina E₂ e 12-HEPE) e metabolitos DHA (ie resolvina D₁, 14 HDHA e 17-HDHA) (DALLI; SERHAN, 2012). Estas moléculas ativas proteicas e lipídicas são diferencialmente produzidas e liberadas pelos neutrófilos. São necessários não apenas para a amplificação da inflamação inicial, mas também desempenham um papel importante na regulação das respostas imunes adaptativas por meio da modulação do recrutamento e ativação das células dendríticas e das respostas das células T e B (MANTOVANI et al., 2011; TECCHIO; CASSATELLA, 2014) e no processo de resolução / regeneração que segue a inflamação (DALLI; SERHAN, 2012; SERHAN, 2014). Assim, neutrófilos contribuem para a geração de mediadores anti-inflamatórios, pró-regenerativos e pró-resolução (isto é, resolvinas, protectinas e factores de crescimento tais como factor de crescimento endotelial vascular e factor de crescimento de fibroblastos) (RODRIGUES et al., 2016).

Já os PUFA ω -3 inibem o recrutamento e o acúmulo de neutrófilos durante a inflamação, efeito que envolve ações nas células endoteliais, neutrófilos e provavelmente em outras células que participam do processo inflamatório (RODRIGUES et al., 2016). PUFA ω -3 e seus metabolitos também podem modular a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos. Em neutrófilos estimulados ou não estimulados, o EPA e o DHA aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (PASCHOAL et al., 2013). Neutrófilos incubados com DHA, mas não EPA, mostraram uma melhora em suas atividades fagocíticas e fungicidas (PASCHOAL et al., 2013). Pisani e colaboradores (2009) descreveram um aumento na atividade fagocítica de neutrófilos incubados com DHA ou EPA (PISANI et al., 2009). É notável que haja um grande número de estudos bem conduzidos, focados em ácidos graxos ω -3 e inflamação, contudo há um número escasso de investigações sobre neutrófilos, as principais células envolvidas na primeira fase da resposta inflamatória (RODRIGUES et al., 2016).

O PUFA ω -6 ácido linoléico é reconhecido como um ácido graxo pró-inflamatório associado à indução ou à perpetuação de doenças inflamatórias, como aterosclerose (MICHAS; MICHA; ZAMPELAS, 2014), obesidade (MASOODI et al., 2015) e artrite (MOONEY et al., 2011). Essa suposição, no entanto, tem sido contestada por estudos recentes (JOHNSON; FRITSCH, 2012). Em uma revisão sistemática de ensaios controlados randomizados, Johnson e Fritsche (2012) mostraram que o tratamento com ácido linoleico não aumenta a concentração plasmática de marcadores inflamatórios (JOHNSON; FRITSCH, 2012).

Alguns autores apontam que o ácido linoléico pode ter ação bifásica na inflamação, especificamente nos neutrófilos. Inicialmente, o ácido linoleico induz respostas pró-inflamatórias, ajudando o corpo a lutar contra o fator indutor de lesão. Em um estágio posterior, no entanto, o ácido linoléico diminui a produção de fatores pró-inflamatórios, e algumas vezes favorece a produção de moléculas de resolução. É provável que essa resposta dupla tenha um papel fundamental no controle da inflamação e na redução do dano tecidual (MANTOVANI et al., 2011; TECCHIO; CASSATELLA, 2014; DALLI; SERHAN, 2012; SERHAN, 2014; RODRIGUES et al., 2016)

Outros estudos in vivo com ácido oleico (MUFA ω -9) sugerem que ele provoca o aumento do recrutamento de neutrófilos. Em um modelo de lesão pulmonar, a injeção intratraqueal de ácido oleico (10 mg / kg de peso corporal) induziu intenso recrutamento de neutrófilos nas primeiras 6 horas e retorno aos níveis basais após 48 h (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2012). A administração oral de ácido oleico puro (0,22g / Kg de peso corporal) também induziu o recrutamento de neutrófilos em ratos em um modelo de bolsa de ar (RODRIGUES et al., 2010). Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da liberação de CXCL3 (Cytokine inducing-neutrophil chemoattractant-3) e da interação neutrófilo-endotélio (RODRIGUES et al., 2016). Padovese e colaboradores (2009) observaram que o ácido oleico elevou a fagocitose (60%) e aumentou a capacidade (30%) de neutrófilos após 30 min de incubação. Estes resultados foram acompanhados por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio via ativação da NADPH oxidase. Assim, o ácido oleico parece melhorar a destruição de microrganismos pelos neutrófilos (PADOVESE;

CURI, 2009). Mais estudos são necessários para esclarecer totalmente essa questão, seja *in vitro* ou *in vivo*.

Portanto, considerando todos esses dados, uma hipótese para os presentes achados, sobre o aumento da atividade de MPO nos animais de meia-idade mais velhos que receberam leite acrescido da mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9, seria da possível influência desses ômega na manutenção da competência neutrofílica durante o envelhecimento, associado ao recrutamento de neutrófilos provocado pelo MUFA ω -9. Associado a isso, as propriedades antioxidantes desses lipídeos preveniram a formação de espécies reativas de oxigênio, formadas a partir da ativação desses neutrófilos.

A suplementação do leite desnatado, sem lactose, enriquecido com uma mistura a 3% de óleos ω -3, ω -6 e ω -9, em proporção que conferiu propriedades anti-inflamatória e antioxidante à mistura, mostrou-se promissora como opção nutracêutica para proteção da neurodegeneração que acontece com o processo de envelhecimento.

Sendo assim, futuras pesquisas devem ser realizadas visando determinar em quais doses a ingestão diária do mix de óleos confere as propriedades neuroprotetoras, bem como elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo, estudando-se para isso o efeito da mistura dos óleos sobre a morfologia neuronal durante o envelhecimento, pela coloração Golgi-cox, bem como determinando o efeito dos óleos na modulação da expressão das proteínas quinases, como o NF κ B, a Caspase 3 e o Ki67, que estão relacionadas à inflamação, à apoptose e ao estresse oxidativo, respectivamente, que pode ocorrer durante o envelhecimento. Também sugere-se estudar o efeito da mistura desses óleos essenciais sobre o encurtamento dos telômeros que ocorre no processo de envelhecimento.

7. CONCLUSÕES

- 1- Com o envelhecimento há um aumento do comportamento depressivo. A suplementação crônica do leite com a mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9 promove menor comportamento do tipo depressivo em animais de meia-idade mais velhos. A ingestão do leite com ou sem a mistura dos óleos protege contra o comportamento anedônico associado ao envelhecimento.
- 2- O envelhecimento e a ingestão crônica da mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9 promovem melhor atividade de comportamento exploratório em relação ao número de levantamentos de patas em animais de meia idade.
- 3- A ingestão do leite com ou sem a mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9 proporciona efeito neuroprotetor nos animais de meia-idade mais novos, pela menor peroxidação lipídica nos tecidos do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Já a mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9 promove nos animais de meia-idade mais velhos menor nível de peroxidação lipídica no corpo estriado em relação aos animais do grupo controle.
- 4- A administração da mistura de óleos ω -3, ω -6 e ω -9 resulta em aumento da atividade de MPO no hipocampo e no corpo estriado dos camundongos de meia-idade mais velhos, sem promover aumento da peroxidação lipídica neste grupo nos homogenatos estudados.

REFERÊNCIAS

- AARAK, K. E. et al. The impact of meal composition on the release of fatty acids from salmon during in vitro gastrointestinal digestion. **Food and Function**, v. 4, n. 12, p. 1819–1826, 2013.
- ACTIS-GORETTA, L. et al. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 924–933, 2013.
- AKIYAMA, H. et al. **Inflammation and Alzheimer's**. [s.l.: s.n.]. v. 21
- AMULIC, B.; HAYES, G. Neutrophil Extracellular Traps (NETs). **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 41, 2015.
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E. 05. Andreyev, Kushnareva and Starkov- Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. v. 70, n. 2, p. 200–214, 2005.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARSENAULT, D. et al. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- BÄCKMAN, L. et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 6, p. 791–807, 2006.
- BARRETO, J. E. F.; PONTE E SILVA, L. Sistema limbico e as emoções - Uma revisão anatômica. **Revista Neurociências**, v. 18, n. 3, p. 386–394, 2010.
- BERBERT, A. A. et al. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 131–136, 2005.
- BOUSQUET, M.; CALON, F.; CICHETTI, F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 4, p. 453–463, 2011.
- BREUER, S. et al. Regulation of stearoyl-CoA desaturase-1 after central and peripheral nerve lesions. **BMC Neuroscience**, v. 5, p. 1–9, 2004.
- BROWER V. Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? **Nat Biotechnol**. 1998;16:728-731.
- BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to fatty acids and lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 1–16, 2015.
- CAPPA, M. et al. A mixture of oleic, erucic and conjugated linoleic acids

- modulates cerebrospinal fluid inflammatory markers and improve somatosensorial evoked potential in X-linked adrenoleukodystrophy female carriers. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 5, p. 899–907, 2012.
- CARDOSO, H. D. et al. Omega-3 deficiency and neurodegeneration in the substantia nigra: Involvement of increased nitric oxide production and reduced BDNF expression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 6, p. 1902–1912, 2014.
- CARR, A. C.; FREI, B. The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H₂O₂/Cl⁻-mediated modification of low density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1822–1828, 2001.
- CASTRO-COSTA, E. et al. Cognitive function among older adults: ELSI-Brazil results. **Revista de Saude Publica**, v. 52, p. 1–9, 2018.
- CAVALCANTE, Beatriz Torres de Melo. Pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 na artrite aguda induzida por zymosan em ratos. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.
- CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 4, p. 264–272, 2002.
- CINTRA, D. E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- COLL, T. et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11107–11116, 2008.
- COLUCCIA, A. et al. Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 599–605, 2009.
- CURI, R. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos. 2002.
- D.C., S. et al. Perspectives on depression, mild cognitive impairment, and cognitive decline. *Archives of General Psychiatry*, v. 63, n. 2, p. 130–138, 2006.
- D'AMBROSIO, D. N.; CLUGSTON, R. D.; BLANER, W. S. Vitamin A metabolism: An update. **Nutrients**, v. 3, n. 1, p. 63–103, 2011.
- DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A_{2a} receptor antagonists

prevent β -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. **Blood**, v. 120, n. 15, p. e60–e72, 11 out. 2012.

DELPORTE, C. et al. Impact of myeloperoxidase-LDL interactions on enzyme activity and subsequent posttranslational oxidative modifications of apoB-100. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 4, p. 747–757, 2014.

DENIS, I. et al. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 579–594, 2013.

CURI, Rui. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos. 2002.

DIMOPOULOS, N. et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochemical Journal**, v. 399, n. 3, p. 473–481, 2006.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993.

DYERBERG, J. Linolenate-derived Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Atherosclerosis. **Nutrition Reviews**, v. 44, n. 4, p. 125–134, 1986.

EBAID, H. et al. Whey protein enhances normal inflammatory responses during cutaneous wound healing in diabetic rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 235, 2011.

ECKERT, G. P.; LIPKA, U.; MULLER, W. E. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: Focus on mitochondria. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, n. 1, p. 105–114, 2013.

ELLULU, M. S. et al. Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 2–3, p. 79–89, 2015.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2986–3008, 2007.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Modulation of inflammation in brain: A matter of fat. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 3,

p. 577–599, 2007.

FAVA, M. et al. Major Depressive Subtypes and Treatment Response. **Biological psychiatry**, v. 42, n. 7, p. 568–576, 1997.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. et al. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 438–450, 2012.

FERRAZ, A. C. et al. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 78, n. 3, p. 183–188, 2008.

FERRAZ, A. C. et al. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 1, p. 116–122, 2011.

FISHER, L. B. et al. The Role of Anger/Hostility in Treatment-Resistant Depression. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 203, n. 10, p. 762–768, 2015.

FLEISHER, D. et al. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n. 3, p. 233–254, 1999.

FONSECA, R. P. et al. Episodic memory, concentrated attention and processing speed in aging: A comparative study of Brazilian age groups. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 4, n. 2, p. 91–97, 2016.

FORTIN, M. et al. Multimorbidity and quality of life in primary care: A systematic review. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 2, 2004.

FOTUHI, M.; MOHASSEL, P.; YAFFE, K. Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: A complex association. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 5, n. 3, p. 140–152, 2009.

GAD, A. S. et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. **Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 582–589, 2011.

GILCA, M. et al. The oxidative hypothesis of senescence. **Journal of postgraduate medicine**, v. 53, n. 3, p. 207, 2007.

GLASS, C. K. et al. Nihms-202136.Pdf. v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F. et al. Oleic Acid Induces Lung Injury

in Mice through Activation of the ERK Pathway. *Mediators of Inflammation*, v. 2012, p. 1–11, 2012.

GURR, M. I. et al. *Lipid biochemistry*. Oxford: Blackwell Science, 2002.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. *Journal of comparative psychology*, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1941.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA, 2015.

HAZELL, L. J. et al. *Hazelle-jci-1996*. p. 1–10, 1996.

HEIMER, L.; VAN HOESEN, G. W. The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. ***Neuroscience and Biobehavioral Reviews***, v. 30, n. 2, p. 126–147, 2006.

HENEKA, M. T.; RODRÍGUEZ, J. J.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia in neurodegeneration. ***Brain Research Reviews***, v. 63, n. 1–2, p. 189–211, 2010.

HERRERA-PÉREZ, J. J.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. ***Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry***, v. 32, n. 8, p. 1798–1803, 2008.

HOOIJMANS, C. R. et al. DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. ***Neurobiology of Disease***, v. 33, n. 3, p. 482–498, 2009.

HUANG, S. Y. et al. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. ***Journal of Psychiatric Research***, v. 42, n. 1, p. 58–63, 2008.

HURST, S. et al. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. ***Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology***, v. 3, n. 4, p. 469–489, 2007.

HUSTED, K. S.; BOUZINOVA, E. V. The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. ***Medicina (Lithuania)***, v. 52, n. 3, p. 139–147, 2016.

HUWILER, A.; PFEILSCHIFTER, J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. ***Pharmacology and Therapeutics***, v. 124, n. 1, p. 96–112, 2009.

HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. ***Annual Review of Neuroscience***, v. 29, n. 1, p. 565–598, 2006.

- JAMES, M. J. Effect of dietary supplementation with n-9 eicosatrienoic acid on leukotriene B4 synthesis in rats: a novel approach to inhibition of eicosanoid synthesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 2261–2265, 2004.
- JOHNSON, G. H.; FRITSCHE, K. Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 7, p. 1029- 1041.e15, 2012.
- KHANDELWAL, P. J.; HERMAN, A. M.; MOUSSA, C. E. H. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. **Journal of Neuroimmunology**, v. 238, n. 1–2, p. 1–11, 2011.
- KIEN, C. L. et al. Substituting dietary monounsaturated fat for saturated fat is associated with increased daily physical activity and resting energy expenditure and with changes in mood...[corrected] [published erratum appears in AM J CLIN NUTR 2013 Aug;98(2):511]. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 689–697, 2013.
- KINDERMAN, P. Explainer: what is the DSM. The Conversation Australia. The Conversation Media Group. Retrieved, v. 21, 2013.
- KOSTYUK, V. A. et al. Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. **FEBS Letters**, v. 537, n. 1–3, p. 146–150, 2003.
- KREGEL, K. C.; ZHANG, H. J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R18–R36, 2007.
- LAKHWANI, L. et al. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 64, n. 3, p. 271–276, 2007.
- LEBBADI, M. et al. Endogenous conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids improves neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 27, n. 4, p. 853–869, 2011.
- LEDESMA, M. D.; MARTIN, M. G.; DOTTI, C. G. Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 23–35, 2012.
- LOEF, M.; WALACH, H. The Omega-6/Omega-3 Ratio and Dementia or

Cognitive Decline: A Systematic Review on Human Studies and Biological Evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v. 32, n. 1, p. 1–23, 2013.

LOTRICH, F. E. et al. Labile anger during interferon alfa treatment is associated with a polymorphism in tumor necrosis factor α . **Clinical Neuropharmacology**, v. 33, n. 4, p. 191–197, 2010.

LUCHTMAN, D. W.; SONG, C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 550–565, 2013.

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 126, p. 1–9, 2017.

LUO, C. L. et al. Lipoxin A 4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1502, p. 1–10, 2013.

MAERCKER, A. et al. Adjustment disorders, posttraumatic stress disorder, and depressive disorders in old age: findings from a community survey. **Comprehensive Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 113–120, 2008.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MAO, Q. Q. et al. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. **Behavioural Brain Research**, v. 261, p. 140–145, 2014.

MARCHETTI, C. et al. Genetic studies on myeloperoxidase deficiency in Italy. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 57, n. 5, p. 14–16, 2004.

MARTIN, H. A. et al. Leukotriene B4 decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 60, n. 2, p. 438–445, 2017.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of clinical pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 620–43, 2002.

MARTINOTTI, G. et al. Anhedonia and Reward System: Psychobiology, Evaluation, and Clinical Features. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 03, n. 07, p. 697–713, 2013.

- MASOODI, M. et al. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 503–518, 2015.
- MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS NETO, T. L. Atividade física e envelhecimento: aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 7, n. 1, p. 2-13, 2001.
- MAURICE, T.; LOCKHART, B. P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Research*, v. 706, n. 2, p. 181–193, 1996.
- MCCLEMENTS, D. J. et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. [s.l: s.n.]. v. 49
- MCCLEMENTS, D. J. Utilizing food effects to overcome challenges in delivery of lipophilic bioactives: structural design of medical and functional foods. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 10, n. 12, p. 1621–1632, 2013.
- MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Excipient foods: Designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food and Function*, v. 5, n. 7, p. 1320–1333, 2014.
- MCINTOSH, G. H. et al. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 4, p. 809-816, 1995.
- MELO, R. B. et al. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 29, n. 6, p. 371–375, 2014.
- MICHAEL-TITUS, A. T.; PRIESTLEY, J. V. Omega-3 fatty acids and traumatic neurological injury: From neuroprotection to neuroplasticity? *Trends in Neurosciences*, v. 37, n. 1, p. 30–38, 2014.
- MICHAS, G.; MICHA, R.; ZAMPELAS, A. Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*, v. 234, n. 2, p. 320–328, 2014.
- MITCHELL, R. W.; HATCH, G. M. Fatty acid transport into the brain: Of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 85, n. 5, p. 293–302, 2011.
- MOELANTS, K. R. N. et al. Relation between particle size and carotenoid bioaccessibility in carrot- and tomato-derived suspensions. *Journal of Agricultural*

and Food Chemistry, v. 60, n. 48, p. 11995–12003, 2012.

MOONEY, R. A. et al. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Research and Therapy*, v. 13, n. 6, p. R198, 2011.

MURRAY, B.; FITZGERALD, R. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, n. 8, p. 773–791, 2007.

NODA, Y. et al. Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, v. 116, n. 5, p. 2531–2537, 1995.

NUNES, B. P. et al. Multimorbidity and mortality in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 67, p. 130–138, 2016.

NUNES, B. P. et al. Multimorbidity: The Brazilian Longitudinal Study of Aging (ELSI-Brazil). *Revista de Saude Publica*, v. 52, p. 1–12, 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OKSMAN, M. et al. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, v. 23, n. 3, p. 563–572, 2006.

ORR, S. K.; TRÉPANIÉ, M. O.; BAZINET, R. P. N-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 88, n. 1, p. 97–103, 2013.

PADOVESE, R.; CURI, R. Modulation of rat neutrophil function in vitro by cis- and trans-MUFA. *British Journal of Nutrition*, v. 101, n. 9, p. 1351–1359, 2009.

PAN, J. P. et al. Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. *Brain Research*, v. 1412, p. 18–27, 2011.

PARK, Y.; MOON, H. J.; KIM, S. H. N-3 polyunsaturated fatty acid consumption produces neurobiological effects associated with prevention of depression in rats after the forced swimming test. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, n. 8, p. 924–928, 2012.

PASCHOAL, V. A. et al. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA)

acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. *Lipids*, v. 48, n. 2, p. 93–103, 2013.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, n. 9, p. 1958–1964, 2011.

PAWEŁCZYK, T. et al. Omega-3 fatty acids in first-episode schizophrenia - A randomized controlled study of efficacy and relapse prevention (OFFER): Rationale, design, and methods. *BMC Psychiatry*, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2015.

PEREZ, S. E. et al. DHA diet reduces AD pathology in young APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mice: Possible gender effects. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88, n. 5, p. 1026–1040, 2010.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 11, p. 1306–1314, 2006.

PISANI, L. F. et al. In vitro modulatory effect of ω -3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 131, n. 1–2, p. 79–85, 2009.

POKORSKA, J. et al. Effect of g.9476869G>A myeloperoxidase (MPO) gene polymorphism on the antioxidant activity of milk from Polish Holstein-Friesian cows of the Black-and-White variety (HO). *Journal of Dairy Research*, v. 84, n. 2, p. 159–164, 2017.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 3, p. 231–248, 2007.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 6, p. 625–637, 2008.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress. v. 88, n. 4, p. 1243–1276, 2010.

PRATICÒ, D. et al. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 12, p. 4183–7, 2001.

PULLI, B. et al. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

- RADI, R. et al. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. *The Journal of biological chemistry*, v. 266, n. 7, p. 4244–4250, 1991.
- REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 75, n. 3, p. 588–602, 2013.
- RIMBACH, G. et al. Effect of dietary phytate and microbial phytase on mineral and trace element bioavailability - a literature review. *Institute of Human Nutrition and Food Science, Christian Albrechts University Kiel, Germany; Institute of Animal Nutrition and Nut. Current topics in nutraceutical research*, v. 6, n. 3, p. 131–144, 2008.
- RODRIGUES, H. G. et al. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *European Journal of Pharmacology*, v. 785, p. 50–58, 2016.
- RUIPÉREZ, V.; DARIOS, F.; DAVLETOV, B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in Lipid Research*, v. 49, n. 4, p. 420–428, 2010.
- RUTERING, J. et al. Myocardial extraction HHS Public Access. v. 5, n. 6, p. 1–8, 2016.
- RYAN, A. et al. Multimorbidity and functional decline in community-dwelling adults: A systematic review. *Health and Quality of Life Outcomes*, v. 13, n. 1, 2015.
- SALES, C.; OLIVIERO, F.; SPINELLA, P. The mediterranean diet model in inflammatory rheumatic diseases. *Reumatismo*, v. 61, n. 1, p. 10–14, 2013.
- SALTHOUSE, T. A. Selective review of cognitive aging - ProQuest. v. 16, n. 5, p. 754–760, 2013.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, v. 141, n. 2, p. 1472–1480, 2013a.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*, v. 139, n. 1–4, p. 878–884, 2013b.
- SANCHES YASSUDA, M.; LASCA, V. B.; NERI, A. L. Meta-memória e Auto-eficácia: Um Estudo de Validação de Instrumentos de Pesquisa sobre Memória e Envelhecimento. *Metamemory and Self-efficacy: A Validation Study of Research Instruments in Memory Aging*. v. 18, n. 1, p. 78–90, 2005.
- SEDLAK JOZEF AND LINDSAY RAYMOND. Estimation Sulfhydryl JOZEF.

- Analytical Biochemistry, v. 205, n. 25, p. 192–205, 1968.
- SERHAN, C. N. for Resolution Physiology. v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.
- SIDHU, V. K. et al. Role of DHA in aging-related changes in mouse brain synaptic plasma membrane proteome. *Neurobiology of Aging*, v. 41, p. 73–85, 2016.
- SINCLAIR, A. J. et al. Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, v. 16 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 391–7, 2007.
- SIRIWARDHANA, N. et al. N-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- κ B-dependent mechanisms. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, n. 12, p. 1661–1667, 2012.
- SMITH, O. R. F. et al. Somatic depression predicts mortality in chronic heart failure: Can this be explained by covarying symptoms of fatigue? *Psychosomatic Medicine*, v. 74, n. 5, p. 459–463, 2012.
- SON, T. A. E. G. E. N. et al. Aging effect on myeloperoxidase in rat kidney and its modulation by calorie restriction. v. 39, n. March, p. 283–289, 2005.
- SUAREZ, E. C.; LEWIS, J. G.; KUHN, C. The relation of aggression, hostility, and anger to lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor (TNF)- α by blood monocytes from normal men. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 16, n. 6, p. 675–684, 2002.
- SUBLETTE, M. E. et al. Meta-analysis: Effects of Eicosapentaenoic Acid in Clinical Trials in Depression NIH Public Access \$watermark-text \$watermark-text \$watermark-text. *J Clin Psychiatry*, v. 72, n. 12, p. 1577–1584, 2011.
- SUN, V. I.; OBERLEY, L.; U', V. 497 2Present address: Radiation Research Laboratory, 14 Medical Laboratories, The University of Iowa. *Clinical Chemistry*, v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988.
- SUN, X. et al. Effects of dairy compared with soy on oxidative and inflammatory stress in overweight and obese subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, p. ajcn.2009.28468, 2009.
- SUPHIOGLU, C. et al. The omega-3 fatty acid, DHA, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. *FEBS Letters*, v. 584, n. 3, p. 612–618, 2010.
- TAEHO, L. From www.bloodjournal.org by guest on June 5, 2018. For personal use only. *Pathogenic*. v. 74, n. 4, p. 1360–1367, 2018.

TECCHIO, C.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. *Chemical Immunology and Allergy*, v. 99, p. 123–137, 2014.

TRANG, T. et al. Involvement of spinal lipoxygenase metabolites in hyperalgesia and opioid tolerance. *European Journal of Pharmacology*, v. 491, n. 1, p. 21–30, 2004.

V. STAZIAKI, P. et al. Fish Oil has Beneficial Effects on Behavior Impairment and Oxidative Stress in Rats Subjected to a Hepatic Encephalopathy Model. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 12, n. 1, p. 84–93, 2013.

VAHIDY, W. H. et al. Effects of intracerebroventricular injections of free fatty acids, lysophospholipids, or platelet activating factor in a mouse model of orofacial pain. *Experimental Brain Research*, v. 174, n. 4, p. 781–785, 2006.

WANG, X. et al. Effects of n-3 FA supplementation on the release of proresolving lipid mediators by blood mononuclear cells: the OmegAD study. *Journal of Lipid Research*, v. 56, n. 3, p. 674–681, 2015.

WAYNER, D. D. M. et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *BBA - General Subjects*, v. 924, n. 3, p. 408–419, 1987.

WEN, H. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology*, v. 12, n. 5, p. 408–415, 2011.

WOODS, A. A.; LINTON, S. M.; DAVIES, M. J. Matrix of Human Atherosclerotic Plaques. *Society*, v. 735, p. 729–735, 2003.

YAMASHIMA, T. PUFA-GPR40-CREB signaling hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Progress in Lipid Research*, v. 51, n. 3, p. 221–231, 2012.

YILDIZ, D. et al. Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 37, n. 4, p. 434–439, 1999.

ZIPP, F.; AKTAS, O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, v. 29, n. 9, p. 518–527, 2006.

APÊNDICE A – TESTES COMPORTAMENTAIS (DADOS BRUTOS)**TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NOVOS – TEMPO 280 DIAS**

GC		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	80,2	63,04
2	14,81	4,63
3	41,84	13,78
4	37,2	2,71
5	14,14	4,6
6	18,46	12,12
7	38,14	6,59
8	3,62	2,54
9	23,97	1,52
10	20,11	9,4

GT1		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	27,3	35,55
2	58,33	38,16
3	55,25	19,11
4	36,78	9,3
5	23,75	39,64
6	93,42	38,99
7	51,72	15,46
8	50,34	45,01
9	44,81	24,9

GT2		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	44,41	14,87
2	19,73	29,14
3	19,05	186,81
4	124	15,77
5	31,95	35,84
6	58,4	25,9
7	35,5	14
8	68,45	28,62

TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NOVOS – TEMPO 400 DIAS

GC		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	42,68	52,41
2	91,13	22,68
3	48,05	37,38
4	57,75	10,94
5	64,48	27,57
6	65,37	44,19

GT1		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	105	18,05
2	56,52	13,13
3	81,24	34,37
4	43,64	5,68
5	91,72	33,14
6	110,74	10,05

GT2		
ANIMAL	OBJ NOVO (S)	OBJ ANTIGO (S)
1	63	25,65
2	54,74	13,29
3	68	16,95
4	151	9,67
5	81	33
6	74	22,49

TESTE DO NADO FORÇADO – TEMPO 280 DIAS

GC	
ANIMAL	TEMPO
1	109
2	8,51
3	6,31
4	101,78
5	48,13
6	2,46
7	31,4
8	0,48

GT1	
ANIMAL	TEMPO
1	70,89
2	107,21
3	62,76
4	58,71
5	108,51
6	19,74
7	131,76
8	25,19

GT2	
ANIMAL	TEMPO
1	99,06
2	160,12
3	100,88
4	107,95
5	90,51
6	121,67
7	173,13
8	51,16

TESTE DO NADO FORÇADO – TEMPO 400 DIAS

GC	
ANIMAL	TEMPO
1	106,37
2	157,53
3	51,33
4	64,09
5	65,44
6	25,08
7	148,66
8	118,5

GT1	
ANIMAL	TEMPO
1	182,95
2	72,07
3	145,09
4	55,2
5	30,09
6	10,32
7	0
8	0

GT2	
ANIMAL	TEMPO
1	69,41
2	54,95
3	24,19
4	52,75
5	0
6	75,22

TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE – TEMPO 280 DIAS

GC								
ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8
VOL ÁGUA INICIO	200	200	200	200	200	200	200	200
VOL ÁGUA FINAL	100	98	99	95	99	98	100	98
VOL CONSUMIDO	100	102	101	105	101	102	100	102
VOL SAC INICIO	100	100	100	100	100	100	100	100
VOL SAC FINAL	94	94	94	95	95	94	96	95
VOL CONSUMIDO	6	6	6	5	5	6	4	5

GT1								
ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8
VOL ÁGUA INICIO	100	100	100	100	100	100	100	100
VOL ÁGUA FINAL	100	98	98	99	97	100	98	98
VOL CONSUMIDO	0	2	2	1	3	0	2	2
VOL SAC INICIO	100	100	100	100	100	100	100	100
VOL SAC FINAL	95	96	94	96	92	94	96	96
VOL CONSUMIDO	5	4	6	4	8	6	4	4

GT2								
ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8
VOL ÁGUA INICIO	100	100	100	100	100	100	100	100
VOL ÁGUA FINAL	100	100	96	100	98	100	100	100
VOL CONSUMIDO	0	0	4	0	2	0	0	0
VOL SAC INICIO	100	100	100	100	100	100	100	100
VOL SAC FINAL	96	94	96	98	96	96	96	96
VOL CONSUMIDO	4	6	4	2	4	4	4	4

TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE – TEMPO 400 DIAS

GC						
ANIMAL	1	2	3	4	5	6
VOL ÁGUA INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL ÁGUA FINAL	198	198	199	198	199	199
VOL CONSUMIDO	2	2	1	2	1	1
VOL SAC INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL SAC FINAL	199	199	198	199	198	198
VOL CONSUMIDO	1	1	2	1	2	2

GT1						
ANIMAL	1	2	3	4	5	6
VOL ÁGUA INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL ÁGUA FINAL	200	200	200	200	200	200
VOL CONSUMIDO	0	0	0	0	0	0
VOL SAC INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL SAC FINAL	199	199	199	199	199	199
VOL CONSUMIDO	1	1	1	1	1	1

GT2						
ANIMAL	1	2	3	4	5	6
VOL ÁGUA INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL ÁGUA FINAL	200	200	200	200	200	200
VOL CONSUMIDO	0	0	0	0	0	0
VOL SAC INICIO	200	200	200	200	200	200
VOL SAC FINAL	192	192	192	192	192	192
VOL CONSUMIDO	8	8	8	8	8	8

TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO 280 DIAS

GC					
	CRUZAMENTO	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	34	31	44,32	3	8,71
2	67	7	7,38	7	27,9
3	46	15	30,93	1	0,88
4	57	10	47,63	2	3,6
5	46	10	14,42	1	1,39
6	40	8	45,71	3	3,25
7	34	11	101,66	4	35,78
8	67	13	14,38	4	6,73
9	54	16	31,7	2	5,54
10	57	4	6,83	8	9,41

GT1					
	CRUZAMENTO	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	84	18	23,71	13	6,08
2	64	7	7,39	5	9,56
3	44	11	27	6	54,58
4	33	12	20,96	5	11,69
5	56	16	28	6	17,72
6	43	13	8,14	8	26,19
7	48	17	57,27	4	4,09
8	64	7	6,28	15	32,26
9	46	18	41,03	9	33,4

GT2					
	CRUZAMENTO S	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	27	3	69	5	4,65
2	84	23	12,47	11	32,93
3	36	18	36	4	3,63
4	14	7	8,2	2	64,97
5	79	11	13,53	9	12,13
6	49	16	30	5	17,38
7	33	15	17	8	60,42
8	53	24	45	6	32,97

TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO 400 DIAS

GC					
	CRUZAMENTO	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	43	11	18,06	3	6,7
2	57	7	5,55	4	8,48
3	49	20	34,41	5	18,92
4	66	28	46,58	4	16,29
5	72	36	69	6	31,76
6	54	34	49,68	6	31,97

GT1					
	CRUZAMENTO	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	38	13	18,99	4	42
2	38	17	39,26	2	7,94
3	34	6	6,56	2	7,81
4	40	30	81	4	14,65
5	57	10	19,27	4	10
6	74	10	24,11	6	47,82

GT2					
	CRUZAMENTO	No LEV PATAS	T(s) LEV PATAS	No CENTRO	T(s) CENTRO
1	50	11	22	8	58
2	90	34	70	4	10,09
3	39	30	41,48	7	36,64
4	75	30	30,76	5	12,63
5	47	34	63	5	10,96
6	57	32	61	6	56

APÊNDICE B – TESTES BIOQUÍMICOS (DADOS BRUTOS)**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) – TEMPO 280 DIAS**

	GC			GT1			GT2		
	PF	HP	CE	PF	HP	CE	PF	HP	CE
1		275,49	277,271	100,91	216,703	196,216	103,582	215,812	165,932
2	177,511	466,994	244,315	93,784	303,993	640,683	120,506	193,544	176,621
3	163,26	320,916	561,409	120,506	577,442	184,637	230,064	239,861	168,604
4	110,708	469,666	275,49	94,675	195,326	179,293	120,506	190,872	182,856
5	206,014	375,25	230,954	175,73	279,944	111,599			
6	155,244	309,337	256,785	104,473					

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) – TEMPO 400 DIAS

	GC			GT1			GT2		
	PF	HP	CE	PF	HP	CE	PF	HP	CE
1	97,347	50,139	101,801	106,254	115,161	132,976		143,664	82,205
2	59,046	76,861	120,506	37,669	100,019	91,112	149,009	100,910	86,659
3	75,970	92,894	168,604	85,768	142,774	103,582	108,036	106,254	104,473
4	92,003	77,751	133,866	84,877	128,522	171,276	93,784	117,834	114,271
5	82,205	81,314	104,473	94,675	134,757	197,998	92,003	107,145	99,129
6	65,281	97,347	165,932	97,347	124,959	121,396	203,342	92,003	101,801
7	274,599	83,096	119,615	83,986	85,768	94,675			
8	148,118	101,801	238,971		208,686	83,986			

GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) – TEMPO 280 DIAS

	GC			GT1			GT2		
	PF	HC	CE	PF	HC	CE	PF	HC	CE
1	355,19	336,57		341,22	452,95	741,57	732,26	350,53	983,64
2	317,95	364,5	1379,3	350,53	830,02	676,4	327,26	601,91	550,71
3	341,22	327,26		341,22	336,57	611,22	308,64	555,36	760,19
4	331,91	350,53		345,88	1086,1	359,84	345,88	336,57	392,43
5	341,22	401,74		350,53	2175,4	802,09	317,95	317,95	327,26
6	359,84	425,02		313,29	317,95	308,64	313,29	327,26	378,47
7	322,6	303,98		322,6	317,95	317,95	322,6	355,19	341,22
8	303,98	345,88		317,95	336,57	345,88	331,91	345,88	336,57

GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) – TEMPO 400 DIAS

	GC			GT1			GT2		
	PF	HC	CE	PF	HC	CE	PF	HC	CE
1		718,29	1365,4		1947,3	2249,8		718,29	2617,6
2		1337,4	532,09	643,81	532,09	3213,5		1574,8	1472,4
3	425,02	1104,7	1109,3		1570,2	569,33		1202,4	1430,5
4	4288,8	1025,5	1630,7		1868,1	797,43		476,22	634,5
5	425,02	1397,9	1821,6	1239,7	1467,8	1835,5	1984,5	448,29	1025,5
6	434,33	643,81	1681,9	1323,5	1370	639,16		1044,2	1742,4
7		741,57	951,05	420,36	1104,7	1160,5			
8		1705,2	951,05		746,22	1928,6			

ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE – TEMPO 280 DIAS

	GC			GT1			GT2		
	PF	HC	CE	PF	HC	CE	PF	HC	CE
1	0,1770	0,0351	0,1270	0,1784	0,1257	0,2757	0,0514	0,0162	0,1284
2	0,9143	0,0673	0,2754	0,1889	0,0640	0,1889	0,3026	0,0673	0,2882
3	0,0559		0,3111	0,1148		0,1827	0,3881	0,0257	0,2552
4	0,0982	0,0428	0,3153	0,1505	0,1442	0,1204	0,1743	0,1236	0,1790
5	0,0793	0,1650	0,1814	0,2103	0,0529	0,4144	0,0076	0,0516	0,0101
6	0,0693	0,0554	0,0918	0,0416	0,0485	0,0243	0,0450	0,0554	0,0069

ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE – TEMPO 400 DIAS

	GC			GT1			GT2		
	PF	HC	CE	PF	HC	CE	PF	HC	CE
1	0,1365	0,0595	0,1014	0,0622	0,1176	0,0730	0,1838	0,2365	0,1905
2	0,1505	0,1297	0,0400	0,1297	0,0849	0,0737	0,2034	0,2306	0,3074
3	0,2461	0,1148	0,0302	0,0951	0,1434	0,0634	0,1555	0,2975	0,3714
4	0,0412	0,1505	0,1774	0,2234	0,1885	0,1204	0,2440	0,2551	0,2266
5	0,0730	0,0340	0,0567	0,1751	0,1474	0,1310	0,2683	0,2267	0,2191
6	0,0988	0,2270	0,1317	0,7190	0,1074	0,0572	0,4349	0,2807	0,0173
7	0,1430	0,1231	0,0572	0,0783	0,0298	0,1517			
8	0,1108	0,1743	0,0266		0,0487	0,1182			

ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

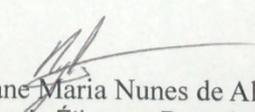
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 63/2013, sobre o projeto intitulado: **“O PAPEL DOS ÓLEOS ÔMEGA 3,6 E 9 EM MODELO DE NEUROPLASTICIDADE EM CAMUNGONGOS C57BL6”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 26 de setembro de 2013.

Fortaleza, 12 de dezembro de 2013


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE: 2166369