



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

**MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE CASADEVALL**

**SUPLEMENTAÇÃO COM MIX DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE MARCADORES  
OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS DE NEUROPLASTICIDADE EM  
CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**

**2019**

MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE CASADEVALL

SUPLEMENTAÇÃO COM MIX DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE MARCADORES  
OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS DE NEUROPLASTICIDADE EM  
CAMUNDONGOS

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-cirúrgicas, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutora em Ciências Médico-cirúrgicas.

Orientadora: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado

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)

---

- C1s      CASADEVALL, Meyssa Quezado de Figueiredo Cavalcante.  
          SUPLEMENTAÇÃO COM MIX DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 SOBRE MARCADORES OXIDATIVOS E  
          COMPORTAMENTAIS DE NEUROPLASTICIDADE EM CAMUNDONGOS / Meyssa Quezado de  
          Figueiredo Cavalcante CASADEVALL. – 2019.  
          109 f. : il. color.

Tese (doutorado) – 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. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Dieta. 2. Ácidos Graxos Poli-insaturados. 3. Ômega 3. 4. Alterações bioquímicas. 5. Golgi Cox.. I. Título.  
CDD 617

---

MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE CASADEVALL

SUPLEMENTAÇÃO COM MIX DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 A SOBRE MARCADORES  
OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS DE NEUROPLASTICIDADE EM  
CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-cirúrgicas, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-cirúrgicas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Ana Paula Fragoso de Freitas  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

---

Profa. Dra. Maria Helane Rocha Batista Gonçalves  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

Profa. Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico,

Aos meus pais, William Cavalcante e Angela Quezado de Figueiredo Cavalcante, exemplos de caráter, integridade e ética. Obrigada pelo amor, cuidado e zelo durante todos esses anos. Por acreditar, incentivar e oferecer apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu filho amado e presente de Deus na minha vida, Lucas Quezado, que tanto me motiva e inspira a ser melhor como pessoa. É através da sua vida que percebo o que realmente vale a pena.

A Paulo Deroci Casadevall Mazui Quezado, meu esposo, sempre ao meu lado, incentivando-me e dizendo que eu seria capaz quando eu mesma não acreditava que daria certo. Obrigada por sua parceria, dedicação e zelo com nossa família. Sou grata pela força, auxílio e por chegar em meio ao caos e me ensinar que a vida pode ser leve e cheia de amor.

Aos meus irmãos Ricardo Quezado de Figueiredo Cavalcante e William Quezado de Figueiredo Cavalcante e minha cunhada-irmã Camily Gomes Quezado por todo amor e carinho e pelo apoiado na concretização deste objetivo.

Aos meus sobrinhos Giovanna Cavalcante Quezado e Guilherme Cavalcante Quezado por todos os momentos felizes compartilhados.

## AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial aos coordenadores Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues (*in memoriam*) pelo apoio e incentivo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, agradeço pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade de realizar meu sonho da obtenção desse grau de Doutora.

A minha Co-orientadora Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado pela condução, agregando ainda mais conhecimento para conclusão dessa pesquisa.

A Maria Luciene Vieira de Oliveira, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e por nos conduzir todos esses anos. A você devo muitas oportunidades e a luz para situações que pareciam sem solução.

A Magda Maria Gomes Fontenele, secretária 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 e incentivo. Pelas orientações e conselhos durante esses anos, em momentos bons e também naqueles mais difíceis. Obrigada, Magda! Serei sempre grata por todo respeito, preocupação, cuidado e amizade.

Ao Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira pelas orientações, apoio e contribuições na finalização da pesquisa.

Aos professores membros da banca de Defesa: Profa. Dra. Maria Helane Rocha Batista Gonçalves, Profa. Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira e Profa. Dra. Ana Paula Fragoso de Freitas pelas relevantes contribuições.

A Empresa NVTRO e as nutricionistas, pela preparação das misturas de óleos e disponibilidade no auxílio a pesquisa.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pelo apoio para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho por me permitir realizar meu experimento no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM).

A Professora Dra. Geanne Matos de Andrade, sou imensamente grata por compartilhar comigo seu laboratório e pelas preciosas sugestões e orientações que abrilhantaram este trabalho.

A minha amiga Michele Albuquerque Jales de Carvalho que foi luz de Deus em um dos momentos mais angustiantes da minha pesquisa, me orientando e auxiliando na busca do conhecimento, estando comigo por muitas manhãs durante o tratamento dos animais. Obrigada por me ensinar com tanto cuidado e dedicação.

Ao Sr. Evanir Lima Gonçalves pelas informações, auxílio e orientação durante as análises da pesquisa.

Ao Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro responsável pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pelas orientações fornecidas durante a pesquisa.

Aos Drs. Marta Regina dos Santos Carmo e Nuno Carmo pela paciência e oportunidade dos ensinamentos relevantes para a pesquisa.

A Vilani Sousa, Pedro Everson Andrade de Aquino e Raica Candeias que participaram diretamente deste trabalho e me auxiliaram em todos os momentos para coleta de material para análise. Agradeço pela paciência e por pegar na minha mão, ensinando um pouco do que vocês sabem.

Aos alunos de graduação e pós-graduação do laboratório de Neurociência da Profa Dra. Geanne Matos pela parceria aos longos desses anos.

Ao Mestrando Adriano José Maia Chaves Filho pelas contribuições e disponibilidade em contribuir com a pesquisa.

A minha grande amiga Leidelamar de Oliveira pelo incentivo e por toda a ajuda fornecida.

As bolsistas de Iniciação Científica Michelle Verde Ramo Soares e Paloma Marinho Jucá pela disponibilidade, auxílio e condução nas técnicas laboratoriais.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com esta pesquisa.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



## RESUMO

### SUPLEMENTAÇÃO COM MIX DE ÔMEGAS 3, 6 E 9 A SOBRE MARCADORES OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS DE NEUROPLASTICIDADE EM CAMUNDONGOS.

Os ácidos graxos poli-insaturados são essenciais e as vitaminas lipossolúveis lipofílicas estão inseridas nas gorduras de alimentos naturais, exercendo papel essencial no metabolismo e fisiologia do organismo. O consumo dos ácidos graxos poli-insaturados pode promover a modificação desses fatores através da suplementação desses ácidos, embora ainda pouco explorados a utilização do  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9. Além disso, a suplementação pode favorecer processos neuronais e influenciar na resposta imune e inflamatória, auxiliando assim na prevenção de doenças. Contudo, este estudo avaliou a ação da suplementação com *mix* de ômega 3, 6 e 9 a 3% sob marcadores oxidativos, inflamatórios, bioquímicos e comportamentais em camundongos C57bl6 saudáveis. Foram utilizados 54 camundongos divididos em três grupos: controle alimentados com a dieta padrão e dois grupos testes alimentados com leite desnatado sem lactose ou leite desnatado sem lactose suplementado com 3% de gordura enriquecido com emulsão de ômega 3, 6 e 9. Os animais foram primeiramente divididos em três grupos ( $n=18$ /grupo) e em seguida subdividido dentro do próprio grupo com  $n=9$ /grupo alimentados durante 45 ou 60 dias. Após percorrido os dias da dieta, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação de memória e cognição (Teste *Y maze* e teste do labirinto aquático de Morris) e avaliação da atividade locomotora (teste do campo aberto). Após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram o hipocampo dissecado e armazenado a  $-80^{\circ}$  C para posterior análise do estresse oxidativo (TBARS e GSH), resposta inflamatória (MPO) e processados de acordo com o protocolo da técnica de Golgi Cox. Coletou-se sangue do plexo venoso retro orbital para realização de testes bioquímicos (Glicemia, AST, ALT, Ureia e Creatinina) e estresse oxidativo (TBARS e GSH). Observamos que a oferta de leite desnatado suplementado com mix de ômegas 3, 6 e 9 aumentou o comportamento de autolimpeza (*grooming*) e melhora da memória. A suplementação com o mix demonstrou um efeito antioxidante no hipocampo e no plasma. Por outro lado, os níveis de MPO foram mais elevados nos animais que receberam esse tipo de dieta. Em relação à toxicidade periférica, a suplementação provocou redução da concentração de AST e da glicemia e não causou diferenças nos níveis de ALT, ureia e creatinina. Foi observada uma possível ação protetora sobre as funções hepáticas e renais, e não influência nos marcadores de função renal. Além de demonstrar efeito protetor neuronal através do aumento da densidade neuronal, do comprimento dos dendritos e número de sinapses, após 45 e 60 dias de suplementação. Os resultados evidenciam os efeitos benéficos da suplementação com mix de ômegas no perfil de lipoproteínas, inflamatório e distúrbios neurológicos nos animais submetidos ao tratamento, nos quais podem prevenir diversos tipos de doenças, em especial as crônico-degenerativas como Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes e até mesmo o câncer. Para complementar os achados pré-clínicos, estudos clínicos e a avaliação das citotoxicidade desses compostos, podem sugerir novas estratégias de tratamento e confirmar os efeitos da suplementação com mix de omegas na qualidade de vida e prevenção de doenças.

**Palavras-chaves:** Dieta. Ácidos Graxos Poli-insaturados. Ômega 3. Alterações bioquímicas. Golgi Cox.

## ABSTRACT

### SUPPLEMENTATION WITH OMEGA MIX 3, 6 AND 9 A ON OXIDATIVE AND BEHAVIORAL OF NEUROPLASTIC MARKERS IN MICE.

Polyunsaturated fatty acids are essential and fat-soluble lipophilic vitamins are embedded in the fats of natural foods, playing an essential role in the body's metabolism and physiology. Consumption of polyunsaturated fatty acids may promote the modification of these factors by supplementing these acids, although the use of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -9 is still poorly explored. In addition, supplementation may favor neuronal processes and influence the immune and inflammatory response, thus aiding in disease prevention. However, this study evaluated the action of omega 3, 6, and 9 3% supplementation on oxidative, inflammatory, biochemical, and behavioral markers in healthy C57bl6 mice. Fifty-four mice were divided into three groups: control fed the standard diet and two test groups fed lactose-free skim milk or lactose-free skim milk supplemented with 3% fat enriched with omega 3, 6 and 9 emulsion. first divided into three groups (n = 18 / group) and then subdivided into the group itself with n = 9 / group fed for 45 or 60 days. After the days of diet, the animals were submitted to behavioral tests for memory and cognition evaluation (Y maze test and Morris water maze test) and locomotor activity evaluation (open field test). After the last behavioral test, the animals were euthanized by decapitation and had their hippocampus dissected and stored at  $-80^{\circ}$  C for further analysis of oxidative stress (TBARS and GSH), inflammatory response (MPO) and processed according to the protocol of the technique. Golgi Cox. Retroorbital venous plexus blood was collected for biochemical tests (Blood Glucose, AST, ALT, Urea and Creatinine) and oxidative stress (TBARS and GSH). We observed that the supply of skim milk supplemented with omega 3, 6 and 9 mix increased grooming behavior and improved memory. Mix supplementation demonstrated an antioxidant effect on hippocampus and plasma. On the other hand, MPO levels were higher in animals receiving this type of diet. Regarding peripheral toxicity, supplementation caused a reduction in AST and blood glucose concentration and did not cause differences in ALT, urea and creatinine levels. A possible protective action on liver and renal functions was observed, and no influence on markers of renal function. It also demonstrates neuronal protective effect by increasing neuronal density, dendrite length and number of synapses after 45 and 60 days of supplementation. The results show the beneficial effects of omega-mix supplementation on lipoprotein profile, inflammatory and neurological disorders in treated animals, which can prevent various types of diseases, especially chronic degenerative diseases such as Alzheimer's, multiple sclerosis, diabetes and even cancer. To complement preclinical findings, clinical studies, and the evaluation of cytotoxicity of these compounds, they may suggest new treatment strategies and confirm the effects of omega mix supplementation on quality of life and disease prevention.

**Keywords:** Diet. Polyunsaturated Fatty Acids. Omega 3. Biochemical alteration. Golgi Cox

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b> Exemplos de ácidos graxos saturado, monoinsaturado e poli-insaturado.....	20
<b>Figura 02</b> Fluxograma do Protocolo experimental.....	33
<b>Figura 03</b> Teste do Labirinto em Y ( <i>Y Maze</i> ).....	35
<b>Figura 04</b> Teste do labirinto aquático de Morris ( <i>Water Maze</i> ).....	36
<b>Figura 05</b> Teste do campo aberto ( <i>Open Field</i> ).....	37
<b>Figura 06</b> Imagem do Teste de Campo aberto com a camera de visão noturna infravermelho.....	37
<b>Figura 07</b> Protocolo de mensuração da mensuração de MDA.....	40
<b>Figura 08</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 no número de crossing (A) distancia total percorrida (B) número de rearing (C), número de grooming (D) e tempo de grooming (E) em camundongos C57BL6 saudáveis.....	44
<b>Figura 09</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 na porcentagem de alterações corretas no teste do Labirinto em Y pelos camundongos C57BL6 saudáveis.....	45
<b>Figura 10</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 no tempo de latência (A), número de entradas na área da plataforma (B) e distancia total percorrida (C) no teste do labirinto aquático de Morris porcentagem em camundongos C57BL6 saudáveis.....	49
<b>Figura 11</b> Variação da massa corpórea em camundongos C57BL6 saudáveis de acordo com tempo e tipo de dieta.....	50
<b>Figura 12</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de TBARS no hipocampo (A) e plasma (B) de camundongos C57BL6 saudáveis.....	52
<b>Figura 13</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações De GSH no hipocampo (A) e plasma (B) de camundongos C57BL6 saudáveis.....	54
<b>Figura 14</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 na atividade da MPO no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.....	56
<b>Figura 15</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações das transaminases AST (A) e ALT (B) no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.....	57

<b>Figura 16</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de Ureia (A) e Creatinina (B) no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.....	58
<b>Figura 17</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de glicose no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.....	60
<b>Figura 18</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre comprimento dos dendritos no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis .....	61
<b>Figura 19</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre quantidade de espículas dendriticas ( <i>Spines</i> ) no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.....	62
<b>Figura 20</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre densidade no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.....	63
<b>Figura 21</b> Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre densidade, comprimento e espículas dendriticas no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis utilizando a técnica de Golgi Cox.....	64
<b>Figura 22</b> Graphic abstract.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Relação dos grupos experimentais em estudo.....	32
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido Araquidônico
<b>AG</b>	Ácidos Graxos
<b>AcO</b>	Ácido Oléico
<b>ALA</b>	Ácido ( $\alpha$ ) Linolenico
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BHC</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética de Uso Animal
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DCNT</b>	Doenças Crônicas não Transmissíveis
<b>DHA</b>	Ácido Docosaheptaenoico
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPA</b>	Ácido Eicosapentaenoico
<b>EROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>Et al</i>	e Colaboradores
<b>FIG</b>	Figura
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>H2O2</b>	Peróxido de Hidrogênio

<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>Mg</b>	Micrograma
<b>mL</b>	mililitro
<b>ML</b>	Médio-lateral
<b>mm</b>	milímetros
<b>mm</b>	milimolar
<b>mM</b>	
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MUFAS</b>	Ácidos graxos monoinsaturados
<b>NPDM</b>	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
<b>PCR</b>	Proteína C-reativa
<b>PUFAS</b>	Ácidos Graxos Poli-insaturados
<b>RL</b>	Radicais Livres
<b>SFA</b>	Ácidos Graxos Saturados
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>PUFA</b>	Poli-insaturado ácidos graxos
<b>TBARS</b>	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
<b>TGO</b>	Transaminase Glutâmico Oxalacético
<b>TGP</b>	Transaminase Glutâmico Pirúvica
<b>UNIFOR</b>	Universidade de Fortaleza
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
®	Marca registrada
<b>ω-3</b>	Ômega 3

**$\omega$ -6**

**Ômega 6**

**$\omega$ -9**

**Ômega 9**



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	Considerações gerais .....	18
1.2	Lipídeos de importância fisiológica .....	19
1.3	Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs) e Ácidos Graxos Monoinsaturados (MUFAs) .....	22
1.4	PUFAs e MUFAs e suas relações com estresse oxidativo e alterações bioquímicas.....	25
1.5	A técnica de Golgi Cox como ferramenta de marcação neuronal.....	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivos gerais.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
<b>4</b>	<b>MÉTODO.....</b>	<b>31</b>
4.1	Animais.....	31
4.2	Dieta alimentar.....	31
4.3	Protocolo experimental.....	31
4.4	Determinações comportamentais.....	35
4.4.1	Teste do labirinto em Y.....	35
4.4.2	Teste do labirinto aquático de Morris (Water maze) .....	36
4.4.3	Teste do campo aberto.....	36
4.5	Determinações bioquímicas.....	38
4.5.1	Dosagem da glicose no plasma.....	38
4.5.2	Determinações de ureia e creatina e das transaminases TGO e TGP no plasma sanguíneo.....	38
4.6	Determinações do estresse oxidativo.....	38
4.6.1	Glutathiona reduzida (GSH).....	38
4.6.2	Peroxidação lipídica.....	39
4.7	Determinação da resposta inflamatória.....	40
4.7.1	Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	40
4.8	Determinações de ureia e creatina e das transaminases AST e ALT no plasma sanguíneo.....	41
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
6.1	Resultado da variação dos pesos .....	44

6.2	Resultados das alterações comportamentais.....	45
6.2.1	Teste do campo aberto.....	45
6.2.2	Teste do labirinto em y.....	48
6.2.3	Teste do labirinto aquático de Morris.....	49
6.3	Resultado das alterações oxidativas.....	51
6.3.1	TBARS.....	51
6.3.2	GSH.....	53
6.4	Resultados das alterações inflamatórias no tecido cerebral hipocampal.....	55
6.4.1	Atividade da MPO no hipocampo.....	55
6.5	Resultados das alterações bioquímicas.....	56
6.5.1	AST e ALT.....	56
6.5.2	Ureia e Creatinina .....	58
6.5.3	Glicemia.....	59
6.6	Técnica de Golgi Cox.....	60
6.6.1	Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre o comprimento do dendrito em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox.....	60
6.6.2	Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre as espículas dendríticas (Spines) em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox.....	61
6.6.3	Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre a densidade de neurônios em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox.....	62
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
	<b>APÊNDICE A – DADOS DOS TESTES DE CAMPO ABERTO.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE B - DADOS DOS TESTES DE WATER MAZE.....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE C - DADOS DOS TESTES DE Y MAZE.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE D – DADOS TÉCNICA DE GOLGI COX.....</b>	<b>101</b>
	<b>APÊNDICE E – FOTOS DAS LÂMINAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.....</b>	<b>107</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

A alimentação é algo indispensável a vida humana. É através dela que são adquiridas as vitaminas, proteínas e minerais essenciais para um funcionamento corporal adequado (MORATOYA *et al.*, 2013). Com o advento dos produtos industrializados a alimentação vem sofrendo significativas modificações. A globalização e modo de vida urbano onde não se tem tempo para o preparo de refeições, as indústrias encontraram oportunidade para investir em produtos alimentícios prontos e saborosos de fácil e rápido preparo. No entanto, o consumo desenfreado de produtos industrializados levou a dieta a um consumo excessivo de alimentos com grandes densidades energéticas, repletos de gorduras de má qualidade e carboidratos simples, deixando o essencial e saudável em segundo plano (DIEZ GARCIA, 2003).

Os nutrientes são as substâncias que configuram e constituem os alimentos. Possuem inúmeras funções orgânicas tais como: produção de energia (glicídios, lipídeos e proteínas), estruturação de tecidos (proteínas) bem como papel regulador das funções orgânicas no caso dos minerais e água junto as vitaminas (VILARTA *et.al.*, 2007).

Os hábitos alimentares, destacando o consumo de gordura, sempre atraíram atenção para alguns problemas como é o caso das doenças cardiovasculares. O foco para a adequação e recomendação dietética de gordura mudou, existindo uma valorização na qualidade consumida em detrimento da quantidade. Nesta perspectiva, poucos tipos de gordura obtiveram espaço como promissora a saúde. Dentre elas, cita-se os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAS) da família ômega 3, que difundiram-se de forma significativa por razões dos seus muitos efeitos positivos documentados em diferentes condições, incluindo cardiovasculares, neurológicas e transtornos psiquiátricos (BURR, FEHILY, GILBERT, 1989; GISSI, 1999; DIN, 2004; MOZAFFARIAN, RIMM, 2006; MAZZA *et.al.*, 2007; VAZ *et.al.*, 2014; BENJAMIM *et.al.*, 2018).

O consumo em excesso de produtos industrializados reflete no surgimento de diversos problemas a saúde, pois dietas copiosas em gorduras gera problemas de obesidade, que é fator de risco para diversas outras doenças crônicas como hipertensão arterial sistêmica, doença coronariana, dislipidemias, diabetes *mellitus* tipo 2 (LIMA *et al.*, 2007). Deste modo, uma alimentação correta e de qualidade passou a ser o cerne de programas de

saúde a nível global, valorizando os alimentos funcionais devido a sua capacidade de viabilizar benefícios a saúde quando utilizados de maneira adequada (COSTA *et.al.*, 2017; BRAGA, BARLETA, 2007). Os alimentos funcionais são aqueles que geram efeitos metabólicos ou fisiológicos pela ação de um nutriente no crescimento, desenvolvimento ou manutenção do organismo. Este não detém capacidade de cura, porém auxiliam na prevenção de enfermidades e reduzindo riscos de doenças crônicas degenerativas (BRASIL, 1999; PACHECO, SGARBIERI, 2001; Vidal *et.al.*, 2012; VAZ *et.al.*, 2014).

## 1.2 Lipídios de importância fisiológica

Os lipídios integram um conjunto de compostos heterogêneos como gorduras, esteróides, óleos ceras e etc., que estão associados por suas propriedades físicas. São componentes importantes da dieta, não somente pelo alto valor energético, mas pelo fato dos ácidos graxos essenciais e as vitaminas lipossolúveis e outros micronutrientes lipofílicos estão inseridos na gordura de alimentos naturais (BOTHAM, MAYES, 2012).

Lipídeos exercem mecanismos bioquímicos e fisiológicos importantes para o organismo. São fontes de grande energia, atuam como isolantes térmicos prevenindo a perda de calor e facilitando a condução nervosa, além de atuarem na camada de proteção dos tecidos e corpo e são componentes estruturais e funcionais das biomembranas (ZIMMER *et.al.*, 2002; MOTTA 2009; BOTHAM, MAYES, 2012). Possuem papel fundamental na nutrição e na saúde, e o conhecimento da bioquímica destes compostos é importante para a compreensão de várias doenças biomédicas relevantes como diabetes mellitus, obesidade e aterosclerose (BOTHAM, MAYES, 2012).

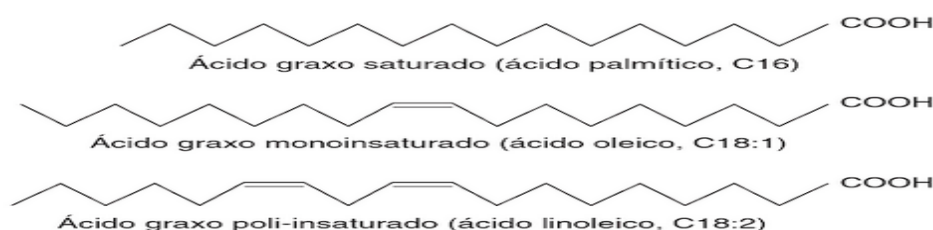
Os Ácidos Graxos (AG) são classificados pelas diversas categorias de saturação em três classes principais: ácidos graxos saturados (SFAs), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Os SFAs são formados por uma cadeia de carbono com ligações simples que, portanto, não contém ligações duplas. Já os MUFAs contêm uma ligação dupla e os PUFAs apresentam cadeias de carbono contendo duas ou mais ligações duplas. As diferenças na posição das duplas ligações e na estrutura química dessas inúmeras classes podem levar a diferentes efeitos fisiológicos (DIMOPOULOS *et al.*, 2006; SIRIWARDHANA *et al.*, 2012).

Os AG são diversos e mais de 100 já foram identificados (HORTON, 2008). Estes são ácidos monocarboxílicos de cadeia longa de hidrocarbonetos acíclicos, não polares e sem ramificações e frequentemente com número par de átomos de carbono. Em óleos e

gordura naturais ocorrem como ésteres que podem estar como ácidos graxos livres (forma esterificada), transportado pelo plasma (MOTTA, 2009; RAPOSO, 2010; BOTHAM, MAYES, 2012).

São encontrados em diferentes alimentos, apresentando-se com diversas variações de quantidades em classes de alimentos diferenciados. Possuem nomenclaturas distintas, sendo nomeados como monoinsaturada ou poli-insaturada de acordo as insaturações (ligações duplas) entre as cadeias de carbono ou ainda saturada quando não há ligações duplas e o tamanho das cadeias de carbono determina se os AG são de cadeia curta, média, longa e muito longa (Fig.1). (EIFERT *et.al.*, 2006; BENJAMIM *et.al.*, 2018).

**Figura 01.** Exemplos de ácidos graxos saturado, monoinsaturado e poli-insaturado.



Fonte: Murray *et al.*, 2012.

A cadeia carbônica de AG saturado normalmente encontra-se em conformação linear e flexível, sendo esta a condição de maior energia. Esta característica possibilita um empacotamento adequado dos AG saturados, aumentando a interação entre as moléculas, possuindo um ponto de fusão maior. Em contrapartida, os AG insaturados encontram-se rígidos em suas cadeias carbônicas, dado que as duplas ligações não giram e uma angulação de 90 graus é formada para cada uma das duplas ligações existentes. A dupla ligação não facilita o empacotamento das moléculas, refletindo em uma menor interação entre elas (CURI *et.al.*, 2013).

Um registro trivial para o tipo de AG é atribuída pela quantidade de carbonos na cadeia seguido pelo número de insaturações. Deste modo, os AG palmítico, oleico e linoleico são representados como 16:0, 18:1 e 18:2, respectivamente (RAPOSO, 2010). Os ácidos graxos polisaturados, também conhecidos como PUFAS, podem ser classificados ainda quanto a localização da primeira insaturação a contar do terminal metil, a qual estabelece a nomenclatura ômega ( $\omega$ ). Assim, os PUFAS compõem famílias de AG  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

Os AG  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 são tidos como essenciais. Esta essencialidade se deve ao fato se serem indispensáveis ao organismo ao mesmo tempo em que não podem ser sintetizados pelo mesmo. Já o  $\omega$ -9 é sintetizado na presença dos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 no organismo (CURI *et.al.*, 2013). Todavia, a restrição dos AG essenciais deve ser considerada uma vez que o excesso de um em detrimento do outro, como no caso do  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, respectivamente, podem ocasionar reações contrárias, uma vez que os AG dessas famílias disputam pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia. Embora tais enzimas tenham maior afinidade pelos AG  $\omega$ -3, a transformação do alfa-linolênico em ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa é diretamente influenciada pelos níveis de ácido linoléico na dieta (EMKEN, ADLOF, GULLEY, 1994; MARTIN *et.al.*, 2006, PERINI *et.al.*, 2010).

Os PUFAS  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 se mostram promissores a saúde humana com prevenção de diversos problemas como redução de doenças cardiovasculares, diminuição da inflamação crônica e do desencadeamento de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) (câncer, diabetes, síndrome metabólica) (PERINI *et al.*, 2010, ADEFEGHA, 2017).

### **1.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs) e Ácidos Graxos Monoinsaturados (MUFAs)**

Os componentes lipídicos, em particular os ácidos graxos, estão presentes nas variadas formas de vida, exercendo funções relevantes na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos, como já mencionados. Os efeitos benéficos dos PUFAS para saúde do indivíduo são notórios, executando importantes funções no tratamento e prevenção de doenças (MARTIN *et al.*, 2006).

O  $\omega$ -3 ou Ácido ( $\alpha$ ) Linolenico (ALA) viabiliza a formação de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa, o Ácido Eicosapentaenoico (EPA) e o Ácido Docosahexaenoico (DHA) (SHILS *et. al.*, 2003) enquanto os  $\omega$ -6 são representados principalmente pelos ácidos linoléico (AL) e o Ácido Araquidônico (AA). Ambas as famílias de ácidos graxos estão envolvidos em diversas ações no organismo como proteção da saúde cardiovascular, desenvolvimento cerebral e sistema visual, associado à saúde materno infantil, são essenciais na divisão celular e manutenção das membranas, funções cerebrais e impulso nervoso (YOU DIM, MARTIN, JOSEPH, 2000; YEHUDA *et. al.*, 2002; ZAMBOM, SANTOS; MODESTO, 2004; MARTINS *et. al.*, 2006).

Os PUFAs ainda se mostram indispensáveis na formação de leucotrienos, eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos e outros fatores oxidantes importantes na mediação e regulação da inflamação (BHANGLE; KOLASINSKI, 2011; LI *et. al.*, 2014). No controle da inflamação atuam por ação de redução na Proteína C-reativa (PCR), quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, como efeitos positivos na prevenção e no controle de doenças cardiovasculares, dislipidemias e diabetes *mellitus* (WALLACE, MILES, CALDER, 2003; SCHWAB, SERHAM, 2006; HARTWEG *et. al.*, 2009; SKULAS-RAY *et. al.*, 2011; BORGES *et. al.*, 2017).

O  $\omega$ -3 comparado ao  $\omega$ -6 possui maior efeito antiinflamatório, isso se explica devido a sua capacidade de promover uma menor síntese da quantidade de prostaglandinas e leucotrienos inflamatórios. Por isso, seu potencial uso em terapias crônicas graves, em que a inflamação é uma causa, está em estudo constante (BOTHAM, MAYES, 2012).

Se tratando do Sistema Nervoso Central (SNC), os PUFAs são componentes importantes dos fosfolipídios das membranas celulares. Determinam as propriedades biofísicas das membranas neuronais auxiliando na formação das espinhas dendríticas e crescimento neuronal (ZIMMER *et.al.*, 2002; ITOKAZU *et.al.*, 200; BODNAR *et.al.*, 2005). Participam de forma veemente de processos de sinalização celular, no funcionamento de receptores, na recaptção de neurotransmissores e na transmissão de sinais, possibilitando melhora na cognição e aumento do desempenho em processos de aprendizagem e memória (MULDOON *et al.*, 2010; SIERRA *et al.*, 2012).

Diante de tantos benefícios, acredita-se que uma alimentação saudável seja um dos pilares para prevenção de manifestações de problemas crônicos e doenças degenerativas. Uma ingesta copiosa de ácidos graxos na dieta auxilia no melhor funcionamento do sistema fisiológico e metabólico, referente principalmente a obesos e diabéticos (SICIŃSKA *et.al.*, 2015; SOARES *et.al.*, 2016), pois o consumo de alimentos funcionais na dieta atua na linha de defesa no controle dos eventos metabólicos (AGOSTONI, MORENO, SHAMIR, 2015).

Evidências ainda demonstram que altos níveis plasmáticos de PUFAS estão relacionados com a diminuição da razão entre colesterol total e o HDL, e que a substituição de 10% das calorias provenientes de SFAs por PUFAs  $\omega$ -6 associa-se a uma redução de 18 mg/dL no LDL (SANTOS *et al.*, 2013).

Nada obstante, a dieta torna-se não favorável a saúde quando ocorre aumento da ingestão do  $\omega$ -6 em detrimento do  $\omega$ -3. Os AG  $\omega$ -6 são metabolizados em AA, substrato para formação de eicosanóides que originam as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos

entre outros que, quando em níveis elevados detém uma ação pró-inflamatória. Neste caso, a elevação da relação  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 na dieta é bastante pró-trombótica e pró-agregativo que podem refletir futuramente no surgimento de doenças como aterosclerose, obesidade e diabetes (SIMOPOULOS, 2016).

Os PUFAs podem ser encontrados em uma diversidade de alimentos. As fontes dos AG  $\omega$ -3 são as folhas verdes e sementes oleaginosas, linhaça, milho, óleo de soja, canola, peixes de água fria como cavala e salmão, entre outros (HARRIS, APPEL, 2007). Já os ácidos graxos ômega 6 podem ser encontrados em alimentos nozes, pistaches, amendoins, sementes de abóbora e óleos vegetais como algodão, milho, girassol, soja e canola, enquanto o ácido graxo ômega 9 pode ser encontrado em dietas como nos representantes do azeite de oliva e o óleo de canola, grãos integrais, frutas e hortaliças (KAYSER *et al.*, 2010).

Os AG  $\omega$ -3 são os mais utilizados nas fontes de estudo pelo seu maior envolvimento nos benefícios dos PUFAS. Uma deficiência no organismo do  $\omega$ -3 provoca sintomas neurológicos, redução da acuidade visual, lesões de pele, retardo do crescimento, diminuição da capacidade e aprendizado, retardo do crescimento, diarreia e eletroretinograma anormal em crianças (WAITZBERG, 2007). A toxicidade dos efeitos surge quando o consumo do  $\omega$ -3 ultrapassa os 15% do valor calórico total, causando alterações no metabolismo de AG de cadeia longa e induzindo a produção de mediadores como prostaglandinas e leucotrienos. Sem deixar de citar o estresse oxidativo, essencialmente relacionado ao nível de instauração do triglicerídeo, levando a peroxidação Lipídica (WAITZBERG, 2007; VAZ *et al.*, 2014).

A raça humana e todos os mamíferos são capazes de sintetizar os MUFA  $\omega$ -9. A dessaturação desses ácidos graxos acontece no retículo endoplasmático através das enzimas dessaturases, onde o ácido oléico (AcO) é o MUFA mais representativo (BURDGE; CALDER, 2015). A síntese de AcO no SNC, demonstrou elevar as taxas de proteína básica de mielina (BREUER *et al.*, 2004), sugerindo um papel central para este ácido graxo na função neuronal.

Os MUFAs também proporcionam a proteção contra a peroxidação lipídica. O uso de suplementações acrescidas com lipídios na forma monoinsaturada, em detrimento ao uso de polinsaturados findou com a redução da resposta inflamatória e baixa produção de radicais livres com a fórmula rica em monoinsaturados (CURI *et al.*, 2013).

#### **1.4 PUFAs e MUFAs e as suas relações com estresse oxidativo e alterações bioquímicas**



Os radicais livres (RL) são espécies químicas extremamente reativas a presença de um par de elétrons livres (FERREIRA, MATSUBARA, 1997, BONNEFOY, 2002). Estes radicais são formados por intermédio do metabolismo aeróbico bem como por processos patológicos (inflamações, estresse emocional ou psicológico) em um contexto de reações de óxido-redução. Também são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROS) e são encontrados em todos os sistemas corporais (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; TSALUCHIDU *et.al.* 2008). Quando em concentrações elevadas, os EROS são tóxicos ao organismo e para se defender de tais ataques as células vivas dispõem de sistemas de defesa formados de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SIES, STAHL, SEVANI, 2005; HUANG, PRIOR, 2005; RODRIGUES NETO, 2010).

Diante de um estresse oxidativo todos os constituintes celulares são vulneráveis à ação dos EROS, no entanto a membrana plasmática é uma das mais atingidas em consequência da peroxidação lipídica, confluindo em danos a estrutura e permeabilidade da célula e por fim apoptose (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; HALLIWELL B, GUTTERIDGE, 1999; SAMPAIO E MORAES, 2010; CUNHA *et al.*, 2017). A peroxidação lipídica é um fator imprescindível para o monitoramento dos danos causados aos lipídeos pelos EROS. Estes se degradam em produtos como o Malondialdeído (MDA) que por sua vez são utilizados como marcadores da peroxidação lipídica para avaliação do estresse oxidativo (BERTOLIN *et al.*, 2009).

Os PUFAs  $\omega$ -3 viabilizam mais radicais livres aos substratos livres, contudo estes são fatores redutores da morte celular em pacientes como patologias associadas as doenças coronarianas. Tem-se que os PUFAs possam funcionar como antioxidantes para evitar a peroxidação de lipídeos em membranas (ERGSTRÖM *et.al.*, 2009). Ainda é desconhecido se estes causam ou não o estresse oxidativo em humanos e animais (MONTEIRO, 2007). Porém, estudo *in vitro* mais recente mostrou que o tratamento com PUFAS diminui consideravelmente os níveis de EROS (KIM *et.al.*, 2010).

O estresse oxidativo está interligado a fisiopatologia de doenças como hipertensão e obesidade, o que pode estar relacionado ao aumento da resistência periférica da ação da insulina em pessoas acima do peso preconizado. Portanto, o aumento dos ácidos graxos livres, da insulina e dos níveis de glicose, são fatores influenciadores para o acréscimo de EROS que resulta no estresse oxidativo (SIMÃO *et al.*, 2010).

Além disso, se tratando de glicose e PUFAS, estudos mostram por um lado seus eficazes efeitos na prevenção de doenças como a diabetes devido ao seu efeito

antiinflamatório e redutor dos lipídios dispostos na corrente sanguínea (ANDRADE, 2009) e por outro que o consumo de capsulas contendo óleo de peixe aumenta a glicose disposta na corrente sanguínea e a resistência à insulina (SIMÃO *et al.*, 2010). Desta forma, há necessidade de uma reavaliação na relação de custo benefício na utilização de tais ácidos graxos por pacientes portadores de síndrome metabólica.

A Alanina Aminotransferase (ALT) ou alanina transaminase, conhecido como Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) é uma enzima transamina cuja sua maior concentração é localizada no fígado e o Aspartato Aminotransferase (AST) ou Transaminase Glutâmico Oxalacético (TGO) é encontrado em vários tecidos dos órgãos vitais do corpo como, coração, rins, fígado e cérebro. Essas enzimas têm a particularidade de catalisarem a conversão nitrogenada de um aminoácido para uma porção residual de aminoácido. A elevação destas enzimas pode indicar a existências de problemas no órgão, como presença de alguma lesão (CANOAVA, 2012).

Consta-se que o fígado é principal órgão envolvido na metabolização de alimentos e drogas e a maioria das substâncias são excretadas a nível renal. Avaliar possíveis danos a esses órgãos pela medição dos parâmetros bioquímicos na função hepática (através das concentrações de ALT e AST) e renal (através das concentrações de ureia e creatinina) são elementos importantíssimo a serem apreciados em um estudo com dietas alimentares.

Em se tratando de função renal, os parâmetros bioquímicos da ureia e creatinina indicam se os órgãos estão adequadamente funcionando. Quando há prejuízo da função renal os níveis plasmáticos de ureia e creatinina tendem a se elevarem. Quanto maior o nível dessas duas substancia, maior é o dano renal (PINHEIRO, 2019).

Alguns estudos demonstram que a associação de  $\omega$ -3, vitamina E, selenito de sódio, gluconato de cobre, gluconato de zinco, sulfato de condroitina e glucosamina que tem ação antioxidante e condorprotetora, proporcionou relativa melhora da excreção dos parâmetros da ureia e creatinina em cães com doenças renais crônicas (VALLE *et al.*, 2015). Outros mostraram que dietas ricas em  $\omega$ -3, reduz a pressão intraglomerular, proporciona aumento da filtração glomerular, conseqüentemente induzindo o aumento da expectativa de vida dos animais. Os AG exercem função importante, pois além de diminuir o colesterol, reduz a pressão sanguínea e melhorar a hemodinâmica renal. A razão entre o  $\omega$ -6 e o  $\omega$ -3 é de 3:1 ou 5:1, foi referenciada como parâmetro benéfico para dietas ofertadas a pacientes renais crônicos (BARTGES, 2012).

A ingestão dietética enriquecida de MUFA  $\omega$ -9 foi associada à redução da raiva e irritabilidade. Outros estudos revelam que a adesão a uma dieta mediterrânea rica em AcO

reduz a dor em pessoas acometidas com artrite inflamatória (SILVA NETO, 2019). 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) (CAPPÀ et al., 2012).

Cutili (2017) em seus estudos enfatizou que os AG ômega-3 são componentes estruturais do cérebro indispensáveis para a síntese da membrana neuronal. Juntamente com a queda da cognição, redução da densidade sináptica e perda neuronal, o envelhecimento normal é acompanhado por uma redução na concentração de PUFA no cérebro em humanos e camundongos. Estudos clínicos e experimentais demonstraram a importância do PUFA no controle da neurodegeneração e disfunções neuronais.

### **1.5 A técnica de Golgi Cox como ferramenta de marcação neuronal**

A evolução do sistema nervoso central (SNC) é um encadeamento complexo. Alguns situações favorecedoras durante este período altamente plástico determinam a maturação funcional do cérebro e a sua completude ao longo da vida.

Silva *et al.* (2012) demonstram em suas pesquisas em humanos e animais que a dieta adequada e estímulos ambientais como prática regular e precoce da atividade física desde a infância favorecem o desenvolvimento do sistema nervoso central. Tem sido observado que tais práticas durante o desenvolvimento cerebral pós-natal de ratos aumenta a densidade de axônios e neurônios, eleva os níveis cerebrais de fatores neurotróficos e melhora aprendizagem e memória.

Dos métodos histológicos não-radioativos que atestam a marcação de neurônios destacam-se a técnica de Golgi Cox, valiosa na observação das espículas dendríticas. A técnica de Golgi Cox apresenta grande versatilidade para a preparação histológica de neurônios, pois evidencia em coloração marrom escuro o corpo dos neurônios e seus prolongamentos em cerca de três meses de elaboração, permitindo a contagem de células, determinando o tamanho do corpo celular e seus prolongamentos. Propicia, também, uma perceptível segmentação entre as camadas corticais (DE PAULA, 2010).

Outra ferramenta importante é o método de quantificação, a determinação do volume de estruturas cerebrais internas. A descrição de técnicas histológicas na literatura não é garantia de sucesso para todos os laboratórios devido a detalhes importantes, nem sempre mencionados (BERNARDI, MELO, 2018).

Mancuso *et. al.* (2013) relatam que o primeiro método histológico para demarcar os neurônios inteiros em fundos claros foi descrito e desenvolvido por Camillo Golgi e continua sendo um das melhores maneiras de visualizar um neurônio.

Mediantes tais benefícios explanados até aqui, objetivou-se no presente trabalho avaliar os efeitos da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 a 3% sobre marcadores oxidativos, comportamentais e morfológicos neuronais em camundongos c57bl6 saudáveis.

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A dieta é um importante fator de contribuição para modular os processos inflamatórios e o estresse oxidativo. Dentre os fatores dietéticos, o consumo dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9), pode promover a modificação desses fatores por meio da suplementação desses ácidos. Embora ainda pouco explorados, a utilização do mix de óleos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9, pode ter participação na redução da inflamação e do estresse oxidativo. Os efeitos biológicos desses ácidos graxos essenciais são mediados por suas interações mútuas que, muitas vezes, podem exercer efeitos contrários na falta de equilíbrio na dieta. Existem poucos estudos que abordem as modificações bioquímicas ocasionadas no consumo de alimentos suplementados.

Observa-se que, na atualidade, há uma escassez de estudos demonstrando o papel da suplementação do mix de Omega 3, 6 e 9 sobre a inflamação, estresse oxidativo e memória. Até então, pesquisas tem-se voltado a desvendar o efeitos protetores e benéficos do ômega 3 à saúde humana. No presente estudo pretende-se além de avaliar o efeito do ômega 3, o 6 e 9 no estresse oxidativo e comportamental em camundongos, preencher uma lacuna que ainda encontramos na literatura científica sobre os efeitos envolvendo o mix de ômega 3, 6 e 9 nos mais variados parâmetros, além do mais apresentar a sociedade o possível efeito do consumo de leite desnatado suplementado.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 em camundongos C57BL6.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a ação da suplementação de ômega 3, 6 e 9 sobre a massa corporal de camundongos C57BL6;
- Avaliar a ação da suplementação de ômega 3, 6 e 9 sobre a memória e cognição de camundongos C57BL6;
- Avaliar a ação da suplementação de ômega 3, 6 e 9 sobre estresse oxidativo em camundongos C57BL6;
- Avaliar a ação da suplementação de ômega 3, 6 e 9 sobre a concentração de mieloperoxidase no hipocampo de camundongos C57BL6;
- Investigar as alterações metabólicas induzidas pela suplementação de ômega 3, 6 e 9 sobre a função hepática e renal em camundongos C57BL6;
- Investigar o papel da suplementação de ômega 3, 6 e 9 na morfologia neuronal do hipocampo de camundongos C57BL6 através do método de Golgi Cox.

## 4 MÉTODO

### 4.1 Animais

Foram utilizados 54 camundongos distribuídos em grupos controles alimentados com a dieta padrão *ad libitum* e grupos testes alimentados com leite desnatado sem lactose *ad libitum* (proveniente de marca comercial) ou leite desnatado sem lactose com 3% de gordura com mix de omega 3, 6 e 9 *ad libitum*.

Os Camundongos C57Bl6 machos provenientes do biotério da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e transferidos para o biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), alocados em gaiolas apropriadas com ciclos claro/escuro de 12/12 horas com comida e água *ad libitum* durante o período de adaptação de 07 dias. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA-UFC) sob número 63/2013 (**ANEXO A**) e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

A escolha por essa espécie animal se deu pelo fato do C57Bl6 apresentar maior susceptibilidade para algumas afecções como obesidade, Diabetes mellitus tipo II, Aterosclerose induzida pela dieta, pela elevada incidência de anormalidades oculares e pela alta preferência ao álcool.

### 4.2 Dieta e Suplementos

Foram utilizadas dieta controle com ração e água, um controle neutro com uso de leite desnatado sem lactose e um teste com leite desnatado sem lactose com 3% de gordura enriquecida com ômega 3, ômega 6 e ômega 9 foram utilizados para alimentação dos animais.

### 4.3 Protocolo experimental

Os 54 animais foram primeiramente distribuídos em três grupos (n=18/grupo) e em seguida subdivididos dentro do próprio grupo com n=9/grupo, conforme a seguir:

Durante os dias de suplementação, os animais não receberam nenhum outro tipo de alimentação. Foram ofertados 200 ml das suplementações do leite desnatado sem lactose e do leite desnatado sem lactose com 3% de gordura enriquecido com emulsão do ômega 3, 6 e 9 diariamente, sendo trocadas a cada 12 horas para evitar a contaminação das mesmas.

**Grupo 1 (CONTROLE)** – Camundongos com dieta composta por ração padrão e água. Este grupo foi composto por 18 animais subdivididos em dois grupos com n= 9 por grupo. Grupo 1A recebeu a dieta por 45 dias e o grupo 1B recebeu a dieta por 60 dias.

**Grupo 2 (DIETA 1)** – Camundongos com dieta composta por leite desnatado sem lactose. Este grupo foi composto por 18 animais subdivididos em dois grupos com n= 9 por grupo. Grupo 2A recebeu a dieta por 45 dias e o grupo 2B recebeu a dieta por 60 dias.

**Grupo 3 (DIETA 2)** – Camundongos com dieta composta por leite desnatado sem lactose com 3% de gordura adicionada de mix de óleos ômega 3, 6 e 9. Este grupo foi composto por 18 animais subdivididos em dois grupos com n= 9 por grupo. Grupo 3A recebeu a dieta por 45 dias e o grupo 3B recebeu a dieta por 60 dias.

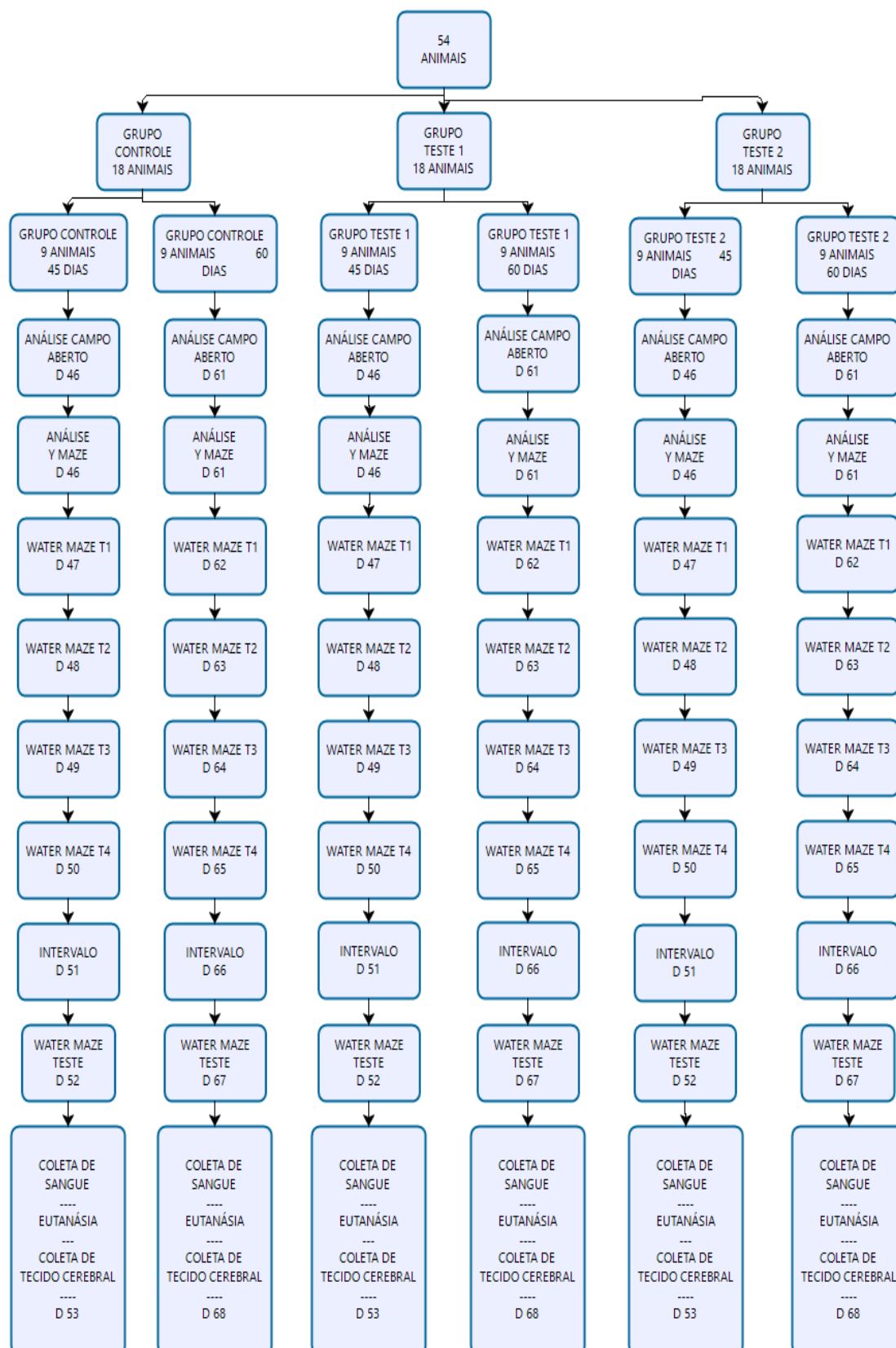
Após transcorridos os 45 e 60 dias de cada grupo com dietas específicas (ração e água; leite desnatado sem lactose; leite desnatado sem lactose com mix de óleos Omega 3, 6 e 9), os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação de memória e cognição (Teste Y maze e teste do labirinto aquático de Morris), bem como avaliação da atividade locomotora (teste do campo aberto). Após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram a área cerebral do hipocampo dissecado, pesado e armazenado em temperatura de – 80° C para posteriores análise do estresse oxidativo (TBARS e GSH), resposta inflamatória (MPO). Também coletou-se sangue do plexo venoso retro orbital para realização de testes bioquímicos (Glicemia, AST, ALT, Ureia e Creatinina) e estresse oxidativo (TBARS e GSH) (Fig. 2). A massa corpórea dos camundongos C57Bl6 foi aferida e registrada desde o primeiro até o último dia de cada dieta, com objetivo de avaliar a variação de peso dos animais conforme cada grupo.



**Tabela 1.** Relação dos grupos experimentais em estudo.

<b>TEMPO DE DIETA</b>	<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>GRUPO DIETA 1</b>	<b>GRUPO DIETA 2</b>
45 DIAS	RAÇÃO	LEITE	LEITE
	+	DESNATADO	DESNATADO
	ÁGUA	ZERO LACTOSE	ZERO LACTOSE
		<i>AD LIBITUM</i>	SUPLEMENTADO ADICIONADA DE MIX DE ÔMEGA 3, 6 E 9  <i>AD LIBITUM</i>
60 DIAS	RAÇÃO	LEITE	LEITE
	+	DESNATADO	DESNATADO
	ÁGUA	ZERO LACTOSE	ZERO LACTOSE
		<i>AD LIBITUM</i>	SUPLEMENTADO ADICIONADO DE MIX DE ÔMEGA 3, 6 E 9  <i>AD LIBITUM</i>

**Figura 02.** Fluxograma do protocolo experimental



\*D = dias

#### 4.4 Determinações comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em sala apropriada, sendo o ambiente iluminado apenas por uma luz vermelha e com ambiente livre de qualquer estímulo sonoro.

Após cada animal ser retirado, as arenas de Campo aberto e Labirinto em Y foram limpas com uma solução de álcool a 20% e secada com toalhas de papel, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste, este procedimento foi feito após cada teste comportamental.

#### **4.4.1 Teste do 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 *et al.*, 1996).

O aparato do teste consiste em três braços idênticos com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Fig. 3). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um dos braços e deixado para explorar o ambiente durante 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Foi considerada correta uma alternância em que 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 braços entrados menos dois ( $n - 2$ ) e a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre: (número de alternâncias corretas/ número máximo de alternâncias) x 100.

**Figura 03.** Teste do Labirinto em Y



O animal era colocado em um dos braços e deixado para explorar o ambiente durante 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entraram foi anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição.

#### **4.4.2 Teste do labirinto aquático de Morris (*Water Maze*)**

Este teste foi utilizado para avaliar a memória espacial do animal. A principal área cerebral envolvida no teste é o hipocampo ao que diz respeito ao processamento de informações espacial. No 45º e 60º dia após o início da dieta, os subgrupos de animais foram submetidos a versão com pistas do labirinto aquático de Morris (1984), seguindo as modificações introduzidas por Packard e McGaugh (1992) para avaliação da aprendizagem relacionada a hábitos.

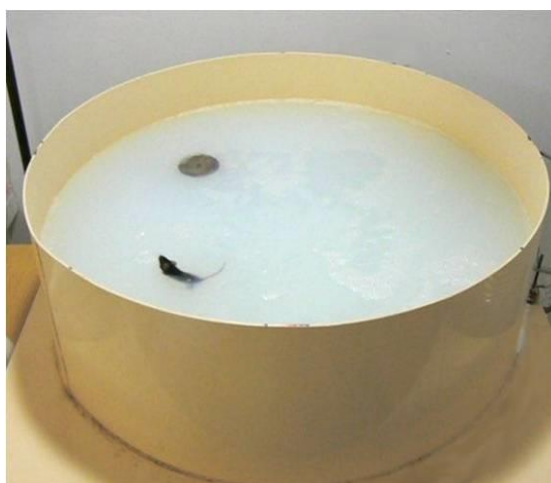
O labirinto aquático consistiu em um tanque de acrílico circular branco com 60 cm de altura, 91 cm de diâmetro, cheio até 10 cm da borda, com água numa temperatura em torno de 25°C, uma plataforma de PVC (11 x 14 cm de diâmetro) no quadrante nordeste, submersa a 2 cm da superfície de água acrescida com tinta branca não tóxica para deixar a água turva (Fig. 4).

Os animais passaram por sessões de treino, intervalo e sessão de teste. Consistiram em quatro treinos por dia durante quatro dias consecutivos, modificando a posição da plataforma em cada treino. Em cada dia das sessões de treino o animal foi colocado em um dos quadrantes e teve 60 segundos para encontrar a plataforma submersa. Foi analisada a latência para o animal encontrar a plataforma em cada treino, sendo este

deixado na mesma durante 10 segundos e posteriormente retirado do tanque por 30 segundos e seco em papel toalha, antes de iniciar o treino seguinte em posição diferente.

Após um dia de intervalo da última sessão treino, realizou-se a sessão de teste para avaliação da memória espacial. Cada animal foi colocado no aparato sem a plataforma e este teve 60 segundos para encontrar o local onde se encontrava a plataforma. O tempo de latência, a distância percorrida, o número de entradas e o tempo de permanência no quadrante da plataforma foram registrados para análises posteriores (MORRIS, 1984).

**Figura 04.** Teste do labirinto aquático de Morris (*Water Maze*)



Cada animal foi colocado no aparato sem a plataforma e este teve 60 segundos para encontrar o local onde localiza-se a plataforma.

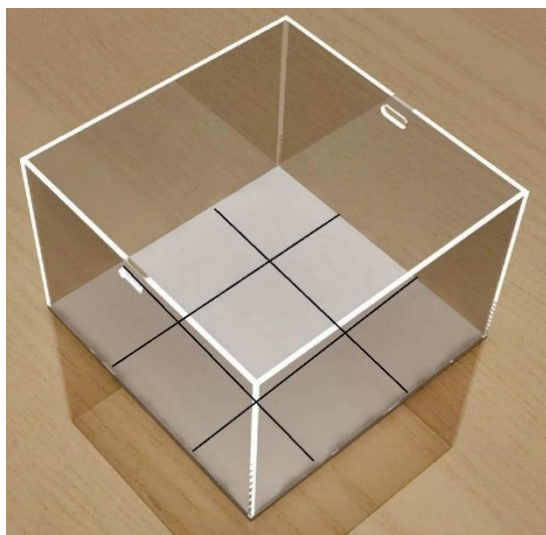
#### **4.4.3 Teste do campo aberto (*Open Field*)**

Com objetivo de observar se a dieta prejudicou a atividade locomotora do animal que conseqüentemente prejudicaria os testes de memória, realizou-se o teste da atividade locomotora do animal através do teste de campo aberto (*Open Field*) (Fig. 5).

O aparato consiste em uma caixa de acrílico (50 x 50 cm) com o chão e paredes pintadas com uma tinta preta fosca e o piso dividido em nove quadrantes iguais. Cada animal foi colocado no centro do aparato e permitido que ele explorasse o cenário por um minuto (tempo de habituação), seguido de mais cinco minutos (período de teste). Os parâmetros observados foram a distância percorrida pelo animal, o grooming (movimento de autolimpeza), tempo do grooming e o rearing (movimento de procura vertical no qual o animal se apoia nas patas traseiras).

Os registros de tais dados ocorreram através do uso de uma câmera de visão noturna com infravermelho localizada na parte superior do aparato, que memorizava cada movimento do camundongo durante os cinco minutos do teste.

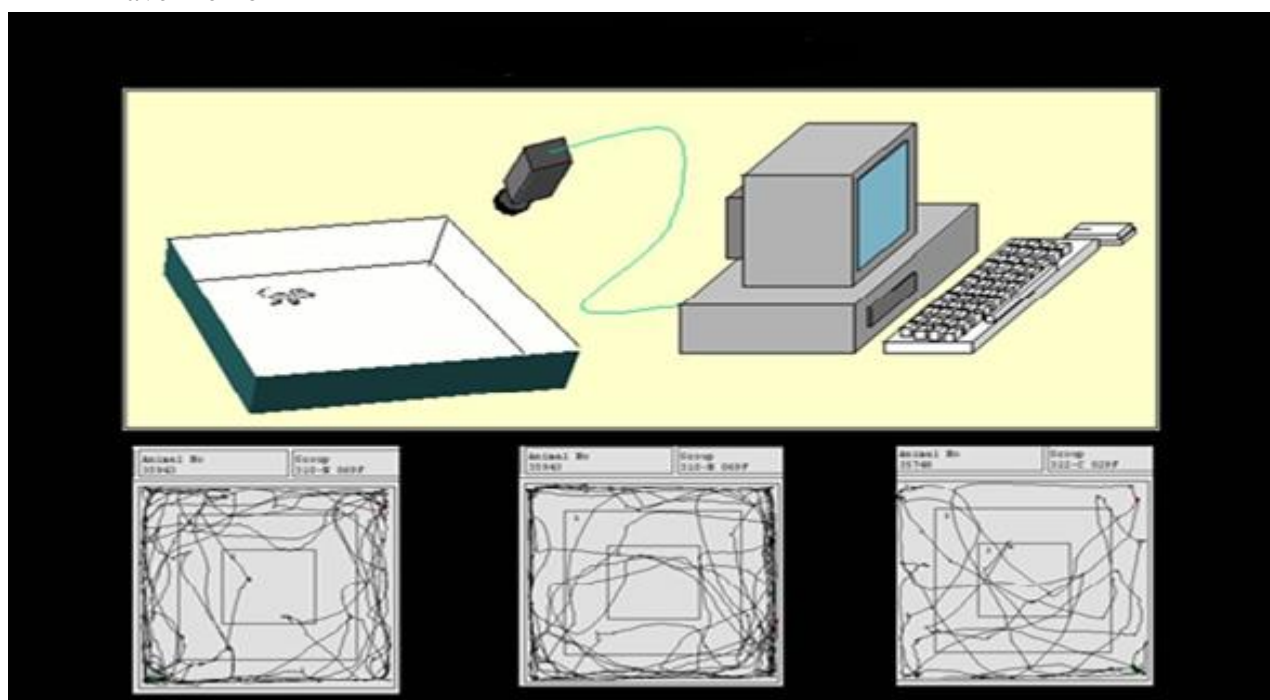
**Figura 05.** Teste do campo aberto (*Open Field*)



Fonte: [www.quazoo.com](http://www.quazoo.com)

Cada animal foi colocado no centro do aparato e permitido que ele explorasse o cenário por um minuto (tempo de habituação) seguidos de mais cinco minutos (período de teste).

**Figura 06.** Imagem do Teste de Campo aberto com a camera de visão noturna infravermelho



Fonte: [www.quazoo.com](http://www.quazoo.com)

## **4.5 Determinações bioquímicas**

### **4.5.1 Dosagem da glicose no plasma**

O sangue coletado do plexo retro orbital dos animais foi analisado pelo método enzimático da glicose oxidase (kit glicose pap liquiform - Labtest).

Logo após a coleta do sangue e separados em alíquotas de micro túbulos, as amostras foram centrifugadas a 4.000rpm/10m e teve o plasma coletado e em seguida encubado em banho Maria 15 minutos a 37°C. 100µL da amostra foram adicionados aos poços na placa de *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* -ELISA. As leituras do teste e padrão foram feitas em 505nm no leitor de placas, acertando o zero com o branco. A concentração foi expressa como mg/dl de plasma.

### **4.5.2 Determinações de uréia e creatina e das transaminases AST e ALT no plasma sanguíneo**

No dia da eutanásia foi realizada a coleta de sangue venoso do plexo retro orbital dos camundongos. O sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo anticoagulante *sodium heparin* (heparina). Foram coletados cerca de 1,5 ml de sangue de cada animal para as análise. O sangue foi centrifugado a 4.000 rpm/mim por 15 minutos e teve o plasma separado do sangue, que foi congelado a -80°C até o dia dos ensaios com mensurações dos parâmetros bioquímicos realizadas no espectrofotômetro.

Para tal análise, foi utilizado o kit glicose pap liquiform – Labtest.

## **4.6 Determinações do estresse oxidativo**

### **4.6.1 Glutathiona reduzida (GSH)**

Os níveis de GSH no hipocampo foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas cerebrais foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e os níveis de GSH foram determinados (Sedlak and Lindsay, 1968). Resumidamente, 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 ng de GSH/g de tecido úmido.

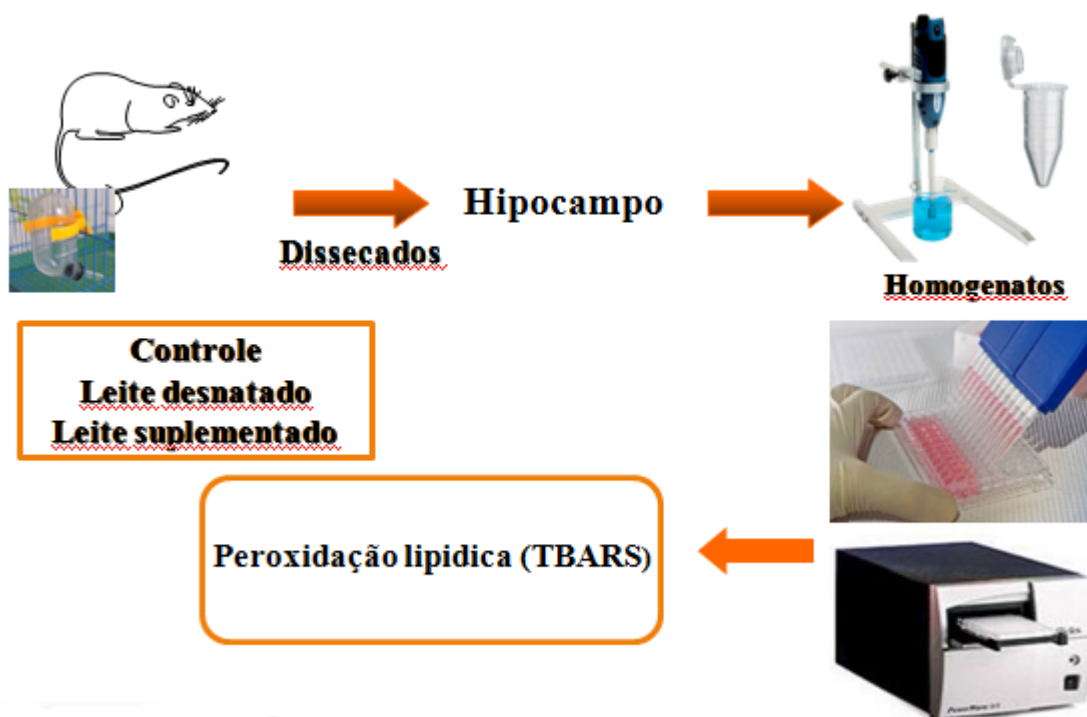
#### **4.6.2 Peroxidação lipídica (TBARS)**

A peroxidação lipídica tanto no tecido cerebral quanto no plasma foi avaliada através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances -TBARS*).

No tecido cerebral – A peroxidação lipídica foi avaliada como uma medida de produção de espécies reativas de oxigênio (DRAPER *et al.*, 1993). As amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA)/mg de proteína (OHKAWA *et al.*, 1979).

Plasma sanguíneo – Os níveis de TBARS foram estimados de acordo com o Método espectrofotométrico descrito por Ohkawa *et al.*, 1979. Em resumo, a cada tubo de ensaio, 0,5 ml de plasma, 0,5 ml de solução salina normal, 1 ml de ácido tricloroacético a 20% (TCA) e 0,25 ml de reagente TBA (200 mg de tiobarbitúrico ácido em 30 ml de água destilada e 30 ml de ácido acético) foi adicionado. Os tubos de ensaio foram mantidos para ferver a 95°C por uma hora. A cada um dos tubos de ensaio, 3 ml de n-butanol foi adicionado e bem misturado. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. A camada de butanol separada foi coletado e lido em um espectrofotômetro contra reagente em branco a 535 nm reação tiobarbitúrgica. A concentração de substâncias foi expressa em termos de nmol de malondialdeído por mililitro de plasma. O valor expresso é em nmol MDA/ml de plasma.

**Figura 07.** Protocolo de mensuração da mensuração de MDA



#### 4.7 Determinação da resposta inflamatória

##### 4.7.1 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase (MPO) presente nos grânulos de neutrófilos é utilizada como um marcador de processo inflamatório, indicando a presença de neutrófilos infiltrados nos tecidos.

Neste ensaio, o Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é clivado por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio ( $O^\bullet$ ) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO.

Para determinações da MPO, as áreas cerebrais do hipocampo foram homogeneizadas (50mg/mL) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 30µL do sobrenadante da amostra e 200µL da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005 % de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0,1 e 3 minutos no comprimento de

onda 460nm. Os resultados foram dados como unidades de MPO por mg de tecido (BRADLEY *et al.*, 1982).

#### 4.8 Processamento histológico através da técnica de Golgi Cox

Procedeu-se com uma dissecação minuciosa, onde os cérebros foram retirados dos crânios e, posteriormente, cortados para separação do hipocampo. Em seguida, estes cortes foram mergulhados em solução de proteção de Golgi Cox.

Para isso, a complexidade neuronal foi investigada através da técnica de Golgi Cox em camundongos C57Bl6 machos submetidos a dieta padrão ou leite desnatado zero lactose ou leite desnatado zero lactose com mix de ômega 3, 6 e 9 por um período de 45 e 60 dias.

Através desta técnica avaliou-se o comprimento dos dendritos, quantidade de espículas dendríticas e densidade dos neurônios. Os dendritos são terminações que recebem os estímulos de células epiteliais sensoriais ou de outros neurônios. Através dos estímulos, esses neurônios se ramificam, afinam até as extremidades e exibem as espículas dendríticas, contactando outros neurônios (OLIVEIRA,2019).

Para o tampão de proteção, utilizamos 300gr de sacarose, 10gr de polivinilpirrolidona e 300ml de etilenoglicol, todos dissolvidos em 500ml de H<sub>2</sub>O destilada.

A solução fixadora e contrastante de Golgi Cox foi confeccionada segundo o método descrito por HONG, ZHANG e WENG (2003); RAJU e SHANAKRANARAYANA RAO (2004) e é composta pela associação das seguintes soluções: (1) Dicromato de potássio; (2) Cromato de Potássio; (3) Cloreto de Mercúrio. As soluções 1 e 3 são misturadas na proporção 1:1, e a solução resultante é misturada 4:10 com a solução 2. Após a preparação, a solução foi mantida em frascos âmbar, protegidos de luminosidade, por pelo menos duas semanas e previamente filtrada antes do uso, para eliminar resíduos.

As peças foram mergulhadas na solução de proteção de Golgi Cox numa proporção fragmento: solução de 1:10. A solução foi trocada a cada cinco dias. Para este estudo, somente o hipocampo foi analisado e procedeu-se o preparo dos cortes para a técnica de Golgi Cox. Em placas de Petri, seguindo a seguinte sequência, lavagem com H<sub>2</sub>O destilada, duas vezes, com duração de 05 minutos cada; lavagem com etanol a 50%, uma vez, por 05 minutos; lavagem com amônia e H<sub>2</sub>O na proporção 3:1 por 08 minutos; lavagem com H<sub>2</sub>O destilada, duas vezes, com duração de 05 minutos cada; lavagem com solução

tiosulfato de sódio a 5% (25mg/50ml) por 10 minutos em ambiente escuro; lavagem com H<sub>2</sub>O destilada, duas vezes, com duração de 01 minuto cada; lavagem com etanol 70, 95 e 100%, com duração de 06 minutos cada; lavagem com Xilol por 12 a 15 minutos; montagem da lâmina na capela.

A análise morfométrica foi realizada utilizando o *software* Imagem J 1.40. Foram avaliados forma, localização dos tipos de neurônios nas camadas corticais, prolongamentos e número de neurônios. Para contagem do número absoluto de neurônios, foi considerada a área de 657, 072  $\mu\text{m}^2$  (0,66  $\text{mm}^2$ ), o que corresponde ao aumento da imagem em 100x.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram avaliados a normalidade utilizando o Teste Shapiro Wilk. Para análise dos dados foi utilizado ANOVA Two way, seguida pelo teste *post hoc* de Tuckey para comparações múltiplas e explorar interações significativas e revelar as diferenças específicas entre os grupos.

O programa utilizado foi o *software* Graphpad Prism versão 6.0 Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média adotando o critério de significância para  $p < 0,05$ .

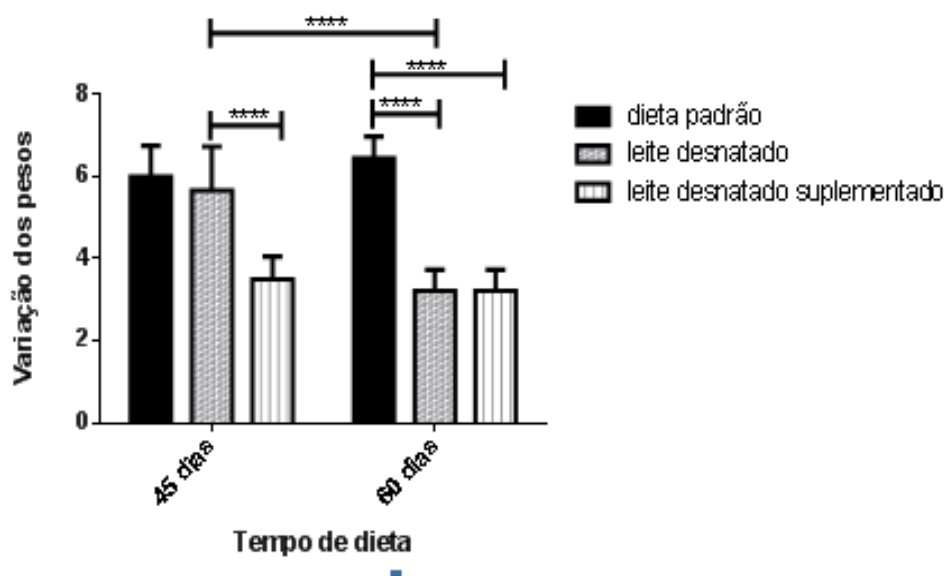
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resultado da variação da massa corpórea

Na avaliação da variação da massa corpórea, observou-se forte interação entre os fatores estudados [F(2,48) = 21, 86 P< 0,0001].

Os animais alimentados com o “leite desnatado suplementado” com mix de ácidos graxos durante 45 dias apresentaram uma menor variação da massa corpórea em relação ao grupo alimentado somente com “leite desnatado” durante 45 dias (P<0.0001). Já durante os 60 dias de dieta o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” também apresentou uma variação da massa corpórea significativamente menor em relação aos grupos alimentados com a “dieta padrão” durante os 60 (P<0.0001) e 45 dias (P<0.0001), bem como em relação ao grupo alimentado somente com “leite desnatado” (P<0.0001) (Fig. 08).

**Figura 08.** Variação da massa corpórea de camundongos C57BL6 saudáveis de acordo com tempo e tipo de dieta.



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. No primeiro e último dia de cada tipo de dieta os animais foram pesados e posteriormente avaliado a variação de peso com consumo das dietas. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

### 6.2 Resultados das alterações comportamentais

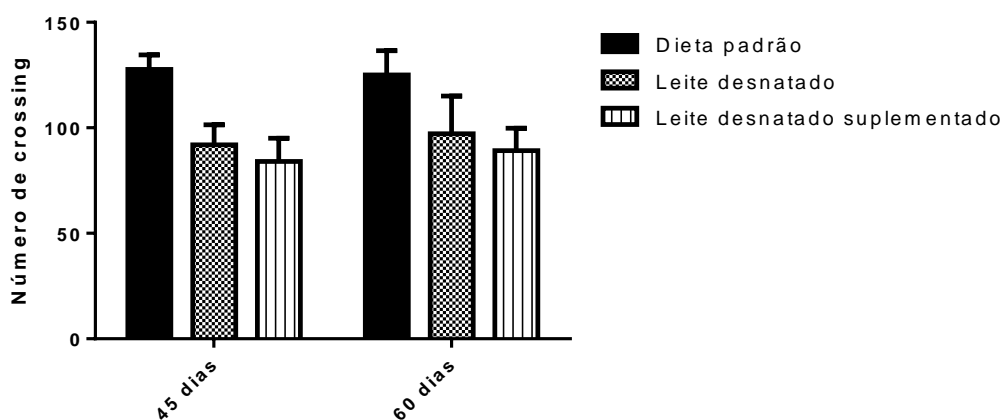
### 6.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto foi observado que houve uma significativa média entre o fator “dieta” na avaliação do grooming [ $F(2,46) = 12,27$   $P < 0,0001$ ] (Fig.9 D) e tempo de grooming [ $F(2,46) = 6,025$   $P = 0,0047$ ] (Fig. E). Não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao crossing, distância total percorrida e rearing (Fig. 9 A, B e C).

No teste de Campo aberto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 45 e 60 dias. Porém, houve uma significativa diferença entre o fator Dieta.

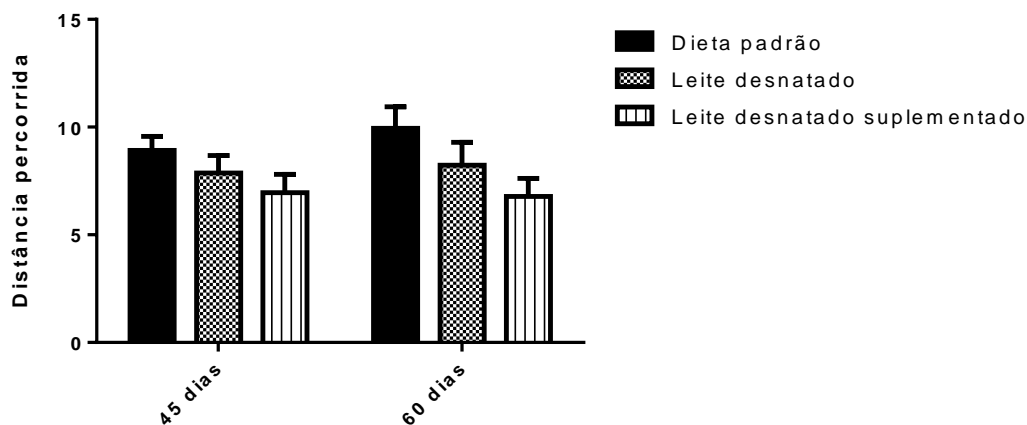
**Figura 09.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 no número de crossing (A) distancia total percorrida (B) número de rearing (C), número de grooming (D) e tempo de grooming (E) em camundongos C57BL6 saudáveis.

A



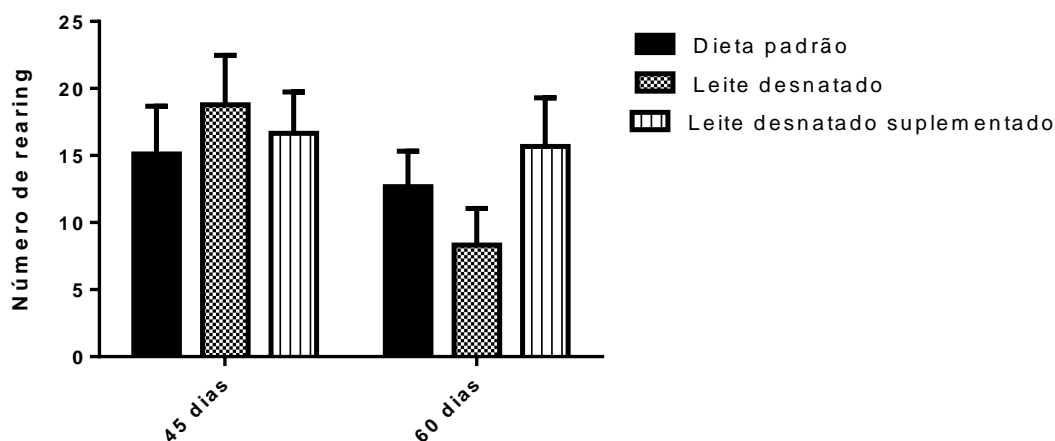
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste de campo aberto. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

B



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste de campo aberto. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

C



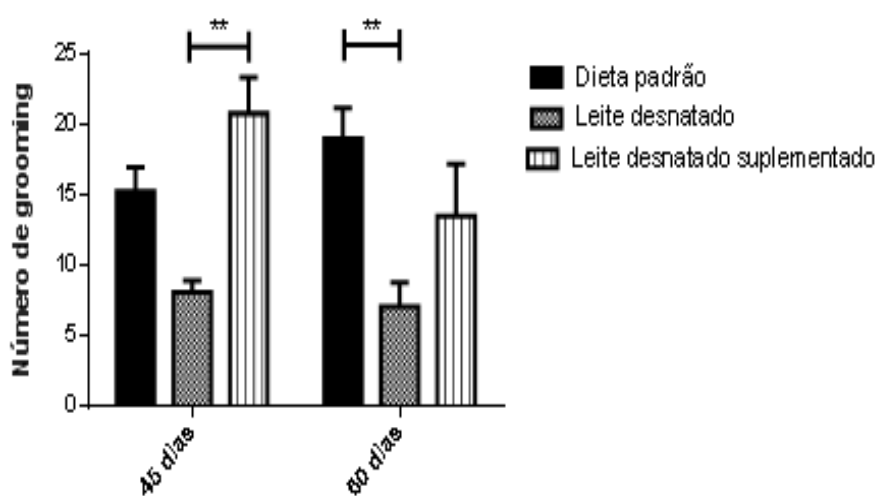
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste de campo aberto. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

Em relação ao número de grooming, o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou um número maior de grooming que o grupo alimentado com “leite desnatado” durante 45 dias (p=0,0023) e o grupo alimentado com



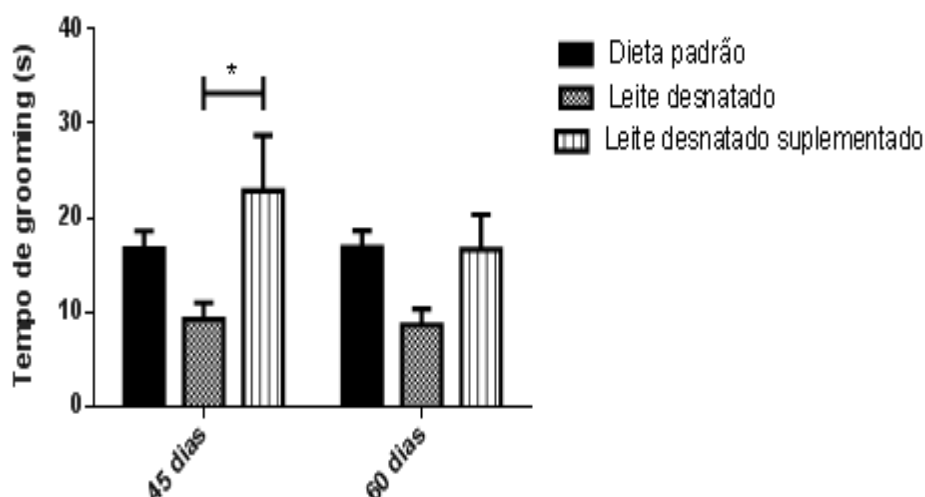
“leite desnatado” durante 60 dias ( $P=0,0009$ ). Enquanto o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 60 dias apresentou um número de grooming maior que os grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 ( $P=0,0124$ ) e 60 dias ( $P=0,0049$ ) (Fig. D). Quanto ao tempo de grooming, o grupo alimentado com o “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou um tempo maior de grooming que o grupo alimentado com “leite desnatado” durante 45 ( $p=0,0461$ ) e 60 dias ( $P=0,0333$ ) (Fig. E).

D



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste de campo aberto. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n=9$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

E

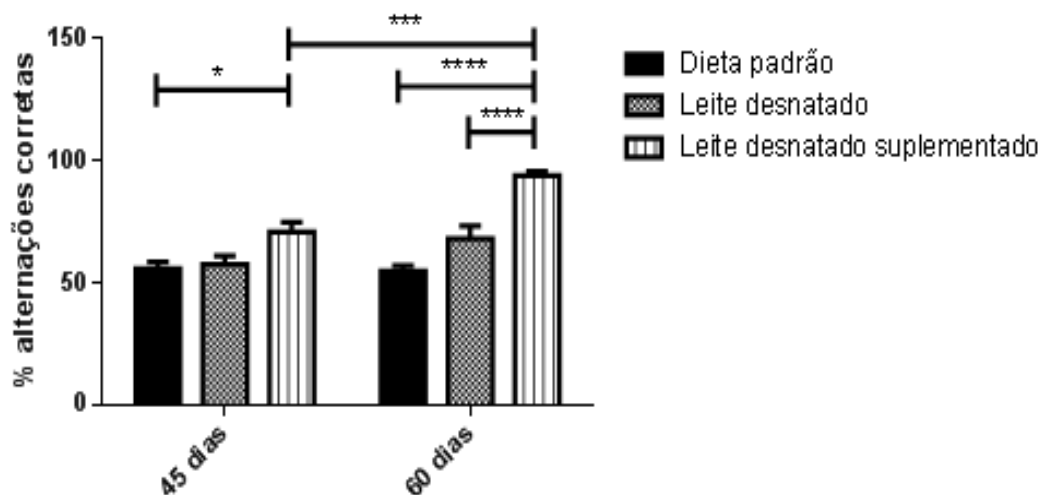


Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste de campo aberto. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

### 6.2.2 Teste do labirinto em Y

Em relação a memória de trabalho foi observada uma interação significativa entre os fatores “dieta” [ $F(2,48) = 32,05$   $P < 0,0001$ ] e “tempo de dieta” [ $F(1,48) = 14,13$   $P = 0,0005$ ]. No teste do labirinto em y, o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou uma porcentagem de alterações corretas maior que os grupos alimentados com “dieta padrão” durante 45 ( $P = 0,0400$ ) e 60 ( $P = 0,0231$ ) dias. Além disso, o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 60 dias apresentou maior percentual de alterações corretas que os grupos alimentados com dieta padrão durante 45 ( $P < 0,0001$ ) e 60 ( $P < 0,0001$ ) dias, “leite desnatado” durante 45 ( $P < 0,0001$ ) e 60 ( $P < 0,0001$ ) dias e “leite desnatado suplementado” durante 45 dias ( $P = 0,0004$ ), ou seja, apresentou o maior nível de acertos dentre os grupos investigados.

**Figura 10.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 na porcentagem de alterações corretas no teste do Labirinto em Y pelos camundongos C57BL6 saudáveis.



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o teste do labirinto em Y para avaliação da memória do animal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

### 6.2.3 Teste do labirinto aquático de Morris (Water Maze)

Na avaliação da memória espacial houve interação significativa entre os fatores “dieta” e “tempo de dieta” em relação a latência do animal pra encontrar a plataforma [ $F(1,48) = 5,967 P = 0,0183$ ;  $F(2,48) = 4,638 P = 0,0144$ ] e o tempo de permanência no norte do aparato onde se encontrava a plataforma [ $F(2,48) = 5,396 P = 0,0077$ ;  $F(1,48) = 8,740 P = 0,0048$ ]. Não houve significância no número de entradas onde localizava-se a plataforma nem na distância percorrida (Fig. 11).

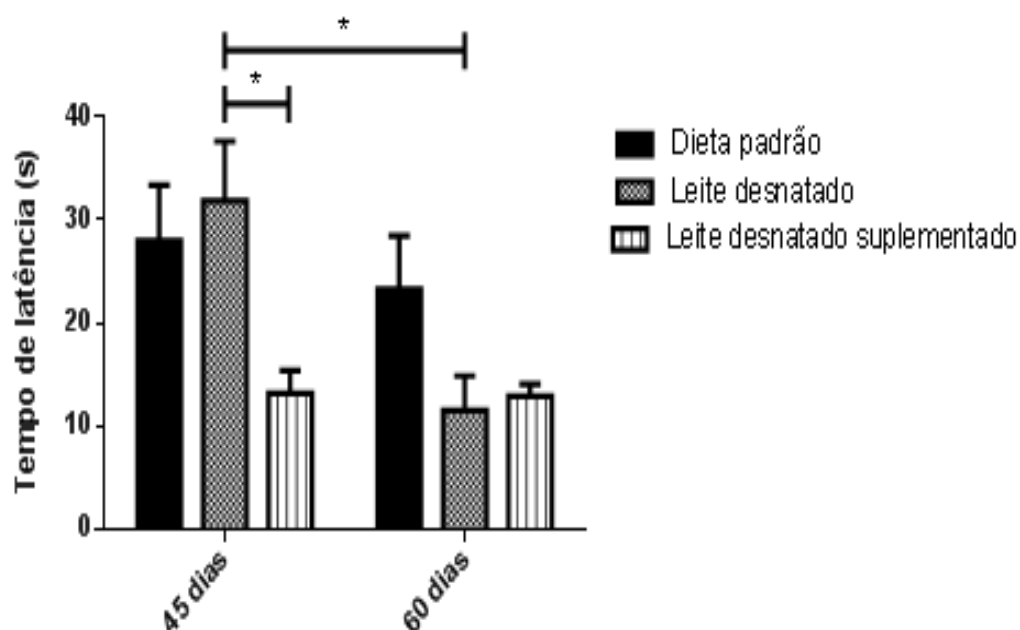
No que diz respeito a latência, o grupo alimentado com “leite desnatado” durante 45 dias apresentou um tempo de latência maior que os grupos alimentados com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias ( $P = 0,0340$ ), com “leite desnatado” durante 60 dias ( $P = 0,0164$ ) e com “leite desnatado suplementado” durante 60 dias ( $P = 0,0304$ ) (Fig. 11A).

Em relação ao tempo de permanência na região norte do aparato, onde localizava-se a plataforma, os grupos alimentados com “dieta padrão” durante 45 e 60 dias apresentaram um tempo de permanência nessa região maior que o dos grupos alimentados com “leite desnatado” durante 60 dias ( $P = 0,0472$ ;  $P = 0,0250$ ) e com “leite desnatado

suplementado” durante 60 dias ( $P=0,0204$ ;  $P=0,0102$ ). Enquanto o grupo alimentado com “leite desnatado” durante 45 dias apresentou um tempo de permanência maior que os grupos alimentados com “leite desnatado” durante 60 dias ( $P=0,0472$ ) e com “leite desnatado suplementado” durante 60 dias ( $P=0,0204$ ). (Fig. 11B).

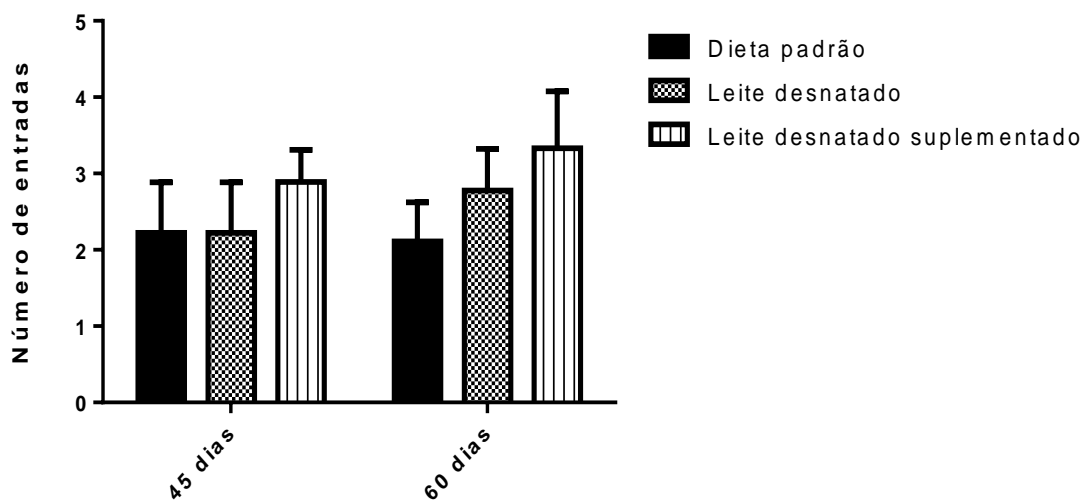
**Figura 11.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 no tempo de latência (A), número de entradas na área da plataforma (B) e distancia total percorrida (C) no teste do labirinto aquático de Morris porcentagem em camundongos C57BL6 saudáveis.

A



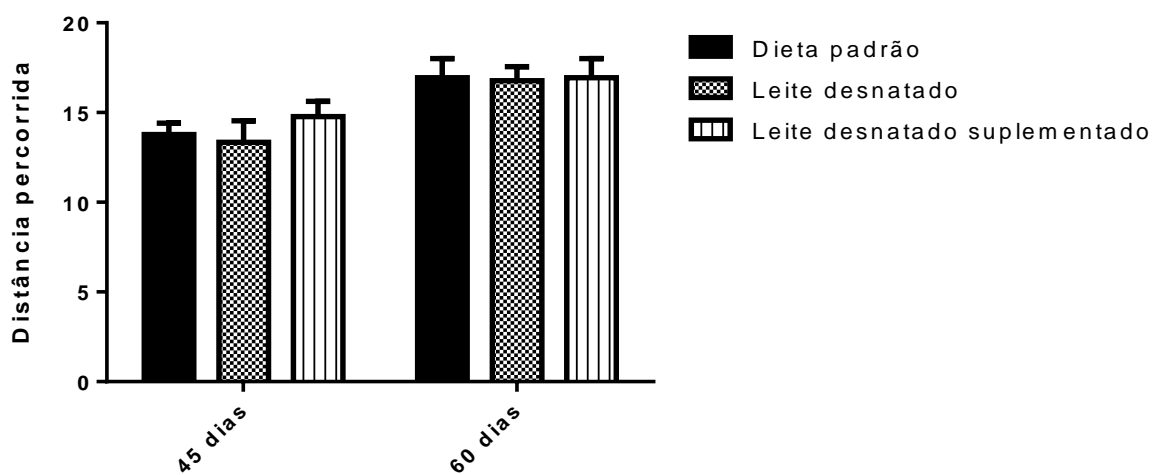
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n=9$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

B



Os animais receberam as dietas *ad libium* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

C



Os animais receberam as dietas *ad libium* durante 45 dias ou 60 dias e no último dia de cada dieta foi realizado o do labirinto aquático de Morris. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

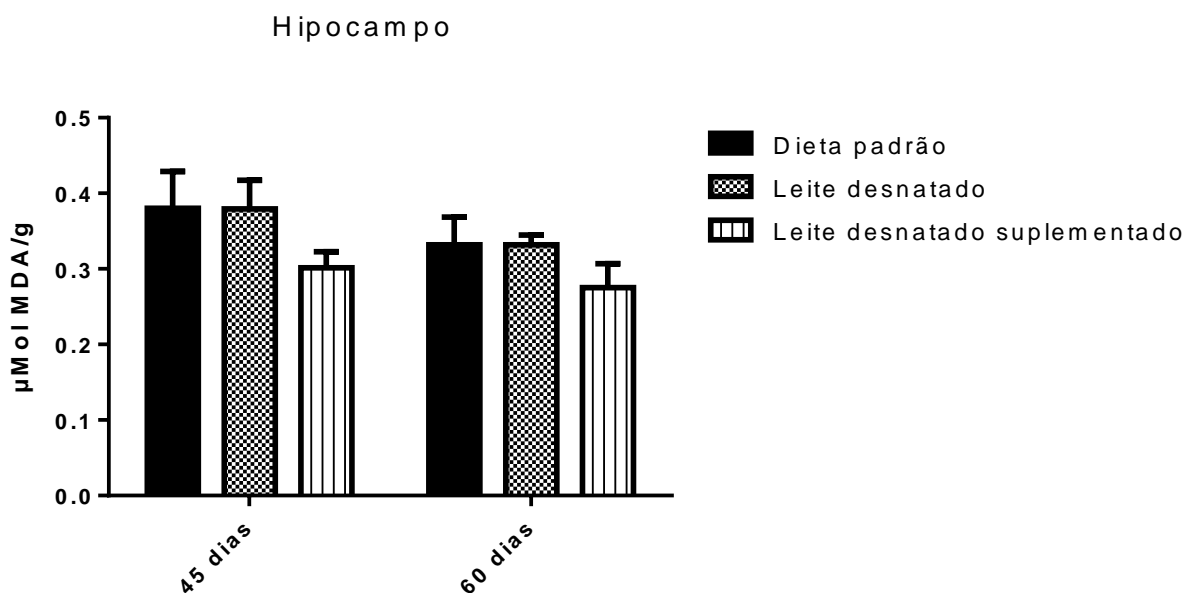
### 6.3 Resultado das alterações oxidativas

#### 6.3.1 TBARS

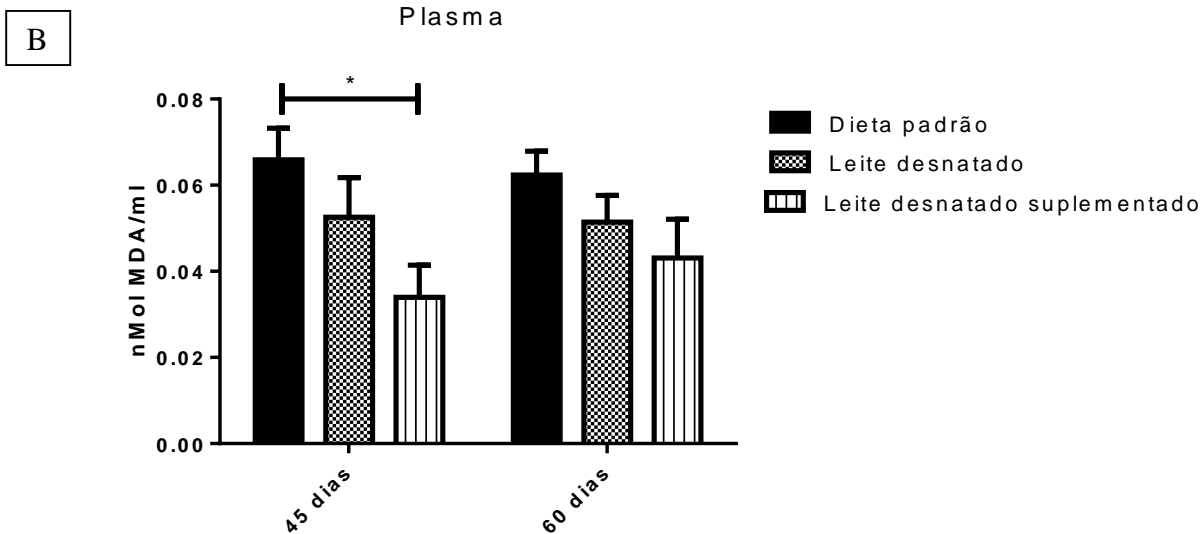
A análise do TBARS no plasma e no hipocampo por meio da determinação das concentrações de malondialdeído revelou uma média entre os “tipos de dieta” [ $F(2,48) = 5,687$   $P = 0,0061$ ] apenas nas concentrações nos níveis plasmáticos (Fig. 12). O grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou um nível menor de malondialdeído no plasma que o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 45 dias ( $P = 0,0492$ ).

**Figura 12.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de TBARS no hipocampo (A) e plasma (B) de camundongos C57BL6 saudáveis.

A



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 9$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram o hipocampo e sangue venoso coletado para análise do TBARS. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

Não foi observada diferença significativamente estatística entre o grupo controle, Teste 1 e Teste 2 em relação ao grupo 60 dias.

### 6.3.2 GSH

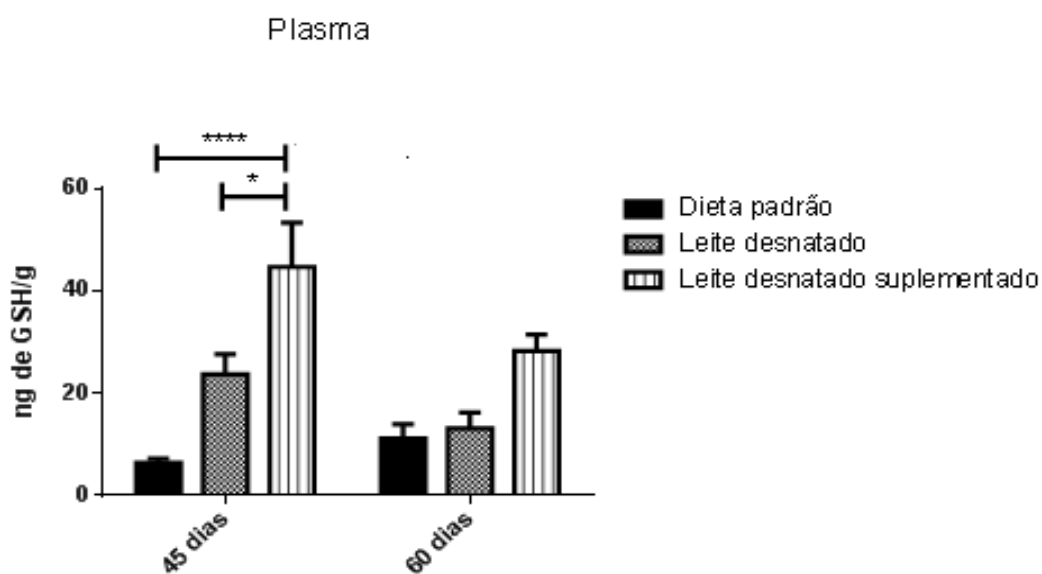
A avaliação dos níveis do GSH revelou uma média no fator “tipo de dieta” [F (2,48) = 35,42 P= 0,0001] no hipocampo e nos fatores “dieta” e “tempo de dieta” [F (2,48) = 19,70 P= 0,0001; F (1,48) = 4,078 P= 0,0490] no plasma (Fig. 13). No hipocampo do grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias foi mais elevado que os níveis de GSH dos grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 (P=0,0074) e 60 (P=0,0006) dias, e “dieta padrão” durante 45 (P<0,0001) e 60 (P<0,0001) dias. Ademais, os grupos alimentados com “leite desnatado suplementado” apresentaram maior nível de GSH que os grupos alimentados com “dieta padrão” por 45 (P<0,0001) e 60 (P=0,0010) dias. Também houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 45 dias e os grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 (P=0,0040) e 60 (P=0,374) dias, os quais apresentaram níveis mais elevados de GSH (Fig. 13A).

Em relação aos níveis de GSH no plasma, o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias demonstrou nível maior de GSH no plasma que os grupos

alimentados com “leite desnatado” durante 45 ( $P=0,0203$ ) e 60 ( $P=0,0001$ ) dias, e “dieta padrão” durante 45 ( $<0,0001$ ) e 60 ( $P<0,0001$ ) dias. Enquanto o nível de GSH do grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 60 dias foi maior que o do grupo alimentado com “dieta padrão” durante 45 dias ( $P=0,0140$ ) (Fig. 13B).

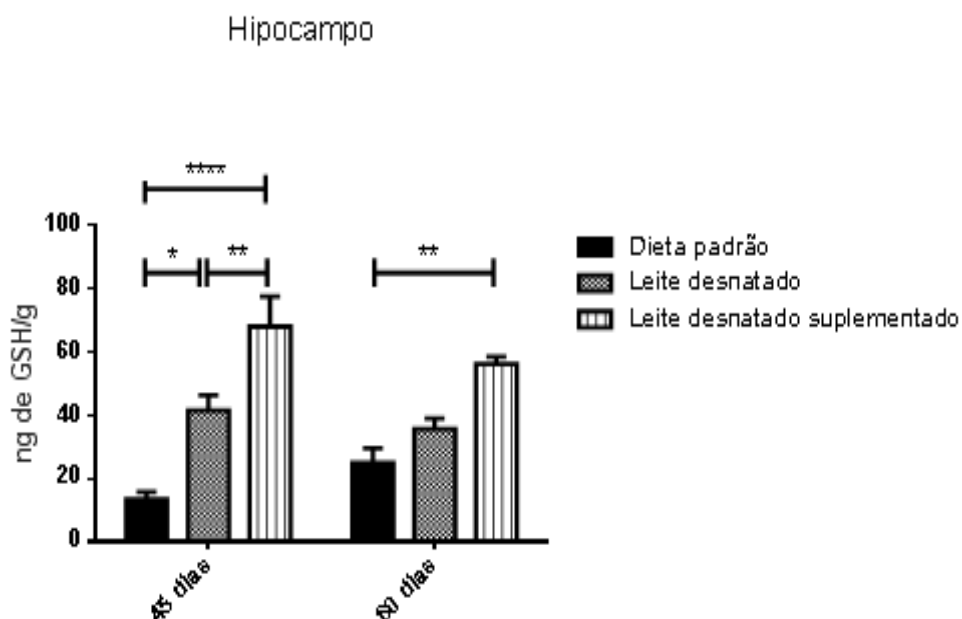
**Figura 13.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de GSH no plasma (A) e hipocampo (B) de camundongos C57BL6 saudáveis.

A



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram o hipocampo e sangue venoso coletado para análise de GSH. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n=9$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).





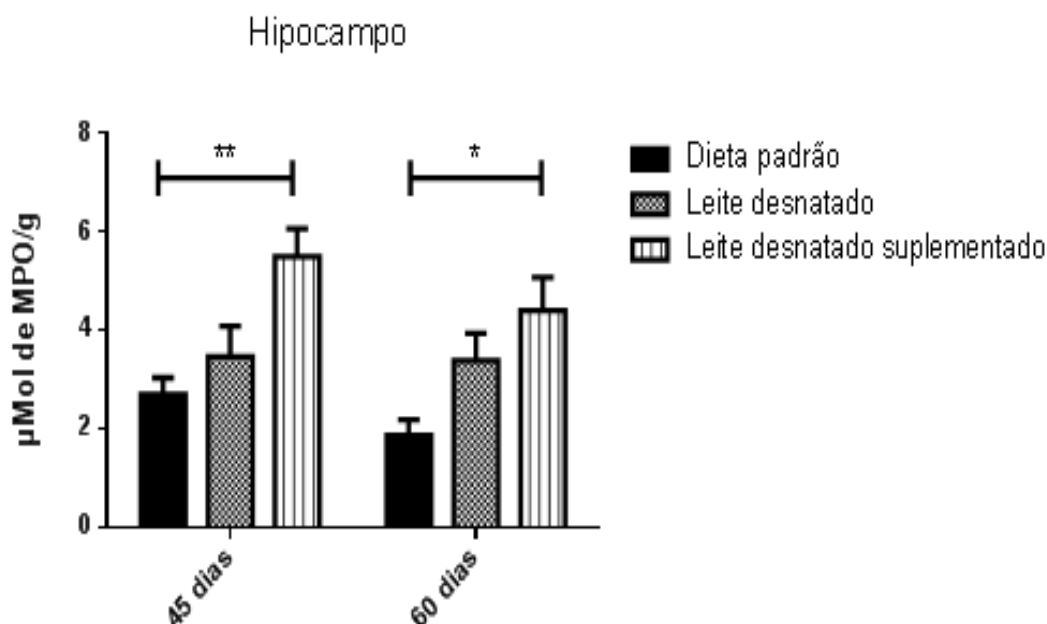
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

## 6.4 Resultados dos marcadores inflamatórios no tecido cerebral hipocampal

### 6.4.1 Atividade da MPO no hipocampo

Houve interação significativa no fator “tipo de dieta” [F (2,48) = 12,69 P= 0,0001] (Fig. 14). O grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou uma concentração maior dessa enzima que os grupos tratados com “dieta padrão” durante 45 (P=0,0064) e 60 (P=0,0002) dias. Além disso, o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 60 dias apresentou uma concentração mais elevada de MPO que o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 60 dias (P=0,0174).

**Figura 14.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 na atividade da MPO no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.



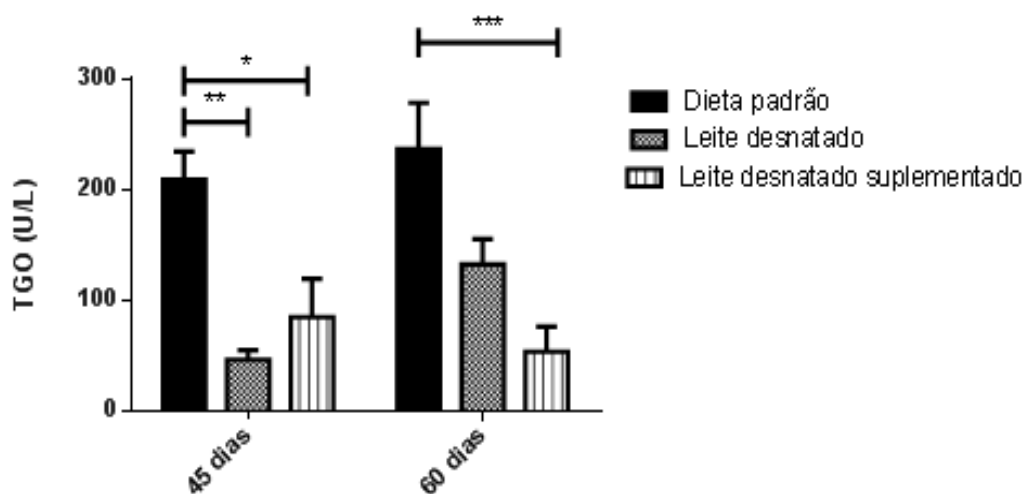
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram o hipocampo dissecado para análise da atividade da MPO. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

## 6.5 Resultados dos marcadores bioquímicas

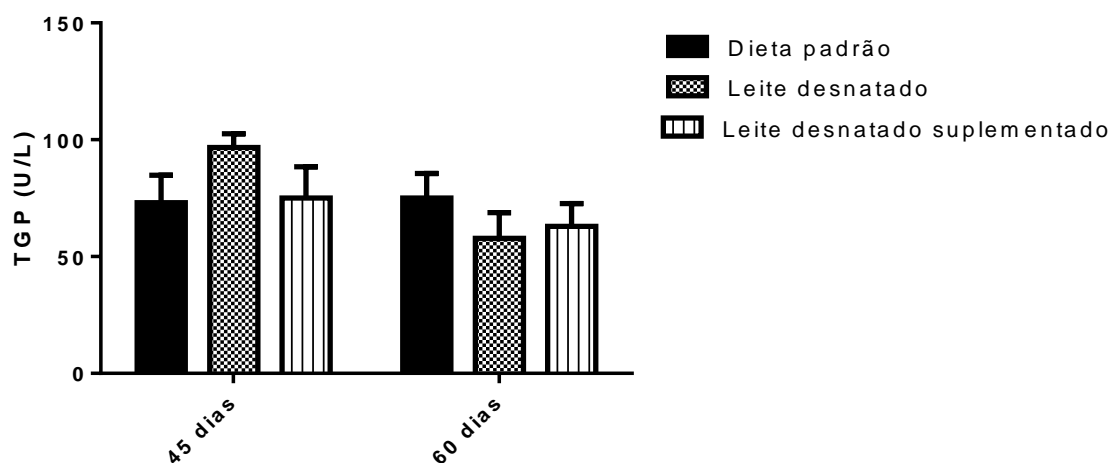
### 6.5.1 AST e ALT

A análise das transaminases no plasma dos camundongos mostrou interação significativa apenas nas concentrações de ALT relacionadas ao fator “dieta” e “tipo de dieta” [F (2,48) = 17,65 P= 0, 0001] (Fig. 12). A concentração de AST dos grupos alimentados com “dieta padrão” durante 45 e 60 dias foi maior que a dos grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 dias (P= 0,0021; P=0,0002), “leite desnatado suplementado” durante 45 dias (P=0,0337; P=0,0048) e “leite desnatado suplementado” durante 60 dias (P=0,0038; P=0,0004) (Fig. 15A), não ocorrendo alterações no níveis de ALT (Fig. 15B).

**Figura 15.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações das transaminases AST (A) e ALT (B) no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram o hipocampo dissecado para análise da atividade da MPO. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise das transaminases TGO e TGP. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

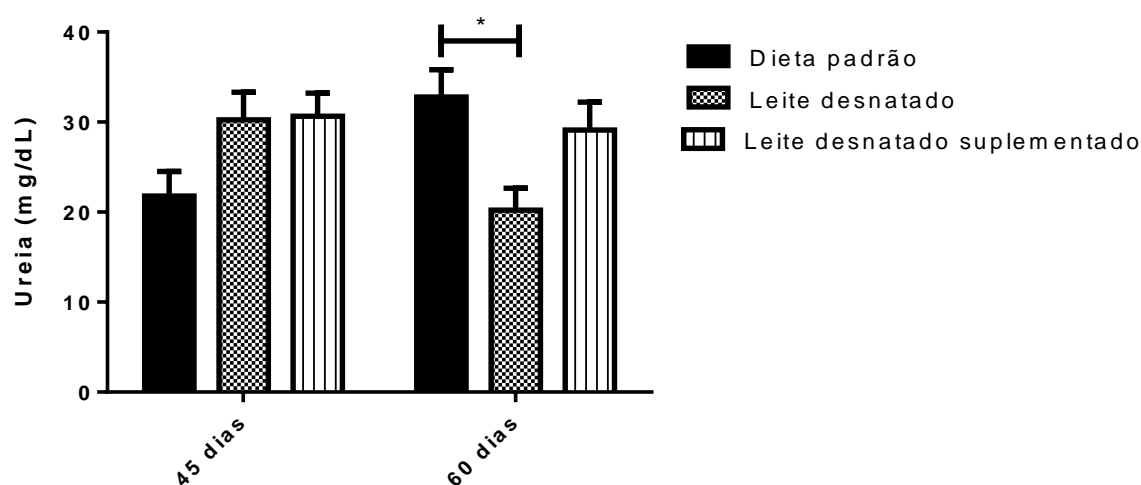
### 6.5.2 Ureia e Creatinina

A avaliação da função renal dos camundongos através das concentrações de ureia e creatinina mostrou interação significativa no “tipo de dieta” em relação as concentrações de ureia [F (2,47) = 6,906 P= 0,0023] mas não nas concentrações de

creatinina (Fig. 16). A interação mostrou que o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 60 dias apresentou uma concentração maior de ureia que o grupo alimentado com “leite desnatado” durante 60 dias ( $P=0,0310$ ) (Fig. 16A).

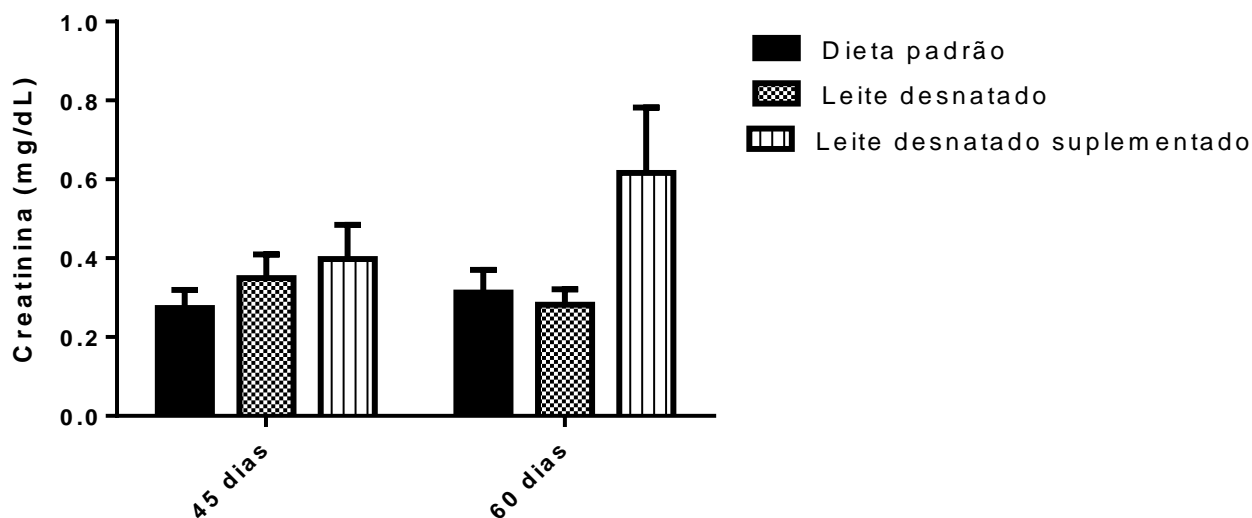
**Figura 16.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de Ureia (A) e creatinina (B) no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.

A



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

B



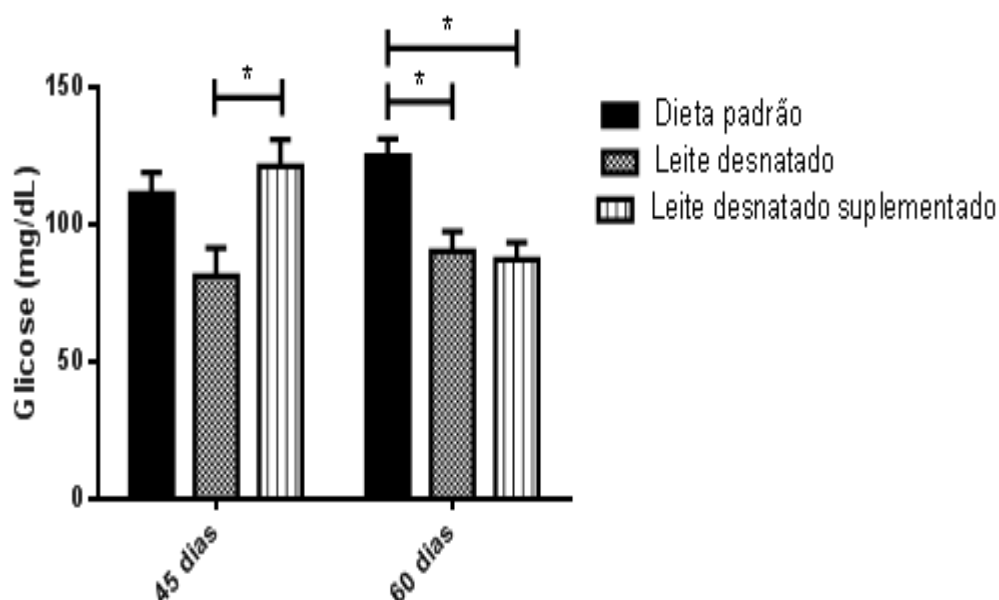
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

Percebe-se que houve significância estatística entre os grupos, porém, sem importância clínica, pois os valores permaneceram dentro dos valores de referência.

### 6.5.3 Glicemia

Na análise dos valores glicêmicos no plasma, os resultados mostram interação no fator “tipo de dieta” [F (2,48) = 8, 241 P= 0, 0008] no qual o grupo alimentado com “leite desnatado suplementado” durante 45 dias apresentou glicemia maior que os grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 dias (P=0,0109) e “leite desnatado suplementado” durante 60 dias (P=0,0459). Ademais, o grupo alimentado com “dieta padrão” durante 60 dias demonstrou glicemia mais elevada que os grupos alimentados com “leite desnatado” durante 45 dias (P=0,0042), “leite desnatado” durante 60 dias (P=0,0396) e “leite desnatado suplementado” durante 60 dias (P=0,0198) (Fig. 17).

**Figura 17.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 nas concentrações de glicose no plasma de camundongos C57BL6 saudáveis.



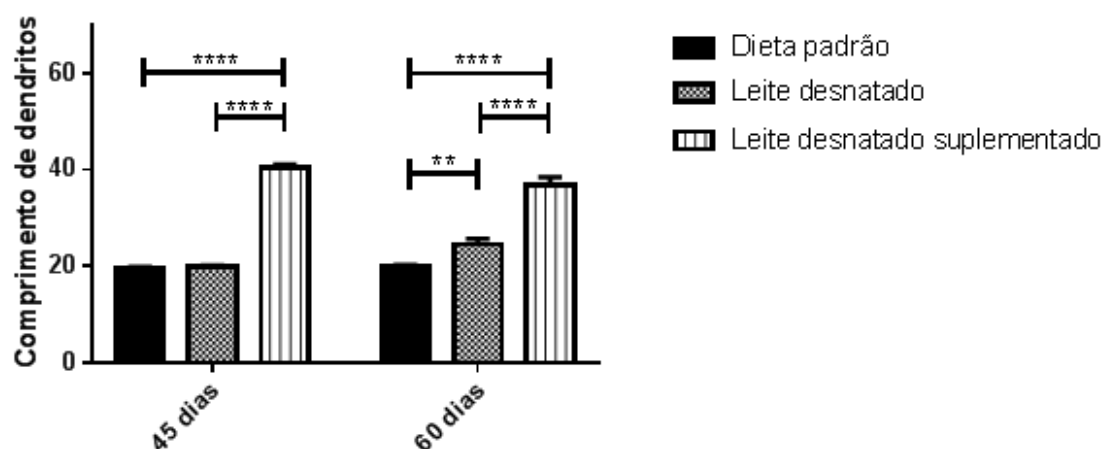
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram sangue venoso coletado para análise dos níveis plasmáticos de glicose. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001).

## 6.6 Técnica de Golgi Cox

### 6.6.1 Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre o comprimento do dendrito em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox

Observou-se um aumento significativo do comprimento dos dendritos do grupo leite desnatado suplementado quando comparado aos grupos dieta padrão e leite desnatado no tempo de 45 dias ( $p < 0,0001$ ). Verificou-se que houve um aumento estatisticamente significativo no comprimento do dendrito do grupo leite desnatado suplementado quando comparado com o grupo dieta padrão e leite desnatado no tempo de 60 dias ( $p < 0,0001$ ). Observou-se uma interação significativa dos fatores tempo e dieta [ $F(2, 39) = 12,05$ ;  $P < 0,0001$ ].

**Figura 18.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre Comprimento dos dendritos no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.

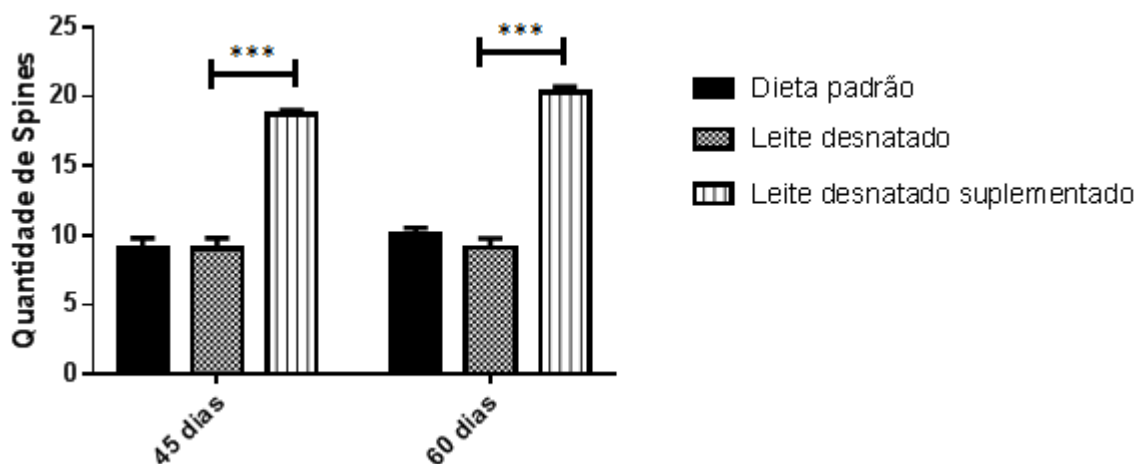


Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados. O comprimento dos dendritos foi avaliada no hipocampo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi realizada através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). 45 Dias: Leite desnatado vs. 60 Dias: Leite desnatado: 0,0032; 45 Dias: Dieta padrão vs. 45 Dias: Leite desnatado suplementado: <0,0001; 45 Dias: Leite desnatado vs. 45 Dias: Leite desnatado suplementado: <0,0001; 60 Dias: Dieta padrão vs. 60 Dias: Leite desnatado: 0,0047; 60 Dias: Dieta padrão vs. 60 Dias: Leite desnatado suplementado: <0,0001; 60 Dias: Leite desnatado vs. 60 Dias: Leite desnatado suplementado: <0,0001

### 6.6.2 Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre as espículas dendríticas (*Spines*) em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox

Observou-se um aumento estatisticamente significativo na quantidade de espículas dendríticas (*Spines*) em hipocampo do grupo leite desnatado suplementado quando comparado aos grupos dieta padrão e leite desnatado no tempo de 45 e 60 dias (p<0,0001). Não houve interação entre os fatores tempo e grupo [F (2, 39) = 0.7012; P=0,5021]. Havendo efeito significativo apenas da dieta [F (2, 39) = 179.5; P<0,0001], independente do tempo.

**Figura 19.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre quantidade de espículas dendríticas (*Spines*) no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.



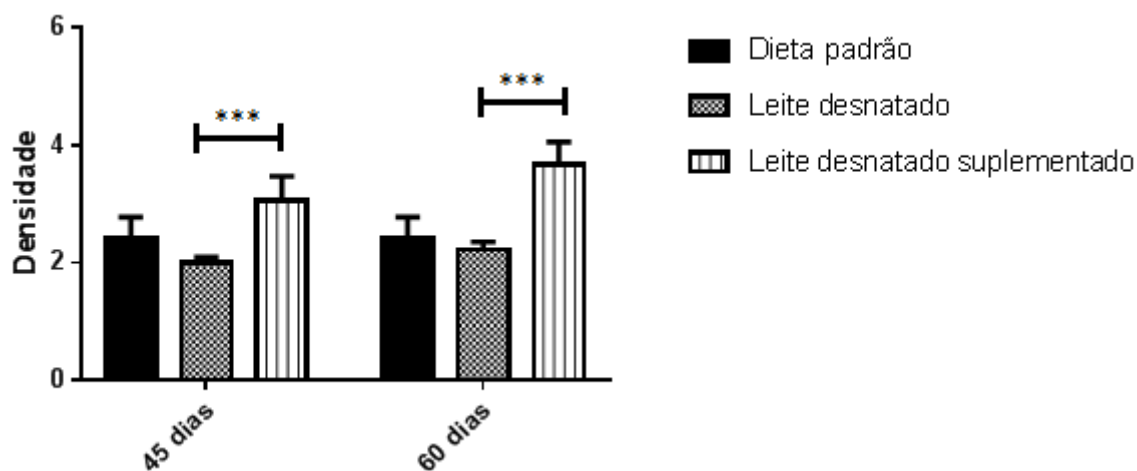
Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados. A quantidade de espinhas dendríticas (*Spines*) foi avaliada no hipocampo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi realizada através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Dieta padrão vs. Leite desnatado suplementado: <0.0001; Leite desnatado vs. Leite desnatado suplementado: <0.0001

### 6.6.3 Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre a densidade de neurônios em hipocampo utilizando a técnica de Golgi Cox

Observou-se um aumento estatisticamente significativo na densidade de neurônios em hipocampo do grupo leite desnatado suplementado quando comparado aos grupos dieta padrão e leite desnatado no tempo de 45 e 60 dias ( $p < 0,0001$ ). Não houve interação entre os fatores tempo e grupo [F (2, 39) = 0.7012; P=0,6266]. Havendo efeito significativo apenas da dieta [F (2, 39) = 8,345; P=0,0010], independente do tempo.

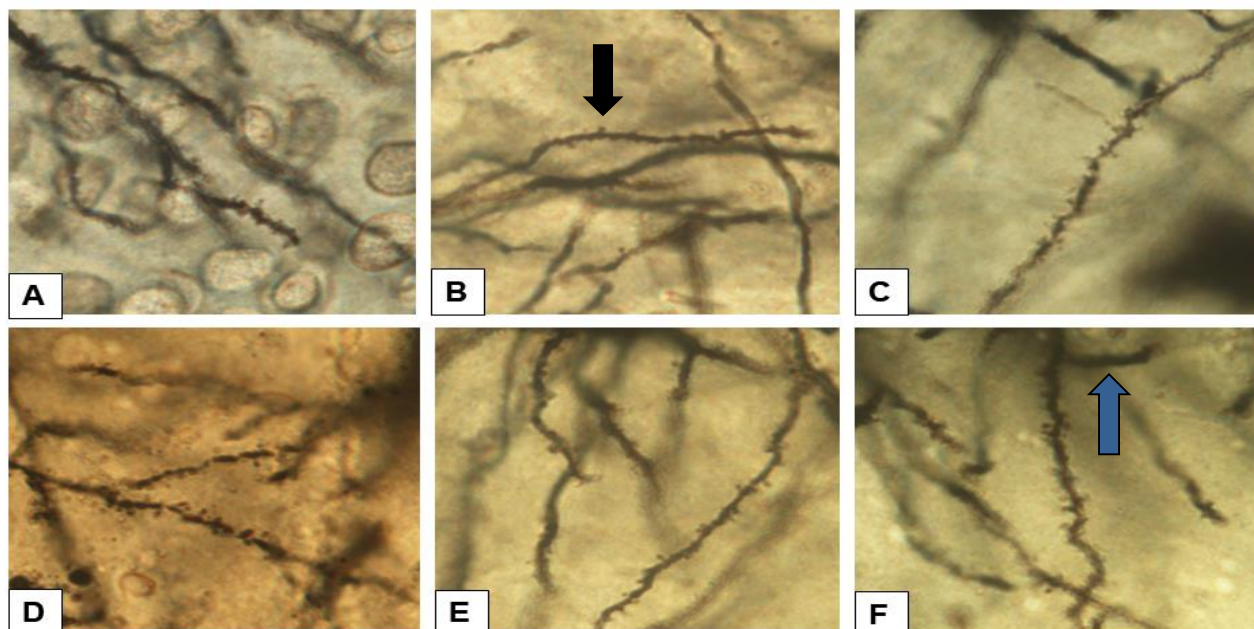


**Figura 20.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre Densidade no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis.



Os animais receberam as dietas *ad libitum* durante 45 dias ou 60 dias. Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados. A densidade do dendrito foi avaliada no hipocampo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=9 animais/grupo). A análise dos resultados foi realizada através de ANOVA Two way seguida pelo teste de Tuckey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Dieta padrão vs. Leite desnatado suplementado: 0,0119; Leite desnatado vs. Leite desnatado suplementado: 0,0009.

**Figura 21.** Efeito da suplementação com mix de ômega 3, 6 e 9 sobre densidade, comprimento e espículas dendríticas no hipocampo de camundongos C57BL6 saudáveis utilizando a técnica de Golgi Cox.



Horizontalmente, o hipocampo é representado pelas letras A, B, C, D, E, F. Grupo A - 1.45 Grupo dieta padrão 45 dias; B - 1.60 Grupo dieta padrão 60 dias; C - 2.45 Grupo leite desnatado 45 dias; D - 2.60 Grupo leite desnatado 60 dias; E - 3.45 Grupo leite desnatado suplementado 45 dias; F - 3.60 Grupo leite desnatado suplementado 60 dias. Seta preta: dendrito; Seta azul: espículas dendríticas (*Spines*).

Nas fotomicrografias apresentadas na figura 21 em relação ao comprimento dos dendritos, a densidade, e espículas dendríticas no hipocampo de camundongos (Figura 19), pode-se evidenciar que aumento desses parâmetros nos grupos leite desnatado suplementado 45 dias e 60 dias (E) e leite desnatado suplementado 60 dias (F) quando comparados com os grupos dieta padrão (A e B) e Grupo leite desnatado 45 e 60 dias (C e D),  $p < 0,05$ .

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a oferta de leite desnatado suplementado com mix de ômega 3, 6 e 9 provocou aumento do comportamento de autolimpeza (*grooming*) e melhora da memória. Houve uma menor variação de peso, evidenciando um menor ganho de peso. Além disso, a suplementação com o mix demonstrou um efeito antioxidante no hipocampo e no plasma. Por outro lado, os níveis de MPO foram mais elevados nos animais que receberam esse tipo de dieta. Em relação à toxicidade periférica, a suplementação provocou redução da concentração de AST e da glicemia e não causou diferenças nos níveis de ALT, ureia e creatinina.

O interesse por parte da comunidade científica por estudos com ácidos graxos poli-insaturados é alicerçado em estudos populacionais e epidemiológicos que evidenciaram os benefícios destes em problemas relacionados aos sistemas corporais (LIMA *et.al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2011). Até início do século passado, os AG foram vistos apenas como forma de conservar energia e que poderiam ser sintetizados no organismo por intermédio das proteínas e carboidratos. Porém, com o surgimento de mais evidências científicas em volta dos AG e que sua deficiência no organismo influenciaria no surgimento de problemas fatais, estes ganharam mais notoriedade, ganhando espaço importante na dieta, passando a serem conhecidos como essenciais por não serem sintetizados pelo organismo (PACHECO, SGARBIERRE, 2001; BORGES *et.al.*, 2017).

Campelo (2018) em seus estudos alinhou que a substancialidade dos AG ômega 3 tardou a acontecer e a ser caracterizada pela complexidade em analisar seus efeitos em modelos animais e pelo fato de ser salientada em humanos quando iniciaram a administração de dietas parenterais suplementadas com AG ômega-6. Innis (1991) na década de 90 comprovou a imprescindibilidade dos ômega 3 e 6, ao modificar as alterações neurológicas e visuais em uma menina de 6 anos que fazia uso de dieta parenteral rica em ômega 6 e pobre em ômega-3.

Embora o organismo possa produzir AG de cadeia muito longa a partir dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, a sua síntese pode ser prejudicada por inúmeros fatores que pode repercutir na manutenção de uma condição de vida saudável. A razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 na dieta tem grande influência na produção AG da família  $\omega$ -3, onde o consumo aumentado do  $\omega$ -6 em detrimento do  $\omega$ -3 propicia o desenvolvimento de doenças alérgicas, inflamatórias, distúrbios neurológicos e cardiovasculares. Desta forma, estudos que avaliam melhor a

razão entre  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 na dieta da população, serviriam de base para um consumo equilibrado através de acompanhamento nutricional.

As gorduras poli-insaturadas também se destacam pela suas ações no SNC. O cérebro é um órgão que contém quantidades significantes de gorduras (mais de 20%) que desempenham funções relevantes em um cérebro saudável, que depende não somente da quantidade, mas da qualidade e tipo de gordura ingerida. O AG  $\omega$ -3 é componente da massa cinzenta cerebral que atua na promoção da comunicação entre células nervosas, uma vez que auxilia na formação das bainhas de mielina ao redor das fibras nervosas possibilitando a neurotransmissão química mais rápida e efetiva na troca de mensagens, podendo refletir em melhor estado de humor e memória (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Em estudos diversos o AG  $\omega$ -3 mostrou-se útil e com inúmeras utilidades terapêuticas. Em uma delas revelou-se operativo na presença de prejuízos cognitivos relacionados ao envelhecimento normal e existência de doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer (ZHANG *et al.*, 2011; KARR, ALEXANDER, WINNINGHAM, 2011) como também eficiente em desempenhos cognitivos, tarefas de atenção, e melhoria na avaliação do humor em mulheres jovens e indivíduos saudáveis (LASSAK, GAULIN, 2011; FONTANI *et al.*, 2005). Outro estudo objetivou investigar se o EPA e DHA poderiam melhorar a capacidade de aprendizagem de ratos envelhecidos. O desfecho sugeriu que a administração crônica de EPA e DHA poderia ser uma estratégia de prevenção contra o declínio cognitivo relacionado com a idade (HASHIMOTO *et al.*, 2015).

Tais achados convergem com nossos estudos. Mostramos que houve uma melhora nas tarefas cognitivas nos grupos alimentados com o leite suplementado com mix em relação as demais dietas, aumentando significativamente o número de alterações corretas no teste do Y maze com o passar dos dias com a dieta. O mesmo observou-se no teste do labirinto aquático de Morris, onde diminuiu significativamente o tempo de latência para encontrar o local da plataforma e o tempo de permanência no norte durante os 60 dias de dieta em comparação com alimentação de dieta padrão.

Muitos autores também obtiveram bons resultados com a utilização do DHA em testes de memória e aprendizagem no labirinto aquático de Morris (LUCHTMAN, MENG, SONG, 2012; CANÇÃO, HORROBIN, 2004; MORIGUCHI, SALEM, 2003; PAN *et al.*, 2011), no qual a utilização de doses adequadas e que favorecem a melhora dessas funções. Ainda foi demonstrado por Nemeth e colaboradores (2015) que avaliaram os efeitos dos PUFAs (tanto 3 quanto 6) sobre a atividade cognitiva de cobaias machos e fêmeas,

mostrando que o consumo destes seja capaz de melhorar a memória espacial e reduzir implicações negativas dos estresse fisiológico sobre as habilidades cognitivas.

O declínio cognitivo está relacionado a limitados níveis de DHA no encéfalo (SCHAEFER *et al.*, 2006; LOPEZ *et al.*, 2011) podendo ser reduzidos com o aumento do consumo de peixe e alimentos que contenham DHA e EPA (KALMIJN *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2005). Foi demonstrado que administração por gavagem de DHA e também de EPA protege contra perda de memória em modelo animal para doença de Alzheimer, e esse efeito protetor foi acompanhado por uma elevação de EPA e DHA no córtex com uma diminuição correspondente no estresse oxidativo e um aumento na expressão de proteínas relativas com a plasticidade sináptica (HASHIMOTO *et al.*, 2009).

Dyall e colaboradores (2010), Dyall, Michael-Tito (2008) e Kitajka *et al.*, (2004) mostram que o mecanismo envolvido no processo da aprendizagem e memória com a utilização de PUFAs estão relacionado com sua capacidade de atuar como ligante regulação da expressão dos fatores de transcrição como os receptores de ácido retinóico (RAR), retinóide X receptores (RXRs), e peroxissoma proliferador-ativado receptor (PPARs). Estas vias retinóides de sinalização têm sido implicadas na regulação da plasticidade sináptica, aprendizado e memória em roedores.

No teste de campo aberto, foram avaliados alguns parâmetros, com intuito de verificar se a dieta suplantada com o mix de início interferia na capacidade motora do animal. O comportamento de autolimpeza (*grooming*) foi avaliado durante o teste e o seu aumento evidenciado nos nossos achados pode estar relacionado a um possível efeito antidepressivo da suplementação com mix de ômega, uma vez que, em outros estudos pré-clínicos, a redução do número de *grooming* foi associada ao aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado (GRIEBEL, *et al.* 2002a; GRIEBEL *et al.*, 2002b), um teste importante para screening de substâncias com efeito antidepressivo (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

Quanto a atividade locomotora, um estudo que avaliou o efeito da oferta de uma dieta com alta quantidade de gordura, mostrou que esse tipo de dieta promove um aumento da atividade locomotora em machos, enquanto a reduz nas fêmeas (GELINEAU *et al.*, 2017). Outro estudo com um objetivo semelhante também revelou alterações da atividade locomotora decorrentes da ingestão de uma dieta com alta quantidade de gordura (WU *et al.*, 2017), evidenciando que o excesso de gordura afeta diretamente o comportamento dos animais.

No presente estudo, entretanto, não houve diferença significativa entre o número de *crossing*, a distância percorrida e o número de *rearing* dos grupos investigados, evidenciando a ausência de interferência das dietas ofertadas sobre a atividade locomotora dos animais sugerindo que a suplementação foi feita adequadamente, uma vez que aumentou o *grooming*, parâmetro relacionado ao comportamento depressivo, e não afetou a atividade locomotora.

Outro achado igualmente importante em nosso estudo foi uma menor variação da massa corpórea entre os grupos alimentados com “leite desnatado suplementado” em relação aos demais grupos. O ganho de massa corpórea foi significativamente menor, evidenciando um controle ocasionado pelo mix de AG  $\omega$ -3  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9.

Consta-se que a população com sobrepeso e obesidade tem aumento consideravelmente em todo o mundo durante décadas (BERNARDO *et.al.*, 2014) e as implicações da obesidade são acentuadas com acúmulo de gorduras no fígado, músculos, vísceras e outros órgãos (BRAY e KRAUSS, 2014) aumentando o número de doenças associadas como diabetes mellitus tipo 2, problemas cardiovasculares e cânceres (PONTES *et.al.*, 2009; FRANCISQUETI *et.al.*, 2015).

Os PUFAs possuem várias características nutricionais. Estudos mostram que o óleo de peixe é um nutriente essencial que está associado a redução da massa corpórea relacionado a presença PUFAs. A presença de 3% de adicionado de ômega 3, 6 e 9 induz a uma menor velocidade de esvaziamento gástrico e maior saciedade. Estudos observacionais demonstram que a ingestão de 1,8g PUFAs/dia, eleva a oxidação de gorduras e conseqüente redução da adiposidade (COUET *et. al.*, 1997; TAPSELL *et. al.*, 2013). Kunesová e colaboradores (2006) já evidenciam uma redução de massa corpórea com de 3,0g de PUFAs da série n-3, porém outros ensaios utilizando esta mesma dose não constataram qualquer efeito sobre o peso (DEFINA *et.al.*, 2011; TAPSEL *et.al.*, 2013).

Além de tais benefícios, a ingestão de  $\omega$ -3 também é fundamental para manutenção adequada do status redox (POUDYAL *et al.*, 2011). O descontrole do estado redox, definido como desequilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares e produção de EROS, pode ocasionar danos as estruturas celulares como membranas, proteínas, lipídios e DNA, acompanhado ainda da cessação das vias de sinalização celular e inativação de enzimas metabólicas. Esse desequilíbrio está agregado ao desenvolvimento de várias doenças como diabetes mellitus, artrite reumatóide, doenças pulmonares inflamatórias, entre outras (FARÍAS *et al.*, 2017).

No nosso estudo, o leite desnatado suplementado com o mix foi capaz de melhorar as defesas antioxidantes, como evidenciado pelo aumento do GSH no plasma e hipocampo e diminuição do TBARS no plasma. No entanto, a função dos AG  $\omega$ -3 na diminuição do dano oxidativo e restabelecimento da homeostase de radicais livres ainda é incompreendido (POUDYAL *et al.*, 2017).

Algumas pesquisas propõem que os AG  $\omega$ -3 podem ter ação antioxidante e assim evitar a peroxidação lipídica de membranas, uma vez que as moléculas dos lipídeos de  $\omega$ -3 são mais sujeitos a perda de hidrogênio para as EROS, fornece mais substratos para ataque dos radicais livre diminuindo ou até mesmo impossibilitado a ação dos radicais livres nos sistemas biológicos de importância para homeostase fisiológica (CAMPOS *et al.*, 2011). Já outros trazem os benefícios em referência ao desequilíbrio redox, quando ocorre a introdução desses ácidos graxos na membrana celular e pela modulação de vias de sinalização redox. Isto é, a ingestão de AG  $\omega$ -3 eleva a expressão de enzimas antioxidantes e reduz as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são produtos da peroxidação lipídica (FARIAS *et al.*, 2017).

Os PUFAs como  $\omega$ -3 possuem capacidade de controlar respostas antiinflamatórias e preservar os tecidos de danos ocasionados pelos radicais livres em uma variedade de doenças em que o mecanismo oxidante/antioxidante está alterado (IRAZ *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2010). Vidmar e colaboradores (2014) trouxeram em sua pesquisa um achado que corrobora com o do presente estudo, no qual a ingestão diária de 2g de ácido graxo  $\omega$ -3 durante 15 dias em indivíduos em pós-reconstrução do ligamento cruzado anterior apresentaram níveis significativamente menores do biomarcador de peroxidação lipídica e um aumento no estado antioxidante não enzimático de grupos-SH.

Os níveis diminuídos de TBARS sugerem a existência da ação antioxidante proporcionada pelo leite suplementado com o mix de ácidos graxos no plasma sanguíneo dos animais deste estudo. Os níveis aumentados do TBARS poderiam ocasionar oxidação com consequente desestabilização das membranas celular com consequente apoptose (TIKU *et al.*, 2003). Diante de tais efeitos, infere-se que a suplementação do AG  $\omega$ -3 é indicado para o equilíbrio entre mediadores pró e antiinflamatórios, na neutralização do estresse oxidativo, bem como na inibição de proteases encarregados pela degradação de proteínas em problemas de cunho inflamatório (ZAINAL *et al.*, 2009).

Cabe lembrar que a MPO é uma peroxidase presente nos grânulos dos neutrófilos que são secretados nos processos inflamatórios. A determinação da atividade dessa enzima é largamente utilizada para concluir a presença de infiltrado neutrofílico no

tecido e a intensidade da inflamação (CAMARGO *et.al.*, 2005; DAWRA *et.al.*, 2007). Os neutrófilos são as células fagocíticas em maior quantidade na circulação e as primeiras células a serem ativadas pelo sistema imune inato contra infecções. Ao chegarem ao local da infecção por quimiotaxia, estas fagocitam e destroem os microrganismos agressores presentes pela liberação de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e ERO (BABIOR, 1984).

O aumento da atividade da MPO no hipocampo, encontrado neste estudo, indica existência de processo neuroinflamatório, podendo aqui também justificar a causa possível do aumento do antioxidante GSH na mesma área. A inflamação acontece devido atuação de radicais livres, com aumento de citocinas pró-inflamatórias (exemplo de TNF-Alpha e IL-6) e ação de células do sistema imune (BHATIA, 2005). Os radicais livres podem ser formados no metabolismo oxidativo fisiológico, porém são produzidos demasiadamente em muitos processos patológicos (DASURI, ZHANG, KELLER, 2013).

A elevação da concentração de MPO no hipocampo em relação ao grupo controle (ração + água) pode traduzir uma maior atividade do sistema imunológico dos animais que receberam a dieta com o adicionado de ômega 3, 6 e 9.

A neuroinflamação é um termo adotado para representar o grupo de respostas imunitárias que acontecem no SNC, que por sinal diferem da inflamação periférica. Esta diferença encontra-se nos tipos de células envolvidas que são os astrócitos e a micróglia. Apesar da barreira hematoencefálica (BHC) separar o SNC do sistema imune periférico, em eventos inflamatórios ela torna-se permeável e mediadores pró-inflamatórios, assim como a linfócitos e outras células imunes advindas da periferia. Em paralelo, as células endoteliais, que são componentes da BHC são ativadas, aumentando a liberação de mais mediadores que acabam também alcançando o SNC dando origem a inflamação (DE VRIES *et al.*, 1996; DILGER, JOHNSON, 2008) que pode gerar danos na função sináptica e morte neuronal, o que culmina no desenvolvimento de várias doenças neurológicas.

Não se sabe os motivos que a dieta do mix suplementado com os ômega tenha causado aumento da atividade da MPO, tendo por base vários estudos que mostram uma ação contrária, principalmente do  $\omega$ -3, como agente antiinflamatório (MILES, CALDER, 1998; SERHAN *et al.*, 2005; MARTIN *et. al.*, 2006; SERHAN *et al.*, 2007; CALDER *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010). Os AG  $\omega$ -3 no processo de resolução de inflamação direcionado a homeostase, acontece mecanismo de resolução ativa, ao intervirem em eicosanóides e mediadores com ação antiinflamatória derivados dos AG  $\omega$ -3 (DAS, 2006; CALDER, 2011). Ainda funcionam como ligantes endógenos dos fatores transcricionais para receptores ativados por proliferação de peroxissoma (PPAR- $\gamma$  e  $\alpha$ ) atuando com a importante



função antiinflamatória em doenças com características inflamatórias como Alzheimer e Parkinson. Isto ocorre em consequência da atenuação na produção de óxido nítrico e prostaglandinas E2, agindo em diferentes pontos de ativação microglial, mielinização, morte celular e inibição da proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- $\kappa$ B (FREITAS *et al.*, 2017).

Além de anti-inflamatório, antiarrítmico, redutores de lipídeos no sangue e possuem propriedades vasodilatadoras, os PUFAs possuem efeitos eminentes no tratamento de diabetes e resistência à insulina (ANDRADE, 2009; SIRIWARDHANA *et al.*, 2012). Uma vez que os AG  $\omega$ -3 estão circulando na corrente sanguínea, ocorre uma melhora na fluidez da membrana celular que contribui para a sinalização celular. Essa melhora de fluidez favorece o funcionamento e sinalização de receptores da superfície que beneficia a sensibilidade a insulina, promovendo o deslocamento do transportador de glicose-4 (Glut-4), contendo a molécula de glicose, do citoplasma para o meio interno, propiciando a homeostase da glicose (GUO *et al.*, 2017).

No presente estudo, o leite desnatado suplementado com o mix de ômega 3, 6 e 9 a 3% aumentou os níveis glicêmicos durante os 45 dias de dieta e diminuiu conforme o tempo da dieta se prolongou. Tais resultados são instigantes, visto que o fígado está envolvido na manutenção da glicemia. Desta forma, os benefícios da suplementação sobre o metabolismo podem ser dependentes da ação do mix sobre o tecido hepático.

A atuação da insulina no fígado envolve a via do receptor de insulina/substrato do receptor de insulina 1/Akt. Uma ampliação na sinalização da insulina reduz a glicogênólise hepática e conseqüentemente a glicemia em estados pós-prandiais. Contudo, falhas nessa via, como ajustes metabólicos hepáticos, podem ocasionar efeitos contrários a sua função, causando aumento da glicogênese e glicogênólise, com conseqüente aumento nos níveis glicêmicos (ALESSI, COHEN; 1998; BARTHEL, SCHMOLL, 2003; WU *et al.*, 2012).

Os animais suplementados com o mix de ômega 3, 6 e 9 apresentaram redução de massa corpórea e elevação de glicemia aos 45 dias de suplementação. Entretanto, o maior consumo de gordura com conseqüente maior saciedade dos animais indica provável redução na ingesta de carboidratos, o que vem de encontro ao presente resultado.

Em seus estudo, Luz e colaboradores (2012) mostraram que a suplementação em diferentes tempos (0, 14 e 21) com diferentes dose (5 e 10mg) de ômega-3 demonstrou uma redução estatisticamente significativa na glicemia nos grupos a partir do 21º e 14º dia, com maiores efeitos no 21º com a dose de 10mg, demonstrando a ação potencial da

suplementação com ômega-3 na diminuição dos níveis glicêmicos dependente da dose e do tempo de tratamento.

Outro estudo randômico, os pesquisadores avaliaram as mulheres com diabetes mellitus tipo 2 e que receberam PUFA por 2 meses, resultando na redução de fatores aterogênicos, não ocorrendo melhora na sensibilidade a insulina (KABIR *et.al*, 2007). Já Simão *et.al.*, (2010) mostraram que os participantes do seu estudo tiveram aumento considerável nos índices glicêmicos após 90 dias de tratamento com capsulas contendo óleo de peixe, não aumentando também a resistência à insulina no sangue dos indivíduos no decorrer da intervenção.

Outros estudos também afirmam a respeito da ocorrência do aumento dos níveis de glicose no sangue e da resistência à insulina com o consumo de capsulas de óleo de peixe que contém  $\omega$ -3. Moris e pesquisadores (2007) consideraram um aumento expressivo da insulina em jejum, com propensão em aumentar os valores da glicose de jejum em homens hiperglicêmicos após a ingestão de óleo de peixe. Esses efeitos comprovam que o metabolismo glicêmico se agrava com dosagens altas de  $\omega$ -3. O mecanismo mais plausível para elucidar tais resultados a respeito dos PUFAs no controle glicêmico, seria uma elevação na formação de glicose no fígado como consequência do aumento do fluxo dos precursores hepáticos da gliconeogênese (WOODMAN *et.al.*, 2002; MORI *et.al.*, 2007).

Trabalhos científicos também têm relatado sobre os efeitos renoprotetores do  $\omega$ -3. Polzin (2011) evidenciou em seu estudo que cães que foram suplementados com  $\omega$ -3 na dieta apresentaram uma redução da glomerulosclerose, da fibrose túbulo-intersticial e de infiltrados de células inflamatórias intersticiais. Wong *et. al.*, (2010), demonstraram que em apenas 12 semanas foi possível observar melhora da função renal em pacientes com a Diabetes *Mellitus* tipo 2, na qual houve redução considerável dos níveis de creatinina. Esses AG na dieta podem influenciar a função renal através de efeitos sobre o metabolismo de eicosanóides renais (SCHARSCHMID *et al.*, 1987; BROWN, 1999).

De forma divergente, nosso estudo não encontrou efeitos protetores proporcionados pela ingestão do leite suplementado com mix de ácidos graxos. A uréia e creatinina avaliada pelo plasma dos animais permaneceram inalteradas se tratando de ações relacionadas ao leite desnatado suplementado com o mix de AG. O efeito protetor foi evidenciado somente pelo leite desnatado, que diminuiu os níveis de uréia aumentados pela dieta padrão ao longo dos 60 dias de alimentação. Um achado instigante e divergente dos estudos que envolvem a suplementação com AG em humanos e animais.

Os estudos demonstram a evidencia dos PUFAs em controlar as doenças renais crônicas em que a suplementação de dietas ricas em ômega  $\omega$ -3 tem ação preventiva na deterioração da função do glomérulo, na qual mantém preservado as funções renais (BROWN, 2002; TASSINE *et al.*, 2011). Wong *et.al.*, (2010) referiu que a suplementação de ômega  $\omega$ -3 reduz a valor de creatinina sérica tanto em cães como em humanos, demonstrando que medicamentos à base de ômega  $\omega$ -3 reduzem os níveis de uréia e creatinina séricas bem como proteinúria.

Valle (2014) em seu estudo com cães com doença renal crônica que foram alimentados com dieta rica em  $\omega$ -3 em associação com vitamina E, selenito de sódio, gluconato de cobre, gluconato de zinco, sulfato de condroitina e glucosamina, tiveram menor mortalidade em os cães que foram suplementados com o ômega  $\omega$ -6. Observou-se que houve uma melhora da ureia e da creatinina com menores valores da ureia em relação a creatinina. Tais fatores se devem hipoteticamente a capacidade do  $\omega$ -3 em reduzir o as concentrações do colesterol e triglicérides plasmáticos juntamente com sua ação antioxidante, auxiliando na prevenção renal.

O mesmo acontece em relação as funções hepáticas. É sabido que a regeneração do fígado é peculiar e a renovação celular basal é mínima e qual tal processo é influenciado pela alimentação dos indivíduos (BIANCHI *et. al.*, 2008). Estudos apontam que o  $\omega$ -3 tem uma propriedade que é o auxílio na modulação de respostas imunológicas e inflamatórias, mantidas nos seres humanos e nos animais na qual esse ácido graxo dispõe de formulações para beneficiar a regeneração do fígado (QIU *et. al.*, 2012).

Na presente pesquisa, o mix com ômega 3, 6 e 9 a 3% mostrou-se protetor nas funções hepáticas. A transaminases AST aumentada pela dieta padrão durante os 45 e 60 dias de dieta foram significativamente reduzidas pelo mix a medida que o tempo da dieta se passava, com maior redução nos 65 dias. Aparentemente, nos níveis da ALT não houve alterações com o consumo de nenhuma das dietas. Poucos estudos foram divulgados acerca das alterações bioquímicas ocasionadas pela suplementação de AG, principalmente se tratando da função hepática e os que foram explorados, mostraram melhoram nos níveis da ALT ou ambas (AST e ALT) apresentando-se inalteradas.

Foi o que a publicação de Silva e colaboradores (2015) relataram. Ao se pesquisar regeneração hepática em ratos submetidos a hepatectomia parcial de 60% com e sem ação de dieta suplementada com AG  $\omega$ -3 através do estudo ponderal do fígado regenerado, comprovou-se que, no que refere a regeneração hepática os parâmetro laboratoriais de AST e ALT mantiveram-se inalterados com a suplementação do  $\omega$ -3.

Zelber; Ratziu e Oren (2011) ressaltaram que a alimentação saudável auxilia no manejo da doença hepática gordurosa não alcoólica e que Intervenções dietéticas formuladas no consumo de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -9 como o azeite de oliva, é útil nesse processo.

Também é descrito que uma baixa ingestão de PUFA ( $\omega$ -3) e elevado consumo de gordura total em relação a maior razão entre os ácidos  $\omega$ -6/  $\omega$ -3, estão fortemente associados a inflamação hepática. As dietas hiperlipídicas causam indução de esteatose e lesão hepática que podem ser evidenciadas pelo aumento de transaminases sérica em animais com esteatose macro vesiculares, entretanto suplementos com óleo de peixe auxiliaram na redução desses parâmetros (ALMEIDA, 2011).

O óleo de peixe contém  $\omega$ -3, é citado em muitas pesquisas por proporcionar efeitos benéficos na redução de lipídios hepáticos em indivíduos que sofrem com esteatose hepática melhorando os níveis de lipídios séricos, bem como nos níveis de ALT (SEALLS, 2008). Saraswathi *et.al.*, (2007); Gonzalez *et.al.*, (2008) demonstraram em seus estudos desenvolvidos com ratos e humanos respectivamente, que PUFA  $\omega$ -3 atuou na regulação e formulação da produção e oxidação dos lipídios com consequente redução da esteatose hepática e inflamação e melhora nos níveis de ALT séricos após a ingestão da suplementação do óleo de peixe, sendo associado a diminuição das gorduras hepáticas.

No presente estudo, nas concentrações de ALT, AST, Uréia e Creatinina não houve alteração das funções hepáticas e renais, portanto conclui-se que houve segurança biológica no uso da dieta adicionada com o mix de ômega 3, 6 e 9.

A impregnação do tecido nervoso pela técnica de Golgi Cox permite a observação de comprimento dos dendritos, espículas dendríticas e densidade dos neurônios. Após a aplicação da técnica de Golgi Cox, observa-se que a mesma é viável para observação de alterações hipocâmpais induzidas por diferentes padrões de dieta (BERNARDI, MELO, 2018). No grupo suplementado com leite desnatado rico em omegas 3, 6 e 9 houve um aumento do comprimento das espículas dendríticas, comprimento e densidade de neurônios em camundongos C57Bl6 saudáveis.

Araújo e colaboradores (2008) verificaram que animais intoxicados com plantas da família Convolvulaceae demonstraram que as espículas dendríticas remanescentes apresentaram o colo encurtado e mais largo, e o aparelho espicular estava com tumefação e desorganização estrutural.

Os resultados evidenciam os efeitos benéficos da suplementação com mix de ômega no perfil de lipoproteínas, nos marcadores de inflamação e alterações neurológicas nos animais submetidos ao tratamento. É sabido da importância dos ômega na redução da

inflamação e prevenção de doenças neurodegenerativas como Alzheimer. Além disso, por atuar nos processos inflamatórios, os ácidos graxos podem prevenir contra doenças cardiovasculares, diabetes e até mesmo o câncer, influenciando ainda na resposta ao tratamento (THOMAS, 2015).

Para complementar os achados pré-clínicos em animais, estudos em modelos celulares avaliando o potencial citotóxico do mix de omegas e o potencial de ação durante progressão tumoral e desenvolvimento do câncer, podem comprovar os efeitos benéficos dessa suplementação, as quais utilizadas em combinação com drogas padrão para o tratamento de determinado tipo de câncer pode trazer achados importantes na resposta ao tratamento e prognóstico dos pacientes. Além disso, estudos clínicos, avaliando diferentes tipos de populações, como obesos, portadores de doenças cardiovasculares, podem sugerir novas estratégias de tratamento e confirmar os efeitos da suplementação com mix de ômega na qualidade de vida e prevenção de doenças.

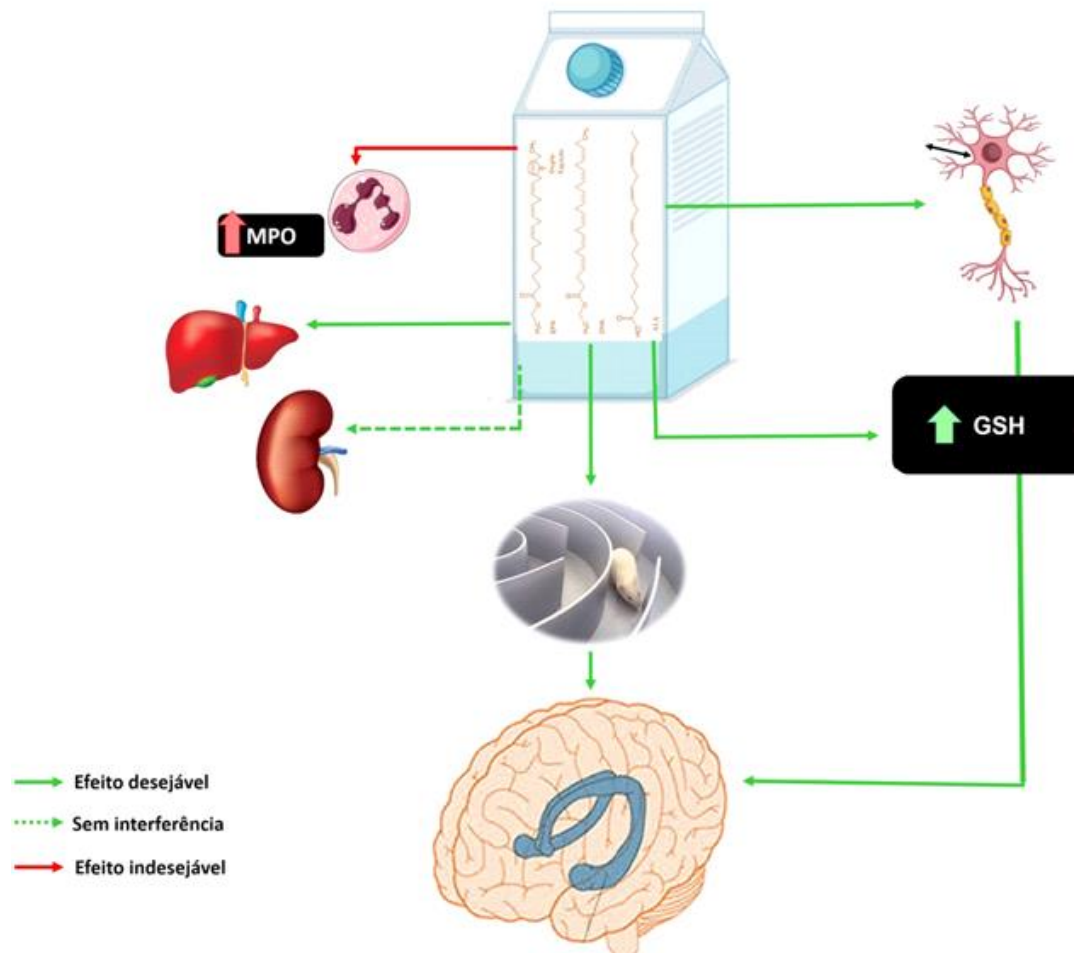
Como perspectiva deste trabalho, pode-se verificar a participação de citocinas inflamatórias no modelo de suplementação com mix de Omega 3, 6 e 9 em camundongos C57Bl6, bem como a participação de outros componentes do estresse oxidativo como superóxido desmutase, catalase e GPX, principalmente com relação ao Omega 6 e 9 que há uma escassez de estudos na literatura.

## 8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos modelos experimentados utilizados e levando em conta o discutido até o presente, pode-se concluir que a mistura de óleos Omega 3, 6 e 9, com elevada relação  $\omega$ -9:  $\omega$ -6 (3,4:1) e baixa relação  $\omega$ -6:  $\omega$ -3 (1,5:1), adicionada a leite desnatado zero lactose:

- 1 – Reduz o peso dos animais
- 2 – Melhora da memória espacial e de trabalho dos camundongos.
- 3 – Induz a ação antioxidante por aumentar níveis de GSH no hipocampo.
- 4 – A oferta da mistura de ômega 3, 6 e 9 não alterou as concentrações de MPO no hipocampo dos camundongos C57Bl6.
- 5 – Não promove alteração em indicadores e marcadores de função hepática e renal dos camundongos C57Bl6.
- 6 – Eleva o comprimento dos dendritos, de quantidade de espículas dendríticas e densidade de neurônios no hipocampo dos camundongos C57Bl6, promovendo a neuroplasticidade.

Figura 22. GRAPHIC ABSTRACT



## REFERÊNCIAS

ADEFEGHA, S.A. Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases; Novel perspectives for health promotion and disease prevention. **J. Diet Suppl.** 2017;1-33. DOI: 10.1080/19390211.2017.1401573.

AGOSTONI, C.; MORENO, L.; SHAMIR, R. Palmitic Acid and Health: Introduction. **Crit Rev Food Sci Nutr.** V.12, p.1. 2015. ISSN 1549-7852.

ALESSI, D.R; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Curr Opin Genet Dev**, v.8, n.1, p.55-62. 1998. doi: 10.1016/S0959-437X(98)80062-2.

ALMEIDA, B.B. **Ação do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia media na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos.** 2011. 143f. Dissertação (Mestrado em Clínica médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

ANDRADE, J.P. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arq. Bras. Cardiol.** V. 93, n.1, Supl1. São Paulo, 2009.

ANDRÉA, N.C.S. *et al.* Efeito dos ácidos graxos n-3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** vol.54 no.5 São Paulo, 2010.

ARAÚJO, J.A.S. *et al.* Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 488-494, Oct. 2008

ARCHER, J. **Tests for emotionality in rats and mice: a review animal behaviour**, 1973.

ASTERN, J. M. *et al.* Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. *The American journal of pathology*, v. 171, n. 1, p. 349–60, 2007.



AVERSI-FERREIRA, T.A., et al. Estudo anatômico de músculos profundos do antebraço de *Cebus apella* (Linnaeus, 1766). **Acta Scientiarum**. 2005b; 27(3): 297-301.

AVERSI-FERREIRA, T.A., et al. Anatomy of the arteries of the arm of *Cebus libidinosus* (Rylands *et al.*, 2000) monkeys. **Acta Scientiarum Biol Sci**. 2007;29 (3).

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v. 73, p.599- 601,

BARTGES, J.W. Chronic kidney disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 669-692, 2012.

BARTGES, J.W.; POLZIN, D.J. Upper urinary tract disorders. Nephrology and Urology of Small Animals. **Ed: Willy Blackwell**, 1 ed, section5, p.431-616, 2011.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n.4, p.685-692. 2003. doi: 10.1152/ajpendo.00253.

BENJAMIM, C.J.R. O consumo de ômega 3 e 6 e a sua relação com doenças crônicas não transmissíveis. **Rev. e-ciência**, v.6, n.2, p. 114-120, 2018.

BERNARDI, T.C.; MELO, S.R. Análise alométrica e estereológica do hipocampo e corpo caloso de rato. **In Encontro Anual de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá**, 2018.

BERTOLIN, T.E. *et al.* Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1253- 1259, 2009.

BHANGLE, S.; KOLASINSKI, S.L. Fish oil in rheumatic diseases. **Rheum Dis Clin N Am**. V.3, n.7, p.77–84. 2011.

BIANCHI, G. *et al.* Nutritional treatment of chronic liver failure. **Hepatol Res**. 2008;38 Suppl 1:S93-S101.

BODNAR, L.M. *et al.* Nutrition and Depression: Implications for improving mental health among child bearing-aged women. **Biological Psychiatry**, v. 58, p. 679–685, 2005.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Analysis of glutathione : perspective. **Presse Med**, v. 31, n. 25, p. 1174-84, 2002.

BOTHAM, K.M.; MAYES, P.A. **Lípideos de Importância Fisiológica**. Em Murray, Robert K., Bender, David A., Botham, Kathleen M., Kennelly, Peter J., Rodwell, Victor W., Weil, P. Anthony (dir.), Harper Bioquímica Ilustrada. 29 ed McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A., 2012, pp. 140 -151, ISBN: 978-0-07-176576-3.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206–209, 1982.

BRAGA, A.A.D.; BARLETA, V.C.N. Alimento funcional: uma nova abordagem Terapêutica das disciplinas como prevenção da doença aterosclerótica. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, ano 2, n. 3, março de 2007. Disponível em <http://unifoa.edu.br/pesuisa/caderno/edição/03/100.pdf>

Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO\\_18\\_1999.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES) ?MOD=AJPERES>. Acessado em : 12/02/19.

BREUER, S. *et al.* Regulation of stearyl-CoA desaturase-1 after central and peripheral nerve lesions. **BMC Neuroscience**, v. 5, p. 1–9, 2004.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to fatty acids and lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 1–16, 2015.

BURR, M.L.; FEHIL, Y.A.M.; GILBERT, J.F. Effects of changes in fat, fish and fiber intakes on health and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). **Lancet**, v.334, p.757–61. 1989.

CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 550-558. 2011.

CALDER, P.C. *et al.* Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. S1–S45. 2009.

CAMARGO, E.A. *et al.* Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A2 in rats. **Toxicon: oficial jornal of the International Society on Toxinology**, v.46, n.8, p.921-926, 15 dez 2005.

CAMPELO, A.P.B.S. Efeitos nutracêuticos do leite enriquecido com ômega 9, 6 e 3 em ratos submetidos à queimadura térmica por condução direta. Tese de Doutorado em Ciências Médico-cirúrgicas. Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina. Fortaleza, 2018.

CAMPOS, S.C. *et al.* Influência da Suplementação com Ácidos Graxos n-3 no Desenvolvimento do Estresse Oxidativo em Camundongos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. São Paulo, v.13, n.4, p. 251-256, 14 de setembro de 2011. Disponível em: <<http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1126/1084>>. Acessado em 20/03/2019.

CANOVA, E.B. **TORTA DE CRAMBE (*Crambe abyssinica* Hochst) NA ALIMENTAÇÃO DE CORDEIROS**. 2012, 77f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) – Instituto de Zootecnia APTA/SAA, Nova Odessa, 2012.

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.

CARREIRA, M.J.O.A.; SILVA, S.G. Análise da arborização dendrítica através da técnica de golgi-cox em ratos submetidos a exercício físico durante o desenvolvimento pós-natal do cérebro. **XIX Congresso da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2016.

COSTA, F.A.D. *et al.* Enriquecimento com ácidos graxos da série ômega 3 em carne de aves e ovos. **Pubvest**, v.11, n.2, p.113-123. 2017.

CUNHA, P.F.M. *et al.* DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO TUCUM (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. V.20, n.2, p.41-46, 2017.

CURI, R. *et al.* **Entendendo a gordura – os ácidos graxos**. 1ed. Baruer: Manole, 2013.

CUTULI, D. Funcional and structural benefits induced by omega-3 polyunsaturated fatty acids durin aging. [CurentNeuropharmacology](#), Volume 15, Number 4, 2017, pp. 534-542(9).

DAS, U.N. Biological significance of essential fatty acids. **Journal of the Association of Physicians India**, v. 54, p. 309-319. 2006.

DASURE, K.; ZHANG, L.; KELLER, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radic Biol Med.**, n. 62: p. 170-185, 2013.

DAWRA, R. *et.al.* Developed of a new mouse model of acute pancreatitis by administration of L-arginine. [Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol](#). v. 292, n. 4, p. 1009-18. 2007.

DE PAULA, J.F. Estudos anatômicos dos principais sulcos e giros dos cérebros de *Cebus libidinosus* (RYLANDS, 2000) (Primates cebidae) e análise de citoarquitetura cortical do lobo parietal usando a técnica de Golgi Cox. Brasília, 2010.

DIEZ, G.; ROSA, W. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. **Rev. Nutr**, Campinas , v. 16, n. 4, p. 483-492, Dez. 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732003000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732003000400011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 10/04/2019.

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.

DIN, J.N.N; FLAPAN, A.D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease: fishing for a natural treatment. **British Medical Journal**. v.328, n.7430, p.30-35. 2004.

DRAPER, H.H.A. Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v.15, p.353–363. 1993.

DRINGER, R. Metabolism and function of glutathione in brain. **Prog. Neurob**, v. 62, n. 2000, p. 649-669, 1999.

EIFERT, E.C. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoleico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. **Rev. Bras. Zootec**, v.35, n.4, p.1829-37. 2006. DOI: 10.1590/S1516-35982006000600034.

EMKEN, E.A; ADLOF, R.O; GULLEY, R.M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. **Biochim Biophys Acta**, v.1213, n.3, p.277-88. 1994.

ERGSTRÖM, K. *et al.* Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. **Ups J Med Sci**, v. 114, p.206-13. 2009.

FARÍAS, J. *et al.* Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p.966-989, 1 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9090966>. Acessado em 20/03/2019.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FORMAN, H.J.; RINNA, A.; ZHANG, H. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med.**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, 2009.

GARCIA, B.C. *et al.* Ômega-3 no músculo sóleo de ratos submetidos à natação: análise histológica e morfométrica. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 5, Set/Out. 2010.

GELINEAU, R.R. *et al.* The behavioral and physiological effects of high-fat diet and alcohol consumption: Sex differences in C57BL6/J mice. **Brain and Behavior**, v. 7, n. 6, e00708, 2017.

GRIEBEL, G. *et al.* 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]-5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-aminehydrochloride (SSR125543A), apotent and selective corticoreophin-releasing factor(1) receptor antagonis. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 30, p. 333–345, 2002a.

GRIEBEL, G. *et al.* Anxiolytic and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stressrelated disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 6370–6375, 2002b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. NEW YORK: CLAREDO, P.285-93. 1999.

HARTWEG, J. *et al.* Potential impact of omega-3 treatment on cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Curr Opin Lipidol**, v.20, p.30–8. 2009.

Health and Medical Information – Blog Henry Okigami, Glutaciona [Em linha]. Disponível em <http://henryokigami.blogspot.com/2009/05/glutaciona.html>. Acessado em 05/03/2019.

HEIENE, R.; LEFEBVRE, H.P. Assessment of renal function. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. **BSAVA Manual of Canine And Feline Nephrology And Urology**. Ed: Elsevier. 2 ed., cap. 9, p. 117-126, 2007.

HONG-ZHANG, S.J., WENG, J.J.H. Does microwaving enhance the Golgi methods? A quantitative analysis of disparate staining patterns in the cerebral cortex. **J Neurosci Meth**; 2003; 124(2):145-155.

HORTON, R.H. *Princípios de Bioquímica*. **Pearson Educaction**, 4 ed. Inc., 976p. 2008. ISBN 0-13-145306-8.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry venid antioxidante capacity assays. **J Agric Food Chem**, v.53, n.6, p.1841-56. 2005.

INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res*, v. 30, p.39-103, 1991.

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

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington: **National Academy Press**. p.422-541, 2005.

ITOKAZU, N. *et al.* Bidirectional actions of docosahexaenóico acid on hippocampal neurotransmissions in vivo. **Brain Research**, v. 862, p. 211-216, 2000.

KABIR, M. *et al.* Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n.6, p.1670-1679. 2007.

KARR, J.E., ALEXANDER, J.E, WINNINGHAM, R.G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: a review. **Nutr. Neurosci.** v. 14, n. 5, p. 216-225, 2011.

KASSEM, M.S.; FORK, S.Y.Y.; SMITH, K.L.; KULIGOWSKI, M.; BALLEINE, B.W. A novel, modernized Golgi-Cox stain optimized for CLARITY cleared tissue. **Journal of Neuroscience Methods**, 2018.

KIMA, S.J. *et al.* Omega-3 and Omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidativestress LI, K *et al.* Effect of marine-derivedn-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor alfa: a meta-analysis. **PLOS One**, v.9, n.2, p.88-103. 2014.

KIMA, S.J. *et al.* Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidativestress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. **Neurosci Lett**. 2010 August 2; 479(3): 292–296.

KLUVER, H.: On Naturally Occurring Porphyrins in the Central Nervous System. *Science*, 99: 482, 1944.

LIMA, L.P; SAMPAIO, H.A.C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 12, n. 4, p. 1011-1020, Ago. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232007000400022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000400022&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 05/04/2019.

LIMA, F.E.L. *et al.* Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: Uma revisão fatty acids and cardiovascular diseases: A REVIEW. **Rev. Nutr**, v.13, n.2, p.73-80. 2000.

LUCHTMAN, D.W., MENG, Q., SONG, C. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. **Behav. Brain. Res.**, v.15, n. 226(2), p. 386-396, 2012.

LUZ, G. *et al.* Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**. 2011; v.111, n.9, p.2015-23. 2011. doi: 10.1007/s00421-010-1802-2.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1978.

MARTINS, M.B. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 26, n.2, p.153-6. 2008.



MARIANE, M.C. Ácidos graxos ômega-3, estado inflamatório e marcadores bioquímicos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo piloto. **Rev. Brás Reumatol**, v. 5, n.6, p.526–534. 2017.

MARTIN, C.A. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, v.19, n.6, p.761-770. 2006.

MAURICE, T.; LOCKHART, B.P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. **Brain Res**, v.706, p.181–93. 1996.

MAZZA, M. *et al.* Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.31, p.12–26. 2007.

MILES, E.A; CALDER, P.C. **Modulation of immune function by dietary fatty acids. Proceeds of the Nutrition Society**, v. 57, p. 277-292. 1998.

MONTEIRO, V.C.B. **Avaliação do estresse oxidativo em humanos e em animais suplementados com ácidos graxos polinsaturados ômega-3**. 2007, 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MORATOYA, E.E. *et al.* Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil e no mundo. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 72-84, jan./fev./mar. 2013. Disponível em: <<https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/283>>. Acesso em: 03/03/19.

MORI, T.A. *et al.* Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. **Am J Clin Nutr**, v.71, p. 1085-94,2000.

MORIGUCHI, T., SALEM JR., N. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. **J. Neurochem.**, v.87, n. 2, p. 297 e 309, 2003.

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

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para laboratório: Princípios e Interpretações. 5ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; EDUCS – Caxias do Sul, 2009.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **The Journal of the American Medical Association**, v.296, n.15, p.1885-1999. 2006.

MDPI, A.G.; SIRIWARDHANA, N.; KALUPAHANA, N.S.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Adv. Food Nutr. Res.**, v.65, p.211-222, 2012.

MULDOON, M.F. *et al.* Serum phospholipid docosahexaenoic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. **Journal of Nutrition**, 140, p. 848-853, 2010.

MURRAY, R.K; BENDER, D.A.; BOTHAM, K.M.; KENNELLY, P.J.; RODWELL, V.W.; WELL, P.A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 29 Ed. Artmed: Rio de Janeiro, 2012.

NETO, A.S.R. **GLUTATIONA: Envolvimento na defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas**. 2010. f.77. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Faculdade ciências da Saúde. Porto, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**, v.95, p. 351–8. 1979.

OLIVEIRA, D.V.; BERNARDI, T.C.; MELO, S.R.; GODINHO, J.; OLIVEIRA, R.M.W.; MILANI, H. Postischemic fish oil treatment restores dendritic integrity and synaptic proteins levels after transient, global cerebral ischemia in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Vol. 101, Nov. 2019.

PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In: I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja e para a Saúde Humana, n. 1, 2001, Londrina. Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja e para a Saúde Humana. Embrapa, 200:37-40.

PAN, J.P.; ZHANG, H.Q.; WEI-WANG, GUO, Y.F.; NA-XIAO, CAO, X.H.; LUI, L.J. Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. **Brain Res.**, v. 15, n. 1412, p. 18-27, 2011.

PARK, W.H.; YOU, B.R. Gallic acid induced lung câncer cell death is related to glutathione: depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicol In Vitro.** v. 24, n. 5, p. 1356-62, 2010.

PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. **Behav. Neurosci.** v. 106, p. 439-446, 1992.

PEREIRA-DE-PAULA, J. PRADO, Y.C.L., TOMAZ, C., AVERSI-FERREIRA, T.A. **Anatomical study of the main sulci and gyri of the *Cebus libidinosus* (Rylands, 2000) brain.** *Neurobiologia J.* 2010; 73 (2). (prelo)

PERINI, J.A.L. *et al.* Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev Nutr**, Campinas/SP, v.23, n.6, p.69-77, nov/dez, 2010.

PINHEIRO, P.M.D. Saúde. Creatinina e Ureia – Avaliação da função dos rins, 2019. Disponível em > <https://www.mdsaude.com/nefrologia/ureia-creatinina>< Acessado em 28/03/2019.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327–36, 1977.

POUDYAL, H. *et al.* Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. **Progress In Lipid Research**, v. 50, n. 4, p.372-387, out. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762726>>. Acesso em 20/03/2019.

QIU, Y.D. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. **World J Gastroenterol**, v.18, n.25, p.3288-95. 2012.

RAJU, T.R., Shanakranarayana Rao BS. **The golgi techniques for staining neurons**. Nat Institute of Mental Health and Neuro Sciences, Bangalore 2004.

RAPOSO, L.F. Efeitos dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Revista de Nutrição**. v.23, p.871-879. 2010.

RAZ, M. *et al.* Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. **Ann Clin Lab Sci**, v.35, n.2, p.169-73. 2005.

SAMPAIO, R.C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.

SARASWATHI, V. Dietary fish oil exerts hipilipidemic effects in lean and insulin sensitizing effects in obese LDRL-/- mice. **J nutri**, v.139, n.12, p.2308-6. 2008.

SCHWAB, J.M.; SERHAN, C.N. Lipoxins and new lipid mediators inthe resolution of inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v.6, p.414–20. 2006.

SEALLS, W. *et al.* Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega 6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v.1781, n.8, p. 406-14. 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem**, v.25, p.192–205, 1968.

SERHAN, C.N. *et al.* Resolution of inflammation: state of art, definitions and terms. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, p. 325-332. 2007.

SERHAN, C.N.E.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Natural Immunology**, v. 6, p. 1191–1197. 2005.

SHILS, M.E. *et al.* **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9. ed. Sao Paulo: Manole, 2003.

SICIŃSKA, P. *et al.* The use of various diet supplements in metabolic syndrome. **Postepy hig med dosw (online)**. v.9, n.69, p.25-33. 2015.

SIERRA, S. *et al.* Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. **Brain Research Bulletin**, v.88, n.5, p. 467-70, 2012.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **J Nutr**, v.135, n.5, p.969-72. 2005.

SILVA, R.M. *et al.* Avaliação da regeneração hepática com dieta suplementada com ácidos graxos ômega-3: estudo experimental em ratos. **Rev. Col. Bras**, v.42, n.6, p. 393-398. 2015.

SILVA, S.G.; DONA, F.; FERNANDES, M.J.S.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R.M. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain Dev**, v. 32, n. 2, p. 137-142. 2010.

SILVA NETO, L.B. Ação da suplementação de leite e de leite com mistura de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre camundongos durante a meia idade. Dissertação de Mestrado em Ciências Médico-cirúrgicas. Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina. Fortaleza, 2019.

SIMÃO, A.N.C. *et al.* Efeito dos ácidos graxos n–3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2010;54/5

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr**, v.70, p.560S–569S, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p.128-145, 2 mar. 2016.

SIRIWARDHANA, N. et al. N-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF-κB-dependent mechanisms. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, n. 12, p. 1661–1667, 2012.

SKULAS-RAY, A.C. *et al.* Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. **Am J Clin Nutr**, v.93, n.2, p. 93:243. 2011.

SOARES, L.A. *et al.* Impactos nutricionais da ingestão alimentar dos ácidos graxos ômega 3 e óleo de palma: uma revisão. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo. v.10. n.56. p.105-114. Mar./Abr. 2016. ISSN 1981- 9919.

SUTHERLAND, C.; O'BRIEN, R.M.; GRANNER, D.K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 351, n.1336, p.191-9. 1996. doi: 10.1098/rstb. 1996.0016.

TASSINI, L.E.S. *et al.* Ômega-3 como terapia renoprotetora na doença renal crônica. In: **Simpósio Internacional de Nefrologia e Urologia Veterinárias**. Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: SINUV, 2011.

TIKU, M.L. *et al.* Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, p. 66-159. 2003.

THOMAZ, J.; THOMAZ, C.J.; RADCLIFFE, J.; ITSIOPOULOS, C. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, 2015.

TSALUCHIDU, S. *et al.* Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders. **Bmc psychiatry** (ONLINE), v.8 (L):S5. 2008;

UED, F.V.; WEFFORT, V.R.S. Vitaminas antioxidantes no contexto da doença hepática gordurosa não alcoólica em crianças e adolescentes obesos. *Rev Paul Pediatr*, v.31, n.4, p.523-30. 2013.

VALLE, P.G. *et al.* Effect of the association of diet, omega-three, and antioxidants in dogs with chronic kidney disease. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 3161-3172, set./out. 2015.

VALLE, P.G. **Efeito da Associação da Dieta, do Ômega Três, e de Antioxidantes em Cães Portadores de Doença Renal Crônica**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado Clínica Médica e Cirurgia Veterinárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

VAZ, D.S.S. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista UNINGÁ Review**, v.20, n.2, p.48-54. 2014.

VIANA, D.E.L. *et al.* Ácidos graxos e sua utilização em doenças cardiovasculares: uma revisão. **RSC online**, v.5, n.2, p. 65-83. 2016.

VIDAL, A.M. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doença. **Cad Grad: Ciênc Biol Saúde**, v.1, n.15, p.43-52.

VILARTA, R. *et. al.* Alimentação saudável e atividade física para a qualidade de vida - Campinas, **IPES Editorial**, p.229. 2007.

WAITZBERG, D.L. **ÔMEGA-3: O QUE EXISTE DE CONCRETO**. SÃO PAULO: NUTRILITE, 2007.

WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **Br. J. Nutr.**, v.89, p.679–89. 2003.

WONG, C.Y. *et al.* Fish-oil supplement has neutral effects on vascular and metabolic function but improves renal function in patients with Type 2 diabetes mellitus. **Journal compilation Diabetes UK**. Diabetic Medicine, v.27.p. 54–60, 2010.

WOODMAN, R.J. *et al.* Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.1007-15, 2002.

WU, J.H. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Br J Nutr**, v.107, n. 2, p.214-27. 2012. doi: 10.1017/S0007114512001602.

WU, H. *et al.* Normal diet Vs High fat diet - a comparative study: behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 1, p. 177–190, 2017.

YEHUDA, S. *et al.* The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiol Aging**, v23, n.5, p.843-53. 2002.

YODIM, K.A; MARTIN, A, JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Dev Neurosci**, v.18, n.4, p.383-99. 2000.

ZAINAL, Z. *et al.* Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, p. 896-905. 2009.

ZAMBOM, M.A.; SANTOS G.T.; MODESTO, E.C. Importância das gorduras poli-insaturadas da saúde humana. **Rev Soc Bras Zootec**, v.547, p.553-7. 2004.

ZELBER-SAGI, S.; RATZIU, V.; OREN, R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. **World J Gastroenterol**, v.17, p. 3377-89. 2011.

ZHANG, W.; LI, P.; HU, X., ZHANG, F.; CHEN, J.; GAO, Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. **Front. Biosci.** V. 17, pag. 2653-2670, 2011.



ZIMMER, L. *et al.* Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3-polyunsaturated fatty acids deficiency in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 321, n.1-2, P. 95-99. 2002.

## APÊNDICE A

CAMPO ABERTO						
TRATAMENTO	TEMPO	Distance	Line_crossings	Rearing_._number _of_presses	Grooming_._number_ [24]Cof_presses	Grooming_._ time_pressed
CONTROLE	45 DIAS	5,866	126	34	61	60,8
CONTROLE	45 DIAS	7,832	91	20	9	15,7
CONTROLE	45 DIAS	8,383	129	14	10	11,7
CONTROLE	45 DIAS	13,070	165	12	14	11,5
CONTROLE	45 DIAS	7,758	105	1	20	25,1
CONTROLE	45 DIAS	9,662	131	10	17	22,3
CONTROLE	45 DIAS	8,928	135	4	23	21,0
CONTROLE	45 DIAS	9,537	134	28	12	12,3
CONTROLE	45 DIAS	9,226	133	13	17	14,2
CONTROLE	60 DIAS	13,512	134	17	17	65,3
CONTROLE	60 DIAS	10,163	107	18	10	14,8
CONTROLE	60 DIAS	6,764	113	9	10	12,3
CONTROLE	60 DIAS	15,042	201	30	19	12,8
CONTROLE	60 DIAS	11,309	143	8	29	24,2
CONTROLE	60 DIAS	9,363	99	8	25	21,2
CONTROLE	60 DIAS	7,064	105	3	16	23,1
CONTROLE	60 DIAS	6,333	85	11	24	13,2
CONTROLE	60 DIAS	9,970	139	10	21	13,4
L. DESNAT.	45 DIAS	9,298	103	33	5	10,5
L. DESNAT.	45 DIAS	9,669	115	12	12	1,2
L. DESNAT.	45 DIAS	12,592	148	27	7	4,5

L. DESNAT.	45 DIAS	7,654	103	33	5	16,7
L. DESNAT.	45 DIAS	6,967	72	22	7	7,6
L. DESNAT.	45 DIAS	6,806	83	21	8	5,8
L. DESNAT.	45 DIAS	3,916	52	3	9	11,7
L. DESNAT.	45 DIAS	7,485	80	8	9	9,2
L. DESNAT.	45 DIAS	6,444	71	10	11	16,3
L. DESNAT.	60 DIAS	7,302	107	17	11	10,2
L. DESNAT.	60 DIAS	8,537	182	4	0	1,5
L. DESNAT.	60 DIAS	0,000	4	0	2	3,6
L. DESNAT.	60 DIAS	13,149	127	2	7	15,8
L. DESNAT.	60 DIAS	5,224	66	7	8	6,5
L. DESNAT.	60 DIAS	5,837	63	3	3	4,9
L. DESNAT.	60 DIAS	5,086	61	3	6	10,8
L. DESNAT.	60 DIAS	8,836	124	16	11	9,8
L. DESNAT.	60 DIAS	11,862	141	23	16	15,1
L. SUPLEM.	45 DIAS	3,834	59	16	30	40,2
L. SUPLEM.	45 DIAS	5,641	114	17	31	30,1
L. SUPLEM.	45 DIAS	9,938	103	7	20	11,4
L. SUPLEM.	45 DIAS	9,793	127	11	17	10,2
L. SUPLEM.	45 DIAS	9,925	102	24	18	9,8
L. SUPLEM.	45 DIAS	6,223	41	25	28	8,9
L. SUPLEM.	45 DIAS	3,321	33	1	9	7,8
L. SUPLEM.	45 DIAS	6,343	86	19	21	57,0
L. SUPLEM.	45 DIAS	7,568	92	30	13	30,6
L. SUPLEM.	60 DIAS	4,490	83	18	28	28,3

L. SUPLEM.	60 DIAS	4,777	60	11	24	24,6
L. SUPLEM.	60 DIAS	7,615	99	8	4	9,4
L. SUPLEM.	60 DIAS	10,795	147	23	8	8,4
L. SUPLEM.	60 DIAS	7,815	120	25	8	6,7
L. SUPLEM.	60 DIAS	5,330	61	4	6	6,7
L. SUPLEM.	60 DIAS	10,454	103	8	4	6,0
L. SUPLEM.	60 DIAS	5,477	82	37	63	32,4
L. SUPLEM.	60 DIAS	4,232	48	7	26	27,3

## APÊNDICE B

WATER MAZE									
TRATAMENTO	TEMPO	Distance	Mean_speed	Sul._time	Sul._distance	Norte_time	Norte._distance	Plataforma._entries	Plataforma._latency_to_first_entry
CONTROLE	45 DIAS	14,411	0,201	29,0	5,094	11,4	2,756	3	9,6
CONTROLE	45 DIAS	15,510	0,310	25,2	7,700	10,6	3,044	7	6,5
CONTROLE	45 DIAS	10,172	0,217	14,0	3,213	18,4	3,450	3	12,8
CONTROLE	45 DIAS	11,456	0,266	8,9	2,555	20,6	5,361	1	50,0
CONTROLE	45 DIAS	13,578	0,136	41,2	3,723	3,8	0,637	2	40,1
CONTROLE	45 DIAS	15,298	0,279	16,5	4,324	19,6	5,363	1	32,9
CONTROLE	45 DIAS	12,919	0,228	23,0	3,797	11,3	2,757	1	33,6
CONTROLE	45 DIAS	14,869	0,232	19,0	4,458	6,7	1,764	1	45,7
CONTROLE	45 DIAS	15,697	0,133	10,9	2,791	25,1	1,261	1	20,8
CONTROLE	60 DIAS	19,210	0,320	17,8	5,922	13,5	3,661	2	4,7
CONTROLE	60 DIAS	19,674	0,328	12,0	4,291	15,7	5,042	1	22,3
CONTROLE	60 DIAS	17,000	0,283	17,4	4,762	14,8	4,203	2	38,6
CONTROLE	60 DIAS	14,275	0,238	25,5	4,803	9,6	2,588	1	43,6
CONTROLE	60 DIAS	10,003	0,167	13,9	2,622	20,2	3,210	2	21,8
CONTROLE	60 DIAS	20,042	0,334	18,1	5,624	13,2	4,700	6	9,3
CONTROLE	60 DIAS	15,773	0,263	15,7	3,802	17,8	4,814	2	26,6
CONTROLE	60 DIAS	17,317	0,289	13,9	4,269	12,0	3,122	1	40,3
CONTROLE	60 DIAS	19,140	0,319	14,8	4,716	16,2	4,777	2	2,1
L. DESNATADO	45 DIAS	12,077	0,201	29,0	5,094	11,4	2,756	3	9,6
L. DESNATADO	45 DIAS	18,570	0,310	25,2	7,700	10,6	3,044	7	6,5
L. DESNATADO	45 DIAS	13,003	0,217	14,0	3,213	18,4	3,450	3	12,8
L. DESNATADO	45 DIAS	15,947	0,266	8,9	2,555	20,6	5,361	1	50,0
L. DESNATADO	45 DIAS	8,172	0,136	41,2	3,723	3,8	0,637	1	46,8
L. DESNATADO	45 DIAS	16,761	0,279	16,5	4,324	19,6	5,363	1	32,9
L. DESNATADO	45 DIAS	13,703	0,228	23,0	3,797	11,3	2,757	2	39,6
L. DESNATADO	45 DIAS	13,936	0,232	19,0	4,458	6,7	1,764	1	44,8
L. DESNATADO	45 DIAS	7,976	0,133	10,9	2,791	25,1	1,261	1	43,5
L. DESNATADO	60 DIAS	16,322	0,285	0,0	17,9	5,065	1,606	1	30,2
L. DESNATADO	60 DIAS	16,036	0,272	0,0	5,5	1,801	5,398	2	27,8
L. DESNATADO	60 DIAS	21,046	0,226	0,0	39,2	8,412	3,347	4	7,1
L. DESNATADO	60 DIAS	12,127	0,255	0,0	29,5	7,170	2,435	3	4,7
L. DESNATADO	60 DIAS	15,987	0,215	0,0	36,9	7,043	1,980	3	8,7
L. DESNATADO	60 DIAS	17,121	0,266	0,0	24,0	6,231	2,245	5	6,9
L. DESNATADO	60 DIAS	18,026	0,262	0,0	33,9	8,939	5,698	5	2,9
L. DESNATADO	60 DIAS	16,330	0,300		30,7	7,897	4,465	1	7,3

L. DESNATADO	60 DIAS	17,933	0,351		29,3	8,675	3,358	1	8,2
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	17,099	0,285	36,7	10,009	6,7	2,135	5	4,3
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	12,990	0,216	18,1	3,767	19,3	3,710	3	22,5
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	16,939	0,282	31,0	8,181	9,8	3,049	4	5,7
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	12,853	0,214	29,7	5,703	6,7	1,352	2	19,1
L. SUPLEMENTADO	45DIAS	15,363	0,256	22,9	6,345	7,5	2,196	1	10,5
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	12,856	0,214	16,1	4,356	23,5	3,605	2	18,5
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	17,203	0,287	26,0	7,714	4,2	1,172	2	19,5
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	10,289	0,171	30,3	5,458	12,0	1,289	3	10,9
L. SUPLEMENTADO	45 DIAS	17,319	0,289	20,7	5,797	17,0	4,414	4	7,5
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	19,210	0,272	0,0	33,5	9,028	15,3	3	11,2
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	19,674	0,258	0,0	11,0	3,727	17,8	2	14,2
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	17,000	0,267	0,0	27,3	6,982	15,5	4	12,1
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	14,275	0,240	0,0	13,9	4,764	16,9	2	8,9
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	10,003	0,202	0,0	20,9	7,411	2,6	7	9,7
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	20,042	0,248	0,0	19,9	4,544	13,9	2	13,3
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	15,773	0,266	0,0	15,7	3,838	24,9	2	15,8
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	17,317	0,170	0,0	23,5	4,882	46,6	1	10,7
L. SUPLEMENTADO	60 DIAS	19,140	0,191	0,0	35,2	8,871	8,0	7	20,3

### APENDICE C

45 DIAS	Y MAZE
L. SUPL. - A 1	72
L. SUPL. - A 2	71,43
L. SUPL. - A 3	68,97
L. SUPL. - A 4	81,48
L. SUPL. - A 5	50
L. SUPL. - A 6	59,26
L. SUPL. - A 7	71,43
L. SUPL. - A 8	73,08
L. SUPL. - A 9	91,3
L. DESN - A 1	72,73
L. DESN - A 2	66,67
L. DESN - A3	51,61
L. DESN - A 4	56
L. DESN - A 5	65,22
L. DESN - A 6	55
L. DESN - A 7	42,86
L. DESN - A 8	46,15
L. DESN - A 9	63,16
CONTROLE - A 1	48
CONTROLE - A 2	55
CONTROLE - A 3	47,83
CONTROLE - A 4	50
CONTROLE - A 5	56
CONTROLE - A 6	72,73
CONTROLE - A 7	58,82
CONTROLE - A 8	64,71
CONTROLE - A 9	50
60 DIAS	Y MAZE
L. SUPL. - A 1	94,44
L. SUPL. - A 2	94,12
L. SUPL. - A 3	98,9
L. SUPL. - A 4	96,41
L. SUPL. - A 5	90,91
L. SUPL. - A 6	95,45
L. SUPL. - A 7	94,74

L. SUPL. - A 8	80
L. SUPL. - A 9	100
L. DESN - A 1	93,75
L. DESN - A 2	56,25
L. DESN - A3	59,09
L. DESN - A 4	55
L. DESN - A 5	68,42
L. DESN - A 6	77,78
L. DESN - A 7	41,67
L. DESN - A 8	77,78
L. DESN - A 9	82,35
CONTROLE - A 1	71,43
CONTROLE - A 2	50
CONTROLE - A 3	55,56
CONTROLE - A 4	53,33
CONTROLE - A 5	50
CONTROLE - A 6	50
CONTROLE - A 7	56,25
CONTROLE - A 8	57,14
CONTROLE - A 9	50



## APÊNDICE D

### TÉCNICA GOLGI COX

GRUPO 1.45					
CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	3	10			
2		4			
3	2	8	2		
4	3	7	1	1	
5	3	5		1	
6	3	6			
7		15			
8		11			

GRUPO 1.60					
CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	4	7	1		
2	3	7			
3	1	7			
4	5	7			
5	10	1			
6	2	9			
7	4	6			
8	3	10			

## GRUPO 2.45

CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	2	7			
2	1	3			
3	6	5			
4		7	1		
5	5	8			
6	3	13			
7	2	14			
8	4	5			

## GRUPO 2.60

CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	6				
2	14				
3	8				1
4	15			1	
5	14				
6	9			1	
7	14	4			

GRUPO 3.45					
CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	18				
2	16				
3	9				2
4	10			2	
5	13				
6	12				
7	14				

GRUPO 3.60					
CORTE	SUBTIPO				
	FILO	MUSH	LONG - THIN	THIN	STUB
1	7			1	
2	10				
3	17				
4	9	8			
5	1	6			
6	9			1	1
7	7	9			

## APÊNDICE E

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
11	19,6154	1,783218182
4	19,7085	4,927125
10	19,9975	1,99975
8	19,7264	2,4658
9	20,4602	2,273355556
9	19	2,086544444
10	19,2803	1,92803
11	19,837	1,803363636

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
11	21,0091	1,909918182
10	20,3443	2,03443
8	20,3209	2,5401125
9	19,6941	2,188233333
11	19,579	1,779909091
11	19,381	1,761909091
10	20,2621	2,02621
11	19,9157	1,810518182

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
9	19,5929	2,176988889
4	19,241	4,81025
11	19,068	1,733454545
8	20,1934	2,524175
10	20,2954	2,02954
11	20,3502	1,850018182
10	20,2874	2,02874
9	20,2087	2,245411111

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
6	26	1,93783467
10	23,9765	2,08276849
9	20,7003	2,10047589
11	22,1834	2,0166483
8	23,1651	2,8956375
10	29,8895	1,94758392
10	25,665	2,5665867

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
18	39,4719	2,19288339
20	38,6821	3,59684958
19	44,3458	2,333989474
18	39,4875	4,38278396
19	40,694	2,141789474
19	40,2644	4,573853939
18	39,5148	2,195266667

QUANTIDADE DE SPINES	COMPRIMENTO DO DENDRITO	DENSIDADE
20	30,3677	4,536472899
21	32,8893	2,968504859
19	39,7536	2,092294737
19	34,3926	4,463749386
22	41,7549	4,37492374
20	38,3647	2,94833059
21	40,5381	4,384739482

**ANEXO**

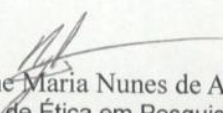
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

**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