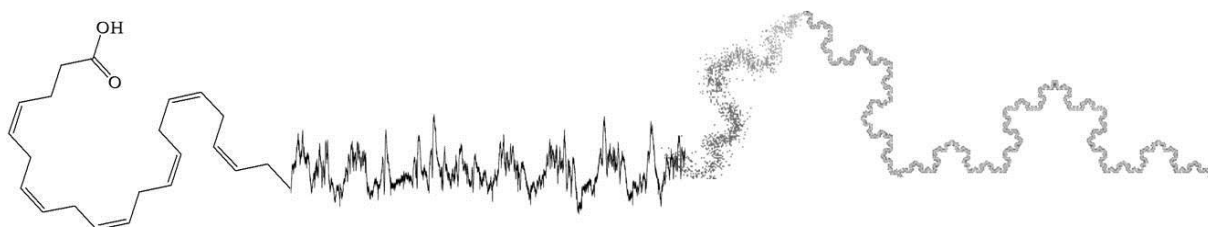


JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA



**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 SOBRE A
ATIVIDADE ELÉTRICA CORTICAL, PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS EM RATOS WISTAR**

**RECIFE - PE
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 SOBRE A ATIVIDADE
ELÉTRICA CORTICAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS EM
RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito final para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Morfofisiologia Animal

Orientador: Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Co-orientador: Dr. Adolpho Marlon Antoniol de Moura

Recife - PE

2015

Ficha catalográfica

S586e Silva, Jeine Emanuele Santos da
Efeitos da suplementação com ômega-3 sobre a atividade elétrica cortical, parâmetros bioquímicos e histológicos em ratos Wistar / Jeine Emanuele Santos da Silva. -- Recife, 2015.
95 f. : il.

Orientador: Romildo de Albuquerque Nogueira.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Referências.

1. Caos 2. Cérebro 3. EcoG 4. Ômega-3 5. Wistar
I. Nogueira, Romildo de Albuquerque, orientador II. Título

CDD 636.089

JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA

Efeitos da suplementação com ômega-3 sobre a atividade elétrica cortical,
parâmetros bioquímicos e histológicos em ratos Wistar

Tese defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

Presidente

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

Prof. Dr. Ramón Enrique Ramayo González

Departamento de Física – UFRPE

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes

Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

AGRADECIMENTOS

Àquele que É, desde o princípio, o Primeiro e o Último, sou grata.

A Ednaldo Silva e Jecilene Santos, meus pais, e ao meu irmão Erikson Lourenço, pelo apoio, compreensão e amor incondicional ao longo dessa jornada. Amo vocês!

A família LABTEC, Professora Dra. Marliete Soares, Edbhergue Ventura, Gesilda Florenço, Thais Almeida, Leandro Aguiar, Ardilles Juan, Radamés, Cláudio D'Castro, Rubens Felipe, Renata... Impossível descrever em palavras a alegria por conhecer, conviver e produzir ciência com vocês... Muito obrigada! A Daniela Tavares, Leandro Aguiar, Eva Luana e Hanna Gracie que participaram nas diversas etapas deste trabalho... Não seria possível sem vocês!

Minha gratidão pela disposição e colaboração. Aos amigos da área de Histologia, Wanessa Noadya, Jéssica Lima, Edna Maria, Mariana Rêgo, Renata, Laise, Cintia, Aline e Carol. Em especial, a Ismaela Melo e Fabiana Felix, pela disponibilidade e colaboração imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada pela coragem!

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Júlio César, André Luis, Vinicius, Taciana Ralph, Vitor Caiaffo, pela amizade e aprendizado mútuo, a todos os docentes e à secretária do PPGBA, Edna Cherias. Aos técnicos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Márcia, Benício, Admilson, Romildo e Vicente. Ao professor Dr. George Jimenez, professora Dra. Daniela e a José Ferreira pelo incentivo e disposição em ajudar sempre. A Rejane e Marize, pelo carinho e café semprequentinho... A André e Renata, do Biotério do DMFA, pelo auxílio no manejo dos animais utilizados neste trabalho.

Aos meus queridos, Amanda Barros, Ana Luiza Melo, Joely Vieira, Patrícia Jasset, Nathalia Ianatoni, Sandra Torres, Arlindo Costa, Bruno Martins, Humberto Veloso, Pablo e em especial, Thiago Andrade, que me acompanham, perto ou longe, e estão sempre na torcida. O tempo passou e a amizade permanece... Obrigada! A Danielle Dutra, minha amiga-irmã, obrigada pelo carinho!

Ao Dr. Adolpho Antoniol de Moura pela co-orientação e parceria e ao professor Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira, que me acompanha desde a graduação, pelo aprendizado contínuo e orientação para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada!

Resumo

A literatura traz uma série de estudos que buscam verificar a interferência da nutrição de fêmeas durante os períodos de gestação e amamentação sobre o desenvolvimento cerebral e cognitivo da prole, tanto em humanos quanto em outras espécies. Os ácidos graxos ômega-3, em especial o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), têm sido descritos como importantes nutrientes para um adequado desenvolvimento das funções do sistema nervoso na infância, adolescência e idade adulta. No presente trabalho, buscou-se verificar os efeitos da suplementação de ratas Wistar com ômega-3 durante os períodos pré, peri e pós-natal sobre parâmetros morfológicos e bioquímicos e na atividade elétrica cortical da prole. Os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento corporal, perfil bioquímico e aspectos histológicos do tecido cerebral em momentos distintos (do nascimento aos 70 dias de idade), utilizando análise bioquímica sérica. A atividade elétrica cortical foi registrada pela técnica do eletrocorticograma (ECoG) e analisada pelos métodos de espectro de potência, complexidade de Lempel-Ziv e dimensão fractal do espaço de fase reconstruído do registro de ECoG. Ratos Wistar machos foram divididos em três grupos experimentais, sendo dois provenientes de ratas suplementadas com ômega-3 (S60D e S90D) e outro de um grupo controle. A suplementação de ratas Wistar com ômega-3 modificou os parâmetros morfofisiológicos (desenvolvimento cerebral e perfil bioquímico) da prole em relação ao grupo Controle para os períodos avaliados. Os métodos matemáticos propostos foram sensíveis para detectar alterações no comportamento dos padrões eletrocorticográficos dos animais dos grupos experimentais, causadas pela suplementação materna com ômega-3 durante os períodos pré, peri e pós-natal.

Palavras-chave

Caos, Cérebro, ECoG, Ômega-3, Wistar

Abstract

The literature bring a lot of studies that seek to verify the interference of females nutrition during pregnancy and breastfeeding periods on brain and cognitive development of offspring, both in humans and in other species. Omega-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been described as important nutrients for proper development of nervous system functions in childhood, adolescence and adulthood. In this study, we evaluated the effects of the omega-3 supplementation on development and cortical electric activity of the Wistar rats brain offspring. The animals were evaluated for body development, biochemical profile and histological aspects of brain tissue at different times (from birth until 70 days old) using serum biochemical analysis. The cortical electrical activity was recorded through the eletrocorticogram (ECoG) technique and analyzed by the following methods: power spectrum, Lempel-Ziv Complexity and fractal dimension of the reconstructed phase space. Males Wistar rats were divided into three groups, two from dams supplemented with omega-3 (S60D and S90D) and another from a control group dams. Wistar rats omega-3 supplementation modified morphophysiological parameters (brain development and biochemical profile) of offspring compared to control group to the periods evaluated. Mathematical methods proposed were sensitive to detect changes in the behavior of electrocorticographic patterns, caused by maternal supplementation with omega-3 during pre, peri and postnatal periods.

Keywords

Brain, Chaos, ECoG, Omega-3, Wistar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cérebro e lipídeos	17
2.2 Ômega-3 e atividade elétrica cerebral	22
2.3 Alterações lipídicas e neuropatologias.....	27
2.4 A decomposição do EEG em seus diferentes ritmos cerebrais.....	34
2.5 EEG/ ECoG e sistemas caóticos	36
2.6 Métodos de análise linear e não-linear	37
2.6.1 Espaço de fase reconstruído	38
2.6.2 Dimensão fractal do espaço de fase reconstruído	39
2.6.3 Transformada de Fourier	39
2.6.4 Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. METODOLOGIA	44
4.1 Local e instalações.....	44
4.2 Animais	44
4.3 Delineamento experimental.....	44
4.4 Gavagem.....	46
4.5 Avaliação de ganho de peso	46
4.6 Provas laboratoriais.....	47
4.7 Registro da atividade elétrica cortical	47
4.8 Eutanásia	48
4.9 Análise dos registros de ECoG.....	49
4.10 Análise histológica.....	49
4.11 Análise estatística	49
5. REFERÊNCIAS	50
Artigo I	60
Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre parâmetros morfológicos e bioquímicos da prole em ratos Wistar	61
Artigo II	76
Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre a atividade cortical da prole em ratos machos Wistar	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AA		Ácido aracdônico
AGPI		Ácidos graxos poliinsaturados
AL		Ácido linoleico
ALA		Ácido α -linolênico
AMPA		α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA		Análise de variância
CDS		Síndrome de disfunção cognitiva
CLZ		Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)
CT		Colesterol total
D _{bc}		Dimensão de box-counting
DHA		Ácido docosahexaenóico
EcoG		Eletrocorticograma
EEG		Eletroencefalograma
EM		Esclerose múltipla
EPA		Ácido eicosapentaenóico
GABA		Ácido γ -aminobutírico
HDL		Lipoproteínas de alta densidade
HMGCoAR		Hidroxil-metil-glutaril-CoA
LDL		Lipoproteína de baixa densidade
LTP		Potenciação de longo prazo
LTD		Depressão de longo prazo
M0		Pós-natal imediato

M21		Vinte e um dias pós-natal
M30		Trinta dias pós-natal;
M60		Sessenta dias pós-natal;
M70		Setenta dias pós-natal.
NaCl		Cloreto de sódio
NMDA		N-metil-D-aspartato
n-3		Ômega-3
n-6		Ômega-6
PE		Fosfatidiletanolamina
PGE		Prostaglandinas
PGP		Proteína mielina proteolipídica
PV		Peso vivo
RBEC		Células endoteliais de cérebro de rato
S60D		Suplementação a partir dos 60 dias
S90D		Suplementação a partir dos 90 dias
SGB		Síndrome de Guillain-Barré
SNC		Sistema nervoso central
SNP		Sistema nervoso periférico
TDAH		Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TF		Transformada de Fourier
TG		Triglicerídeos totais
4-HHE		4-hidroxi-2-hexenal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de colesterol. O colesterol sintetizado no retículo do astrócito liga-se a ApoE. Ao deixar astrócito, o complexo ApoE-colesterol ligando-se ao LDLR da membrana neuronal, sendo internalizada. O tráfico intracelular de colesterol requer proteínas do tipo 1 (NPC1) e 2 (NPC2) Niemann-Pick tipo C. SREBP - Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol. ApoE – apolipoproteína E. LDLR – receptor de LDL. CYP46 –Citocromo P46. Traduzido de BENARROCH, 2008.17

Figura 2. Cooperação metabólica dos axônios, oligodendrócitos e astrócitos no desenvolvimento de substância branca do SNC. Durante a mielinização, o metabolismo está orientado para a formação de mielina. Glicose, lactato e N-acetil-aspartato (NAA), são utilizados para gerar o acetil-CoA para a síntese de lipídeos, incluindo colesterol da mielina. Enquanto o NAA é derivado de neurônios através de uma rota que ainda não está totalmente esclarecida, o lactato pode ser entregue a partir de astrócitos ou diretamente via junções comunicantes (GJ) ou ainda, por meio de lançamento e reabsorção através transportadores de monocarboxilato (MCT). CoA: coenzima A; GLUT: transportador de glicose; Glc: glicose; Lac: lactato; Pir: piruvato. Traduzido de HIRRLINGER; NAVE (2014).....18

Figura 3. Mielinização. Micrografia eletrônica de varredura (SEM) colorida de um oligodendrócito (centro, laranja) aderindo-se a uma fibra nervosa do axônio (verde claro). Este é o início da mielinização no sistema nervoso central (SNC). Processos dendríticos do citoplasma dos oligodendrócitos dão origem a camadas de membrana citoplasmática, que formam a bainha de mielina em torno dos axônios nervosos de forma concêntrica. A mielinização fornece aos axônios o apoio e o isolamento, permitindo a condução do impulso rápido. Fonte: Science Photo Library.28

Figura 4. Esclerose múltipla. Micrografia eletrônica de varredura (SEM) de uma micróglia (em laranja) ingerindo oligodendrócitos (em rosa, ramificada) no tecido nervoso. Micróglias normalmente ingerem os detritos celulares e bactérias, como parte da resposta imunitária do corpo. Na esclerose múltipla, atacam os oligodendrócitos, numa reação possivelmente desencadeada por um vírus em pessoas com susceptibilidade hereditária. A destruição das bainhas de mielina leva à perda de função do nervo. Fonte: Science Photo Library.29

Figura 5. Resumo dos processos envolvidos no surgimento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e Huntington. A β - beta amiloide; BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro; DJ1 - proteína da doença de Parkinson 7; P – sítio de fosforilação; REST, elemento repressor do fator de silenciamento de transcrição-1; ROS – espécies reativas ao oxigênio. Traduzido de (STRANAHAN; MATTSON, 2012a)33

Figura 6. Ondas cerebrais em ratos. δ - ondas delta (1 - 4 Hz) - em sono profundo. θ - ondas teta (4 - 8 Hz) - em sonolência ou estados emocionais alterados. α - ondas

alfa (8-12 Hz) - em vigília com relaxamento mental. β - ondas beta (12-30 Hz) - em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição. Fonte: Aguiar, 2015.35

Figura 7. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias.45

Figura 8. Pesagem do animal em balança analítica para avaliação do desenvolvimento corporal. Fonte: Arquivo pessoal.47

Figura 9. Dosagem de perfil sérico utilizando o aparelho Accutrend Plus (Roche®). Fonte: Arquivo pessoal.47

Figura 10. Preparo do animal para registro do ECoG. Fixação da cabeça do animal à base do estereotáxico e incisão da pele.48

Artigo I

Figura 1. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias.64

Figura 2. Desenvolvimento corporal (peso médio) das matrizes e tamanho da ninhada durante o período experimental para os diferentes tratamentos. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias (ANOVA, $p < 0,05$).65

Figura 3. Valores de peso corporal (média $\pm$ desvio padrão) dos animais avaliados ao nascer (M0), ao desmame (M21), aos trinta (M30), sessenta (M60) e setenta (M70) dias de idade. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias (ANOVA e post-hoc de Tukey). *** $p < 0,0001$66

Figura 4. Perfil glicêmico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....67

Figura 5. Níveis de colesterol total sérico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....68

Figura 6. Níveis de triglicerídeo total sérico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....69

Figura 7. Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 (Coloração: HE. Aumento 40X). B - Região CA1. Os boxes em vermelho indicam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade de celular. Aumento 40X. C - Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios. D, G, J - Grupo S60D (M0, M30 e M60, respectivamente). E, H, K - Grupo S90D (M0, M30 e M60, respectivamente). F, I, L - Grupo Controle (M0, M30 e M60, respectivamente). Coloração: Nissl. Aumento 400X.....70

Figura 8. Média da densidade de área (%) de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos avaliados ao nascimento, aos trinta e sessenta dias de idade (M0, M30 e M60, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).....71

Artigo II

Figura 1. Valores de peso cerebral absoluto (g) e peso cerebral relativo dos animais avaliados aos 70 dias de idade. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a

partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*p < 0,05; ** p < 0,001). (ANOVA e post-hoc de Tukey).

.....84

Figura 2. Segmentos de dez segundos do ECoG dos grupos: Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias.....86

Figura 3. Espectro de potência para os grupos experimentais. A energia de cada onda é calculada pela integral da área do intervalo de frequência correspondente das ondas: delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 16 Hz) e beta (16 – 20 Hz). S60D (verde) - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D (vermelho) - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle (verde)– Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. *p < 0.05 (ANOVA e post-hoc de Tukey).86

Figura 4. Atratores obtidos para as ondas delta, teta, alfa e beta dos animais dos grupos experimentais. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional e níveis de garantia da ração Presence® ratos e camundongos.....44

Artigo II

Tabela 1. Valores de potência média ($\mu\text{V}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$) das distintas ondas cerebrais e Complexidade de Lempel-Ziv dos registros do ECoG.....87

Tabela 2. Valores obtidos para a Complexidade de Lempel-Ziv (média $\pm$ desvio padrão) dos registros do ECoG.....88

Tabela 3. Dimensão fractal (média $\pm$ desvio padrão) obtida pelo método de *box-counting* (contagem por caixas) para as ondas cerebrais dos animais dos grupos experimentais.90

1. INTRODUÇÃO

A suplementação com óleo de peixe durante o período embrionário e/ou pós-natal pode influenciar positivamente a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 pelo cérebro, proporcionando um melhor desenvolvimento deste órgão e das funções a ele relacionadas.

A deficiência de ácido docosahexaenóico (DHA) - ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa - durante o desenvolvimento embrionário tem sido associada com anormalidades neurológicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento anormal da bainha de mielina (LEITE, 2011), fundamental para a propagação do impulso nervoso ao longo das fibras dos axônios. Além disso, esse AGPI é fundamental para um desenvolvimento adequado das células do hipocampo, que tem importante papel nos processos de aprendizagem e memória, tanto na fase desenvolvimento do cérebro quanto em indivíduos na senilidade, agindo como um neuroprotetor.

No Sistema Nervoso Central (SNC), os neurônios conduzem o impulso nervoso através de potenciais de ação e sinapses (KANDEL et al., 2000). A sobreposição de potenciais pós-sinápticos de populações de neurônios é responsável pela atividade elétrica cerebral detectável pelo Eletrocorticograma (ECoG). Apesar de ser aparentemente aleatório, o ECoG apresenta propriedades caóticas.

Os fenômenos caóticos apresentam como principal característica a sensibilidade crítica às condições iniciais, ou seja, uma pequena diferença num estímulo inicial pode resultar em respostas bastante diferentes (SAVI, 2006). Na atividade elétrica cerebral, como em qualquer sistema fisiológico, a capacidade de

auto-regulação é que define a regra do caos. Uma vez que o cérebro apresenta-se como um sistema dinâmico não-linear caótico, a aplicação de métodos matemáticos lineares e não-lineares, como o espectro de potência, a dimensão fractal do espaço de fase reconstruído e a complexidade de Lempel-Ziv, pode auxiliar na compreensão de aspectos importantes desses processos.

A suplementação materna com ômega-3 pode modificar físico-quimicamente o tecido cerebral na prole, alterando a composição fosfolipídica e de colesterol das membranas das células neuronais, o que por sua vez altera processos de sinalização celular, expressão gênica, e ainda a síntese protéica e lipídica. Uma outra possibilidade é que AGPI e/ou seus metabólitos possam interferir diretamente sobre a modulação da atividade elétrica cortical da prole. Estas alterações podem ser verificadas por meio da aplicação de técnicas matemáticas na análise dos registros da atividade elétrica cortical obtidos no ECoG. Neste trabalho, são analisados os efeitos da suplementação com ômega-3 em ratas Wistar durante os períodos pré-gestacional, gestacional e de aleitamento materno sobre desenvolvimento corporal, perfis lipídico e glicêmico, morfometria do hipocampo e atividade elétrica cortical da prole.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cérebro e lipídeos

Os lipídios são responsáveis por cerca de metade do peso seco do tecido cerebral. Assim, não é de estranhar que a bioquímica, neuroquímica, estrutura da membrana lipídica e função tenham evoluído junto com o conhecimento acerca do funcionamento do cérebro. São componentes estruturais das membranas celulares e atuam como reguladores. A quantidade de lipídios no tecido cerebral varia espacialmente, entre as diferentes regiões, e temporalmente, com a idade. (BOURRE, 2009).

O cérebro é o órgão do corpo mais rico em colesterol, contendo quase 25% da quantidade total. A maioria (70 - 80%) deste colesterol está presente na mielina, onde desempenha um papel crítico de isolamento. Os astrócitos são a principal fonte de colesterol para os neurônios (Fig. 1).

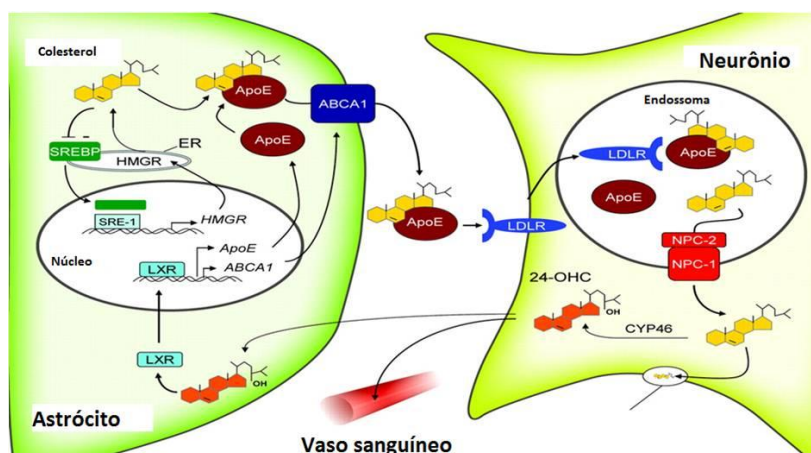


Figura 1. Transporte de colesterol. O colesterol sintetizado no retículo do astrócito liga-se a ApoE. Ao deixar astrócito, o complexo ApoE-colesterol ligando-se ao LDLR da membrana neuronal, sendo internalizada. O tráfico intracelular de colesterol requer proteínas do tipo 1 (NPC1) e 2 (NPC2) Niemann-Pick tipo C. SREBP - Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol. ApoE – apolipoproteína E. LDLR – receptor de LDL. CYP46 – Citocromo P46. Traduzido de BENARROCH, 2008.

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático pela HMGR (3-hidroxil-3-metilglutaril-coenzima-A-redutase, regulado por um *feedback* inibitório via proteína de ligação do elemento de regulação do esterol (SRBP), que se liga ao gene do HMGR. Astrócitos secretam o colesterol ligado à Apolipoproteína E (ApoE) via transportador BCA1 ligado ao ATP (ABCA1). O complexo apoE-colesterol é internalizado via receptores LDL (LDLR). O colesterol é convertido em 24-

hidroxicolesterol (24-OHC) via citocromo P450. Este e outros oxiesteróis podem atravessar a barreira hematoencefálica ou ser trazidos do plasma via fluido cérebrospinal (MARTÍN; PFRIEGER; DOTTI, 2014).

No início do desenvolvimento, os axônios crescem antes da chegada da maioria das células gliais e quando as projeções axonais são relativamente jovens (dias/ semanas) e curtas (mm/ cm). Só após o estabelecimento das conexões neuronais os precursores de astrócitos e oligodendrócitos expandem em número e a diferenciação dos precursores de oligodendrócitos leva a mielinização (Fig. 2). A síntese de colesterol tanto em neurônios quanto em células gliais é maior durante a embriogênese e infância, quando a mielogênese é máxima (VITALI; WELLINGTON; CALABRESI, 2014).

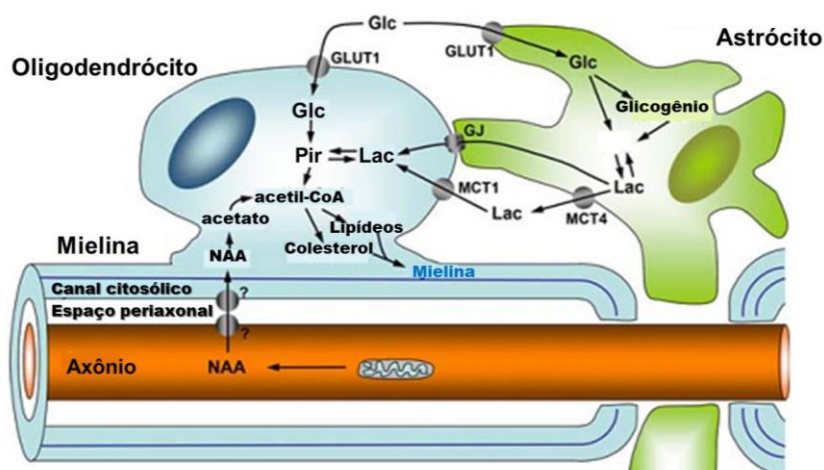


Figura 2. Cooperação metabólica dos axônios, oligodendrócitos e astrócitos no desenvolvimento de substância branca do SNC. Durante a mielinização, o metabolismo está orientado para a formação de mielina. Glicose, lactato e N-acetil-aspartato (NAA), são utilizados para gerar o acetil-CoA para a síntese de lipídeos, incluindo colesterol da mielina. Enquanto o NAA é derivado de neurônios através de uma rota que ainda não está totalmente esclarecida, o lactato pode ser entregue a partir de astrócitos ou diretamente via junções comunicantes (GJ) ou ainda, por meio de lançamento e reabsorção através transportadores de monocarboxilato (MCT). CoA: coenzima A; GLUT: transportador de glicose; Glc: glicose; Lac: lactato; Pir: piruvato. Traduzido de HIRRLINGER; NAVE (2014).

Nesta fase, os oligodendrócitos produzem grandes quantidades de lipídeos e proteínas em poucos dias, sintetizando o equivalente a sua própria massa, em menos de 8 horas. Após a conclusão da mielinização, um segundo desafio metabólico é manter estas estruturas, incluindo a bainha de mielina, que pode ser considerada uma organela oligodendroglial externa (HIRRLINGER; NAVE, 2014).

Dentre os lipídios no cérebro, destacam-se os fosfolipídios, dos quais as fosfatidiletanolamina (PE) são os mais abundantes (BOURRE, 2009). Na fração de PE de membranas, o DHA corresponde a aproximadamente 25% (em peso %) dos ácidos graxos totais no córtex cerebral (GUESNET; ALESSANDRI, 2011). Os componentes mais importantes desses lipídeos são os ácidos graxos essenciais n-6, ácido linoléico (LA) e n-3, ácido alfa-linolênico (ALA), que não podem ser metabolizados pelo organismo, e são obtidos a partir da dieta (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013; VAN ELST et al., 2014). Portanto, a dieta é um fator ambiental chave que influencia a estrutura e função do sistema nervoso (BOURRE, 2009).

Os n-6 e n-3 são os precursores do n-6, ácido araquidônico (AA), n-3, ácido docosahexaenóico (DHA) e n-3 ácido eicosapentaenóico (EPA), respectivamente (DESAI; KEVALA; KIM, 2014; VAN ELST et al., 2014), sendo estes últimos altamente concentrados no cérebro (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013; GRAYSON et al., 2014). Torna-se evidente que quantidades elevadas desses AGPI são necessárias para a sinaptogênese e a maturação dos nervos (VAN ELST et al., 2014). Trinta e cinco por cento dos lipídeos cerebrais são AGPIs de cadeia longa (ECKERT; LIPKA; MULLER, 2013).

Dietas com AGPI reduzem a concentração de colesterol ligada à membrana neuronal, que em excesso, causa rigidez desta última. Em células não neurais, a suplementação com DHA aumenta a fluidez da membrana e o índice de insaturação dos ácidos graxos (HORROCKS; FAROOQUI, 2004).

A literatura nutricional e bioquímica tem discutido o conceito de fluidez de membrana baseado, principalmente, no ponto de fusão dos lipídeos naturais que diminuem seu ponto de fusão à medida que aumenta o número de duplas ligações *cis*. Por exemplo, os pontos de fusão de dois AGPI de cadeia longa que diferem em apenas uma dupla ligação, o AA e o EPA são 50°C e 54°C, respectivamente. Já o ponto de fusão para o DHA é de 44°C, que prediz que a fluidez diminui quando o DHA é substituído por outros AGPI na membrana. Além disso, alterações na insaturação de membranas de células neurais, em função da temperatura são observadas apenas para os ácidos graxos saturados e monoinsaturados, porém as concentrações de DHA não são afetadas (BRENNAN; CARLSON, 2014).

Há cada vez mais evidências de estudos observacionais, epidemiológicos, biológicos, bioquímicos que os AGPI ômega-3 podem proteger o cérebro contra o envelhecimento e demência. Eles poderão atuar, protegendo os neurônios, e / ou têm propriedades antiamilóide, antioxidantes, antiinflamatória e antiaterogênicas (BOURRE, 2009; CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013). No entanto, estudos mais recentes buscam também verificar os processos de oxidação desses AGPI e suas consequências nos tecidos.

Em comparação com o DHA, o EPA está presente numa concentração muito baixa de fosfolípidos cerebrais. No entanto, num estudo de perfusão cerebral *in situ*, verificou-se que camundongos suplementados com EPA durante um longo período apresentaram um aumento significativo na concentração cerebral dos níveis desse AGPI. No mesmo estudo demonstrou-se que assim com o DHA, o EPA atravessou facilmente a barreira hematoencefálica (OUELLET et al., 2009).

A composição dos lipídeos dos tecidos neurais é única em relação ao seu teor de DHA e outros AGPI, quando comparada a outros tecidos corporais. A retina, considerada uma extensão do sistema nervoso central, também é rica em DHA. Os níveis deste ácido graxo nos tecidos, especialmente no tecido nervoso, são muito sensíveis à ingestão, mesmo quando comparado a outro importante AGPI de cadeia longa, o ácido aracdônico (BRENNAN; CARLSON, 2014).

O conteúdo de DHA em membranas cerebrais é de importância crucial para o desenvolvimento ideal das funções cerebrais. Níveis reduzidos de DHA no cérebro são acompanhados por déficit de aprendizagem ligado a deficiências nos processos de neurotransmissão. Além disso, a redução de fornecimento DHA ao cérebro produz diminuição do metabolismo energético cerebral (HARBEBY et al., 2012).

A relação entre a estrutura e a função do tecido nervoso e AGPI se verifica em diversos estudos envolvendo animais privados de DHA pré-formado em sua dieta. É possível observar que enquanto os órgãos fetais estão formados na época do nascimento, o cérebro continua a explorar o fornecimento de DHA materno no período pós-natal. Há uma hipótese de que mulheres que consomem regularmente DHA e assim, possuem níveis adequados deste ácido graxo no início da gravidez apresentariam maiores benefícios a sua saúde, bem como a do bebê, quando comparadas a mulheres que iniciem uma suplementação com DHA durante a

gravidez. Entretanto, até o momento não existe um consenso sobre o período crítico ideal para melhora dos níveis de DHA no leite materno (BRENNAN; CARLSON, 2014).

Harbeby e colaboradores (2012) obtiveram dados experimentais que suportam a hipótese de que os ácidos graxos n-3 podem modular o metabolismo cerebral e a utilização de glicose. Ratos deficientes em DHA pela supressão severa de AGPI na dieta apresentaram alterações, dentre as quais se destacam: baixa utilização de glicose cerebral, redução de transportadores de glicose GLUT, tanto em células endoteliais quanto em astrócitos, além de repressão da expressão gênica de GLUT1 no estado basal e mediante ativação neuronal. Isto pode ser devido a uma ação específica do DHA na regulação da expressão de GLUT1.

Um estudo anterior mostrou uma redução significativa de GLUT1 endotelial (-23%) em microvasos de ratos deficientes em AGPI ômega-3 em comparação ao controle. Por outro lado, observou-se um aumento (+35%) em microvasos de ratos suplementados com elevado teor destes AGPIs. Em paralelo, os mesmos autores mediram a captação de glicose em culturas primárias de células endoteliais de cérebro de rato (RBEC) expostas a DHA e EPA ou AA. A suplementação de RBEC com DHA ou EPA aumentou a absorção de [3H]-3-O-metilglicose (refletindo o transporte de glicose basal) em 35% e 50%, respectivamente, enquanto o AA não teve nenhum efeito, sugerindo que os AGPI ômega-3 podem modular o transporte de glicose cerebral em células endoteliais da barreira hematoencefálica, possivelmente por meio de alterações na expressão e atividade de proteínas GLUT1 (PIFFERI et al., 2007).

Em cultivos de células endoteliais de cérebro de ratos tratadas com doses fisiológicas de DHA houve um acréscimo do transportador GLUT1 quando comparado a cultivos sem DHA. Estes resultados destacam o impacto do ômega-3 sobre a utilização de glicose pelo cérebro, constituindo assim um fator chave no controle da atividade sináptica, sugerindo que o consumo destes ácidos graxos na dieta poderia ajudar a reduzir déficits cognitivos e possíveis alterações metabólicas cerebrais sintomáticas em doenças neurodegenerativas, pela promoção do metabolismo da glicose (HARBEBY et al., 2012).

2.2 Ômega-3 e atividade elétrica cerebral

A fluidez das membranas neuronais afetam as propriedades de processos de sinalização dos neurônios. Assim, modificações do equilíbrio na incorporação de AGPI ômega-6 e ômega-3 podem alterar esta característica da membrana (BRENNA; CARLSON, 2014). Uma deficiência de ômega-3 produz alterações na composição de fosfolípidos de membrana neuronal no córtex frontal e no hipocampo, com uma diminuição considerável do DHA. Essa deficiência no tecido cerebral, por sua vez, pode afetar significativamente a atividade das enzimas ligadas à membrana, canais iônicos e receptores, como a bomba de sódio e potássio, proteína quinase-C e outras enzimas relacionadas com a transdução de sinal (HORROCKS; FAROOQUI, 2004).

A dieta deficiente em ômega-3, desde o período de desenvolvimento do SNC durante a gestação até a vida adulta, levou a déficits na memória aversiva de longa duração, estando relacionada com a redução dos níveis de DHA (ω 3), aumento do ácido docosapentaenóico (DPA ω 6) e redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo de ratos. Os resultados mostram a importância dos ácidos graxos ω 3 na manutenção dos níveis adequados de DHA ω 3 e BDNF no hipocampo, bem como seus efeitos na persistência da memória após uma tarefa de memória aversiva (BACH, 2012).

Os AGPIs desempenham um papel importante na estrutura e função das membranas celulares neuronais no cérebro, bem como no desenvolvimento e homeostase da retina e da bainha de mielina (VAN ELST et al., 2014). Os efeitos benéficos de DHA podem ser devidos não apenas ao seu efeito sobre as propriedades físico-químicas das membranas neuronais (AVRAMOVIC et al., 2012; SIDHU; HUANG; KIM, 2011; STONEHOUSE, 2014), mas também estão relacionados com a modulação da expressão dos genes de muitas proteínas enzimáticas envolvidas nos processos de transdução de sinal (HORROCKS; FAROOQUI, 2004; KOMPRDA, 2012; SAKAYORI et al., 2011; SALVATI et al., 2008; SINHA et al., 2009; UAUY; DANGOUR, 2006).

Além disso, vários estudos revelam alterações da distribuição e metabolismo de neurotransmissores colinérgicos no hipocampo e dopaminérgicos no córtex frontal decorrentes da suplementação ou deficiência da incorporação de DHA nos

fosfolipídeos de membrana neuronal, sugerindo que alterações observadas nos testes de comportamento animal podem estar relacionadas aos níveis de DHA na dieta (HORROCKS; FAROOQUI, 2004). Entretanto, os níveis ideais de ômega-3 para estes efeitos benéficos ainda não foram bem definidos (AWADA et al., 2013).

Por outro lado, estudos recentes revelam que esses AGPI ômega-3 não estão isentos de riscos. Efeitos prejudiciais de altos níveis de ômega-3 na degeneração da membrana da retina tem sido descritos na literatura (ROBMAN et al., 2007). Ácidos graxos de cadeia longa usados nas dietas com AGPI ômega-3 são propensos a oxidação, produzindo metabólitos potencialmente deletérios, como o 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE), um produto final da oxidação de AGPI n-3, que pode favorecer o estresse oxidativo metabólico e processos inflamatórios crônicos (AWADA et al., 2012, 2013). Quantidades desses AGPI superiores a 1% das calorias na dieta podem tornar-se um fator de risco em decorrência do aumento da susceptibilidade à oxidação do LDL e estresse oxidativo de outras lipoproteínas (FRANKEL, 2014).

Os ácidos graxos EPA e DHA modulam a expressão gênica cerebral, incluindo genes que controlam o metabolismo energético e produção de ATP, bem como codificação de fatores regulatórios para a biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo (ECKERT; LIPKA; MULLER, 2013). O AA e o DHA também atuam em conjunto, ativando a transcrição de genes cujas proteínas sintetizadas são responsáveis por regular o processo de interação entre as células nervosas durante o desenvolvimento cerebral, sendo essenciais para a via de sinalização da resposta de células gliais para os neurônios, uma atividade que é regulada pelo DHA (UAUY; DANGOUR, 2006).

O estado físico da membrana neuronal é crítico no controle de transferência de informações neuronais, isto é, não deve ser muito rígido nem demasiado fluido para a troca iônica entre os meios intra e extracelulares (CUNNANE et al., 2009). O DHA também modula as propriedades do núcleo hidrofóbico da bicamada da membrana, o que confere um elevado grau de flexibilidade e interação direta com as proteínas da membrana, exercendo assim um impacto na velocidade de transdução de sinal, neurotransmissão e a formação de jangadas lipídicas (*lipid rafts*) (CUNNANE et al., 2009). Sendo assim, um nível adequado deste ácido graxo é necessário para manter a integridade da membrana e função dos neurônios (BOURRE, 2009).

A funcionalidade das membranas neuronais depende de níveis ótimos de AGPI e sua deficiência no tecido cerebral pode afetar significativamente a atividade elétrica cerebral. Tem sido sugerido que o DHA participa do processo de estabilização das membranas neuronais e da modulação da dinâmica dos canais iônicos e receptores de neurotransmissores. Ao bloquear canais de potássio, este AGPI pode aumentar a excitabilidade dos neurônios e agravar a ocorrência de crises epiléticas. Por outro lado, o DHA pode estabilizar as membranas neuronais, através da supressão de correntes elétricas relacionadas a canais de cálcio e sódio dependentes de voltagem. Além disso, o DHA inibe fortemente a frequência de disparo de potenciais de ação gerados por pulsos de corrente, sem afetar, no entanto, os potenciais de ação individualmente (HORROCKS; FAROOQUI, 2004).

O potencial genético do desenvolvimento cerebral é determinado durante a embriogênese e no início da vida pós-natal. Neste período ocorrem os processos de neurodesenvolvimento mais importantes: mielinização, organização de sistemas neurotransmissores, arborização dendrítica e gênese sináptica, observadas com maior intensidade no sistema visual e no hipocampo (FERNANDES, 2007). No momento do nascimento, o córtex é bastante primitivo e poucos circuitos foram estabelecidos. Proliferação, migração de células e diferenciação ocorrem no período pré-natal, enquanto o crescimento em extensão de axônios e dendritos, sinaptogênese e gliogênese são todos eventos pós-natal (KASAI; SATOH; AKIYAMA, 2005).

Em ratos, o período da histogênese do neocórtex pode ser dividido em duas etapas: neurogênese e gliogênese. Durante a primeira fase, uma população de células dá origem a neurônios. Este estágio se completa quando o número definitivo de fibras nervosas está formado. Nesta espécie, essa formação se inicia por volta do 11º ou 12º dia pós-concepção e finaliza ao nascimento, sendo seguido pela etapa da gliogênese, em que populações de células germinais do mesmo tipo ou diferentes produzem os vários tipos de células gliais. Esta última fase pode ter início no momento do nascimento e permanecer durante o desenvolvimento do cérebro, nos primeiros quinze dias do período pós-natal. (LENZI; TELES; GUZMÁN, 2011). Há uma sobreposição entre o fim da neurogênese e o início da gliogênese (KASAI; SATOH; AKIYAMA, 2005).

A deposição de DHA, bem como de AA nos fosfolipídeos do cérebro humano ocorre principalmente durante o período da neurogênese fetal ativa e maturação das células (a partir do sexto mês de gestação) e no período pós-natal inicial (durante o período de amamentação - primeiros 6 meses de vida pós-natal), com desenvolvimento de intensa sinaptogênese, que continua durante os dois primeiros anos de vida em humanos (GUESNET; ALESSANDRI, 2011). Em ratos, esse fenômeno ocorre durante a fase embrionária (por volta do 10º dia de gestação) e as três primeiras semanas de vida pós-natal, período no qual se dá o aleitamento exclusivo (FERNANDES, 2007; VELASCO et al., 2012).

Durante a gestação, a transferência placentária fornece ALA e DHA pré-formado, assegurando assim a incorporação de DHA em membranas do cérebro fetal, favorecendo a deposição de AGPI n-3 nos depósitos corporais, que por sua vez contribuem para satisfazer as necessidades de DHA do recém-nascido. Observam-se alterações na concentração deste AGPI em prematuros, provavelmente porque a transferência placentária ocorre com maior intensidade no terço final da gestação (GUESNET; ALESSANDRI, 2011). Após o nascimento, esses AGPI são transferidos das mães aos filhotes, no período de aleitamento materno Bortolozo et al. (2013)

Estudos têm enfatizado a importância do DHA na dieta de cadelas durante a gestação até o desmame, bem como na dieta dos filhotes, a fim de assegurar o desenvolvimento neurológico ideal. Ainda não foi estabelecida uma recomendação da quantidade de DHA ideal para cadelas gestantes e lactantes ou filhotes, mas a dose diária recomendada de ácido α -linolênico é de 3,35 g/ 1000 kJ para esta espécie (BOSCH et al., 2007). Um estudo recente mostrou que a conversão de ALA em DHA ocorre durante o primeiro mês de amamentação (BAUER et al., 2006), com aparente redução da capacidade de síntese deste AGPI a partir de seus precursores está ativo apenas por um curto período de tempo (BOSCH et al., 2007).

Buscando avaliar o impacto da suplementação na dieta de gestantes e de lactantes com ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA) e sua influência na composição do leite humano Bortolozo et al. (2013) realizaram um estudo com mulheres gestantes, as quais receberam cápsulas de ômega-3 entre o terceiro trimestre de gravidez e o terceiro mês após o parto, o que resultou em teores mais elevados na

concentração de DHA e EPA, demonstrando que um maior consumo de ômega-3 pode influenciar na sua concentração no leite humano.

Comitês internacionais recomendam para as mulheres gestantes e mães, a ingestão de doses diárias de 200 a 300 mg de DHA, que é o mesmo nível que o recomendado, em geral, para adultos humanos. Estudos têm sido realizados buscando determinar a relação dose-efeito e se a ingestão materna de DHA durante a gravidez e lactação tem implicações de longo prazo para a função neural dos bebês (LENZI; TELES; GUZMÁN, 2011).

A deficiência deste AGPI durante o desenvolvimento cerebral tem sido correlacionada com anormalidades de comportamento em várias espécies animais (LENZI; TELES; GUZMÁN, 2011). Outros estudos apontam que seu efeito é bem documentado em doenças neurodegenerativas e inflamatórias. Além disso, processos biofisiológicos podem ser influenciados pelo EPA e DHA, componentes de óleo de peixe (AVRAMOVIC et al., 2012). Existem hoje inúmeros estudos observacionais relacionando o nível de DHA materno ou ingestão durante a gravidez, ou o nível de DHA do recém-nascido, a uma variedade de resultados positivos no desenvolvimento das crias. Os resultados medidos variam da função imune à função cognitiva, sendo relatados em idades que variam do início ao final da infância (BRENNAN; CARLSON, 2014).

Estudos com animais demonstraram que dietas com altos níveis de AL e baixos níveis de ALA, utilizadas como fonte exclusiva de lipídeos durante a gravidez e lactação resultam em déficits visuais, cognitivos e comportamentais na prole. Estas dietas consistentemente induziram déficits funcionais de eletroretinograma, respostas reflexas, aprendizagem, comportamento e desenvolvimento motor em comparação com animais suplementados com ômega-3 (BRENNAN, 2011).

Em um estudo com ratos neonatos, Tuzun e colaboradores (2012) verificaram que a suplementação materna com altas doses de ômega-3 (1000 mg/kg DHA, 400 mg/kg EPA) diminuiu significativamente a apoptose em hipocampo e córtex pré-frontal de neonatos expostos a hiperóxia, quando comparada a suplementação com baixas doses de ômega-3 (250 mg/kg DHA, 100 mg/kg EPA), onde se observou uma contagem neuronal significativamente mais baixa e morte celular por apoptose significativamente maior nas referidas regiões do cérebro, sugerindo que a

suplementação materna com ômega-3 pode proteger o cérebro em desenvolvimento contra a lesão hiperóxica.

O reforço da neurogênese é uma importante ferramenta para tratar distúrbios cerebrais e foi sugerido para melhorar ou prevenir doenças mentais, denervação colinérgica, e doenças neurodegenerativas. AGPI ômega-3 teria reforçado a neurogênese no hipocampo de ratos adultos, tecido cerebral de lagostas, e em camundongos transgênicos (CUNNANE et al., 2009; ECKERT; LIPKA; MULLER, 2013; FALINSKA et al., 2012; MORRIS, 2012).

O DHA (22:6 n-3) é abundantemente encontrado no cérebro e, principalmente, ancorado na membrana neuronal, onde está envolvido na manutenção das funções neurológicas normais. O maior acúmulo de DHA no cérebro ocorre durante o desenvolvimento deste órgão no período perinatal. Os neurônios em desenvolvimento do cérebro e do hipocampo podem sintetizar DHA e incorporá-lo nos fosfolípidos de membrana, em especial a PE, resultando em maior neurogênese e sinaptogênese. A exposição a esse AGPI melhora a plasticidade sináptica, aumentando a potenciação de longo prazo (LTP) e a expressão da proteína sináptica, a qual propicia uma maior densidade de espinhos dendríticos, número de neurônios c-Fos-positivos e neurogênese no hipocampo, o que é essencial para os processos de memória e aprendizagem (SU, 2010).

2.3 Alterações lipídicas e neuropatologias

As fibras nervosas de alguns axônios dos neurônios, tanto sensitivos quanto motores, apresentam bainhas de mielina (Fig. 3) ao longo de grande parte de seu comprimento. Essa bainha é disposta em camadas concêntricas constituídas por repetidas camadas bimoleculares de lipídios alternadas entre camadas protéicas. A mielina possui composição semelhante à das membranas plasmáticas, composta por 70% de lipídeos e 30% de proteínas, com alta concentração de colesterol e fosfolípidos (CARLSON et al., 2013; FALINSKA et al., 2012; HAUBNER et al., 2002; HIRRLINGER; NAVE, 2014; ROGERS; VALENTINE; KEIM, 2013; WEI et al., 1987).

A bainha de mielina é regularmente interrompida ao longo do comprimento do axônio. Nestes espaços, chamados nodos de Ranvier, o axolema está exposto ao espaço extracelular por cerca de 0,5 μm . Este arranjo segmentado da mielina

aumenta significativamente a velocidade na qual o impulso nervoso é conduzido ao longo do axônio, porque o impulso pode se propagar de um nodo para o próximo, numa condução saltatória (ALMEIDA, 2007; HAROUTUNIAN et al., 2014; HIRRLINGER; NAVE, 2014; LEE et al., 2012; WANG; YOUNG, 2013).



Figura 3. Mielinização. Micrografia eletrônica de varredura (SEM) colorida de um oligodendrócito (centro, laranja) aderindo-se a uma fibra nervosa do axônio (verde claro). Este é o início da mielinização no sistema nervoso central (SNC). Processos dendríticos do citoplasma dos oligodendrócitos dão origem a camadas de membrana citoplasmática, que formam a bainha de mielina em torno dos axônios nervosos de forma concêntrica. A mielinização fornece aos axônios o apoio e o isolamento, permitindo a condução do impulso rápido. Fonte: Science Photo Library (Disponível em <http://www.sciencephotolibrary.com>).

Doenças que causam a destruição da bainha de mielina provocam alterações associadas a redução da sensibilidade e movimento, porque a desmielinização dos axônios lentifica a transmissão dos potenciais de ação, e portanto, acarreta problemas com a percepção sensorial e a coordenação motora adequada, que podem ter reflexos devastadores sobre o comportamento. A mielina é produzida por uma classe especial de células da glia, os oligodendrócitos. No SNC, essas células envolvem em média 15 axônios cada um. Já no SNP, as células envolvem apenas um segmento internodal do axônio, de forma que até 500 oligodendrócitos participam da mielinização de um único axônio sensorial periférico (FALINSKA et al., 2012; HIRRLINGER; NAVE, 2014; WANG; YOUNG, 2013).

Na esclerose múltipla (EM), uma doença incapacitante altamente complexa com patologia e curso clínico variáveis, cujo progressivo envolvimento sistêmico do SNC leva a distúrbios funcionais e deficiências complexas (BEER; KESSELRING, 2014). Micróglias normalmente ingerem os detritos celulares e bactérias, como parte

da resposta imunitária do corpo. Na esclerose múltipla, atacam os oligodendrócitos, numa reação possivelmente desencadeada por um vírus em pessoas com susceptibilidade hereditária. A destruição das bainhas de mielina leva à perda de função do nervo (Fig. 4).

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma polineuropatia aguda, cujo quadro clínico típico é baseado no aumento da fraqueza muscular e arreflexia. Existem diferentes subtipos descritos como neuropatia desmielinizante inflamatória aguda, neuropatia axonal motora aguda, neuropatia sensorimotora axonal aguda e síndrome de Miller Fisher (VELÁZQUEZ BENITO et al., 2014).

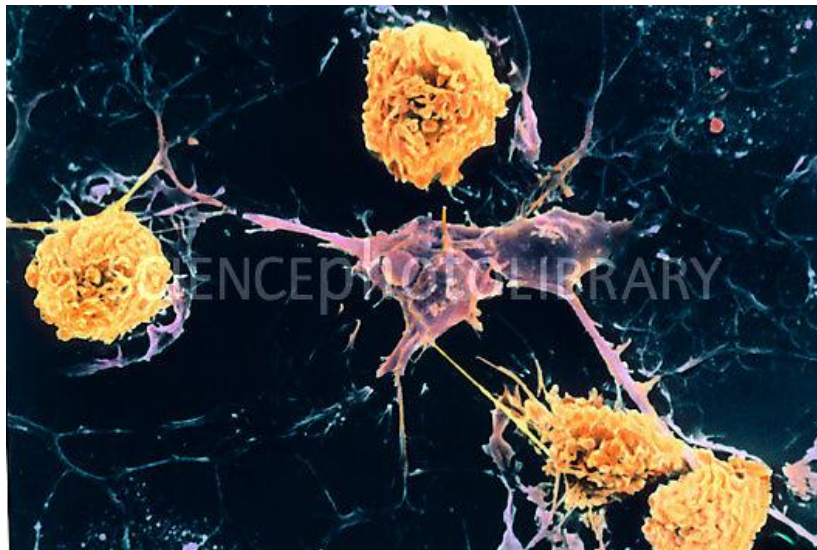


Figura 4. Esclerose múltipla. Micrografia eletrônica de varredura (SEM) de uma micróglia (em laranja) ingerindo oligodendrócitos (em rosa, ramificada) no tecido nervoso. Micróglias normalmente ingerem os detritos celulares e bactérias, como parte da resposta imunitária do corpo. Na esclerose múltipla, atacam os oligodendrócitos, numa reação possivelmente desencadeada por um vírus em pessoas com susceptibilidade hereditária. A destruição das bainhas de mielina leva à perda de função do nervo. Fonte: Science Photo Library (disponível em <http://www.sciencephotolibrary.com>).

Os cães representam uma espécie que é frequentemente afetada por ocorrências espontâneas de alterações do SNC (SPITZBARTH; BAUMGÄRTNER; BEINEKE, 2012). A cinomose canina, uma doença infecciosa que ocorre em todo o mundo, causada por um amorbilivírus da família Paramixoviridae, pode resultar em uma série de formas clínicas que afetam os sistemas respiratório e gastrointestinal, pele e outros órgãos e tecidos. Entretanto, a imunossupressão e a leucoencefalite desmielinizante (DL, do inglês “*demyelinating leukoencephalitis*”) representam a principal sequela nesta espécie (BEINEKE et al., 2009).

A síndrome de disfunção cognitiva (CDS) é uma síndrome neurodegenerativa reconhecida em cães mais velhos que é primordialmente atribuído à deterioração patológica do cérebro. A condição se manifesta como mudanças no comportamento do cão afetado, memória e capacidade de aprendizagem, estando relacionada ao acúmulo de β -amilóide e se correlaciona com o desempenho cognitivo funcional diminuído em cães, com redução no volume cerebral. O dano oxidativo é mais prevalente nos cérebros dos cães idosos (DAVIS; HEAD, 2014; HEAD; ROFINA; ZICKER, 2009). Quando detectada precocemente, podem ser tomadas medidas para retardar a progressão da doença e até mesmo reverter alguns sinais clínicos utilizando intervenção farmacológica com drogas: tais como a selegilina, a suplementação nutricional com antioxidantes e outros compostos protetores cérebro, e modificação de comportamento (BENNETT, 2012).

Deficiências no processo de mielinização do SNC, decorrente de alterações genéticas que induzem a redução da produção das proteínas básicas da mielina, podem resultar também em alterações motoras. Em cães *sharking (pup sh)*, ocorre uma mutação pontual no gene da proteína mielina proteolipídica (PLP), que inibe o desenvolvimento de oligodendrócitos maduros e reduz a produção de proteínas de mielina (PLP e proteína básica de mielina) do cão *sh*, conduzindo a uma profunda hipomielinização (WU et al., 2011).

Devido às semelhanças morfológicas com doenças desmielizantes em humanos, como a esclerose múltipla, a cinomose canina representa um modelo para o estudo da patogênese da perda de mielina associada a mecanismos imunomediados (BEINEKE et al., 2009). Deficits de memória e aprendizagem visuoespacial são marcadores precoces para declínio cognitivo da idade e doença de Alzheimer em seres humanos. Similarmente ao que ocorre em humanos, cães idosos, em especial da raça beagle podem apresentar deficiência de aprendizagem e de memória (STUDZINSKI et al., 2006). Os cães são, portanto, apreciados como um importante modelo animal de pesquisa translacional, além de sua relevância veterinária (SPITZBARTH; BAUMGÄRTNER; BEINEKE, 2012).

Estudos epidemiológicos têm relacionado baixos níveis de DHA ao desenvolvimento neural deficiente em crianças e ao declínio cognitivo nos indivíduos idosos. Em animais, a redução de DHA no cérebro em desenvolvimento resultou em déficits na neurogênese, neurotransmissores, função visual e aprendizagem. Em

experimentos utilizando ratas, o DHA foi melhor incorporado quando consumidos em forma de triglicerídeos (TG) em relação aos fosfolipídeos. A suplementação com óleo de atum com concentrações mais elevadas de DHA na composição do TG resultou em maior deposição de DHA cerebral. A digestibilidade de DHA mais elevada, associada ao óleo de salmão também resultou em maior deposição de DHA do cérebro. Dieta utilizando-se óleo de soja não continha EPA detectável e, por conseguinte, a deposição de EPA nos tecidos cerebrais de ratos alimentados com essa dieta sugeriu que a síntese *de novo* dos AGPI ômega-3 ocorreu no cérebro (TOU et al., 2011).

Ratos espontaneamente hipertensivos, utilizados como modelo animal de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), apresentam níveis reduzidos de AGPI na membrana cerebral, especificamente o DHA, quando comparados a ratos normais. Além disso, demonstrou-se uma relação entre metabólitos cerebrais e comportamento, que reforça a hipótese de uma disfunção energética no TDAH. Outra causa dessa alteração é proposta como sendo decorrente da neurotoxicidade que pode ser causada por um aumento do glutamato (Glu), possivelmente pela interação deste neurotransmissor excitatório com dopamina e noradrenalina e/ ou sua ligação com a glicólise e o fluxo de lactato que ocorre entre neurônios e astrócitos. O efeito imediato dessa disfunção é que durante as tarefas que exigem disparos neuronais rápidos e contínuos, os neurônios podem não ter energia suficiente para manter esse ritmo. A longo prazo, pode ser consequência de deficiências na mielinização dos axônios, devido à diminuição dos níveis de lactato, que por sua vez influenciam a síntese de ácidos graxos e mielina pelos oligodendrócitos. A suplementação com ômega-3 promoveu aumento na creatina total mediada por fosfocreatina, gerando mais ATP, que pode, potencialmente, compensar o déficit de energia associado ao TDAH (NAVARRO et al., 2014).

O sistema glutamatérgico é o maior sistema excitatório do sistema nervoso central (SNC) em humanos. Ele se distribui na maior parte das estruturas do SNC e está envolvido em funções cognitivas fundamentais tais como memória e aprendizado. Os receptores glutamatérgicos tipo NMDA são sofisticados neuroreceptores ionotrópicos essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo os mecanismos de potenciação a longo prazo (LTP, do inglês "*long term potentiation*"),

sinaptogênese e excitotoxicidade. Alterações deste sistema estão envolvidas em doenças neurológicas como esquizofrenia, epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer e doença de Huntington e transtornos psiquiátricos como dependência de substâncias, transtornos obsessivo-compulsivo e afetivo bipolar, entre outros (BRESSAN, 2003).

Outros pesquisadores mostraram que o desequilíbrio dietético de AGPI ômega-3 altera a atividade da micróglia no cérebro em desenvolvimento, levando à formação anormal de redes neuronais, o que foi confirmado através de experimentos em que ratos alimentados com uma dieta deficiente em ômega-3 apresentaram redução dos níveis desses AGPI no cérebro no pós-natal imediato (dia 0) e tardio (dia 21), com alteração de fenótipo da micróglia e motilidade no cérebro em desenvolvimento pós-natal, acompanhada por um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e modificação neuronal relacionada com a expressão de genes de plasticidade, levando ao desenvolvimento de um estado pró-inflamatório no SNC que podem contribuir para alterações no neurodesenvolvimento, com aumento da expressão de RNAm das citocinas IL-1 β e IL-6. Estas alterações foram observadas em hipocampus de camundongos deficientes em ômega-3 avaliadas aos 21 dias pós-natal (MADORE et al., 2014).

O AGPI ômega-3 aumenta a gênese de neurônios no adulto, relacionados com os processos cognitivos e comportamentais e promove a plasticidade sináptica, aumentando a potenciação de longo prazo e modulando a expressão de uma proteína sináptica que estimula a formação de novas arborizações dendríticas. Isto possibilita a utilização do ômega-3 como uma nova abordagem terapêutica para doenças neurodegenerativas. Entre os AGPI ômega-3 nutricionalmente importantes, estão os ácidos α -linolênico (ALA), EPA e DHA que são altamente concentrados no cérebro e têm efeitos antioxidativos, antiinflamatórios e antiapoptóticos. Eles estão envolvidos em muitos processos corporais e pode supostamente levar a proteção dos neurônios em doenças neurológicas, envelhecimento ou danos neuronais e na doença de Alzheimer. O seu efeito nas funções cognitivas e comportamentais e em várias doenças neuro-psiquiátricas também tem sido comprovados (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013).

O papel dos AGPIs no desenvolvimento do cérebro e de desordens neurológicas é uma área relativamente nova e desafiadora de pesquisa

neurobiológica. Patologias relacionadas com a idade, tais como declínio cognitivo relacionado à idade, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington, surgem a partir de uma combinação de factores genéticos e ambientais (Fig. 5). O envelhecimento normal é acompanhado por alterações na manipulação neuronal de cálcio e mudanças na peroxidação lipídica, levando ao aumento da geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e danos à mitocôndria. Envelhecimento bem-sucedido é caracterizada pela implementação de mecanismos de plasticidade alternativas para compensar as mudanças do microambiente local (STRANAHAN; MATTSON, 2012).

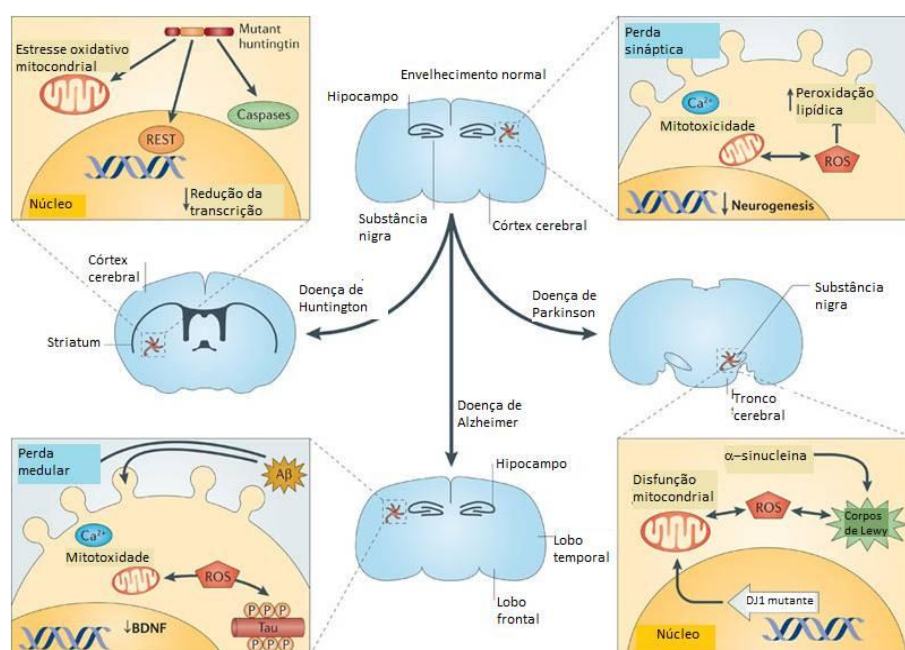


Figura 5. Resumo dos processos envolvidos no surgimento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e Huntington. Aβ - beta amiloide; BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro; DJ1 - proteína da doença de Parkinson 7; P – sítio de fosforilação; REST, elemento repressor do fator de silenciamento de transcrição-1; ROS – espécies reativas ao oxigênio. Traduzido de (STRANAHAN; MATTSON, 2012)

Outros autores defendem a idéia de que a suplementação dietética com óleo de peixe em ratos aumenta a resistência ao ataque de radicais livres e reduz a peroxidação lipídica, promovido por uma elevada produção da enzima superóxido desmutase, que naturalmente se encontra em baixas concentrações no tecido cerebral de animais não suplementados com ômega-3. Este resultado sugere que o ômega-3 pode ser eficaz no tratamento de várias doenças em que o equilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes é perturbado, como no tecido cerebral de animais idosos (AVRAMOVIC et al., 2012).

Fosfolipídeos contendo DHA, um componente essencial das membranas excitáveis do cérebro e da retina, são alvos da peroxidação lipídica, e como resultado da peroxidação catalizada por radicais livres, F4-isoprostanos são formados. Eles são encontrados em fosfolipídeos esterificados, e há relatos de que o seu conteúdo é aumentado nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. A peroxidação do AA também leva a formação de prostanóides, no entanto do tipo F2 (BAZAN, 2003).

Duas formas de plasticidade sináptica, a potenciação de longo prazo (LTP) e depressão em longo prazo (LTD), são os principais mecanismos celulares associados com os processos de aprendizagem e de memória. Os efeitos da dieta sobre a expressão de genes sugerem que o DHA pode estar envolvido na melhoria de funções mentais. A suplementação com DHA não só reverte a diminuição do AA relacionada com a idade, mas também restaura a liberação de neurotransmissores e deficiência na expressão da LTP. O DHA é essencial para a indução da LTP e sua deficiência na dieta afeta o processo de envelhecimento, diminuindo a longevidade e capacidade de aprendizagem em ratos (HORROCKS; FAROOQUI, 2004). Em ratos adultos, a suplementação com ômega-3 reverte alterações relacionadas à senilidade e mantém a performance de aprendizagem e memória. Os AGPI ômega-3 possuem efeitos anti-oxidativos, anti-inflamatórios e anti-apoptóticos, levando a proteção neuronal em cérebros senis, lesionados e na Doença de Alzheimer (SU, 2010).

2.4A decomposição do EEG em seus diferentes ritmos cerebrais

Uma maneira de investigar os possíveis efeitos da suplementação da dieta de ratos com ômega-3 sobre a atividade elétrica cortical é através do registro dessa atividade. Por meio do eletroencefalograma (EEG) e do eletrocorticograma (ECoG) pode-se detectar alterações nas ondas cerebrais capazes de identificar anormalidades na atividade do cérebro. A atividade elétrica cortical é gerada por dois tipos de biopotenciais: O potencial pós-sináptico e o potencial de ação. O potencial pós-sináptico é alteração no potencial de membrana pós-sináptica, gerado como resultado final da ação do neurotransmissor no receptor pós-sináptico, que transforma o sinal químico num potencial gerador, que é um sinal elétrico (PESSOA, 2012). Estes são os biopotenciais que mais contribuem para os registros corticais, pois tem duração de vários milissegundos e enquanto durar esses potenciais há

excitação contínua do neurônio, fazendo com que este transmita uma sequência de impulsos elétricos de resposta. O potencial de ação, gerado pela transmissão de impulsos eletroquímicos através do axônio pouco contribui com o registro da atividade elétrica cortical, uma vez que são assíncronos, de curta duração e se apresentam em direções ortogonais à superfície do escalpo (CAPARELLI, 2007; LOPES, 2005).

O registro da atividade elétrica cerebral pode ser decomposto em faixas distintas de frequência (Fig. 6): delta (1 - 4 Hz), em sono profundo; teta (4 - 8 Hz), em sonolência ou estados emocionais alterados; alfa (8 - 12 Hz), em vigília com relaxamento mental; beta (12 - 30 Hz), em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição (GENG et al., 2014; KUNICKI, 2011). Embora o registro possa conter todas essas frequências, haverá predominância de um ritmo de onda (PESSOA, 2012).

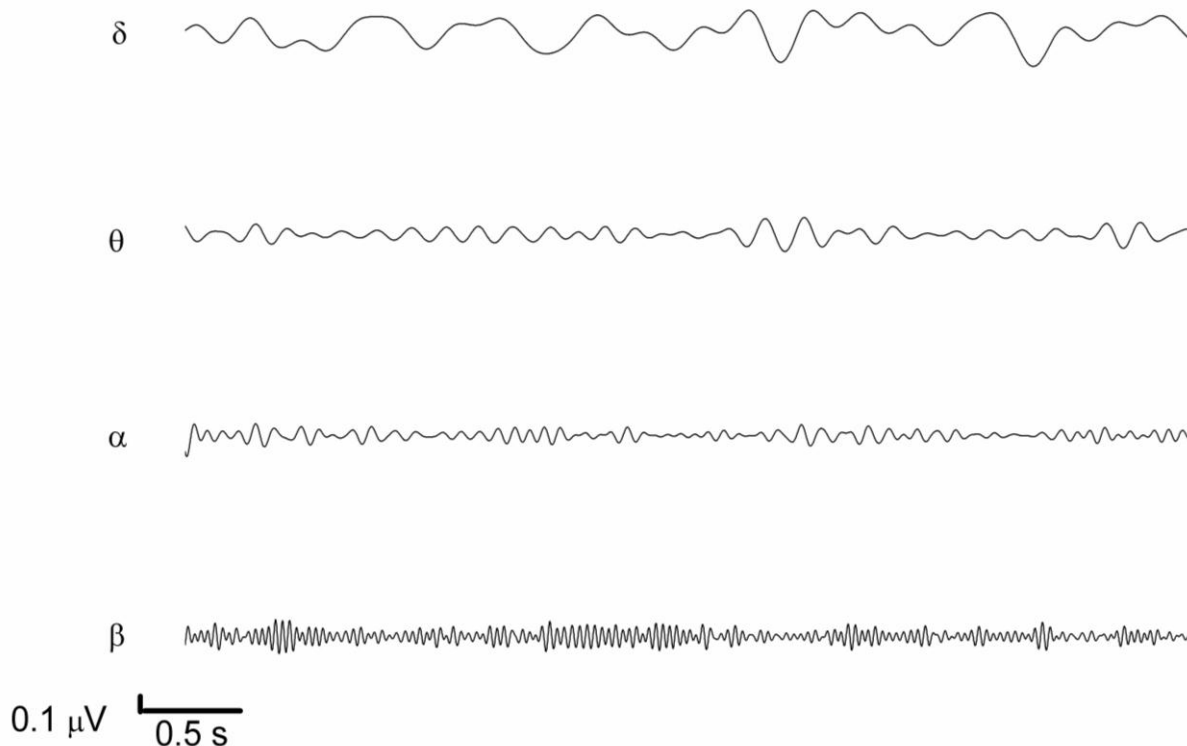


Figura 6. Ondas cerebrais obtidas a partir de um registro de ECoG em ratos. δ - ondas delta (1 - 4 Hz) - em sono profundo. θ - ondas teta (4 - 8 Hz) - em sonolência ou estados emocionais alterados. α - ondas alfa (8-12 Hz) - em vigília com relaxamento mental. β - ondas beta (12-30 Hz) - em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição. Fonte: Aguiar, 2015.

2.5 EEG/ ECoG e sistemas caóticos

O EEG é uma ferramenta importante para verificar a atividade cerebral dentro do padrão de normalidade ou detectar disfunções (GENG et al., 2014). Nestas técnicas, registra-se os potenciais de membrana, resultantes das sinapses, em especial o potencial pós-sináptico, sendo assim o resultado do somatório espacial e temporal da atividade de milhares ou milhões de neurônios disparando sincronicamente, capturado em uma determinada região próxima ao eletrodo. No eletrocorticograma (ECoG), a aquisição do sinal elétrico é semelhante ao do EEG, porém enquanto o EEG é um exame não invasivo, no ECoG os eletrodos são dispostos diretamente no córtex cerebral. O ECoG é utilizado quando se deseja analisar a atividade elétrica diretamente do córtex. Tanto o EEG como o ECoG registram a voltagem em função do tempo, originando uma série temporal (PESSOA, 2012).

Por estar relacionada a uma série de fatores, a atividade cerebral comporta-se como parte de um sistema dinâmico determinístico não-linear e ao longo dos últimos anos, tem sido estudado sobre o ponto de vista da teoria do caos. Um sistema dinâmico determinístico tem o seu estado em um instante dependente de seu estado num instante precedente. A não-linearidade de um sistema, por sua vez, diz respeito à imprevisibilidade dos efeitos de pequenas mudanças nas condições iniciais de suas variáveis. Outra questão é a impossibilidade de compreensão do sistema pelo estudo de partes isoladas (superposição). Assim, ao contrário dos sistemas lineares, a resposta total não pode ser conhecida simplesmente pelo somatório das partes constituintes (proporcionalidade e superposição) (SAVI, 2006).

Neste contexto, o termo caótico teria uma conotação positiva, refletindo uma situação fisiológica, na qual o organismo processa a informação mais rapidamente e pode ter uma maior variedade de respostas às mudanças abruptas do meio no qual está inserido (WANG et al., 2010). Mesmo quando são analisados a partir de indivíduos saudáveis, estes registros manifestam o caos no sistema nervoso (SARBADHIKARI; CHAKRABARTY, 2001). Por outro lado, a perda da complexidade do sistema (ou a ausência do caos) pode refletir uma condição patológica, onde o sistema perde sua complexidade vital (FERREIRA, 2010). Neste contexto, o registro do ECoG pode ser considerado a resposta desse sistema (WANG et al., 2010).

Embora um sistema caótico opere de acordo com regras estabelecidas, a retroalimentação constante, atrasos, e pequenas mudanças fazem o sistema se comportar de forma aparentemente aleatória, sem repetição (TSUDA; FUJII, 2007). Estes sistemas têm sensibilidade extraordinária para as condições iniciais, o que os torna inerentemente imprevisíveis em longo prazo. Quando os dados caóticos são representados em três dimensões, os chamados "atratores estranhos" emergem (MACIVER; BLAND, 2014; SARBADHIKARI; CHAKRABARTY, 2001).

Estes atratores no cérebro desempenham um papel chave que distingue o cérebro de todas as outras máquinas de computação: a capacidade de criar ativamente. Como a batida irregular do coração, impulsos eletromagnéticos do cérebro são caóticos. A atividade caótica no cérebro permite as rápidas transições de estado. Tais transições são essenciais para o processamento de informações. Sem eles, a cognição e a percepção seriam imensamente lentas (IVES, 2004).

Em contraste com sistemas dinâmicos não-caóticos que possuem atratores de dimensões inteiras com pontos fixos, sistemas caóticos podem estar associados a atratores estranhos caracterizados por dimensão não-inteira, apresentando pois, estrutura fractal. Os processos fractais possuem auto-similaridade estatística em diferentes escalas temporais, como atividade elétrica cerebral, os batimentos cardíacos, as flutuações na respiração e a cinética de canais iônicos, da mesma forma que os objetos fractais possuem estrutura semelhante nas varias escalas espaciais, como a árvore brônquica, a vascularização da retina, os vasos da membrana do saco vitelino do embrião de aves, dentre outras estruturas encontradas na natureza (KUNICKI et al., 2009; PESSOA, 2012; SILVA; MOURA; NOGUEIRA, 2012; SILVA et al., 2014).

2.6 Métodos de análise linear e não-linear

Os processos caóticos podem ser caracterizados por algumas técnicas baseadas na análise direta da série temporal, como a transformada de Fourier, pela qual obtemos o espectro de potência, e a complexidade de Lempel-Ziv (MACIVER; BLAND, 2014; VARGHESE et al., 2014), enquanto outras são baseadas na geometria do atrator, como a dimensão fractal do espaço de fase reconstruído a partir de uma série unidimensional (KRAKOVSKA, 2009; MACIVER; BLAND, 2014).

2.6.1 Espaço de fase reconstruído

Séries temporais experimentais, como o registro da atividade cerebral por meio do EEG/ ECoG, têm disponível a evolução de uma variável no tempo, que representa uma das componentes da trajetória de um dado sistema dinâmico m -dimensional. Com técnicas como a reconstrução do espaço de fase torna-se possível analisar um sistema dinâmico completo a partir dessa série unidimensional. Nesta técnica, é plotado o gráfico da série contra ela mesma defasada no tempo ($x(t)$ versus $x(t + \alpha)$) por um determinado “*time-delay*” (ou tempo de retardo), sendo o método de imersão de Takens o mais utilizado para o cálculo do tempo de retardo (LOPES, 2013; SIMÃO; SALMON; CARVALHO, 2008).

Takens provou que, no espaço de fase formado pelos eixos $x(t), x(t + p), x(t + 2p), \dots, x(t + (m-1)p)$, o atrator reconstruído, sobre o qual se conhece apenas a evolução em tempo discreto da variável de estado $x(t)$, é topologicamente equivalente ao atrator “real”. Neste método, chamamos de espaço de imersão o espaço no qual se realiza a reconstrução, m é a dimensão de imersão e p o passo da reconstrução (ou tempo de retardo). Assim, a cada instante t_i , assinala-se o ponto de coordenadas $x(t), x(t + p), x(t + 2p), \dots, x(t + (m-1)p)$ no espaço de imersão. Variando-se i de 1 a N obtém-se a trajetória reconstruída (LOPES, 2013).

Na sua prova, Takens assumiu que a série temporal é formada por infinitos pontos e que não há ruído. Se essas condições são satisfeitas, as propriedades topológicas do atrator são preservadas e a escolha do tempo de atraso p é na maioria das vezes, arbitrária. Entretanto, séries temporais experimentais são finitas, usualmente contaminadas com ruído externo e obtidas com o uso de filtros. Deste modo, a escolha do tempo de retardo é importante para a reconstrução correta do espaço de fase, pois se o retardo for muito pequeno $x(t), x(t + p)$ e $x(t + 2p)$, por exemplo, terão o mesmo valor e como consequência o atrator reconstruído fica comprimido em torno da diagonal $x = y = z$, ou seja, esse atrator apresentará uma dependência linear, que não ocorre nas componentes reais x, y, z . Por outro lado, como a trajetória real está restrita a um volume finito do espaço de fase, se o valor do tempo de retardo for muito grande, a distância entre os dados considerados no

vetor de defasagem serão completamente não correlacionados, cobrindo todo o espaço de fase (COSTA et al., 2013).

2.6.2 Dimensão fractal do espaço de fase reconstruído

Um fractal tem várias características, uma das quais é a escala fractal, em que o mesmo nível de detalhe ocorre em todas as escalas dentro do fractal. Outra característica fundamental é a auto-similaridade, pela qual as formas observadas em uma escala de um fractal se assemelham as formas vistas em todos os outros níveis de detalhe. Num fractal determinístico, não importa quantas vezes uma determinada área do fractal é ampliada, a auto-similaridade será mantida.

A dimensão fractal, definida aqui como dimensão de auto-similaridade, descreve quantos novos pedaços geometricamente similares ao objeto são observados quando a resolução é aumentada (BASSINGTHWAIGHTE; LIEBOVITCH; WEST, 1991). O método de *box counting* (contagem por caixas) consiste em cobrir o objeto fractal com $N(r)$ caixas que contenham pelo menos um ponto (pixel) do objeto. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r . O ângulo de inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de box-counting (D_{bc}). A dimensão fractal pode ser definida formalmente através da equação:

$$D_{bc} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N_{(r+\varepsilon)} - \log N_{(r)}}{\log_{(r+\varepsilon)} - \log_{(r)}} \right] \quad (1)$$

$N_{(r+\varepsilon)}$ e $N_{(r)}$ são o número de caixas que cobrem a imagem em dois instantes diferentes, $r + \varepsilon$ e r são os tamanhos dos lados das caixas nesses dois instantes distintos.

2.6.3 Transformada de Fourier

Segundo o teorema de Fourier, todo sinal oscilatório pode ser decomposto em vários outros sinais senoidais com diferentes frequências. É o que acontece com o EEG e ECoG, um sinal complexo que pode ser decomposto em sub-ritmos e representados no domínio da frequência. Depois de decomposto o sinal, pode-se calcular a potência média de cada faixa de frequência. A utilização desse teorema torna possível a decomposição de um sinal periódico $f(t)$ nas suas componentes

frequenciais com a somatória de termos senos e cossenos harmonicamente relacionados na forma da seguinte expressão:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) [\cos(2\pi\nu t) - i \sin(2\pi\nu t)] dt \quad (2)$$

A Transformada de Fourier (TF) torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa série temporal. A TF é calculada a partir da decomposição do sinal complexo oscilatório em suas frequências componentes. A função $F(\nu)$ é a transformada de Fourier da função temporal $f(t)$, que representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal $f(t)$; passando uma informação no tempo para o domínio da frequência. Então, $F(\nu)$ representa o grau de participação das componentes frequenciais da função $f(t)$ (WELCH, 1967).

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um sinal eletrofisiológico específico pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_{\omega} = \frac{\int_{\nu_s}^{\nu_e} |F(\nu)|^2 d\nu}{\int_{\nu_s}^{\nu_e} d\nu} \quad (3)$$

onde $F(\nu)$ é a Transformada de Fourier do sinal $f(t)$, aqui representado pelo ECoG. O $\overline{E}_{\omega}$ é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência $\omega = [\nu_s, \nu_e]$, aqui representado pelos diferentes ritmos ν_s até ν_e . Ao contrário do que se observa nos sinais periódicos comuns, que apresentam espectro de potência com picos em frequências bem definidas, nos sistemas caóticos o espectro de potência apresenta bandas largas (MACHADO et al., 2012).

2.6.4 Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)

Utilizada para analisar dados através da compressão da sua sequência via recorrência de padrões (LEMPER e ZIV, 1976), a CLZ é uma metodologia que possibilita a quantificação dos padrões distintos de uma série. O registro da atividade cerebral obtida no ECoG apresenta característica de caoticidade e autosimilaridade

(AGUIAR; PESSOA; NOGUEIRA, 2014), tornando possível o cálculo da complexidade da série temporal utilizando o método de Lempel-Ziv (ABÁSOLO et al., 2014).

Antes de calcular a CLZ é necessário transformar a série temporal em uma sequência binária. Nos sistemas biológicos a sequência binária mais adequada é composta por 0 e 1. A sequência binária é gerada a partir da comparação de cada ponto da série temporal com a média m de todos os pontos da série. Se o valor do ponto for superior ao da média ele passa a ser representado por 1, se esse valor for inferior ao da média ele passa a ser representado por 0. Dessa forma se obtém uma sequência (P) composta por 1's e 0's (ABOY et al., 2006): $P = S_{(1)}, S_{(2)}, ..., S_{(n)}$, onde:

$$S_i = \begin{cases} 0, & \text{se } S_i < \text{média} \\ 1, & \text{se } S_i > \text{média} \end{cases}$$

O algoritmo de Lempel-Ziv é implementado da seguinte maneira:

1. A sequência original P é dividida em subsequências de tamanhos menores, denominadas S e Q , com o objetivo de verificar se a subsequência Q pode ser reconstruída a partir de cópias da subsequência S .
2. Determina-se uma subsequência S reconstruída a partir de P , que será fixa até que os termos da sequência Q não possam mais ser simplesmente copiados de S . Neste momento se insere um novo termo em S , em que cada nova subsequência S é limitada por um termo inserido: $S = s_1, s_2, ..., s_r$, onde s_r é o termo inserido e $Q = s_{r+1}, s_{r+2}, ..., s_n$.
3. Após a inserção de um termo, o próximo passo é definir $Q = s_{r+1}$ e verificar se o esse termo pode ser copiado do vocabulário ($SQ\pi$). Este vocabulário é formado pela concatenação de Q e S . O símbolo π indica que o último termo deve ser removido. Caso o termo $Q = s_{r+1}$ pertença ao vocabulário ($SQ\pi$), o próximo termo a ser testado será $Q = s_{r+1}, s_{r+2}$ e assim sucessivamente até que Q não possa mais ser construído a partir de uma cópia de S . Nesse momento se insere um novo termo em S e Q voltará a ser $Q = s_{r+1}$, partindo do novo termo inserido (PESSOA, 2012).

Quanto maior for o número de termos de Q que podem ser copiados de S , maior será a auto-similaridade da série e menor a sua complexidade, ou seja, mais próxima de 0 será a CLZ. Por outro lado, quanto maior for o número de termos inseridos, maior será a complexidade da série, o que se refletirá numa CLZ mais próxima de 1 e mais aleatório será o comportamento do sinal. A CLZ, como postulado por Aboy et al. (2006) é definida pela seguinte equação:

$$CLZ = \frac{c(n) \log_k n}{n} \quad (4)$$

onde $c(n)$ é o número de dígitos inseridos, n é o tamanho do sinal e k o número de símbolos diferentes na sequência (no caso binário, $k = 2$) (SILVA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 em ratas Wistar durante os períodos pré-gestacional, gestacional e de aleitamento materno sobre desenvolvimento corporal, perfis lipídico e glicêmico, morfometria do hipocampo e atividade elétrica cortical da prole.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da suplementação de matrizes com ômega-3 durante 30 e 60 dias pré-acasalamento sobre o desenvolvimento corporal da prole em relação ao grupo controle, avaliados ao nascer, ao desmame, aos 30, 60 e 70 dias de idade;
2. Verificar os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e glicose de ratos suplementados com ômega-3 em relação ao grupo controle aos 30, 60 e 70 dias de idade;
3. Verificar a interferência da suplementação com ômega-3 sobre a morfometria do hipocampo de ratos ao nascer, aos 30 e aos 60 dias de idade;
4. Utilizar métodos matemáticos e computacionais para analisar padrões eletrocorticográficos em ratos adultos jovens, suplementados com ômega-3 em relação ao grupo controle avaliados aos 70 dias de idade.

4. METODOLOGIA

4.1 Local e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Dois Irmãos, Recife – PE.

4.2 Animais

Foram utilizados inicialmente 15 *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem Wistar, fêmeas (F0), provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local onde foram realizados os ensaios biológicos. As mesmas foram mantidas em ambiente com temperatura e umidade controladas, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*. Os animais receberam ração comercial Presence® 7883 (Tab. 1). Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/ UFRPE).

Tabela 1. Composição nutricional e níveis de garantia da ração Presence® ratos e camundongos.

Componente	Percentual
Umidade (Max)	13,0%
Proteína Bruta (Min)	23,0%
Extrato Etéreo (Min)	4,0%
Matéria Fibrosa (Max)	5,0%
Matéria Mineral (Max)	10,0%
Cálcio (Max)	1,3%
Fósforo (Min)	0,85%

Fonte: SP Rações. Disponível em <http://www.spracoes.com.br/produto/presence-ratos-e-camundongos/153>.

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento, sendo dois grupos suplementados e um grupo controle. A suplementação foi feita com cápsulas de 1000 mg óleo de peixe Naturallis®, contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA.

Grupo S60D – Fêmeas suplementadas com óleo de peixe (1ml/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 60 dias de idade (n = 5 animais).

Grupo S90D – Fêmeas suplementadas com óleo de peixe (1ml/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 90 dias de idade (n = 5 animais);

Grupo Controle – Fêmeas que receberam solução fisiológica de NaCl 0,9% (1ml/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 90 dias de idade (n = 5 animais).

Aos 120 dias de idade as ratas foram colocadas em acasalamento por 15 dias, numa proporção de um macho para cada 3 fêmeas. Após esse período, os machos foram separados e deu-se prosseguimento aos tratamentos.

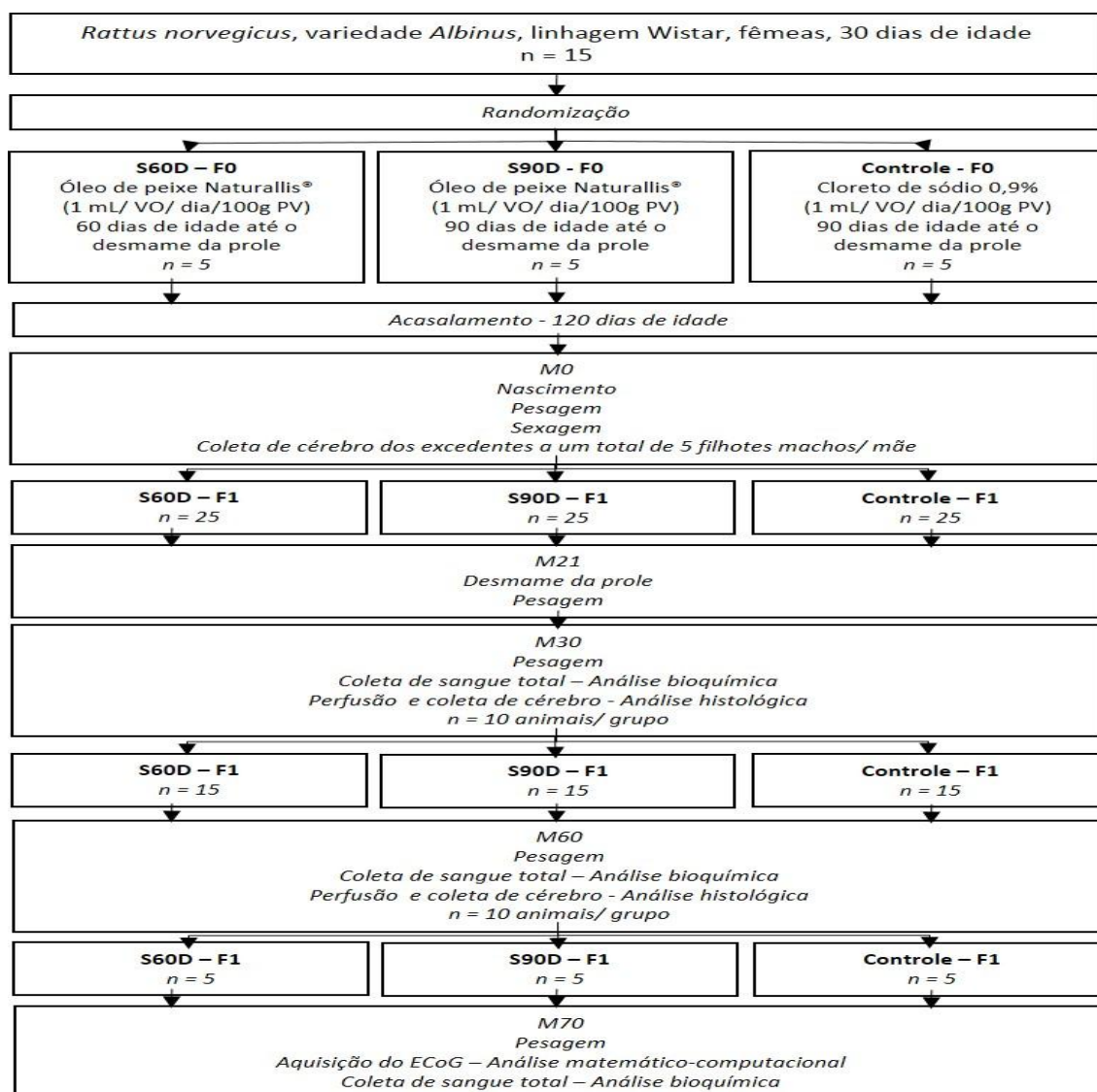


Figura 7. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias.

Após o período de gestação obteve-se a geração F1, a qual foi analisada em momentos distintos, conforme organograma (Fig. 7). No primeiro momento (M0), realizou-se a sexagem dos animais e aqueles excedentes a um total de 5 filhotes machos foram submetidos a eutanásia até 12 horas após o nascimento. Os animais restantes (n = 5 filhotes/ matriz) foram amamentados até o 21º dia (M21), quando foram desmamados de suas mães e passaram a receber água e alimentação *ad libitum*.

Aos 30 dias de idade (M30) dois animais de cada subgrupo (n = 10/ grupo) foram escolhidos ao acaso, pesados, anestesiados e submetidos a eutanásia (Item 4.8) pelo método de exsanguinação por punção cardíaca, com coleta de sangue total para análise do perfil bioquímico sérico dos animais (Item 4.6). Em seguida, os animais foram perfundidos com solução de formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4) para coleta dos cérebros, os quais foram submetidos posteriormente ao procedimento histológico.

Aos 60 dias de idade (M60) repetiu-se o procedimento descrito em M30, com coleta de sangue total e cérebro para as análises bioquímica e histológica (n = 10 animais/ grupo). Aos 70 dias de idade (M70), os demais animais (n = 5 animais/ grupo) foram pesados e anestesiados para procedimento de registro da atividade elétrica cortical (ver item 4.7). Após o registro, realizou-se o procedimento descrito no item 4.8. Os cérebros foram removidos da caixa craniana e pesados em balança analítica.

4.4 Gavagem

A gavagem foi realizada para administrar tanto o NaCl 0,9% quanto o óleo de peixe. Utilizou-se uma agulha de gavagem em aço inoxidável com ponta arredondada, a qual foi introduzida na cavidade oral do animal e gentilmente empurrada pelo esôfago, assegurando que o tubo não penetrasse inadvertidamente a traqueia.

4.5 Avaliação de ganho de peso

A variação de peso corporal foi avaliada até o fim do período experimental, por meio de pesagem em balança analítica (Fig. 8). As matrizes foram avaliadas a partir dos 90 dias de idade até o final da gestação. Os filhotes foram avaliados até a

realização da eutanásia dos mesmos, tanto os do grupo Controle quanto aqueles dos grupos S60D e S90D.



Figura 8. Pesagem do animal em balança analítica para avaliação do desenvolvimento corporal. Fonte: Arquivo pessoal.

4.6 Provas laboratoriais

Amostras de sangue (0,5 mL) coletadas em tubos com anticoagulante foram utilizadas para análise de triglicerídeos totais, colesterol total e glicose, com o auxílio do aparelho Accutrend® Plus (Roche) imediatamente após a coleta (Fig. 9).



Figura 9. Dosagem de perfil sérico utilizando o aparelho Accutrend Plus (Roche®). Fonte: Arquivo pessoal.

4.7 Registro da atividade elétrica cortical

Aos 70 dias de idade, os animais foram pesados em balança analítica e anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose

de 0,1 mL para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (Massoni, 2011). A temperatura corporal foi controlada em torno de $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com aquecedor elétrico posicionado sob o animal. Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico, o rato foi posicionado em um aparelho estereotáxico (Insight®) e realizado uma incisão longitudinal da pele na linha média do crânio. Posteriormente, trepanou-se um orifício circular com aproximadamente 3 mm de diâmetro sobre o hemisfério esquerdo na região parietal no córtex sensori-motor, cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma. Neste orifício foi posicionado um eletrodo do tipo Ag-AgCl sobre o córtex cerebral e outro eletrodo, do mesmo tipo, foi colocado sobre o osso nasal (eletrodo de referência) (NASCIMENTO et al., 2010).

Para cada animal registrou-se 30 minutos da atividade cerebral com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 pontos por segundo. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday, a qual foi mantida fechada, evitando-se a interferência de estímulos sonoros e luminosos (Fig. 10) (PESSOA, 2012).



Figura 10. Preparo do animal para registro do ECoG. Fixação da cabeça do animal à base do estereotáxico e incisão da pele. Fonte: Arquivo pessoal.

4.8 Eutanásia

Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de aprofundamento anestésico utilizando-se o dobro da dose recomendada da associação de cetamina e xilazina necessária para produzir sedação. Verificou-se a ausência de reflexos digitais profundos, bem como palpebral e na sequência, foi realizada exsanguinação por punção cardíaca, com coleta do sangue total em tubos para as análises bioquímicas.

4.9 Análise dos registros de ECoG

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de 2 minutos. Esses segmentos foram importados para o programa Matlab 7.8 (2009) para análise da Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e do espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG. Para o cálculo da dimensão fractal, os espaços de fase das diferentes ondas foram gerados no programa Origin 8, OrinPro (2007), após gerados, esses tiveram sua dimensão fractal quantificada no programa Benoit 1.3, TruSoft Int'l (1999) através do método de contagem de caixas com uso de software (Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System).

4.10 Análise histológica

Após a exsanguinação por punção cardíaca, realizou-se perfusão dos animais com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e posteriormente, com formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros dos animais foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído 10% para posterior processamento e análise histológica.

Fragmentos de cérebro foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Plus®. Secções do hipocampo foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo Leica®, com cortes de 4µm, seriados, em um plano coronal.

Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas, mantidas em seqüência conhecida, corados com Hematoxilina e Eosina e Cresil violeta e cobertos com lamínulas de vidro. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em aumentos de 40X e 400X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação morfométrica da região CA1 do hipocampo.

4.11 Análise estatística

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

5. REFERÊNCIAS

ABÁSULO, D. et al. Lempel-Ziv complexity analysis of local field potentials in different coarse-graining techniques. **IFMBE Proceedings**, IFMBE Proceedings. v. 41, p. 706–709, 2014.

AGUIAR, L. A. A.; PESSOA, D. T.; NOGUEIRA, R. A. Epilepsy & Behavior NEW science 2013-Posters Abstracts. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 181, 2014.

AGUIAR, L. Á. D. A. **CORRELAÇÃO DE LONGO ALCANCE NO ELETROCORTICOGRAMA COMO UM BIOINDICADOR DE EXPOSIÇÃO CEREBRAL À RADIAÇÃO IONIZANTE**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, 2015.

ALMEIDA, K. C. L. **A incorporação de ácidos graxos ômega-3, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2007.

AVRAMOVIC, N. et al. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 241–5, jul. 2012.

AWADA, M. et al. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 2069–2080, 2012.

AWADA, M. et al. n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. **Nutrition & metabolism**, v. 10, p. 23, 2013.

BACH, S. A. **A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2012.

BASSINGTHWAIGHTE, J. B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, B. J. **Fractal Physiology**. [s.l.] Oxford University Press, 1991. p. 364

BAUER, J. E. et al. Docosahexaenoic Acid Accumulates in Plasma of Canine Puppies Raised on α -Linolenic Acid-Rich Milk during Suckling but Not When Fed α -Linolenic Acid-Rich Diets after Weaning. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2087S–2089S, 2006.

BAZAN, N. G. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. **Journal of lipid research**, v. 44, n. 12, p. 2221–33, dez. 2003.

BEER, S.; KESSELRING, J. Multiple sclerosis: Rehabilitation and long-term course. **Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft**, v. 111, n. 8, p. 715–21, ago. 2014.

BEINEKE, A et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 127, n. 1-2, p. 1–18, 15 jan. 2009.

BENNETT, S. Cognitive dysfunction in dogs: pathologic neurodegeneration or just growing older? **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 194, n. 2, p. 141–2, nov. 2012.

BORTOLOZO, E. A. F. Q. et al. Supplementation with the omega-3 docosahexaenoic acid: influence on the lipid composition and fatty acid profile of human milk. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 1, p. 27–36, fev. 2013.

BOSCH, G. et al. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. **Nutrition research reviews**, v. 20, n. 2, p. 180–94, dez. 2007.

BOURRE, J. M. Brain lipids and ageing. **Food for the Ageing Population**, v. i, p. 219–251, 2009.

BRENNAN, J. T. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. **Maternal & child nutrition**, v. 7 Suppl 2, p. 59–79, abr. 2011.

BRENNAN, J. T.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. **Journal of human evolution**, p. 1–8, 26 abr. 2014.

BRESSAN, R. A. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. v. 25, n. 3, p. 177–183, 2003.

CAPARELLI, T. B. **Projeto e desenvolvimento de um sistema multicanal de biotelemetria para detecção de sinais ECG, EEG e EMG.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, 2007.

CARLSON, S. J. et al. The role of the ω -3 fatty acid DHA in the human life cycle. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 37, n. 1, p. 15–22, jan. 2013.

CORTOPASSI, S. G.; FANTONI, D. T. **Anestesia em Cães e Gatos.** [s.l.] Roca, 2010. p. 632

COSTA, W. C. D. A. et al. Classificação de sinais de vozes saudáveis e patológicas por meio da combinação entre medidas da análise dinâmica não linear e codificação preditiva linear. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 3–14, 2013.

CRUPI, R.; MARINO, A.; CUZZOCREA, S. N-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2953–63, jan. 2013.

CUNNANE, S. C. et al. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 5, p. 239–56, set. 2009.

DAVIS, P. R.; HEAD, E. Prevention approaches in a preclinical canine model of Alzheimer's disease: benefits and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, n. March, p. 47, jan. 2014.

DESAI, A.; KEVALA, K.; KIM, H.-Y. Depletion of brain docosahexaenoic acid impairs recovery from traumatic brain injury. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86472, jan. 2014.

ECKERT, G. P.; LIPKA, U.; MULLER, W. E. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 88, n. 1, p. 105–14, jan. 2013.

FALINSKA, A. M. et al. The role of n-3 dietary polyunsaturated fatty acids in brain function and ameliorating Alzheimer's disease: Opportunities for biotechnology in the development of nutraceuticals. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 159–166, abr. 2012.

FERNANDES, F. S. **A semente de linhaça (Linum usitatissimum) como fonte de ácido graxo omega-3 durante a gestação, lactação e crescimento no desenvolvimento cognitivo de ratos.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2007.

FERNANDES, K.; POLACOW, M. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, n. 2, p. 235–241, 2005.

FERREIRA, M. T. **Métodos lineares e não-lineares de análise de séries temporais e sua aplicação no estudo da variabilidade da frequência cardíaca de jovens saudáveis**. [s.l.] Instituto de Biociências de Botucatu, 2010.

FRANKEL, E. N. **Lipid Oxidation**. 2th. ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 488

GENG, S. et al. Bifurcation and oscillation in a time-delay neural mass model. **Biological cybernetics**, 22 jul. 2014.

GRAYSON, D. S. et al. Dietary omega-3 fatty acids modulate large-scale systems organization in the rhesus macaque brain. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2065–74, 5 fev. 2014.

GUEDES, A. A. A importância do controle glicêmico perioperatório. **Rev Med Minas Gerais**, v. 20, n. 4 (Supl 1), p. 3–6, 2010.

GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 7–12, jan. 2011.

HARBEBY, E. et al. N-3 fatty acids, neuronal activity and energy metabolism in the brain. **Oléagineux, Corps gras, Lipides (OCL)**, v. 19, n. 4, p. 238–244, 15 jul. 2012.

HAROUTUNIAN, V. et al. Myelination, oligodendrocytes, and serious mental illness. **Glia**, p. 1–34, 23 jul. 2014.

HAUBNER, L. Y. et al. Maternal dietary docosahexanoic acid content affects the rat pup auditory system. **Brain research bulletin**, v. 58, n. 1, p. 1–5, maio 2002.

HEAD, E.; ROFINA, J.; ZICKER, S. NIH Public Access. **The Veterinary Clinic of North America. Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 1–10, 2009.

HIRRLINGER, J.; NAVE, K.-A. Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction. **Glia**, 6 ago. 2014.

HORNERO, R.; ABOY, M.; ABÁSULO, D. Analysis of intracranial pressure during acute intracranial hypertension using Lempel-Ziv complexity: Further evidence. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 45, p. 617–620, 2007.

HORROCKS, L. A; FAROOQUI, A. A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 70, n. 4, p. 361–72, maio 2004.

HUSSAIN, G. et al. Fattening the brain: a brief of recent research. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. September, p. 144, jan. 2013.

IVES, C. Human beings as chaotic systems. **Life Science Tehcnology**, p. 1–7, 2004.

KASAI, M.; SATOH, K.; AKIYAMA, T. Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs. **Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms: devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 10, n. 8, p. 777–83, ago. 2005.

KATAKURA, M. et al. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. **Stem cells international**, v. 2013, p. 490476, jan. 2013.

KOMPRDA, T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 25–38, jan. 2012.

KRAKOVSKA, A. Two Decades of Search for Chaos in Brain. **MEASUREMENT**, p. 90–94, 2009.

KUNICKI, A. C. B. et al. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. October, p. 930–934, 2009.

KUNICKI, A. C. B. **Dinâmica do sistema córtico-hipocampal durante o condicionamento contextual de medo**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

LEE, J. et al. The contribution of myelin to magnetic susceptibility-weighted contrasts in high-field MRI of the brain. **NeuroImage**, v. 59, n. 4, p. 3967–75, 15 mar. 2012.

LEHNERTZ, K. Epilepsy and nonlinear dynamics. **Journal of biological physics**, v. 34, n. 3-4, p. 253–66, ago. 2008.

LEITE, C. D. F. C. **Efeito da alimentação suplementada com semente de linhaça no crescimento corporal e na organização histológica da retina de ratos durante o desenvolvimento**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2011.

LENZI, A.; TELES, B.; GUZMÁN, S. Influence of omega-3 fatty acids from the flaxseed (*Linum usitatissimum*) on the brain development of newborn rats. **Nutricion hospitalaria: organo ...**, v. 26, n. 5, p. 991–996, 2011.

LEUNG, L. S. et al. Brain areas that influence general anesthesia. **Progress in neurobiology**, v. 122C, p. 24–44, nov. 2014.

LOPES, C. D. **Análise de sinais de EEG utilizando a transformada wavelet discreta e as redes neurais artificiais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

LOPES, S. B. D. **Teorema do mergulho de Takens: reconstrução do espaço de fase de um sistema dinâmico usando séries temporais**. [s.l.] UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA, 2013.

MACHADO, B. S. et al. Spectral characteristics of the hippocampal LFP during contextual fear conditioning. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 10, n. 2, p. 140–4, 2012.

MACIVER, M. B.; BLAND, B. H. Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 8, n. October, p. 203, jan. 2014.

MADORE, C. et al. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. **Brain, behavior, and immunity**, p. 1–10, 13 abr. 2014.

MARTÍN, M. G.; PFRIEGER, F.; DOTTI, C. G. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. **EMBO reports**, v. 15, n. 10, p. 1036–52, 1 out. 2014.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas**. 6^a. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2011. p. 448

MOREIRA, J. D. et al. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. **Neurochemistry international**, v. 56, n. 6-7, p. 753–9, 2010.

MORRIS, M. C. Nutritional determinants of cognitive aging and dementia. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 1, p. 1–13, fev. 2012.

MORSE, N. L. Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 799–840, jul. 2012.

NASCIMENTO, R. S. et al. Analysis of signal fluctuations of Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 389, n. 9, p. 1869–1873, maio 2010.

NAVARRO, A. A L. et al. Effect of diet on brain metabolites and behavior in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural brain research**, v. 270, p. 240–7, 15 ago. 2014.

OUELLET, M. et al. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood – brain barrier : An in situ cerebral perfusion study. **Neurochemistry International**, v. 55, p. 476–482, 2009.

PESSOA, D. T. **Análise não linear de padrões eletroencefalográficos de ratos normais e em status epilepticus submetidos a dieta normal e hiperlipídica**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

PIFFERI, F. et al. n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 77, n. 5-6, p. 279–86, 2007.

PILGE, S. et al. Burst suppression-MAC and burst suppression-CP₅₀ as measures of cerebral effects of anaesthetics. **British journal of anaesthesia**, v. 112, n. 6, p. 1067–74, jun. 2014.

ROBMAN, L. et al. Dietary lutein, zeaxanthin, and fats and the progression of age-related macular degeneration. **Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie**, v. 42, n. 5, p. 720–6, 10 out. 2007.

ROGERS, L. K.; VALENTINE, C. J.; KEIM, S. A. DHA supplementation: current implications in pregnancy and childhood. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 70, n. 1, p. 13–9, abr. 2013.

SAKAYORI, N. et al. Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. **Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 16, n. 7, p. 778–90, jul. 2011.

SALVATI, S. et al. Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 4, p. 776–84, mar. 2008.

SARBADHIKARI, S. N.; CHAKRABARTY, K. Chaos in the brain: a short review alluding to epilepsy, depression, exercise and lateralization. **Medical Engineering & Physics**, v. 23, n. 7, p. 447–457, set. 2001.

SAVI, M. **Dinâmica não-linear e caos**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. p. 304

SIDHU, V. K.; HUANG, B. X.; KIM, H.-Y. Effects of docosahexaenoic acid on mouse brain synaptic plasma membrane proteome analyzed by mass spectrometry and (16)O/(18)O labeling. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 12, p. 5472–80, 2 dez. 2011.

SILVA, A. C. D. S. **Caracterização de sinais elétricos cerebrais de bovinos usando técnicas avançadas de processamento digital de sinais**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, J. E. S.; MOURA, A. M. A.; NOGUEIRA, R. A. Efeito dos ácidos graxos essenciais sobre lipídeos e vascularização da membrana vitelina de codornas japonesas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1603–1612, dez. 2012.

SILVA, M. M. S. et al. Crescimento vascular em membrana do saco vitelínico e desenvolvimento embrionário de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) expostas a campo magnético de baixa frequência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1003–1009, ago. 2014.

SIMÃO, E. M.; SALMON, C. E. G.; CARVALHO, D. Z. Determinação dos Parâmetros de Reconstrução do Espaço de Fase para Séries de Sinais de EEG de Sono de Pacientes com Apnéia Obstrutiva. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2008.

SINHA, R. A et al. Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 377–83, jun. 2009.

SPITZBARTH, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BEINEKE, A. The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 147, n. 1-2, p. 6–24, 15 jun. 2012.

STAM, C. J. Nonlinear dynamical analysis of EEG and MEG: Review of an emerging field. **Clinical Neurophysiology**, v. 116, p. 2266–2301, 2005.

STONEHOUSE, W. Does Consumption of LC Omega-3 PUFA Enhance Cognitive Performance in Healthy School-Aged Children and throughout Adulthood? Evidence from Clinical Trials. **Nutrients**, v. 6, n. 7, p. 2730–58, jan. 2014.

STRANAHAN, A.; MATTSON, M. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 209–216, 2012.

STUDZINSKI, C. M. et al. Visuospatial function in the beagle dog: an early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. **Neurobiology of learning and memory**, v. 86, n. 2, p. 197–204, out. 2006.

SU, H.-M. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 364–73, maio 2010.

TOU, J. C. et al. Different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids affects apparent digestibility, tissue deposition, and tissue oxidative stability in growing female rats. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 179, jan. 2011.

TSUDA, I.; FUJII, H. Chaos reality in brain. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 309–326, 2007.

TUZUN, F. et al. Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 315–23, jun. 2012.

UAUY, R.; DANGOUR, A. D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutrition reviews**, v. 64, n. 5 Pt 2, p. S24–33; discussion S72–91, maio 2006.

VAN ELST, K. et al. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 45, p. 369–378, 12 jul. 2014.

VARGHESE, J. P. et al. Frequency characteristics of cortical activity associated with perturbations to upright stability. **Neuroscience letters**, v. 578, p. 33–8, 22 ago. 2014.

VELASCO, P. C. et al. Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual system. **Experimental neurology**, v. 234, n. 1, p. 220–9, mar. 2012.

VELÁZQUEZ BENITO, A. et al. Acute sensory-motor axonal neuropathy (Guillain-Barre syndrome) following vertebroplasty. **Medicina clinica**, n. x, p. 2013–2014, 18 jan. 2014.

VITALI, C.; WELLINGTON, C. L.; CALABRESI, L. HDL and cholesterol handling in the brain. **Cardiovascular research**, v. 103, n. 3, p. 405–413, 1 ago. 2014.

WANG, S.; YOUNG, K. M. White matter plasticity in adulthood. **Neuroscience**, v. 276, p. 148–160, 23 out. 2013.

WANG, X. et al. Research on the relation of EEG signal chaos characteristics with high-level intelligence activity of human brain. **Nonlinear biomedical physics**, v. 4, n. 1, p. 2, jan. 2010.

WEI, J. W. et al. Phospholipids and fatty acid profile of brain synaptosomal membrane from normotensive and hypertensive rats. **The International journal of biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 1225–8, jan. 1987.

WELCH, P. D. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms. **IEEE Transactions on Information Theory**, v. 15, n. 2, p. 70–73, 1967.

WU, Y.-C. et al. High b-value and diffusion tensor imaging in a canine model of dysmyelination and brain maturation. **NeuroImage**, v. 58, n. 3, p. 829–37, 1 out. 2011.

Artigo I

Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre parâmetros morfológicos e bioquímicos da prole em ratos Wistar

Effects of maternal supplementation with omega-3 on morphological and biochemical parameters in the prole in Wistar rats

Artigo redigido de acordo com as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre parâmetros morfológicos e bioquímicos da prole em ratos Wistar
Effects of maternal supplementation with omega-3 on morphological and biochemical parameters in the prole in Wistar rats

SILVA, J.E.S.¹, MOURA, A.M.A.², NOGUEIRA, R.A.³

1,3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Manguinhos, 21040 - 900 - Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Autor correspondente R. A. Nogueira, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: 81-3320-6057. E-mail: ran.pe@terra.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de ratas Wistar com ômega-3 durante os períodos pré, peri e pós-natal sobre parâmetros morfológicos e bioquímicos da prole. *Rattus norvegicus* fêmeas foram divididos em três grupos experimentais de acordo com o tratamento: grupo S60D (suplementação com ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame da prole), S90D (suplementação a partir dos 90 dias de idade até o desmame da prole) e grupo Controle. A prole foi avaliada quanto ao desenvolvimento corporal, perfil bioquímico e aspectos histológicos do tecido cerebral em momentos distintos (desde o nascimento até os 70 dias de idade). Este trabalho discute as implicações da suplementação de ratas Wistar com ômega-3 para os referidos parâmetros.

Palavras-chave: hipocampo, ômega-3, suplementação, Wistar

Abstract

The aim of this study was to evaluate the omega-3 supplementation effect during pre, peri and postnatal periods upon offspring morphological and biochemical parameters. Females *Rattus norvegicus* were divided into three groups according to treatment: S60D group (omega 3 supplementation from 60 days of age until offspring weaning),

S90D group (supplementation from 90 days of age until offspring weaning) and Control group. The offspring was evaluated for body development, serum biochemical profile and histological aspects of brain tissue at different times (from birth until 70 days old). Omega-3 supplementation in Wistar rats modified morphological parameters of offspring compared to control group for the different periods evaluated.

Keywords: hippocampus, omega-3, supplementation, Wistar

INTRODUÇÃO

A suplementação com óleo de peixe durante o período embrionário e/ou pós-natal pode influenciar positivamente a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 pelo cérebro, proporcionando um melhor desenvolvimento deste órgão e das funções a ele relacionadas.

A deficiência de ácido docosahexaenóico - um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa - durante o desenvolvimento embrionário tem sido associada com anormalidades neurológicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento anormal da bainha de mielina (Leite, 2011), fundamental para a propagação do impulso nervoso ao longo das fibras dos axônios.

Os componentes mais importantes dos lipídeos das membranas celulares são os ácidos graxos essenciais n-6, ácido linoléico (LA) e n-3, ácido alfa-linolênico (ALA), que não podem ser metabolizados pelo organismo, e são obtidos a partir da dieta (Crupi; Marino; Cuzzocrea, 2013; Van Elst et al., 2014). Portanto, a dieta é um fator ambiental chave que influencia a estrutura e função do sistema nervoso (Bourre, 2009).

Os n-6 e n-3 são os precursores do n-6, ácido araquidônico (AA), n-3, ácido docosahexaenóico (DHA) e n-3 ácido eicosapentaenóico (EPA), respectivamente (Desai; Kevala; Kim, 2014; Van Elst et al., 2014), sendo estes últimos altamente concentrados no cérebro (Grayson et al., 2014). Torna-se evidente que quantidades elevadas desses AGPI são necessárias para a sinaptogênese e a maturação dos nervos (Van Elst et al., 2014).

Em ratos, o período da histogênese do neocórtex pode ser dividido em duas etapas: neurogênese e gliogênese. Durante a primeira fase, uma população de

células dá origem a neurônios. Este estágio se completa quando o número definitivo de fibras nervosas está formado. Nesta espécie, essa formação se inicia por volta do 11º ou 12º dia pós-concepção e finaliza ao nascimento, sendo seguido pela etapa da gliogênese, em que populações de células germinais do mesmo tipo ou diferentes produzem os vários tipos de células gliais (Lenzi; Teles; Guzmán, 2011). A deposição de DHA, bem como de AA nos fosfolipídeos do cérebro em ratos ocorre durante a fase embrionária (por volta do 10º dia de gestação) e as três primeiras semanas de vida pós-natal, período no qual se dá o aleitamento exclusivo (Velasco et al., 2012).

Há uma hipótese de que fêmeas que consomem regularmente DHA, e assim possuem níveis adequados deste ácido graxo no início da gravidez, apresentariam maiores benefícios a sua saúde, bem como a da prole, quando comparadas a fêmeas que iniciem uma suplementação com DHA durante a gestação. Entretanto, até o momento não existe um consenso sobre o período crítico ideal para suplementação do ômega-3 na dieta materna sobre a melhoria da qualidade do leite (Brenna; Carlson, 2014).

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de ratas Wistar com ômega-3 durante os períodos pré, peri e pós-natal sobre o desenvolvimento corporal, perfis lipídico e glicêmico séricos e região hipocampal do tecido cerebral da prole.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/ UFRPE). Foram utilizados 15 *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem Wistar, fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local onde foram realizados os experimentos. As mesmas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação (ração comercial Presence® 7883) *ad libitum*. Os animais (F0) foram divididos em três grupos experimentais (n = 5 animais/ grupo) de acordo com o tratamento (Fig. 1).

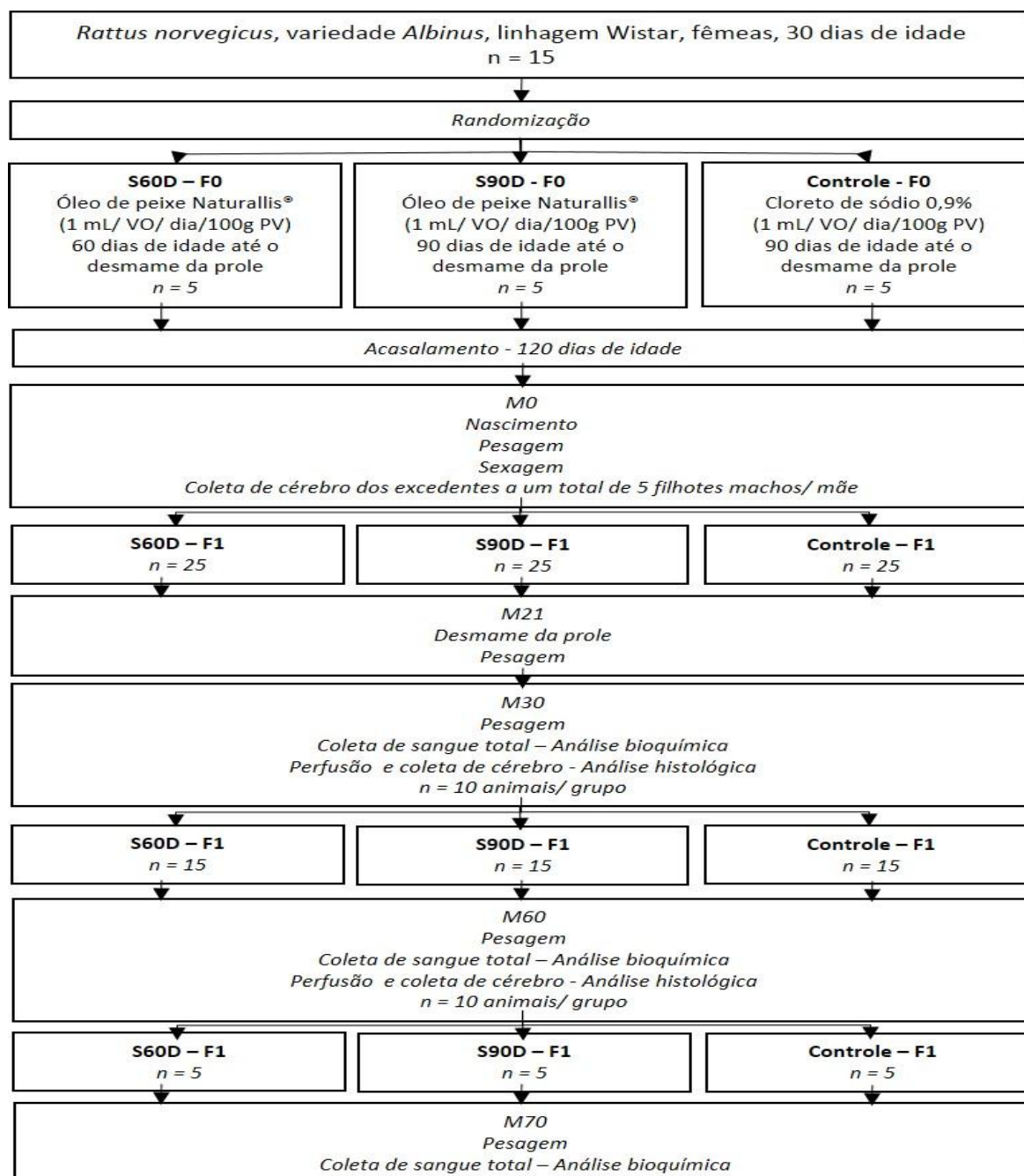


Figura 1. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias.

No grupo S60D a suplementação com ômega-3 deu-se a partir dos 60 dias de idade até o desmame da prole, enquanto no S90D a suplementação deu-se a partir dos 90 dias de idade até o desmame da prole. Para a suplementação foi utilizado óleo de peixe Naturalis® (180 mg EPA e 120 mg DHA) administrado por meio de gavagem. No grupo Controle as ratas receberam solução fisiológica de NaCl 0,9% (gavagem) a partir dos 90 dias de idade até o desmame da prole. A partir do

desmame os animais passaram a receber água e alimentação (ração Presence®
ratos e camundongos) *ad libitum*.

Aos 120 dias de idade as ratas foram colocadas em acasalamento por 15 dias, numa proporção de um macho para cada 3 fêmeas. Após esse período, os machos foram separados e deu-se prosseguimento aos experimentos. A prole (geração F1) foi analisada em momentos distintos.

No primeiro momento (M0), realizou-se a sexagem dos animais e aqueles excedentes a um total de 5 filhotes machos foram submetidos a eutanásia até 12 horas após o nascimento para coleta do cérebro. Os animais restantes (n = 5 filhotes/ matriz) foram amamentados até o 21º dia (M21), quando foram desmamados de suas mães e passaram a receber água e alimentação (ração Presence®
ratos e camundongos 7883) *ad libitum*.

Aos 30 dias de idade (M30) dois animais de cada subgrupo (n = 10/ grupo) foram escolhidos ao acaso, pesados, anestesiados e submetidos a eutanásia pelo método de exsanguinação por punção cardíaca, com coleta de sangue total para análise do perfil bioquímico sérico dos animais. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução de formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4) para coleta dos cérebros, os quais foram submetidos posteriormente ao procedimento histológico.

Aos 60 dias de idade (M60) repetiu-se o procedimento descrito em M30, com coleta de sangue total e cérebro para as análises bioquímica e histológica (n = 10 animais/ grupo). Aos 70 dias de idade (M70), os demais animais (n = 5 animais/ grupo) foram pesados e anestesiados para coleta de sangue e análise de perfil sérico. A variação de peso corporal foi avaliada realizando-se pesagem em balança analítica. A anestesia foi realizada com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (Massoni, 2011). Os dados para perfil lipídico (triglicerídeos e colesterol total) e glicêmico séricos foram obtidos em amostras de sangue (0,5 mL) coletadas em tubos com anticoagulante com o auxílio do aparelho Accutrend Plus (Roche®) imediatamente após a punção cardíaca.

A perfusão dos animais foi feita com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e em sequência, com formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros dos

animais foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído 10% para posterior processamento e análise histológica.

Fragmentos de cérebro foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Plus®. Secções do hipocampo foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo Leica®, foram realizados cortes seriados a 4µm em um plano coronal. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas, mantidas em seqüência conhecida, corados com Hematoxilina e Eosina e Cresil violeta e cobertos com lamínulas de vidro. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em aumentos de 40X e 400X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação morfométrica da região CA1 do hipocampo.

Foram delimitadas aleatoriamente cinco áreas em cada corte histológico em um aumento de 400x, e com o auxílio de uma grade (21 x 21) realizou-se a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo, bilateralmente, obtendo-se a média para cada corte histológico. Esses dados permitiram conhecer a densidade relativa da área (%) de neurônios na referida região em ratos com idade de zero, trinta e sessenta dias. A densidade de área na região CA1 do hipocampo foi calculada como descrito em Fernandes e Polacow (2005).

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a suplementação com AGPI não interferiu no metabolismo das matrizes, resultando em um ganho de peso semelhante entre os tratamentos durante o período de gestação. O número de filhotes por matriz também não variou entre os tratamentos (Fig. 2).

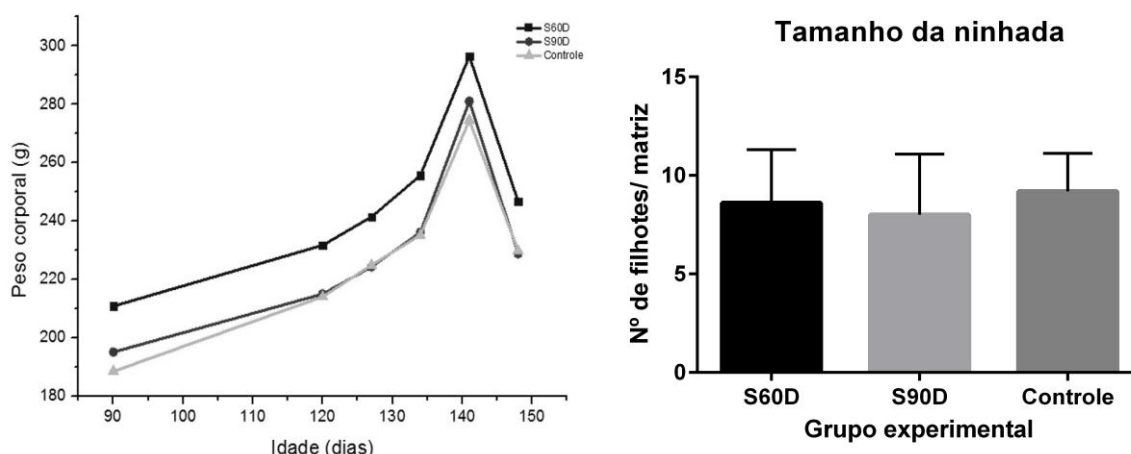


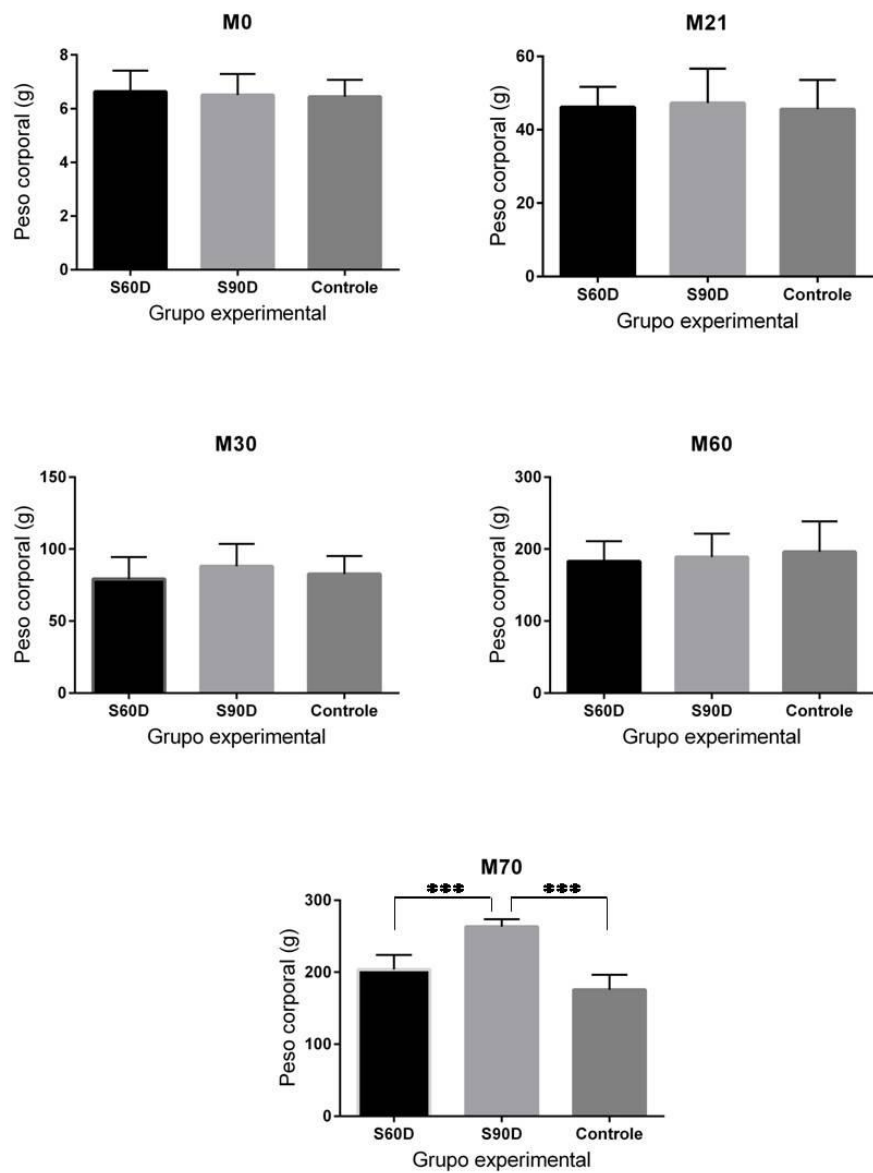
Figura 2. Desenvolvimento corporal (peso médio) das matrizes e tamanho da ninhada durante o período experimental para os diferentes tratamentos. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias (ANOVA, $p < 0,05$).

Na avaliação do desenvolvimento corporal da prole (Fig. 3) não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), nos momentos M0 (peso ao nascer), M21 (peso ao desmame), M30 e M60 (30 e 60 dias de idade, respectivamente). Entretanto, na avaliação final (M70), houve diferença significativa ($p < 0,0001$) quanto a massa corporal dos animais cujas mães foram suplementadas com ômega-3 quando comparados aqueles do grupo Controle avaliados aos 70 dias de idade.

Os ácidos graxos EPA e DHA fornecidos às fêmeas durante a gestação e lactação tiveram efeito direto sobre o desenvolvimento da prole em longo prazo, como pode ser observado na figura 4. A prole das ratas que receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade apresentou maior peso corporal médio em relação aos grupos Controle e S60D, sendo o menor peso corporal observado nos animais do grupo Controle.

Os resultados obtidos neste estudo, para o peso corporal de ratos ao nascer (M0) corroboram com aqueles descritos por Almeida (2007) e Tuzun et al. (2012), em que a suplementação de ratas com óleo de linhaça e EPA e DHA, respectivamente, durante a gestação e o período de aleitamento, não promoveu alteração do peso corporal da prole ao nascer, em relação ao grupo controle, mesmo quando foi administrada uma concentração elevada desses AGPI às matrizes. Já Fernandes (2007) descreve que a suplementação com 10% de óleo de linhaça na ração de ratas durante os períodos ratas nos períodos pré-concepcional e

193 perinatal provocou menor crescimento intra-uterino da prole dos animais e menor
194 peso corporal ao nascer, comparada ao grupo Controle.



195

196 Figura 3. Valores de peso corporal (média $\pm$ desvio padrão) dos animais avaliados ao nascer (M0), ao desmame
197 (M21), aos trinta (M30), sessenta (M60) e setenta (M70) dias de idade. S60D - Prole cujas mães receberam
198 ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a
199 partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos
200 90 dias de idade até o desmame das crias (ANOVA e post-hoc de Tukey). ***p < 0,0001.

201 Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho no que se refere ao peso
202 corporal dos animais avaliado em M30 diferem do que foi observado por outros
203 autores, em que a suplementação dietética de ratas durante o período de gestação e
204 amamentação com ração enriquecida com óleo de linhaça, rico em ômega-3,
205 resultou em menor ingestão de alimentos e proteínas, com consequente redução do

peso corporal da prole avaliada no mesmo período (aos 30 dias de idade), quando comparada ao grupo controle (Almeida, 2007, Leite et al., 2011)

A avaliação dos animais para os níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos séricos são mostrados na figura 4. A suplementação das matrizes com ômega-3 modificou os parâmetros de glicose e colesterol total séricos em diferentes momentos de análise dos dados.

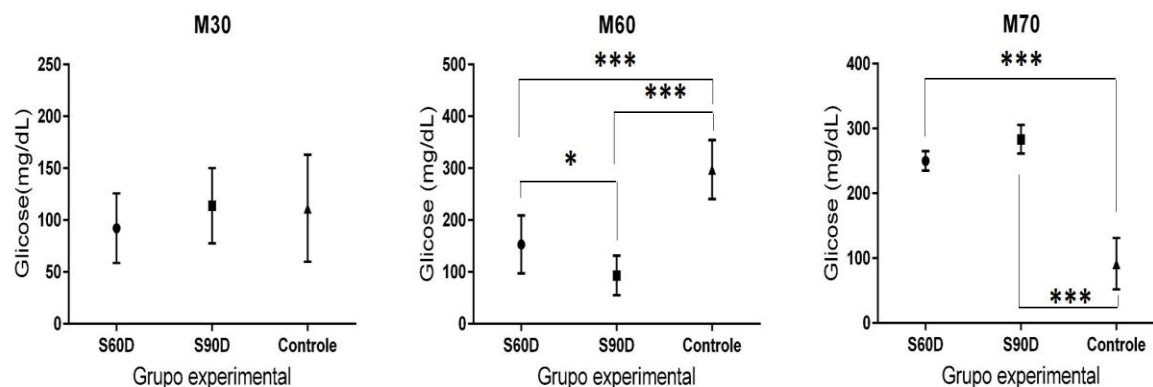


Figura 4. Perfil glicêmico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

No momento M30, a glicemia dos animais não mostrou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, aos 60 dias de idade (M60), este parâmetro mostra diferença significativa entre os grupos, com menores valores observados em S90D e S60D, respectivamente, em relação ao grupo Controle. Na última etapa de análise, verificamos que ocorreu uma inversão neste comportamento, com elevados níveis glicêmicos observados nos animais dos grupos S60D e S90D e normoglicemia no grupo Controle.

Diante da hipótese proposta na literatura, as alterações de perfil glicêmico observada nos animais tratados (S60D e S90D) em relação ao Controle podem ser consideradas também para o metabolismo cerebral, dada a elevada demanda energética de glicose no cérebro. Dessa maneira, as funções associadas a esse órgão podem sofrer interferência da suplementação com EPA e DHA, desde os processos ligados a expressão de receptores GLUT1 no endotélio vascular cerebral até a captação e utilização da glicose pelo tecido cerebral, como observado por outros autores em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A literatura veterinária descreve que a associação anestésica de cetamina e xilazina apresenta diversas vantagens do ponto de visto prático, pois possui ação rápida, promove um período anestésico hábil de cerca de 30 a 50 minutos, não abole os reflexos protetores e é de fácil aplicação. No entanto, esses fármacos podem produzir alterações exarcebadas nos parâmetros fisiológicos em função da dose e da espécie animal. Em camundongos e ratos, a associação de cetamina e xilazina promove um tempo de anestesia que pode durar de 50 a 80 minutos (Massone, 2011). Os efeitos desses fármacos sobre a glicemia são promovidos pelo bloqueio da captação de catecolaminas uma classe de hormônios catabólicos que elevam a glicemia (Cortopassi; Fantoni, 2010).

Níveis elevados de catecolaminas plasmáticas podem determinar hiperglicemia por complexas e variadas interações desse neurotransmissor em receptores α e β -adrenérgicos em diversos órgãos e tecidos, como fígado, pâncreas, músculos e tecido adiposo, tendo como resultado final aumento na produção de glicose e redução na sua utilização (Guedes, 2010).

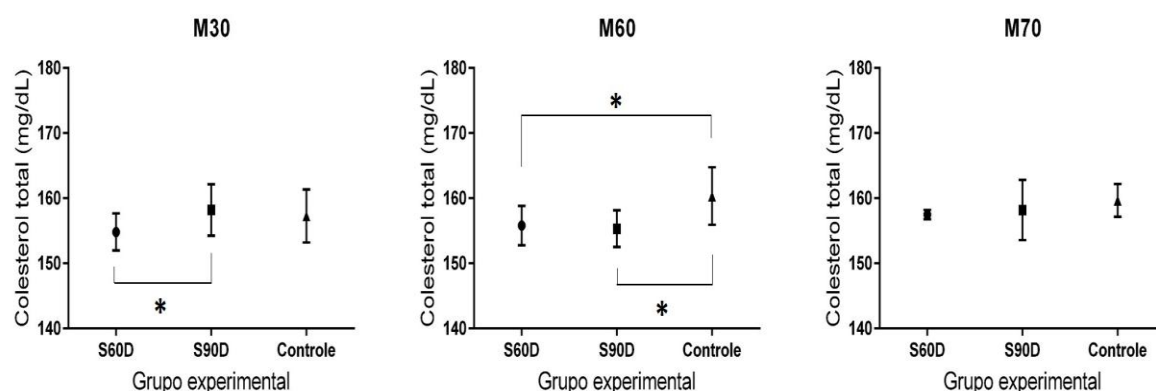


Figura 5. Níveis de colesterol total sérico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $p < 0,05$).

Em relação ao colesterol total, a suplementação resultou em modificações do perfil lipídico sérico entre os tratamentos (Fig. 5). Aos 30 dias de idade (M30) os animais do grupo S60D apresentaram menor nível de colesterol total em relação ao grupo S90D. Em M60, este parâmetro mostra menores valores para os grupos suplementados em relação ao controle. Em M70 nenhuma diferença foi observada.

O colesterol cerebral é sintetizado *in situ* pelos astrócitos e oligodendrócitos, onde parece ser regulada por meio de mecanismos semelhantes aos observados em tecidos extra-cerebrais, sendo essa síntese mais intensa durante a embriogênese e infância, quando a mielogênese é máxima (Vitali, Wellington, Calabresi, 2014). A redução dos níveis de colesterol total sérico observada no presente trabalho indica que a suplementação com ômega-3 durante a gestação e amamentação pode interferir na fluidez da membrana neuronal, promovendo maior flexibilidade e modulando os processos envolvidos na atividade cerebral.

Nenhuma diferença foi observada em relação aos triglicerídeos (Fig. 6) para os tratamentos nos períodos avaliados (M30, M60 e M70).

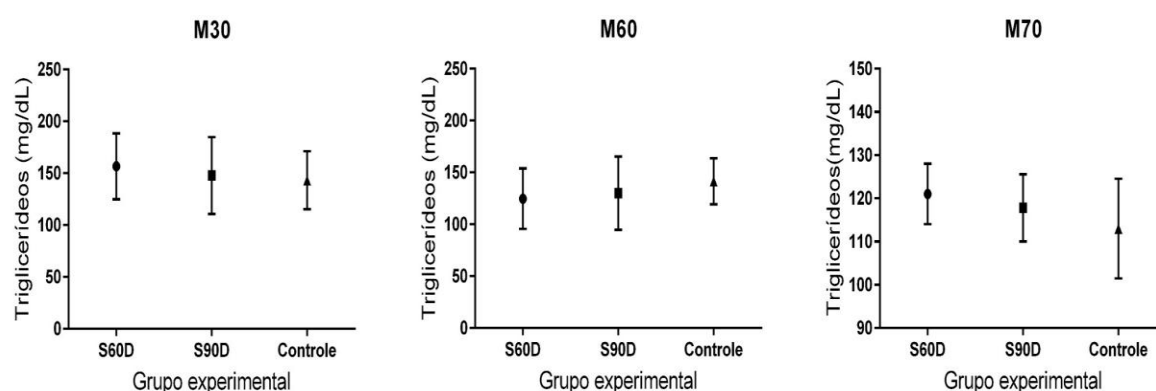


Figura 6. Níveis de triglicerídeo total sérico dos animais avaliados aos 30, 60 e 70 dias de idade (M30, M60 e M70, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A literatura descreve que a ingestão de EPA e DHA pode favorecer a redução dos níveis destes lipídeos em indivíduos com hipertrigliceridemia. Já em indivíduos saudáveis, os dados referentes a este parâmetro ainda não estão bem caracterizados. Contudo, o consumo de AGPI ômega-3 pode ser benéfico, pois a maioria dos estudos mostra redução significativa dos níveis de triglicerídeos séricos em indivíduos normais.

Os dados relativos à morfometria do tecido cerebral para os diferentes tratamentos foram comparados. A análise permitiu verificar que a suplementação com ômega-3, interferiu no número de neurônios da região CA1 do hipocampo, avaliada pela densidade de área em diferentes idades para os tratamentos realizados (Fig. 7).

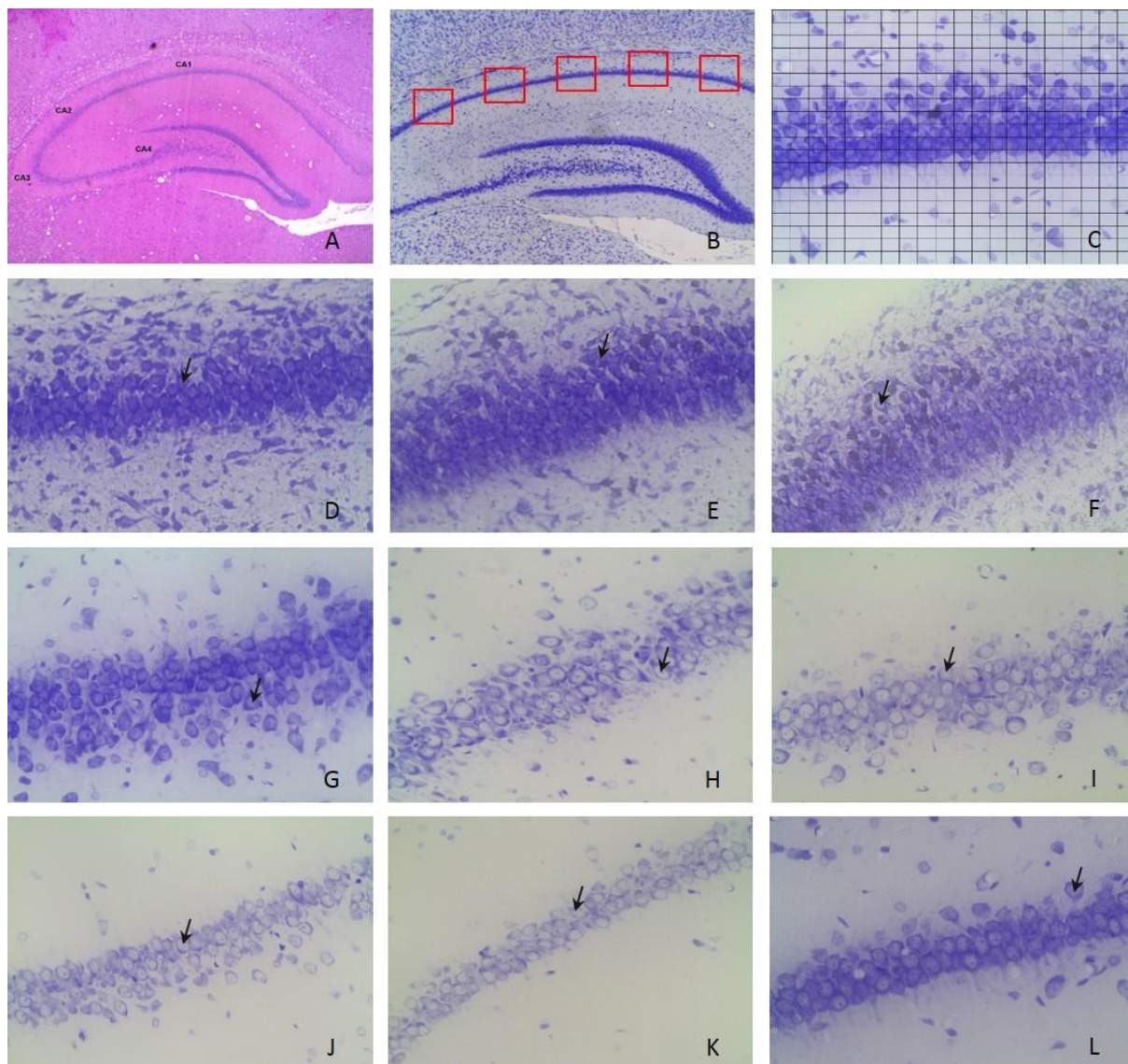


Figura 7. Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 (Coloração: HE. Aumento 40X). B - Região CA1. Os boxes em vermelho indicam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade celular. Aumento 40X. C - Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais. D, G, J - Grupo S60D (M0, M30 e M60, respectivamente). E, H, K - Grupo S90D (M0, M30 e M60, respectivamente). F, I, L - Grupo Controle (M0, M30 e M60, respectivamente). Observar neurônios piramidais (setas). Coloração: Nissl. Aumento 400X.

O início da suplementação das matrizes alterou o comportamento da população de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo da prole ao nascimento, bem como aos trinta e sessenta dias de idade (Fig. 8). A prole cujas matrizes foram suplementadas durante um tempo mais curto e próximo ao período de acasalamento (S90D) apresentou maior população de neurônios piramidais ao nascer (M0) quando comparada aos grupos S60D e Controle ($p = 0,0025$).

Aos 30 dias de idade, a densidade neuronal foi estatisticamente superior nos animais cujas mães foram suplementadas por um período mais longo (S60D)

quando comparada aqueles do grupo controle ($p = 0,0001$). Também houve diferença na densidade neuronal da região avaliada para o grupo S90D quando comparada ao grupo Controle ($p < 0,05$).

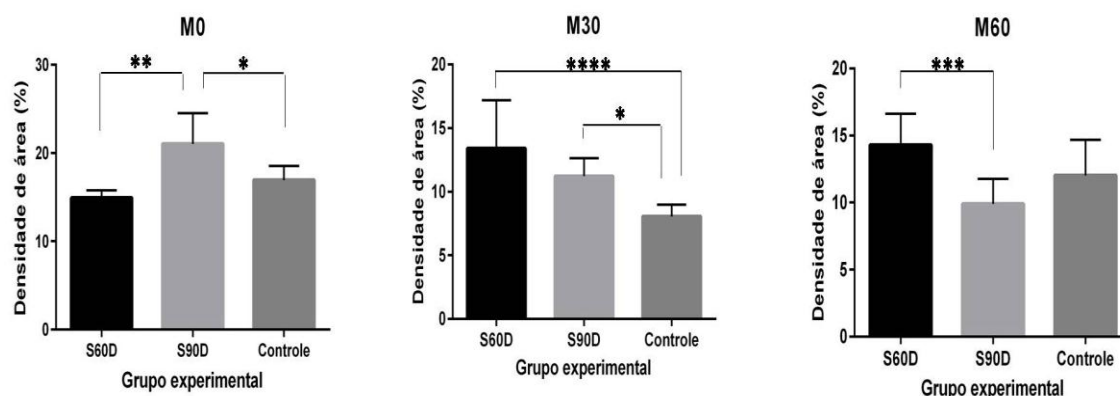


Figura 8. Média da densidade de área (%) de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos avaliados ao nascimento, aos trinta e sessenta dias de idade (M0, M30 e M60, respectivamente). S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Na morfometria realizada em cérebros de ratos aos 60 dias de idade (M60) observou-se que o tempo de suplementação das matrizes durante os períodos pré, peri e pós-gestacional resultou em variação significativa da densidade de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo nos animais do grupo S60D quando comparados ao grupo S90D ($p = 0,0010$). A suplementação de fêmeas durante 60 dias antes do período de acasalamento proporcionou uma maior densidade neuronal nos animais em idade jovem, indicando que o início da suplementação com ômega-3 é importante para um adequado desenvolvimento cerebral nos animais.

Estes resultados corroboram com outros autores, em que é observado que a suplementação com EPA e DHA pode interferir nos processos de desenvolvimento do tecido cerebral, no que se refere à proliferação e manutenção dos neurônios (Crupi; Marino; Cuzzocrea, 2013; Tuzun et al., 2012; Van Elst et al., 2014), que por sua vez tem relação direta com os processos de cognição e memória, podendo se estender à fase adulta (Avramovic et al., 2012; Bach, 2012; Crupi; Marino; Cuzzocrea, 2013).

CONCLUSÕES

A suplementação com ômega-3 não apresentou efeitos sobre o desenvolvimento corporal dos ratos da F1 avaliados ao nascer, ao desmame, aos

330 trinta e aos sessenta dias de idade, independentemente do tempo de suplementação
331 realizado nas matrizes, em contrapartida ao que é descrito na literatura. Os AGPI
332 EPA e DHA exerceram efeitos sobre os níveis de glicose e colesterol total séricos
333 dos animais, sem modificar os triglicerídeos nestes últimos.

334 O tempo de suplementação das ratas com ômega-3 interferiu de maneira
335 significativa sobre a densidade dos neurônios piramidais da região CA1 do
336 hipocampo da prole, avaliada no pós-natal imediato, bem como aos trinta e sessenta
337 dias de idade, indicando que os ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA tem
338 influência no desenvolvimento do tecido cerebral.

339 REFERÊNCIAS

340 AVRAMOVIC, N. et al. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain
341 tissue oxidative status in aged wistar rats. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 241–5, jul.
342 2012.

343 BACH, S. A. **A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil**
344 **lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos:**
345 **implicações sobre a formação da memória aversiva.** [s.l.] UNIVERSIDADE
346 FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2012.

347 BOURRE, J. M. Brain lipids and ageing. **Food for the Ageing Population**, v. i, p.
348 219–251, 2009.

349 BRENNAN, J. T.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and human brain
350 development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development.
351 **Journal of human evolution**, v. 2014, p. 1–8, 26 abr. 2014.

352 CORTOPASSI, S. G.; FANTONI, D. T. **Anestesia em Cães e Gatos.** [s.l.] Roca,
353 2010. p. 632

354 CRUPI, R.; MARINO, A.; CUZZOCREA, S. N-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis
355 and Neuroplasticity. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2953–63, jan.
356 2013.

357 DESAI, A.; KEVALA, K.; KIM, H.-Y. Depletion of brain docosahexaenoic acid impairs
358 recovery from traumatic brain injury. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86472, jan. 2014.

359 FERNANDES, K.; POLACOW, M. Análise morfométrica dos tecidos muscular e
360 conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista**
361 **Brasileira de Fisioterapia**, v. 9, n. 2, p. 235–241, 2005.

362 GRAYSON, D. S. et al. Dietary omega-3 fatty acids modulate large-scale systems
363 organization in the rhesus macaque brain. **The Journal of neuroscience: the**
364 **official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2065–74, 5 fev.
365 2014.

- 366 GUEDES, A. A. A importância do controle glicêmico perioperatório. v. 20, p. 3–6,
367 2010.
- 368 LEITE, C. D. F. C. **Efeito da alimentação suplementada com semente de linhaça**
369 **no crescimento corporal e na organização histológica da retina de ratos**
370 **durante o desenvolvimento.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2011.
- 371 LENZI, A.; TELES, B.; GUZMÁN, S. Influence of omega-3 fatty acids from the
372 flaxseed (*Linum usitatissimum*) on the brain development of newborn rats. **Nutricion**
373 **hospitallaria: organo ...**, v. 26, n. 5, p. 991–996, 2011.
- 374 MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas.** 6^a. ed. [s.l.]
375 Guanabara Koogan, 2011. p. 448
- 376 TUZUN, F. et al. Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates
377 hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. **International journal of**
378 **developmental neuroscience: the official journal of the International Society**
379 **for Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 315–23, jun. 2012.
- 380 VAN ELST, K. et al. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios
381 and the increase in autism spectrum disorders. **Neuroscience and biobehavioral**
382 **reviews**, v. 45, p. 369–378, 12 jul. 2014.
- 383 VELASCO, P. C. et al. Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters
384 topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual
385 system. **Experimental neurology**, v. 234, n. 1, p. 220–9, mar. 2012.

Artigo II

Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre a atividade cortical da prole em ratos machos Wistar

**Effects of maternal supplementation with omega-3 on cortical
activity in the prole in male Wistar rats**

Artigo redigido de acordo com as normas da revista
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia.

Efeitos da suplementação materna com ômega-3 sobre a atividade cortical da prole em ratos machos Wistar

Effects of maternal supplementation with omega-3 on cortical activity in the prole in male Wistar rats

SILVA, J.E.S.¹, MOURA, A.M.A.², NOGUEIRA, R.A.³

^{1,3} Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Fundação Oswaldo Cruz Manguinhos – FIOCRUZ, 21040-900 - Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Autor correspondente R. A. Nogueira, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: 81-3320-6057. E-mail: ran.pe@terra.com.br

Resumo

A literatura traz uma série de estudos que buscam verificar a interferência da nutrição de fêmeas durante os períodos de gestação e amamentação sobre o desenvolvimento cerebral e cognitivo da prole, tanto em humanos quanto em outras espécies. Os ácidos graxos ômega-3, em especial EPA e DHA, têm sido descritos como importantes nutrientes para um adequado desenvolvimento das funções do sistema nervoso na infância, adolescência e idade adulta. No presente trabalho, buscou-se verificar os efeitos da suplementação de ratas com ômega-3 sobre o desenvolvimento cerebral e a atividade elétrica cortical da prole, utilizando técnicas de análise linear e não-linear do registro de ECoG de ratos Wistar em idade jovem. *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos foram divididos em três grupos experimentais, sendo dois provenientes de ratas suplementadas com ômega-3 (S60D e S90D) e outro de um grupo controle. ECoG foram registrados e analisados pelos métodos de espectro de potência, complexidade de Lempel-Ziv e dimensão fractal do espaço de fase reconstruído. O presente artigo discute essa abordagem matemática e as implicações da suplementação materna com ômega-3 durante os períodos pré-gestacional, gestacional e de aleitamento sobre a atividade eletrocortical da prole.

Palavras-chave: Caos, ECoG, Ômega-3, Wistar

Abstract

The literature brings a lot of studies that seek to verify the interference of nutrition females during pregnancy and breastfeeding periods on brain and cognitive development of offspring, both in humans and in other species. Omega-3 fatty acids, especially EPA and DHA, have been described as important nutrients for proper development of nervous system functions in childhood, adolescence and adulthood. In this study, we sought to assess the omega- 3 supplementation effects on rats brain development and cortical electric activity of the offspring, using linear analysis and non-linear techniques of ECoG recording in Wistar rats at young age. *Rattus norvegicus*, Wistar were divided into three groups, two from dams supplemented with omega-3 (S60D and S90D) and another from a control group dams. ECoG signals were registered and analyzed by the following methods: power spectrum, Lempel-Ziv Complexity and fractal dimension of the rebuilt phase space. This article discusses the mathematical approach and the implications of maternal supplementation with omega-3 during the pre-gestational, pregnancy and lactation periods on the behavior offspring electrocortical activity.

Keywords: Chaos, ECoG, Omega-3, Wistar

INTRODUÇÃO

Os lipídeos são responsáveis por cerca de metade do peso seco do tecido cerebral. São componentes estruturais das membranas celulares e atuam na regulação de seus processos bioquímicos e fisiológicos. A quantidade e o tipo de lipídeo no cérebro variam nas diferentes regiões e com a idade (Bourre, 2009). Neste órgão, concentra-se quase um quarto do colesterol total, sobretudo na mielina (70 – 80%), onde desempenha papel de isolamento. O colesterol cerebral é sintetizado *in situ* pelos astrócitos e oligodendrócitos, em especial durante a embriogênese e infância quando a mielogênese é máxima (Vitali; Wellington; Calabresi, 2014).

Além do colesterol, neste tecido destacam-se os fosfolipídios, dos quais as fosfatidiletanolamina (PE) são os mais abundantes (Bourre, 2009). Dentre os fosfolipídios, o ácido docosahexaenóico (DHA 22:6) corresponde a

aproximadamente 25% da massa percentual dos ácidos graxos totais no córtex cerebral (Guesnet; Alessandri, 2011). Seu maior acúmulo no cérebro ocorre também durante o desenvolvimento deste órgão, no período perinatal. O ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5), precursor do DHA, tem seus efeitos bem documentados em doenças neurodegenerativas e inflamatórias. Além disso, processos biofisiológicos podem ser influenciados por esses AGPI (Avramovic et al., 2012). Em comparação com o DHA, o EPA está presente numa concentração muito baixa nos fosfolípidos cerebrais (Katakura et al., 2013).

Uma maneira de investigar os possíveis efeitos da suplementação da dieta de ratos com ômega-3 sobre a sua atividade elétrica cortical é o registro elétrico dessa atividade, realizada através do eletrocorticograma (ECoG).

A análise do eletrocorticograma (ECoG) permite detectar-se anormalidades nas ondas cerebrais ou na atividade elétrica do cérebro. O registro é produzido através da amplificação e gravação de diferenças de tensão entre os eletrodos colocados diretamente sobre o córtex cerebral, que refletem a atividade elétrica no cérebro (Geng et al., 2014). A atividade elétrica cortical é gerada, principalmente, pelo potencial pós-sináptico, que resulta da ação do neurotransmissor no receptor pós-sináptico, gerando um sinal elétrico (potencial gerador) (Pessoa, 2012).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento dos métodos de análise de dinâmicas não-lineares, cada vez mais evidências indicam que o cérebro é um sistema dinâmico não-linear e o sinal do ECoG pode ser considerado como sua resposta. A característica fisiológica destes sinais difere muito em condições patológicas e sobre influência de anestésicos. Em condições de normalidade, o cérebro é mais caótico, processa a informação mais rapidamente e pode ter uma maior variedade de respostas (MacIver; Bland, 2014; Wang et al., 2010).

Mesmo quando são analisados a partir de indivíduos saudáveis, estes registros manifestam o caos no sistema nervoso (Sarbadhikari; Chakrabarty, 2001). Neste sistema, a não-linearidade já está introduzida no nível celular, uma vez que o comportamento dinâmico de neurônios individuais é regido por fenômenos de integração, de limites e de saturação (Lehnertz, 2008). Um sistema linear pode ser compreendido como um conjunto de unidades simples, que quando combinadas levam ao surgimento de propriedades emergentes complexas. A não-linearidade de

um sistema diz respeito à imprevisibilidade dos efeitos de pequenas mudanças nas condições iniciais de suas variáveis (Savi, 2006).

Os processos caóticos podem ser caracterizados por algumas técnicas baseadas na geometria do atrator, como a dimensão fractal do espaço de fase reconstruído (Krakovska, 2009; MacIver; Bland, 2014) enquanto outras são baseadas na análise direta da série temporal, como a transformada de Fourier (MacIver; Bland, 2014; Varghese et al., 2014) e a Complexidade de Lempel-Ziv (Abásolo et al., 2014). Ao contrário do que se observa nos sinais periódicos comuns, que apresentam espectro de potência com picos em frequências bem definidas, nos sistemas caóticos o espectro de potência apresenta bandas largas (Machado et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de ratas com ômega-3 sobre o desenvolvimento do cérebro e na atividade elétrica cortical da prole em idade jovem por meio de técnicas de análises linear e não-linear do registro de ECoG, submetida à indução anestésica dissociativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (licença nº 103/2014 – CEUA/ UFRPE). Foram utilizados 15 *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem Wistar, machos, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local onde foram realizados os ensaios biológicos. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}$ C), em ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n = 5 animais/ grupo) de acordo com o tratamento, sendo dois tratados (S60D e S90D) e um controle.

O Grupo S60D era composto por ratos machos jovens cujas mães receberam óleo de peixe Naturallis® (1 mL/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 60 dias de idade até o desmame da prole. O Grupo S90D era formado por ratos machos jovens cujas mães receberam óleo de peixe Naturallis® (1 mL/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 90 dias de idade até o desmame da prole, enquanto o grupo Controle foi constituído de ratos machos jovens cujas mães receberam solução fisiológica de NaCl 0,9% (1 mL/ VO/ dia/100g PV) a partir dos 90 dias de idade até o desmame da prole. A partir do desmame os animais passaram a receber água e alimentação *ad libitum*.

Aos 70 dias de idade, os animais foram pesados em balança analítica e anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL da solução para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (Massoni, 2011). A temperatura corporal foi controlada em torno de $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ com aquecedor elétrico posicionado sob o animal.

Com a cabeça do animal fixada à base de um estereotáxico, realizou-se uma pequena incisão na pele e foi removido parte do periósteo. Posteriormente, trepanou-se um orifício circular com aproximadamente 3 mm de diâmetro sobre o hemisfério esquerdo na região parietal no córtex sensori-motor cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma. Neste orifício foi posicionado um eletrodo do tipo Ag-AgCl, sobre o córtex cerebral e outro eletrodo, do mesmo tipo, foi colocado sobre o osso nasal (eletrodo de referência) (Nascimento et al., 2010).

Para cada animal registrou-se 30 minutos da atividade cerebral com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 pontos por segundo. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday, a qual foi mantida fechada, evitando-se a interferência de estímulos sonoros e luminosos (Pessoa, 2012).

Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de aprofundamento anestésico. Na sequência, removeu-se o cérebro da caixa craniana com auxílio de tesoura e pinça de dissecação. Os cérebros foram pesados em balança analítica para obtenção do peso cerebral e cálculo do peso cerebral relativo.

Os registros dos ECoG foram segmentados em janelas de dois minutos. Estes segmentos foram importados para o software OriginPro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) e filtrados com um filtro passa banda do tipo Transformada Rápida de Fourier (FFT, do inglês "*Fast Fourier Transform*"). Em seguida os envelopes correspondentes aos ritmos: delta (0 - 4 Hz), teta (4 - 8 Hz), alfa (8 - 16 Hz) e beta (16 - 32 Hz) foram extraídos pela Transformada de Hilbert.

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um registro do ECoG pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_\omega = \frac{\int_{v_s}^{v_e} |f(v)|^2 dv}{\int_{v_s}^{v_e} dv} \quad (1)$$

onde $f(v)$ é a Transformada de Fourier do sinal no domínio do tempo, aqui representado pelo ECoG. O $\overline{E}_\omega$ é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência $\omega = [v_s, v_e]$, aqui representado pelos diferentes ritmos. O cálculo da potência média de cada ritmo foi obtido utilizando uma rotina baseada no método de Welch (1967) e implementado no software MATLAB (The Mathworks, Natick, MA, EUA).

A complexidade do registro do ECoG foi calculada utilizando-se o método de Lempel-Ziv (CLZ) (Abásolo et al., 2014). Quando calculada a CLZ, obtém-se um número que está entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto similaridade.

Para cada onda cerebral foi feita a reconstrução do espaço de fase, obtido pela plotagem da série temporal contra ela mesma defasada no tempo por um dado tempo de retardo tempo (Lopes, 2013; Simão; Salmon; Carvalho, 2008), utilizando-se o software OriginPro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Em seguida, calculou-se a dimensão fractal dos atratores gerados, utilizando-se o método de *box counting* (contagem por caixas). Este método consiste em cobrir o objeto fractal com $N(r)$ caixas que contenham pelo menos um ponto (pixel) do objeto. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r . O ângulo de inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de box-counting (D_{bc}). A dimensão fractal pode ser definida formalmente através da equação:

$$D_{bc} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N_{(r+\varepsilon)} - \log N_{(r)}}{\log_{(r+\varepsilon)} - \log_{(r)}} \right] \quad (1)$$

$N_{(r+\varepsilon)}$ e $N_{(r)}$ são o número de caixas que cobrem a imagem em dois instantes diferentes, $r + \varepsilon$ e r são os tamanhos dos lados das caixas nesses dois instantes distintos.

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e teste *post-hoc* de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação interferiu no desenvolvimento cerebral dos animais, avaliados pela massa absoluta e relativa do cérebro (Fig. 1).

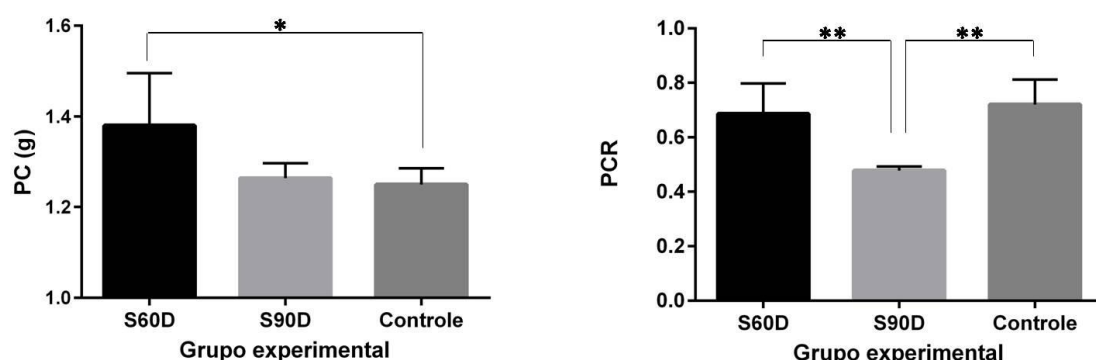


Figura 1. Valores de peso cerebral absoluto (g) e peso cerebral relativo dos animais avaliados aos 70 dias de idade. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes entre linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). (ANOVA e *post-hoc* de Tukey).

A suplementação de fêmeas na idade adulta, durante a gestação e amamentação com ômega-3 (EPA e DHA) proporcionou um maior peso cerebral da prole avaliada aos 70 dias de idade no grupo S60D em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Entretanto, a suplementação das matrizes a partir dos 90 dias de idade (S90D), não foi capaz de promover um ganho significativo de massa cerebral da correspondente prole, quando comparado ao grupo cujas mães não foram suplementadas (Controle). É possível que haja uma relação entre o início da suplementação com AGPI para uma adequada incorporação dos ácidos graxos no cérebro da prole durante os períodos peri e pós-natal.

Em estudo utilizando linhaça na ração de ratas durante o período de gestação e amamentação, Almeida (2007) encontrou desenvolvimento cerebral estatisticamente significativo na prole destes animais quando comparado ao grupo

controle, avaliados aos 30 dias pós-natal. De acordo com a autora, nessa fase o cérebro tem atingido praticamente o mesmo peso daqueles de animais na fase adulta.

Os AGPI são requeridos em todos os estágios reprodutivos. Antes da concepção, eles garantem níveis nutricionais adequados possibilitando que a fêmea tenha uma gestação satisfatória. Durante a gravidez, eles são necessários para o crescimento das glândulas mamárias, placenta, útero e feto. No terço final da gestação há um aumento rápido nos níveis de DHA na retina e cérebro do feto, com consequente aumento do peso do cérebro, o que justifica a importância de uma ingestão adequada de EPA e DHA neste momento (Morse, 2012).

A literatura traz uma série de estudos que buscam verificar a interferência da nutrição de fêmeas durante a gestação e a amamentação sobre o desenvolvimento cerebral e cognitivo da prole tanto em humanos quanto em outras espécies. Os AGPI ômega-3, em especial EPA e DHA, têm sido descritos como importantes nutrientes para um adequado desenvolvimento das funções do sistema nervoso na infância, adolescência e idade adulta (Morse, 2012; Tuzun et al., 2012).

O DHA, ômega-3 dominante no cérebro, é um componente importante das membranas celulares neuronais, afetando vários processos e vias neurológicas (Stonehouse, 2014). Estudos preliminares indicam que o cérebro mantém os níveis de DHA notavelmente constantes em espécies terrestres (Brenna; Carlson, 2014). Os resultados obtidos são consistentes com o fato de que a incorporação de DHA durante o desenvolvimento neonatal seja um fator limitante no desenvolvimento do cérebro adulto, como observado por outros autores.

Segmentos de 10 segundos do registro do ECoG de um animal de cada grupo são exibidos na figura 2. Os espectros de potência foram construídos a partir de cada segmento de ECoG e a potência média foi calculada em intervalos de frequência diferentes, correspondente aos diferentes ritmos.

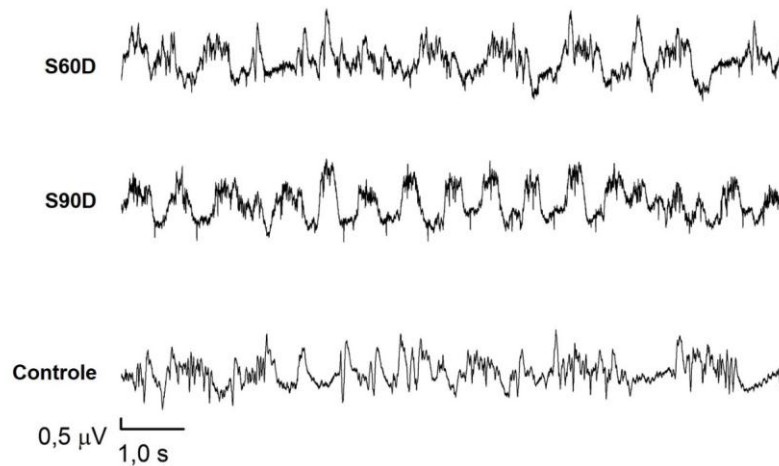


Figura 2. Segmentos de dez segundos do ECoG dos grupos: Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias.

O comportamento das potências das ondas é característica de cada animal, independentemente do tratamento realizado (Fig. 3). Em nosso experimento, o comportamento do espectro de potência evidenciou uma maior contribuição das ondas delta (0,5 – 4,0 Hz). Esse resultado se justifica, uma vez que durante o registro do ECoG os animais encontravam-se anestesiados e portanto, a atividade cerebral se caracteriza pela predominância de ondas de menor frequência. Isso é semelhante a padrões produzidos por outros anestésicos em humanos e ratos (Leung et al., 2014; MacIver; Bland, 2014; Pilge et al., 2014).

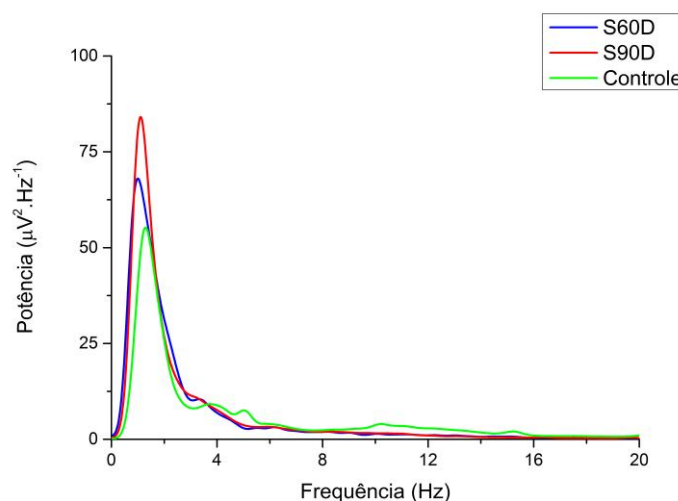


Figura 3. Exemplo do espectro de potência para um animal de cada grupo experimental. A energia de cada onda é calculada pela integral da área do intervalo de frequência correspondente das ondas: delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 16 Hz) e beta (16 – 20 Hz). S60D (verde) - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D (vermelho) - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos

90 dias de idade até o desmame das crias; Controle (verde)– Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. *p < 0.05 (ANOVA e post-hoc de Tukey).

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação às potências das ondas cerebrais entre os tratamentos, como pode ser observado na tabela 1. O ômega-3 não modificou o padrão de comportamento da atividade cerebral dos animais tratados (S90D e S60D) em relação aqueles do grupo Controle no que se refere a contribuição das frequências para o espectro de potências durante o registro do ECoG.

Tabela 1. Valores de potência média ($\mu\text{V}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$) das distintas ondas cerebrais e Complexidade de Lempel-Ziv dos registros do ECoG

Frequência		Delta (0,5 - 4 Hz)	Teta (4 - 8 Hz)	Alfa (8 - 16 Hz)	Beta (16 - 30 Hz)
Grupo experimental	N	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD
S60D	5	30,18 $\pm$ 3,40	3,06 $\pm$ 0,63	1,39 $\pm$ 0,27	0,33 $\pm$ 0,22
S90D	5	29,13 $\pm$ 0,90	3,32 $\pm$ 0,30	1,57 $\pm$ 0,22	0,33 $\pm$ 0,03
Controle	4	27,09 $\pm$ 5,19	4,26 $\pm$ 2,04	2,01 $\pm$ 1,08	0,47 $\pm$ 0,30
P		0,3646	0,2349	0,2513	0,5053

S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. CLZ - Complexidade de Lempel-Ziv. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas para os dados de Complexidade de Lempel-Ziv (Tab. 2). Os animais do grupo controle apresentaram maior média para este parâmetro em relação aos grupos tratados S60D ($p < 0,01$) e S90D ($p < 0,05$). Entretanto, a CLZ não divergiu entre os animais suplementados com ômega-3, independente do tempo de suplementação a complexidade de Lempel-Ziv foi maior no grupo Controle em relação aos animais dos grupos S60D e S90D, mostrando que a atividade cortical dos animais suplementados apresentou maior auto-similaridade, ou seja, o comportamento dos dados nesses animais apresentou maior nível de padronização em relação aos animais do grupo que não recebeu suplementação com EPA e DHA durante o período de desenvolvimento do tecido cerebral (períodos intra-uterino e de aleitamento materno).

286
287

Tabela 2. Valores obtidos para a Complexidade de Lempel-Ziv (média $\pm$ desvio padrão) dos registros do ECoG.

CLZ		
Grupo experimental	N	M $\pm$ SD
S60D	5	0,1780 $\pm$ 0,02a
S90D	5	0,1643 $\pm$ 0,01a
Controle	4	0,2349 $\pm$ 0,04b
P		0,0060

288
289
290
291

S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. CLZ - Complexidade de Lempel-Ziv. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

292
293
294
295
296
297
298

Valores de CLZ próximos a 1 correspondem a processos estocásticos não correlacionados. Já valores em torno de 0,05 correspondem a sinais periódicos, enquanto uma CLZ próxima a 0,2 é obtida para sinais quase-periódicos com harmônicos variáveis (Hornero; Aboy; Abásolo, 2007). Em nosso estudo, os valores da CLZ dos registros de ECoG dos animais dos grupos S60D, S90D e Controle apresentaram-se próximos a 0,2 indicando que atividade elétrica cortical é um sinal quase-periódico e não um sinal aleatório.

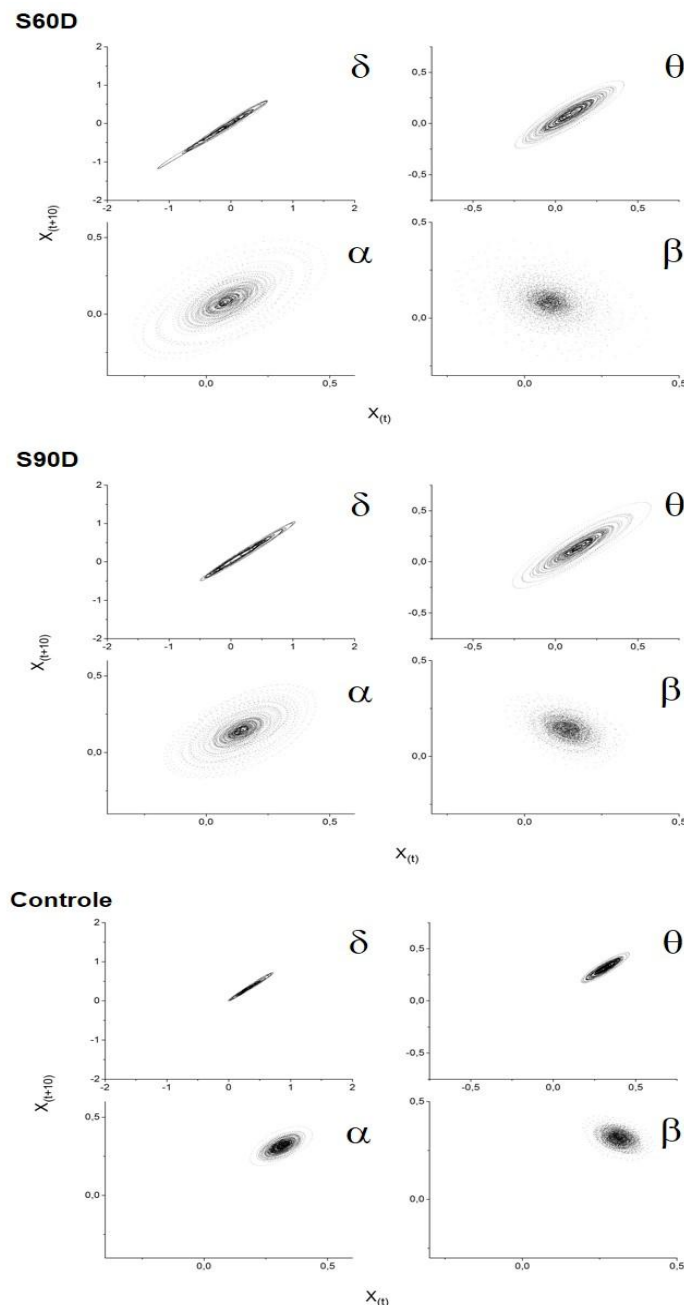
299
300
301
302
303
304

Uma vez que o DHA desempenha importante papel como regulador-chave em diversas funções cerebrais, é provável que uma maior incorporação de DHA no tecido nervoso dos animais suplementados modifique de alguma maneira a interação da cetamina com um ou vários de seus receptores, dentre eles os receptores glutamatérgicos, modulando a ação deste fármaco sobre a atividade elétrica cerebral por mecanismos diversos.

305
306
307
308
309
310
311

Os dados observados no presente trabalho corroboram com aqueles observados por outros autores (Hussain et al., 2013; Moreira et al., 2010). É importante ressaltar que a suplementação administrada em estágios perinatais pode ter consequências duradouras. Assim, a abundância de ômega-3 na dieta de fêmeas gestantes revela-se favorável nas atividades cerebrais também durante a fase juvenil, indicando que a suplementação de fêmeas gestantes e lactantes com ômega-3 pode produzir efeitos positivos sobre o desenvolvimento cerebral da prole.

312 A literatura tem descrito que a forma do atrator caótico pode ser mais eficiente
 313 para discernir variações no registro da atividade elétrica cerebral em ratos quando
 314 comparado à técnica da Transformada de Fourier (TF), tanto em animais em estado
 315 de alerta, quanto durante o sono e em diferentes planos anestésicos (MacIver;
 316 Bland, 2014).



317

318 Figura 4. Atratores obtidos para as ondas delta, teta, alfa e beta dos animais dos grupos
 319 experimentais. S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o
 320 desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o
 321 desmame das crias; Controle – Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o
 322 desmame das crias.

Entretanto, a inspeção visual do atrator obtido pode fornecer informações incorretas a respeito do comportamento do sistema, por se tratar de um método subjetivo de análise. Assim, tem-se buscado utilizar algoritmos matemáticos que possibilitem quantificar estes tipos de dados, como a dimensão fractal, que tem se mostrado capaz de identificar pequenas diferenças entre estruturas que visualmente parecem similares. A forma dos atratores variou entre os diferentes ritmos cerebrais e ainda entre os mesmos ritmos para os animais dos diferentes grupos (Fig. 4).

A suplementação com ômega-3 alterou a dimensão fractal do espaço de fase reconstruído do registro da atividade elétrica cerebral dos animais (Tab. 3). A dimensão fractal obtida pelo método de box-counting (D_{bc}) das ondas cerebrais teta e beta foi menor no grupo S60D quando comparado ao controle, porém não diferiu significativamente daquela do grupo S90D. Já a onda alfa foi diferente entre os tratamentos, com maior D_{bc} para o espaço de fase sendo observada no grupo Controle, seguido pelos grupos S90D e S60D, respectivamente. Para a onda delta não houve alteração da D_{bc} entre os grupos tratados e controle.

Tabela 3. Dimensão fractal (média $\pm$ desvio padrão) obtida pelo método de *box-counting* (contagem por caixas) para as ondas cerebrais dos animais dos grupos experimentais.

Frequência		Delta (0,5 - 4 Hz)	Teta (4 - 8 Hz)	Alfa (8 - 16 Hz)	Beta (16 - 30 Hz)
Grupo experimental	N	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD
S60D	15	1,419 $\pm$ 0,139	1,437 $\pm$ 0,021a	1,467 $\pm$ 0,021a	1,438 $\pm$ 0,017a
S90D	15	1,463 $\pm$ 0,028	1,428 $\pm$ 0,017a	1,446 $\pm$ 0,026a	1,419 $\pm$ 0,012ab
Controle	15	1,453 $\pm$ 0,077	1,491 $\pm$ 0,056b	1,516 $\pm$ 0,065b	1,472 $\pm$ 0,053b
P		0,5105	0,0017	0,0025	0,0026

S60D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 60 dias de idade até o desmame das crias; S90D - Prole cujas mães receberam ômega-3 a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias; Controle - Prole cujas mães receberam NaCl a partir dos 90 dias de idade até o desmame das crias. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A dimensão fractal do espaço de fase reconstruído permitiu verificar discretas alterações na configuração dos atratores das diferentes ondas cerebrais obtidas a partir do registro do ECoG, o que não foi observado quando utilizamos outros métodos de análise linear, como o espectro de potência. A dimensão reduziu-se nos animais cujas matrizes foram suplementadas quando comparada àquela dos

animais do grupo Controle, reforçando a idéia de que a incorporação de ômega-3 no tecido cerebral da prole e suas implicações na atividade elétrica destes animais.

A redução dessa dimensão, bem como da complexidade de Lempel-Ziv podem estar relacionadas a uma maior sincronização da atividade cerebral. Estudos de dinâmica não-linear do sistema nervoso em condições normais e patológicas mostram que a perda da complexidade dinâmica tem relação com um maior grau de sincronização local em indivíduos normais, enquanto a dinâmica local do cérebro na doença de Alzheimer, por exemplo, é mais complexa (com mais ruídos, menor linearidade e menor sincronização), como descrito por Stam (2005).

CONCLUSÕES

A suplementação com ômega-3 em ratas gestantes e lactantes tem influência sobre o peso cerebral absoluto e relativo, bem como sobre o padrão da atividade elétrica cerebral da prole avaliada aos 70 dias de idade.

A utilização de métodos de análise de dinâmica linear e não linear, como o espectro de potência, complexidade de Lempel-Ziv e dimensão fractal do espaço de fase reconstruído podem ser utilizados em conjunto para uma melhor avaliação de alterações da atividade elétrica cerebral em animais saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ABÁSOLO, D. et al. Lempel-Ziv complexity analysis of local field potentials in different coarse-graining techniques. **IFMBE Proceedings**, v. 41, p. 706–709, 2014.
- AVRAMOVIC, N. et al. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged wistar rats. **Hippokratia**, v. 16, n. 3, p. 241–5, jul. 2012.
- BOURRE, J. M. Brain lipids and ageing. **Food for the Ageing Population**, v. i, p. 219–251, 2009.
- BRENNAN, J. T.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. **Journal of human evolution**, v. 2014, p. 1–8, 26 abr. 2014.
- GENG, S. et al. Bifurcation and oscillation in a time-delay neural mass model. **Biological cybernetics**, 22 jul. 2014.
- GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 7–12, jan. 2011.

382 HORNERO, R.; ABOY, M.; ABÁSULO, D. Analysis of intracranial pressure during
383 acute intracranial hypertension using Lempel-Ziv complexity: Further evidence.
384 **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 45, p. 617–620, 2007.

385 HUSSAIN, G. et al. Fattening the brain: a brief of recent research. **Frontiers in cellular**
386 **neuroscience**, v. 7, n. September, p. 144, jan. 2013.

387 KATAKURA, M. et al. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal
388 differentiation in cultured rat neural stem cells. **Stem cells international**, v. 2013, p.
389 490476, jan. 2013.

390 KRAKOVSKA, A. Two Decades of Search for Chaos in Brain. **MEASUREMENT**, p.
391 90–94, 2009.

392 LEHNERTZ, K. Epilepsy and nonlinear dynamics. **Journal of biological physics**, v.
393 34, n. 3-4, p. 253–66, ago. 2008.

394 LEUNG, L. S. et al. Brain areas that influence general anesthesia. **Progress in**
395 **neurobiology**, v. 122C, p. 24–44, nov. 2014.

396 LOPES, S. B. D. **Teorema do mergulho de Takens: reconstrução do espaço de**
397 **fase de um sistema dinâmico usando séries temporais**. [s.l.] UNIVERSIDADE
398 TÉCNICA DE LISBOA, 2013.

399 MACHADO, B. S. et al. Spectral characteristics of the hippocampal LFP during
400 contextual fear conditioning. **Einstein** (São Paulo, Brazil), v. 10, n. 2, p. 140–4, 2012.

401 MACIVER, M. B.; BLAND, B. H. Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced
402 loss of righting in rats. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 8, n. October, p. 203,
403 jan. 2014.

404 MOREIRA, J. D. et al. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of
405 glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. **Neurochemistry**
406 **international**, v. 56, n. 6-7, p. 753–9, 2010.

407 MORSE, N. L. Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on
408 foetal and infant brain development and function following maternal supplementation
409 during pregnancy and lactation. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 799–840, jul. 2012.

410 PESSOA, D. T. **Análise não linear de padrões eletroencefalográficos de ratos**
411 **normais e em status epilepticus submetidos a dieta normal e hiperlipídica**. [s.l.]
412 Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

413 PILGE, S. et al. Burst suppression-MAC and burst suppression-CP₅₀ as measures of
414 cerebral effects of anaesthetics. **British journal of anaesthesia**, v. 112, n. 6, p.
415 1067–74, jun. 2014.

416 SARBADHIKARI, S. N.; CHAKRABARTY, K. Chaos in the brain: a short review
417 alluding to epilepsy, depression, exercise and lateralization. **Medical Engineering &**
418 **Physics**, v. 23, n. 7, p. 447–457, set. 2001.

419 SAVI, M. **Dinâmica não-linear e caos**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços
 420 Editoriais Ltda, 2006. p. 304

421 SILVA, J. E. S.; MOURA, A. M. A.; NOGUEIRA, R. A. Efeito dos ácidos graxos
 422 essenciais sobre lipídemia e vascularização da membrana vitelina de codornas
 423 japonesas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p.
 424 1603–1612, dez. 2012.

425 SIMÃO, E. M.; SALMON, C. E. G.; CARVALHO, D. Z. Determinação dos Parâmetros
 426 de Reconstrução do Espaço de Fase para Séries de Sinais de EEG de Sono de
 427 Pacientes com Apnéia Obstrutiva. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2008.

428 STAM, C. J. Nonlinear dynamical analysis of EEG and MEG: Review of an emerging
 429 field. **Clinical Neurophysiology**, v. 116, p. 2266–2301, 2005.

430 STONEHOUSE, W. Does Consumption of LC Omega-3 PUFA Enhance Cognitive
 431 Performance in Healthy School-Aged Children and throughout Adulthood? Evidence
 432 from Clinical Trials. **Nutrients**, v. 6, n. 7, p. 2730–58, jan. 2014.

433 TUZUN, F. et al. Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates
 434 hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. **International Journal of**
 435 **Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 4, p. 315–23, jun. 2012.

436 VARGHESE, J. P. et al. Frequency characteristics of cortical activity associated with
 437 perturbations to upright stability. **Neuroscience letters**, v. 578, p. 33–8, 22 ago.
 438 2014.

439 VITALI, C.; WELLINGTON, C. L.; CALABRESI, L. HDL and cholesterol handling in
 440 the brain. **Cardiovascular research**, v. 103, n. 3, p. 405–413, 1 ago. 2014.

441 WANG, X. et al. Research on the relation of EEG signal chaos characteristics with
 442 high-level intelligence activity of human brain. **Nonlinear biomedical physics**, v. 4,
 443 n. 1, p. 2, jan. 2010.

444 WELCH, P. D. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power
 445 Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms.
 446 IEEE Transactions on Information Theory, v. 15, n. 2, p. 70–73, 1967.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo do desenvolvimento desta tese, verificamos os efeitos da suplementação com ômega-3 em ratas Wistar durante os períodos pré-gestacional, gestacional e de aleitamento materno sobre o desenvolvimento corporal da prole em relação ao grupo controle, avaliados ao nascer, ao desmame, aos 30, 60 e 70 dias de idade. Em relação aos momentos avaliados, o peso corporal dos animais só variou significativamente aos 70 dias de idade.

A suplementação de matrizes com ômega-3 durante 30 e 60 dias pré-acasalamento modificou os perfis lipídico e glicêmico das proles em relação aos animais do grupo que não recebeu suplementação. Os ácidos graxos EPA e DHA exerceram efeitos sobre os níveis de glicose e colesterol total séricos dos animais, sem modificar os triglicerídeos nestes últimos. É provável que essas alterações interfiram no metabolismo energético dos animais e consequentemente em sua atividade elétrica cerebral.

Em relação ao desenvolvimento cerebral e atividade elétrica cortical, observamos que o ômega-3 em ratas gestantes e lactantes teve influência sobre o peso cerebral absoluto e relativo final (70 dias de idade) da prole. Nos animais neonatos, a densidade média de células piramidais do grupo S60D foi menor do que aquela observada no grupo S90D. Entretanto, essa relação se inverte, com um aumento significativo no número de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo no grupo S60D e drástica redução desse parâmetro nos animais do grupo S90D, ambos avaliados aos 60 dias de idade.

Os dados obtidos demonstraram que um período de suplementação mais longo possibilita uma maior biodisponibilidade de AGPI ômega-3 nas matrizes, com consequente transferência via placenta e aleitamento para a prole. Como consequência, há um maior acúmulo de DHA no tecido cerebral, o que interfere diretamente sobre o padrão da atividade elétrica cerebral da prole, como foi observado neste trabalho, em animais avaliados aos 70 dias de idade. Isto, por sua vez pode ter impactos positivos sobre os processos de memória e aprendizagem, inclusive a longo prazo.

Os métodos de análise utilizados neste trabalho, como o espectro de potência, a complexidade de Lempel-Ziv e a dimensão fractal do espaço de fase reconstruído possibilitaram verificar as alterações dos padrões da atividade elétrica cortical obtida a partir do registro do ECoG nos animais dos grupos experimentais. Estes métodos matemáticos e computacionais são importantes ferramentas que podem ser aplicadas para avaliação de alterações em indivíduos saudáveis, bem como naquelas alterações decorrentes dos vários processos neuropatológicos que modificam a atividade cerebral, uma vez que esta atividade possui caráter dinâmico e não-linear. Essa característica caótica do sistema nervoso, que permite rápidas transições de estado é crucial para o processamento de informações, permitindo que o indivíduo tenha uma maior variedade de respostas às mudanças abruptas do meio no qual está inserido.