

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Victória Maria Rossetti Pereira

**“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS ADULTOS EXPOSTOS A ESTRESSE
CRÔNICO. ”**

Uberlândia

2019

VICTÓRIA MARIA ROSSETTI PEREIRA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3 SOBRE
COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A ESTRESSE CRÔNICO.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado a
Universidade Federal de Uberlândia, como
parte das exigências para a obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Erika Renata Barbosa Neiro

Uberlândia, 25 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Erika Renata Barbosa Neiro
Docente do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Prof^a. Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Docente do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biomédicas

Dra. Simone Ramos Deconte
Técnica Administrativa dos Laboratórios da ARFIS
Instituto de Ciências Biomédicas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu guia protetor, que sempre me protegeu para que eu pudesse desempenhar meus desafios diários.

Agradeço especialmente os meus pais Marcos Roberto Pereira e Daniela Cecília Rossetti pelo amor, pelo cuidado, pela paciência e compreensão em todo o meu caminhar da vida. Sem eles não seria possível realizar o meu sonho em fazer este curso.

Aos meus melhores amigos Thallys Félix, Júlia Almeida Moraes, Patrick Martins, Bruno Guerra, que sem eles eu não conseguiria passar pelas dificuldades e pelas alegrias de uma vida longe de casa. Sou eternamente grata pela família que construímos.

Á Mariana Sozza, minha companheira de projeto e de vida. Obrigada pela ajuda extraordinária para a conclusão desse projeto, e por fazer ser uma parte tão maravilhosa da minha vida.

Á Marcela Machado, que juntas nos desafiamos a desenvolver esse projeto e conseguimos realiza-lo com efetividade. Obrigada por se tornar uma grande amiga no meio das dificuldades da vida acadêmica.

Um agradecimento excepcional à minha orientadora Erika Barbosa Renata Neiro, que me auxiliou e contribuiu para a realização deste projeto. Obrigada pela ajuda, paciência, dedicação, pelo carinho e por acreditar na minha capacidade para desenvolver este trabalho.

Agradeço imensamente a Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, pela colaboração, pela dedicação, pelo cuidado e pela disponibilidade em me ajudar a realizar o trabalho.

RESUMO:

A deficiência de ácidos graxos os quais são componentes da membrana fosfolipídica do sistema nervoso central pode acarretar em vários tipos de transtornos psiquiátricos. Alterações na proporção destas substâncias afeta negativamente os neurotransmissores dopamina e serotonina, os quais são responsáveis por controlar os estados de humor. O transtorno de ansiedade social é comumente encontrado nos dias atuais e relaciona-se com a desregulação destes neurotransmissores modificando a atividade neuronal. Pesquisas realizadas indicam que baixas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados Ômega 3 nas membranas estão intimamente ligadas a severidade deste distúrbio. Desse modo, muitos fármacos são prescritos para pacientes com estes transtornos, entretanto são relatados diversos efeitos colaterais prejudiciais na administração destes. Assim, este trabalho tem como objetivo utilizar o Ômega 3 como um composto natural e alternativo para tratamento deste distúrbio. Para isto utilizaram-se 48 machos adultos de camundongos Balb/c divididos em quatro grupos. Destes grupos, dois grupos suplementado via gavagem com a dosagem de 0,03 ml de óleo de peixe contendo ácidos graxos Ômega 3 (DHA e EPA) e dois grupos com água, sendo duas vezes ao dia durante quatorze dias. Uma vez por dia, durante duas horas, dois grupos administrados com água e ômega 3 foram induzidos ao estresse crônico em um aparato de acrílico. Após isto, todos os animais foram submetidos aos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado e foram avaliados quanto a presença de comportamentos do tipo ansiosos a partir de parâmetros relacionados a esses testes. Os dados obtidos não demonstraram diferença significativa entre os grupos, inferindo que o Ômega 3 nessa dosagem não foi capaz de alterar os comportamentos dos camundongos.

“Palavras-chave”: Ômega 3. Ansiedade. Estresse Crônico .

ABSTRACT

Fatty acid deficiency is a component of the central nervous system membrane that can become a type of psychiatric disorder. The changes occurred negatively in the dopamine and serotonin neurotransmitters, which are responsible for mood states. Social anxiety disorder is found today and is related to a derangement of these neurotransmitters modifying a neuronal activity. Paper investigations containing the rates of omega-3 polyunsaturated fatty acids in membranes closely linked to the severity of this disorder. Thus, many drugs are prescribed for patients with these disorders, since they are controlled by their patients under administration. Thus, this work aims to use omega 3 as a natural and alternative compound for the treatment of this disorder. For this purpose, 48 adult males of Balb / c mice are divided into four groups. Of these groups, two groups were supplemented via gavage with a dosage of 0.03 Ml with fish oil with Omega 3 fatty acids (DHA and EPA) and two groups with water, being twice a day for fourteen days. Once a day, for two hours, two groups administered with water and omega 3 were included in stress in an acrylic apparatus. After this, and the tests were to the tests of field and open the Labeled on Cross elevated and were tested to the presence of behavior ansiest to partid from data related to these tests. The obtained data did not demonstrate the difference between the groups, inferring that Omega 3 was not able to change the behavior of the mice.

"Key words": Omega 3. Anxiety. Chronic Stress. Treatment.

LISTA ABREVIATURAS

AGPI - Ácidos Graxos Poli-insaturados

AGPI- O3 – Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega 3

AGPI- O6 – Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega 6

AA – Ácido Araquidônico

ALA – Ácido Alfa-linolênico

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

DHA – Ácido Docosahexaenóico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

GLA – Ácido Gama-linolênico

LA – Ácido Linolênico

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

SOCS-2 - Inibidor de Sinalização de Citocinas

TCA – Teste de Campo Aberto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivos gerais.....	13
2.3 Objetivos específicos.....	13
3. METODOLOGIA.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Delineamento experimental.....	15
3.3. Etapas do experimento.....	15
3.4. Metodologia de administração do Ômega 3/ou água	16
3.5. Metodologia de indução do estresse crônico	17
3.6. Eutanásia dos animais.....	17
3.7. Análises estatísticas.....	17
4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	18
4.1. Teste de Campo Aberto.....	18
4.2. Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Teste de Campo Aberto.....	20
5.2. Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	23
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
9. ANEXO I.....	41

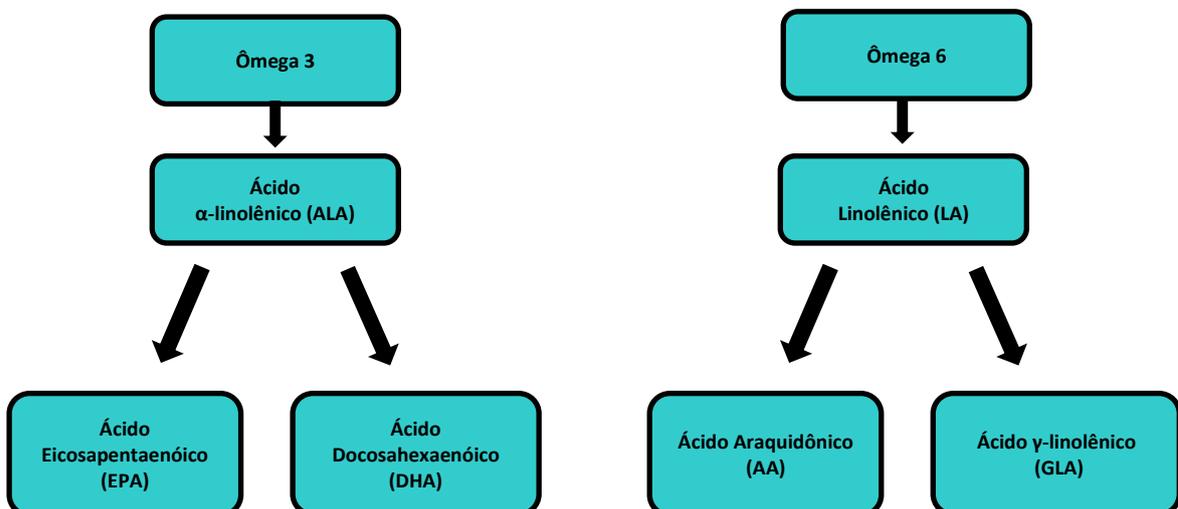
1. INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos transtornos psiquiátricos acometem a população mundial à medida que os indivíduos buscam um sucesso integral em todos os ramos em que ele está inserido como família, trabalho, e físico-estético. A partir disso, o indivíduo provoca uma grande pressão psicológica sobre si, e devido a correria do dia, a alimentação fica desbalanceada, culminando para desregulações fisiológicas.

Os fosfolipídios são um componente importante das membranas celulares, e são compostos por duas grandes caudas de ácidos graxos hidrofóbicas e uma cabeça hidrofílica (polar) que contém fosfato. O encéfalo é uma estrutura rica em fosfolipídios, os quais compõem aproximadamente 25% do seu peso seco (UAUY; DANGOUR, 2006; LUCHTMAN; SONG, 2013). Os fosfolipídios contêm ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como o Ômega 3 (O3) e Ômega 6 (O6), os quais são parte integrante e possuem elevada proporção nas membranas celulares neuronais (TASSONI, 2008) podendo apresentar um papel facilitador na transmissão de sinais interneuronais (CUNNANE et al., 2013).

Os principais representantes da família Ômega 3 são o ácido α -linolênico (ALA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), sendo ALA precursor dos demais; e os da família ω 6 são ácido araquidônico (AA), o ácido linolênico (LA), ácido γ -linolênico (GLA), visto que LA é precursor dos restantes (ANDRADE e CARMO, 2006; SILVA, 2018).

Figura 1. Esquema dos ácidos precursores e derivados do Ômega 3 e Ômega 6.



Em humanos, os ácidos LA e ALA são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos, também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, além de auxiliar na síntese da hemoglobina e da divisão celular (MARTIM *et al.*, 2006).

Estes ácidos graxos são considerados essenciais para humanos devido à limitada ação sintética das dessaturases e elongases que fazem as duplas ligações entre os carbonos 3-4 e 6-7 (ABEDI; SAHARI, 2014; ZÁRATE *et al.*, 2017, ERDINEST *et al.*, 2012). Portanto os AGPI- O3 são obtidos por meio da dieta rica em de óleos de peixes (sardinha e salmão) e óleos vegetais (linhaça e canola), enquanto os AGPI- ω 6 podem ser obtidos a partir de plantas oleaginosas (girassol e milho) (SU, 2009).

Pesquisas desenvolvidas pelo Institute Of Medicine (2002) e por Martin (2006) descrevem a existência de um equilíbrio na relação da quantidade entre os AGPI-O6 e AGPI-O3, a qual seria aproximadamente 10 a 5:1, respectivamente. Visto isso, um desequilíbrio na proporção entre os ácidos graxos da família O3 e O6, provavelmente contribuiu para o aumento da prevalência de uma série de doenças crônicas, algumas que afetam o sistema nervoso central (GREEN *et al.*, 2006).

A partir dos estudos de Simopoulos (1999) e Silva *et al.*, (2018) demonstrou-se que, no mundo oriental há uma dieta (“Dieta Mediterrânea”) rica em AGPI, devido à alimentação a base de óleos de oliva, vegetais, entre outros. Já no Ocidente há uma deficiência significativa na dieta de AGPI-O3 (“Dieta Ocidental”), pois o maior consumo é de gorduras trans encontradas nos “fast foods” (EDWARDS, 2011). Visto que altas taxas de colesterol, presente na dieta ocidental, aumentam o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, e que a alimentação com baixo teor de gorduras saturadas reduz o risco de demência, isto confirma o papel importante da dieta em mecanismos patológicos relacionados ao cérebro.

Uma pesquisa de Clarke (2001) mostrou que os AGPI não são apenas utilizados como fonte energética para o organismo e componentes estruturais celulares, eles também atuam como importantes mediadores da expressão gênica, além da síntese de tecidos (ANDRADE e CARMO, 2006; YODIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). Ademais, pesquisas descrevem que o

consumo destes revela uma prevenção, redução e é indicado como um tratamento não farmacológico em algumas doenças neurológicas (ANDERSON *et al.*, 2011).

Os ácidos DHA (proveniente do Ômega 3) e o AA (advindo do Ômega 6) são importantes componentes estruturais do encéfalo, e a proporção de DHA para ácido araquidônico e outros ácidos graxos no encéfalo afeta o funcionamento de inúmeras células (OWEN *et al.*, 2008). A taxa de conversão endógena de ALA para DHA é pequena (PAWLOSKY *et al.*, 2001) assim como a conversão de LA para AA, no entanto esta é contabilizada estatisticamente como aproximadamente 5%, sendo 10 vezes maior que a primeira (PEET; GLEN; HORROBIN, 1999). Portanto, é de extrema importância o elevado consumo de alimentos que contenham estes componentes.

O DHA é presente em maior quantidade no encéfalo e entre os AGPI-O3 é o mais importante fisiologicamente para funções cerebrais (MARSZALEK; LODISH, 2005; BOURRE, 2004), afetando o seu desenvolvimento e a neuroplasticidade (WU *et al.*, 2008). Pesquisas realizadas por Chalon (2006) e Tassoni (2008) relatam que baixo conteúdo de DHA tem efeitos críticos sobre o desenvolvimento neuronal, podendo acarretar mudanças na aprendizagem, memória, nas respostas auditivas e olfativas.

A presença do DHA influencia na fluidez da membrana, funcionamento de enzimas, canais iônicos, afinidade e expressão de ligação ao receptor (LITMAN *et al.*, 2001; OWEN, 2008), além da regulação da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica (ZIMMER *et al.*, 2000). A regulação da síntese de eicosanoides, importantes mensageiros químicos em relação a respostas inflamatórias, derivados do AA, auxilia como precursor dos docosatrienos e resolvinas, os quais detêm de propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras (CALDER, 2006; TASSONI, 2008), participa do desenvolvimento da placenta, do crescimento e desenvolvimento neuronal do feto envolvendo-se no crescimento e proteção de células neuronais contra apoptoses (AHMAD *et al.*, 2002; TASSONI, 2008).

A suplementação de DHA e EPA em períodos críticos de desenvolvimento (gestação e lactação) pode ser benéfica para a saúde da criança na maturação cortical, sinaptogênese e mielinização, podendo também reduzir o risco de déficits cognitivos e psicopatológicos na idade adulta (VINES *et al.*, 2012), além de diminuir a chance de uma depressão materna pós-parto (LOTTENBERG, 2009).

Demonstrou-se que níveis plasmáticos elevados de DHA na mãe e particularmente no leite materno, estão diretamente relacionados ao melhor crescimento e desenvolvimento do encéfalo e do sistema visual em crianças (CLANDININ *et al.*, 1980). Recentemente, revelou-se que a redução maternal da ingestão de AGPI-O3 está relacionada com a prevalência de distúrbios neuropsiquiátricos nos filhos quando adolescentes (MORGESE; TRABACE, 2016).

As resolvinas e neuroprotectinas, produzidas a partir do DHA, as quais têm a capacidade de neutralizar a neuroinflamação, atuam na otimização do fornecimento de energia para as células funcionalmente mais importantes do organismo, incluindo as células do sistema imunológico (GRIMM *et al.*, 2002). Assim como os eicosanoides produzidos a partir do AA, como lipoxinas, que promovem uma resposta antinflamatória por meio da ligação de um receptor acoplado à proteína G levando à expressão de um inibidor de sinalização de citocinas (SOCS-2) (MACHADO *et al.*, 2006). Portanto, há uma redução do quadro pró-inflamatório no organismo.

A diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias por meio destes compostos ácidos é importante visto que pacientes que apresentaram sintomas depressivos isolados e relacionados à ansiedade, como fadiga, função cognitiva prejudicada, insônia e raiva indicaram uma elevação na quantidade de citocinas (MARQUES *et al.*, 2007). Desse modo, a ingestão de Ômega 3 e Ômega 6 contribuiria positivamente para um efeito neuroprotetor, evitando o surgimento destas doenças.

Dados sugerem que uma desregulação entre DHA e EPA podem afetar a produção e a função de neurotransmissores como a dopamina e a serotonina, os quais participam dos sistemas neurais que regulam estados de humor (DU BOIS *et al.*, 2006; FENTON *et al.*, 2000) sendo que alterações dopaminérgicas ocorrem em ratos com dietas deficientes em Ômega 3 (FEDOROVA *et al.*, 2009). De acordo com as recomendações do *Food and Nutrition Board of the National Academies* (Institute of Medicine – USA, setembro de 2002) a ingestão de ácidos graxos essenciais deve ser em torno de 10% do total de lipídios na dieta, sendo que este valor varia de 5 a 10% para os AGPI- ω 6 e de 0,6 a 1-2% para os AGPI-O3.

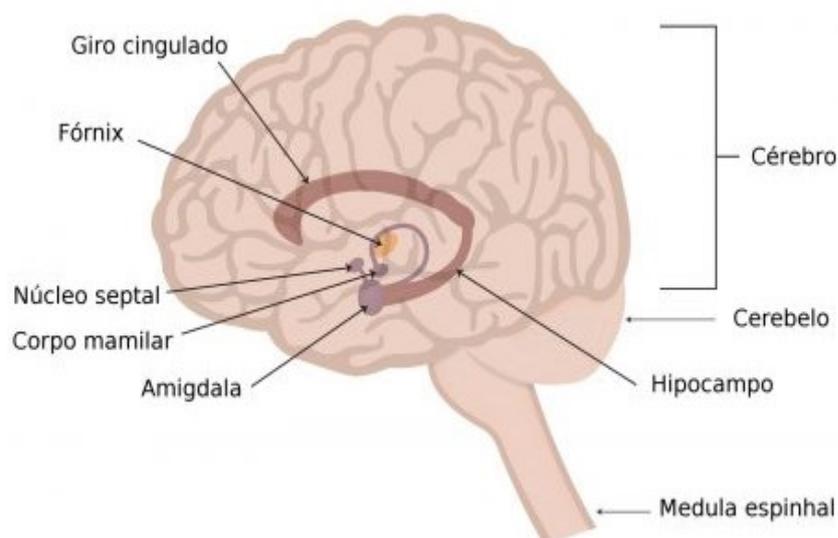
Vários transtornos psiquiátricos estão associados com alterações na composição da membrana fosfolipídica no sistema nervoso central. Mecanismos celulares implicados em transtornos psiquiátricos, tais como transtorno afetivo bipolar (MANJI; LENOX, 2000) e

esquizofrenia são afetados pela composição de ácidos graxos essenciais no tecido neural (WAINWRIGHT, 2002; INNIS, 2000).

Ademais, HIBBELN *et al.*, (1998), SALEM (2001) observaram que baixos níveis de AGPI-O3 e altos níveis de AGPI-O6 estão associados a depressão e transtornos de ansiedade, sendo que alguns indicadores comportamentais e endócrinos de estresse psicológico e ansiedade foram atenuados pela administração de AGPI-O3 em humanos (HAMAZAKI *et al.*, 1996).

O transtorno de ansiedade social é um dos distúrbios psiquiátricos mais comumente relatados (KIM; YOON, 2018). As principais hipóteses sobre o surgimento de transtornos de ansiedade implicam em uma desregulação dopaminérgica e serotoninérgica central (STEIN *et al.*, 2002; SCHNEIER *et al.*, 2000; MATHEW *et al.*, 2001). Nestes transtornos há alteração na atividade neuronal nos centros cerebrais relacionados ao estresse, tais como a amígdala, hipotálamo e o giro cingulado (ROSS, 2009). Este distúrbio é caracterizado por um medo excessivo e/ou prevenção de situações em que o indivíduo se sente observado por outros (GREEN *et al.*, 2006). Os indivíduos também o definem como uma sensação vaga e difusa, desagradável, de apreensão expectante acompanhada de diversas manifestações físicas como falta de ar, dores de cabeça, aceleração do batimento cardíaco, entre outros (KIM, YOON, 2018).

Figura 2. Centros cerebrais relacionados ao estresse: amígdala, giro cingulado e hipotálamo.



Estudo realizado por GREEN *et al.*, (2006) aponta para uma relação entre o grau de deficiência do AGPI-O3 aferido em hemácias e a gravidade do transtorno de ansiedade. Observou-se que as concentrações de ALA e DHA foram reduzidas significativamente em hemácias dos pacientes que apresentam este distúrbio em situação grave. Além disto, estes indivíduos apresentavam uma oscilação na razão Ômega 3 e Ômega 6 -excedente aos valores padrões- na membrana eritrocitária quando comparados a indivíduos do grupo controle (SUBLETTE *et al.*, 2011), indicando uma correlação entre a presença da severidade do distúrbio e a baixa quantidade de Ômega 3 nos pacientes.

Por outro lado, foram observados que maiores níveis de EPA foram associados à diminuição da ansiedade. Um estudo realizado por Kiecolt-Glaser (2011) com estudantes demonstrou que aqueles que receberam AGPI-O3, apresentaram uma redução de 20% dos sintomas da ansiedade, comparados aos modelos controle. Além disso, um estudo observou que a efetividade do Ômega 3 está relacionada à razão EPA/DHA que compõe o produto, evidenciando que aqueles estudos em que o Ômega 3 suplementado possuía um mínimo de 60% de EPA apresentaram resultados benéficos significativos sobre tal transtorno (SUBLETTE *et al.*, 2011).

O Índice de Desenvolvimento Mental avaliou que fórmulas que fornecem um mínimo de 0,35% de suprimento dietético precoce de DHA melhora significativamente o desempenho mental. Nas análises de Tsukada *et al.*, (2000) demonstrou-se que a suplementação em macacos senis com DHA de 1 a 4 semanas (uma suplementação dietética de curto prazo) levou ao aumento regional do fluxo sanguíneo encefálico, um parâmetro que está intimamente ligado à ativação neuronal. A partir da observação de que a deficiência de Ômega 3 e sua suplementação desempenham um papel na utilização de glicose cerebral em ratos, isto poderia fundamentar mudanças comportamentais com tratamentos dietéticos de Ômega 3. Existe uma hipótese que AGPI-O3 promove a melhora dos desempenhos cognitivos em primatas não-humanos (Lêmure) através do reforço da utilização da glicose do encéfalo (VINOT, *et al.*, 2011).

Muitos mecanismos são sugeridos para explicar a ligação entre Ômega 3 e desordens psiquiátricas, incluindo: alterações nas funções das membranas; estabilização do humor; aumento na expressão de BDNF (Fator Neurotrófico derivado do encéfalo - proteína envolvida na estimulação da neurogênese e neuroproteção, incluindo sobrevivência neuronal,

arborização dendrítica, plasticidade sináptica e neurodesenvolvimento), redução da inflamação e, por fim, mudança na síntese de eicosanoides, docosatrienos e de genes do sistema nervoso central (CORTES *et al.*, 2013).

A partir do frequente número de casos de distúrbios psiquiátricos, vários fármacos, provenientes de diversas classes terapêuticas têm sido prescritos aos pacientes com estes transtornos, apresentando comprovada eficácia na redução dos sintomas. Entretanto, todas essas substâncias apresentam efeitos colaterais inconvenientes, o que justifica a busca por novas substâncias ansiolíticas mais naturais. É possível afirmar que o Ômega 3 é necessário como auxílio na funcionalidade cerebral (plasticidade, neurogênese, etc) ao se fazer presente nas membranas celulares neuronais. Diante desses fatos, esse estudo propõe a análise dos efeitos da suplementação de Ômega 3 em camundongos machos previamente estressados em relação à diminuição dos sintomas ansiogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do estresse crônico sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos (Balb/c) suplementados com Ômega 3.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do estresse crônico por meio da restrição de movimento para a indução de comportamentos do tipo ansiosos em camundongos avaliados pelos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevada;

-Estudar os efeitos da suplementação com Ômega 3 na redução dos comportamentos do tipo ansiosos nos animais que passaram por protocolo de estresse crônico.

3. METODOLOGIA:

3.1. Animais:

Os experimentos realizados e cujos resultados são apresentados no presente trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), com protocolo de nº 112/17, de acordo com os princípios éticos aprovados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O estudo foi realizado com camundongos machos da linhagem Balb/c (*Mus musculus*) fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR/UFU). Foram utilizados 48 camundongos da linhagem Balb/c, com idade de 60 dias.

Ao longo de todo o tempo de experimentação foram mantidas as condições padrões de luz (12h :12h, claro: escuro) e alimentação (*ad libitum*), com bebedouros com água potável e filtrada.

Figura 1. Caixa e modelo de estante para armazenamento de camundongos com fluxo de ar isolado para evitar contaminação.



Fonte: <https://www.alescobrasil.com.br/estantes-basic>

3.2. Delineamento Experimental:

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais aleatoriamente, com um N amostral de 11 a 14 animais por grupo:

Grupo H2O/SE: animais **não** submetidos a estresse por restrição de movimento e que receberam água no lugar do Ômega 3 por gavagem.

Grupo H2O/E: animais submetidos a estresse por restrição de movimento e que receberam água por gavagem.

Grupo O3/SE: animais **não** submetidos a estresse por restrição de movimento e suplementados com Ômega 3 por gavagem.

Grupo O3/E: animais submetidos a estresse por restrição de movimento e suplementados com Ômega 3 por gavagem.

3.3. Etapas Dos Experimentos

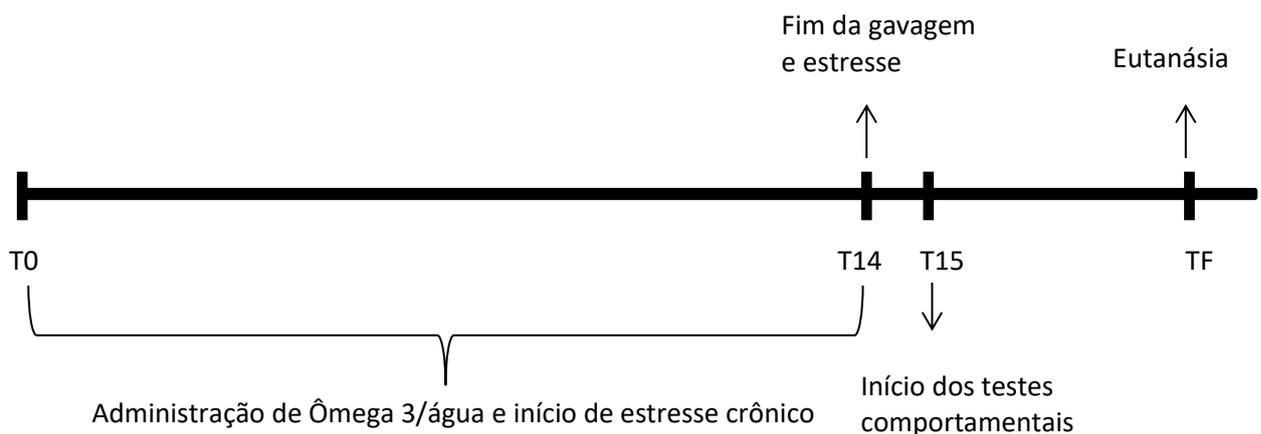
O experimento foi dividido em quatro etapas, conforme representado no esquema abaixo:

(Etapa 01): A solicitação dos animais;

(Etapa 02): Ao atingirem a idade adulta (P60), iniciaram-se as administrações de Ômega 3 por meio da gavagem (2 vezes/dia; T 01 até T 14 dias), sendo que após 45 minutos da gavagem, os animais eram submetidos ao protocolo de estresse crônico descrito adiante no texto (item 4.4);

(Etapa 03): Posteriormente as semanas da indução do estresse e da gavagem começaram os testes comportamentais (T- 15-);

(Etapa 04): No final dos testes comportamentais foi realizada a eutanásia dos animais.



Os animais foram monitorados diariamente desde que recebidos pelo REBIR; foram observados quanto ao seu estado geral de saúde, analisando-se padrões de atividade normal para roedores (como “grooming” e “licking”, referentes aos cuidados do animal como o próprio pelo).

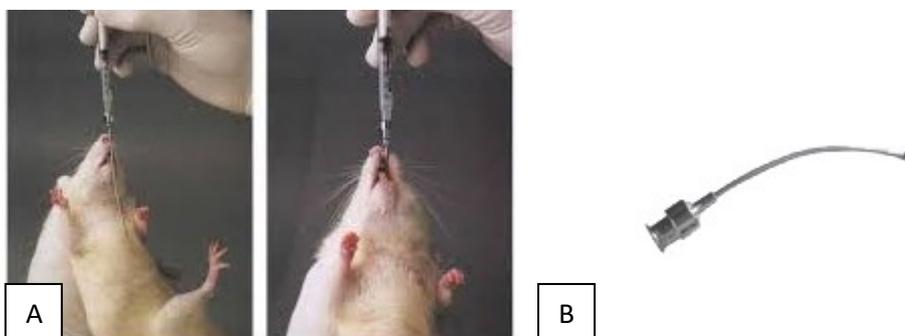
3.4. Método de administração de Ômega 3 ou água

A suplementação com Ômega 3 da marca B-Well (1000 mg) foi de 1,4 g de óleo de peixe sendo que 0,17g de ácido eicosapentaenoico (EPA) e 0,13g ácido docosahexaenóico (DHA) nos grupos O3/E e O3/SE, e água deionizada nos grupos H2O/E e H2O/SE.

A aplicação das substâncias foi realizada por gavagem (Figura 2a), uma técnica que utiliza uma seringa conectada a uma cânula curvada com a ponta arredondada (Figura 2b) e é introduzida na boca do animal passando pelo esôfago até o estômago. As cânulas utilizadas para camundongos são de 4 centímetros de comprimento. O volume indicado para camundongos é de 1 ml de solução para cada 100g de peso corporal.

O volume utilizado para cada camundongo foi, portanto, de aproximadamente 0,03 mL e perdurou por 14 dias, a qual foi aplicada 45 minutos antes a submissão dos animais ao protocolo de estresse crônico. Para isto, os animais foram imobilizados segurando-os na parte da cabeça e apoiando o rabo entre os dedos. A administração foi realizada no período da manhã, por volta das 09h15min e a tarde às 16h30min.

Figura 2. a) Método de gavagem em camundongo. b) Cânula de gavagem.



a)Fonte: Trabalho USP – via de administração b)Fonte: <http://www.avsprojetos.com.br/produtos/categoria>

Figura 3. Embalagem da B-Well contendo cápsulas gelatinosas Ômega 3.



Fonte: <https://www.drogaraia.com.br/b-well-omega-3-com-180-capsulas-gelatinosas.html>

3.5. Método de indução de estresse crônico

O protocolo seguido para indução de estresse crônico foi o de restrição de movimento e ocorreu em um aparato de acrílico cilíndrico individual fechado, apenas com pequenos furos para circulação de ar e para a passagem a cauda do animal. Os animais permaneceram no aparato por duas horas diárias no período da manhã durante 14 dias.

Figura 4. Aparato de acrílico para indução de estresse.



3.6. Eutanásia dos animais

Ao final dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados (sigla TF da etapa 4.2) a fim de prevenir qualquer dano ou sofrimento desnecessário, por meio de relaxante muscular anestésico com solução de cetamina 80mg/Kg e xilasina 10mg/Kg injetada por via

intraperitoneal, seguido de deslocamento cervical. As carcaças foram acondicionadas a -20°C até o momento de descarte definitivo pelos técnicos do REBIR.

3.7. Análises estatísticas

Os vídeos gravados durante os testes comportamentais foram documentados e analisados criteriosamente para a geração do dado estatístico final utilizando-se Two-Way ANOVA, programa: SYSTAT versão 12. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM) e com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos. Além disto, realizou-se o pós-teste de Tukey para a comparação entre os grupos.

4. TESTES COMPORTAMENTAIS:

Foram realizados os testes: Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado detalhados abaixo:

4.1. Teste De Campo Aberto (TCA)

O Teste de Campo Aberto é amplamente utilizado na avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade. Para essa avaliação foi utilizado um aparato de acrílico circular com base de 90 cm de diâmetro circundado por uma parede de 60 cm de altura cuja área é dividida em quadrantes periféricos (adjacentes à parede) e centrais. Os animais foram inicialmente colocados no centro do aparato e avaliados de acordo com a atividade locomotora (número de quadrantes percorridos), o número de comportamentos de levantar (elevação das patas dianteiras com exploração do ambiente) e o tempo gasto tanto no centro quanto na periferia do aparato.

O protocolo experimental foi realizado em duas fases: uma fase de habituação ao aparato em que cada animal foi colocado no recipiente e mantido por 5 minutos e após 24h a fase de teste, onde cada animal foi colocado novamente no recipiente e seus comportamentos foram filmados por 5 minutos para análise posterior. O aparato foi limpo com uma solução de álcool 20% entre cada animal testado. Os testes foram gravados e posteriormente avaliados.

Figura 5. Aparato do Teste de Campo Aberto.



4.2. Teste Labirinto Em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um teste comportamental para estudo de ansiedade e alguns aspectos relacionados a desordens de pânico. O teste é baseado no comportamento de “conflito de aproximação-esquiva” do animal em um ambiente desconhecido somado à preferência natural de esquiva às regiões abertas, potencialmente perigosas. A atividade exploratória foi avaliada por 5 minutos em um aparato elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (34 x 6,5 cm), que formam uma cruz com dois braços fechados (34 x 6,5 x 15 cm). Foi analisado o número de entradas nos braços fechados, a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do aparato. Compreende duas fases: a fase de habituação em que o animal foi colocado no aparato e mantido por 5 minutos. Após 24 horas, realizou-se a fase de teste, em que o animal foi colocado novamente no aparato e seus comportamentos foram filmados. O aparato foi limpo com uma solução de álcool 20% para cada animal testado.

Figura 6. Aparato do Teste de Labirinto em Cruz Elevado.



5. RESULTADOS

5.1. Teste De Campo Aberto (TCA)

Para todas as figuras apresentadas nos resultados considerar:

Grupo H2O/SE: animais **não** submetidos a estresse por restrição de movimento e que receberam água no lugar no lugar do Ômega 3.

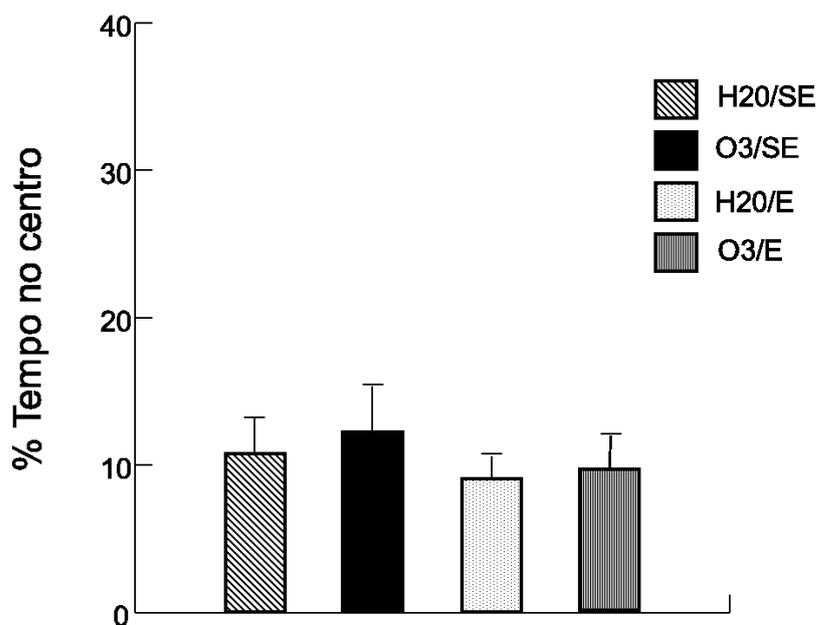
Grupo O3/SE: animais **não** submetidos a estresse por restrição de movimento e suplementados com Ômega 3 por gavagem.

Grupo H2O/E: animais submetidos a estresse por restrição de movimento e que receberam água por gavagem.

Grupo O3/E: animais submetidos a estresse por restrição de movimento e suplementados com Ômega 3 por gavagem.

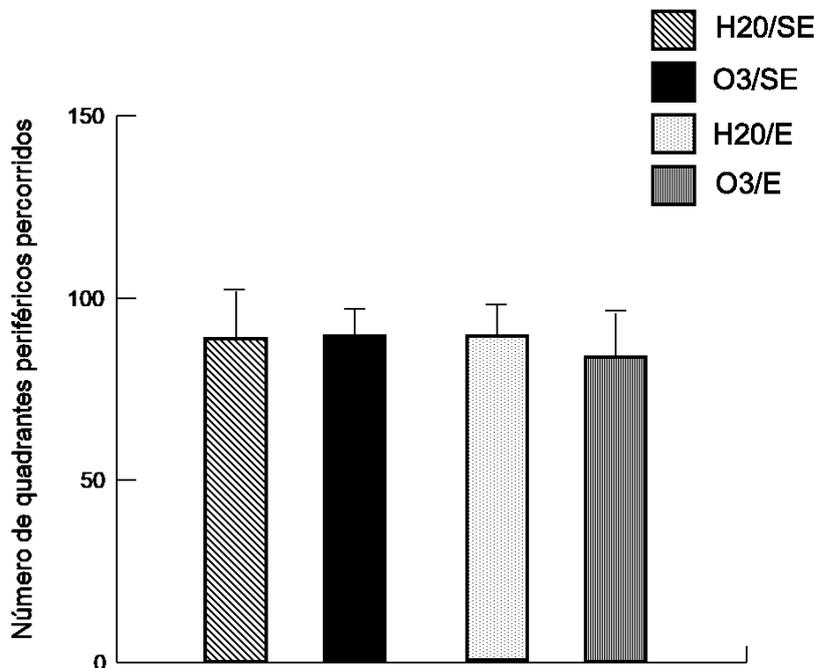
Em relação à porcentagem de tempo que os animais passaram nos quadrantes centrais do TCA, observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados apresentados pelos animais dos quatro grupos experimentais. Os valores de média e erro padrão da média apresentados foram: animais suplementados com Ômega 3 e induzidos a estresse crônico ($9,7 \pm 2,3$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($12,3 \pm 3,06$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($9,06 \pm 1,5$); animais tratados com água e não-estressados ($10,8 \pm 2,3$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na Figura 7.

Figura 7. Tempo de permanência dos animais dos quatro grupos experimentais no **centro** do aparato de Campo Aberto. Dados apresentados em porcentagem de tempo. Não houve diferença significativa entre os grupos. Resultados foram expressos na forma de média \pm EPM (erro padrão da média), com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



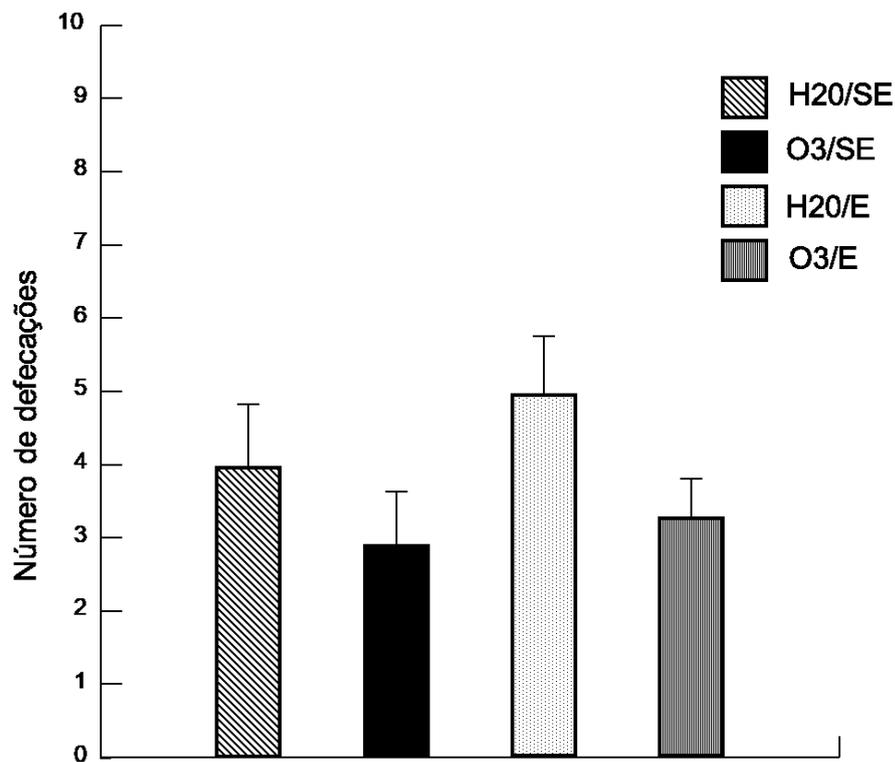
A análise do número de quadrantes periféricos percorridos pelos animais no TCA revelou que não houve diferença significativa entre os resultados apresentados pelos animais dos quatro grupos experimentais. Os resultados obtidos foram: animais suplementados com Ômega e induzidos a estresse crônico ($84 \pm 12,1$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($89,2 \pm 8,18$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($89,3 \pm 8,04$); animais tratados com água e não-estressados ($89,43 \pm 5,2$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na figura abaixo (Figura 8).

Figura 8. Número de quadrantes periféricos percorridos pelos animais dos quatro grupos experimentais no Teste de Campo Aberto. Não houve diferença significativa entre os grupos. Resultados foram expressos na forma de média \pm EPM, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



Ao comparar o número de defecações dos animais durante o TCA, observou-se que não houve diferenças significativas entre os resultados apresentados pelos animais dos quatro grupos experimentais. Os resultados obtidos foram: animais suplementados com Ômega e induzidos a estresse crônico ($3,19 \pm 0,6$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($2,9 \pm 0,7$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($4,9 \pm 0,7$); animais tratados com água e não-estressados ($4 \pm 0,75$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na figura abaixo (Figura 9).

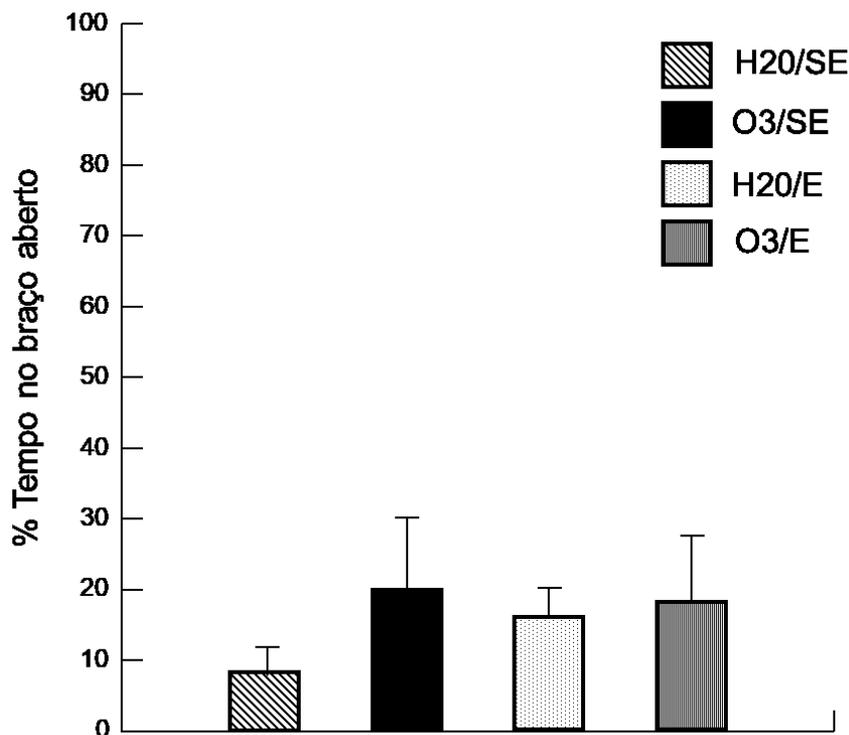
Figura 9. Número de defecações apresentadas pelos animais dos quatro grupos experimentais no Teste de Campo Aberto. Não houve diferença significativa entre os grupos. Resultados foram expressos na forma de média \pm EPM, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



5.2. Teste Labirinto Em Cruz Elevado (LCE)

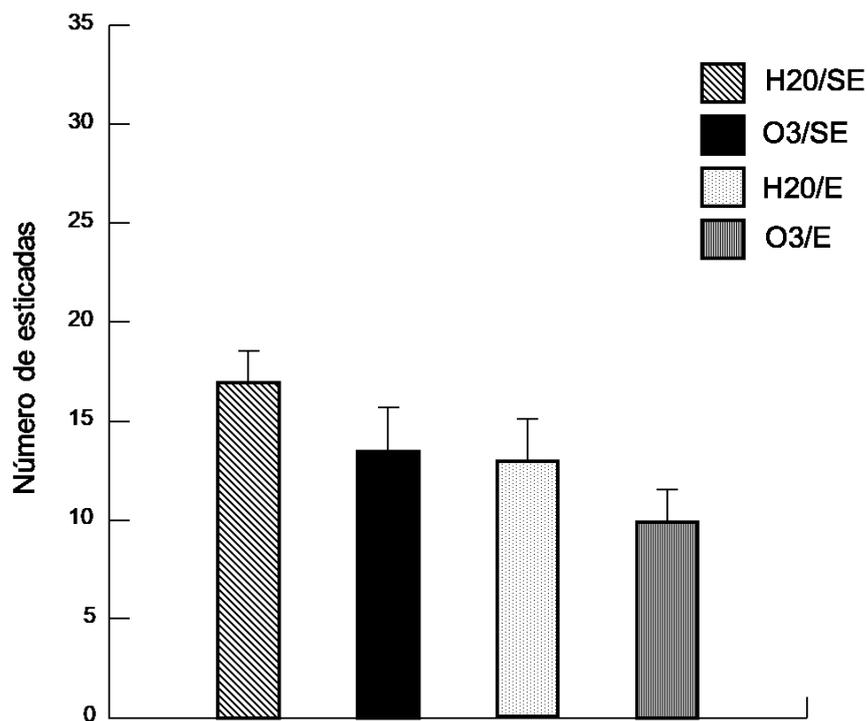
Em relação ao tempo de permanência nos braços abertos no LCE, observou-se que não houve diferença significativa entre os quatro grupos experimentais. Os resultados obtidos foram: animais suplementados com Ômega e induzidos a estresse crônico ($18,4 \pm 8,9$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($20,7 \pm 8,7$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($14,9 \pm 5,1$); animais tratados com água e não-estressados ($8,3 \pm 2,6$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na figura abaixo (Figura 10).

Figura 10. Porcentagem de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do aparato no Teste de Labirinto em Cruz Elevado. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos na forma de média + EPM, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



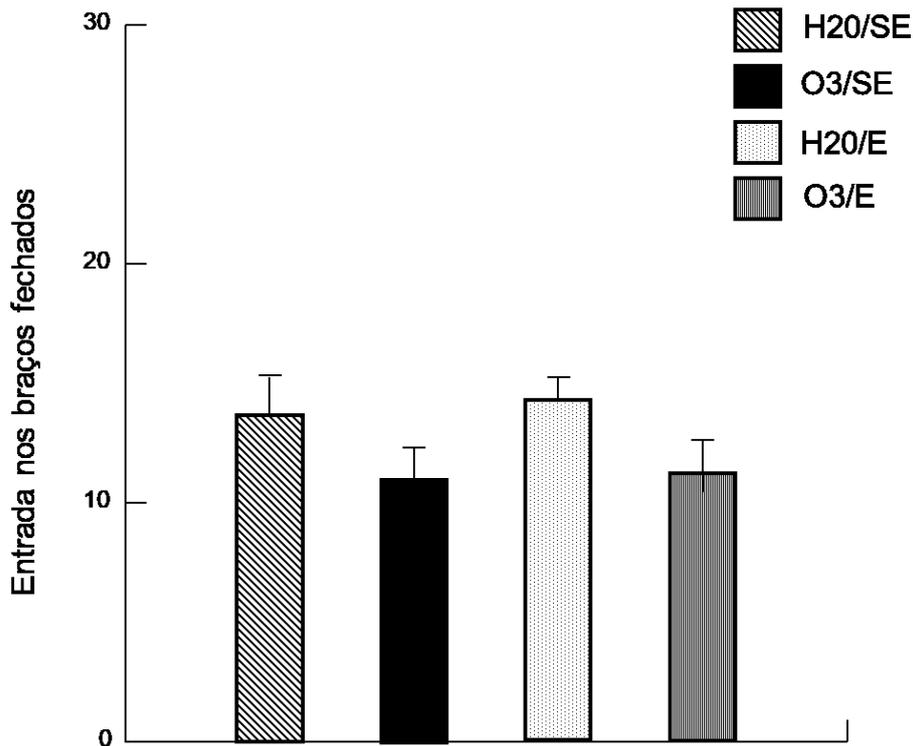
Ao comparar o número de esticadas (*stretch attend postures*) apresentadas pelos animais quando no aparato, demonstrou-se que não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados obtidos foram: animais suplementados com Ômega 3 e induzidos a estresse crônico ($9,6 \pm 1,8$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($13,3 \pm 2,4$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($12,9 \pm 2,1$); animais tratados com água e não-estressados ($16,9 \pm 1,8$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na figura abaixo (Figura 11).

Figura 11. Número de esticadas (*stretch attend postures*) apresentadas pelos animais nos braços abertos durante Teste de Labirinto em Cruz Elevado. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm EPM, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



A quantidade de entrada nos braços fechados no teste de Labirinto em Cruz Elevado revela que não houve diferença significativa entre os quatro grupos experimentais. Os resultados obtidos foram: animais suplementados com Ômega e induzidos a estresse crônico ($11,2 \pm 1,3$); animais suplementados com Ômega 3 e não estressados ($10,8 \pm 1,34$); animais tratados com água e que sofreram estresse ($14,3 \pm 0,87$); animais tratados com água e não-estressados ($14,1 \pm 1,2$). Em todos os casos os valores de p foram maiores que 0,05 ($p > 0,05$). Dados apresentados na figura abaixo (Figura 12).

Figura 12. Número de entradas dos animais nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado nos 4 grupos experimentais. Não houve diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm EPM, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos.



6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar se a suplementação de Ômega 3 em camundongos induzidos a estresse poderia reverter comportamentos do tipo ansiosos nestes, visto que o déficit de ácidos graxos Ômega 3 pode estar relacionado a doenças psiquiátricas. Estes ácidos obtidos pela dieta alimentar, são essenciais à saúde humana devido à sua relação com a prevenção de doenças cardiovasculares, contribuição para uma melhora do perfil lipídico plasmático, fluidez da membrana, redução dos processos inflamatórios, entre outros (COVINGTON, 2004).

Os principais representantes da família Ômega 3 são o ácido α -linolênico (ALA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), sendo que o DHA é um importante componente das membranas neuronais e a deficiência deste composto está associado a disfunções destas membranas e da neurotransmissão de serotonina, noraepinefrina e dopamina (CHALON, 2006), cuja alteração está ligada a vários transtornos psiquiátricos.

Estudos realizados em humanos demonstraram que doenças psiquiátricas, como a ansiedade podem inclusive estar relacionadas com fatores nutricionais do indivíduo e que substâncias bioativas suplementadas ajudariam no tratamento em quadros ansiosos (PINTO, 2010; FERRAZ, 2011). Deste modo, a suplementação com Ômega 3 poderia ter um efeito positivo no tratamento de alguns transtornos psiquiátricos, visto que em situações de estresse e de ansiedade generalizada há uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como catecolaminas e glicocorticoides. Visto isto, a presença deste composto pode reduzir a condição inflamatória e ajudar a normalizar a liberação e ação desses agentes mediadores da resposta estressora (KIECOLT-GLASER *et al.*, 2011).

Para a avaliação dos efeitos de determinados compostos em relação a comportamentos do tipo ansiosos, o TCA, é um teste amplamente utilizado na pesquisa experimental e permite a validação dos efeitos de drogas ou outros compostos em comportamentos do tipo ansiosos e a avaliação da atividade locomotora (CHOLERIS *et al.*, 2001; MENARD; TREIT, 1999). Esse teste foi desenvolvido por Hall (1934) que sugeriu que alta defecação e baixa atividade locomotora no centro do aparato indicariam a presença de comportamentos do tipo ansiosos do animal (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

No experimento realizado com a administração de Ômega 3 via gavagem em camundongos machos adultos, o TCA permitiu avaliar que não houve significância estatística do número de defecações entre os grupos água sem estresse, Ômega 3 sem estresse e os grupos água com estresse e Ômega 3 com estresse (com valores de $p > 0,05$). De acordo com o experimento de PASE (2013), todos os animais expressaram uma maior variação emocional, pois ocorreu um aumento do número de defecações dos animais estressados e não estressados. Isto também ocorreu no presente trabalho ao se quantificar as fezes dos animais. Visto que estes apresentaram semelhança dos dados, não se pode inferir se o comportamento destes é do tipo ansioso.

Em relação à porcentagem de tempo no centro e na periferia do campo aberto, todos os nossos grupos experimentais apresentaram uma preferência pela permanência nos quadrantes periféricos permanecendo tempos semelhantes neste local. Isto provavelmente deve-se ao fato de que roedores são animais que vivem em grupos e tuneis pequenos, e quando são introduzidos em um ambiente novo, iniciam uma intensa atividade locomotora localizada principalmente ao longo das paredes laterais do ambiente. Este comportamento é espontâneo de ratos e camundongos e é denominado de tigmotaxia (PRUT; BELZUNG, 2003).

Ademais, foi observado por Simon, Dupuis e Costentin (1994) que independente do nível de ansiedade, o comportamento de tigmotaxia é utilizado para exploração e mapeamento espacial, o qual tende a reduzir ao longo do tempo, salvo uma intensa condição ansiogênica que propiciaria comportamentos diferentes aos visualizados. Neste experimento, o aparato utilizado era feito de material acrílico permitindo a visualização ampla da sala experimental, portanto, sugere-se podendo ocasionar em um maior receio de exploração do centro –área desprotegida- por parte destes animais.

Uma observação feita foi que a preferência dos animais pela periferia do aparato no TCA em relação à parte central foi observada durante 5 minutos em nossos experimentos. Simon, Dupuis e Costentin (1994) observaram os animais por 30 minutos no TCA e perceberam a redução do comportamento de tigmotaxia após 15 minutos. Portanto, ao comparar esse artigo com o presente trabalho, supõe-se que essa exploração no tempo observado pelo nosso experimento não diz respeito ao nível de ansiedade dos animais e, assim, neste parâmetro não é possível propor se há distinção nos comportamentos dos camundongos a partir do Ômega 3.

Apesar da preferência periférica, os quatro grupos de animais permaneceram em movimento, resultando em um razoável número de deslocamentos pelos quadrantes. Prut e Belzung (2003) afirmam que os tratamentos com ansiolíticos não aumentam a exploração no TCA, no entanto, eles reduzem a inibição do comportamento de exploração após um estresse induzido. A partir da observação de que os animais dos nossos quatro grupos experimentais se locomoveram ativamente, mas sem diferença significativa entre eles, sugere-se que os animais, neste teste, não apresentaram comportamentos do tipo ansiosos distintivos entre os grupos estressados e os não-estressados, além de que o Ômega-3 nas nossas condições experimentais proporcionou a mesma influência que a água nos animais.

Outro teste realizado para a avaliação de comportamentos do tipo ansiosos foi o LCE, sendo que os principais parâmetros avaliados foram a porcentagem de tempo gasto explorando os braços abertos do aparato experimental, o número de entradas nos braços fechados e o número de esticadas (*stretch attend postures*) que os animais apresentaram nos braços abertos. Os braços abertos do LCE constituem uma região propícia para se observar a condição emocional dos roedores, devido ao fato de este aparato não ser invasivo e condicionante, e possuir partes fechadas e abertas. O roedor deve escolher se deve ou não se arriscar a explorar o braço aberto, sendo que este fator está associado uma tomada de decisão, pois é importante para a sobrevivência do roedor (PINTO *et. al.*, 2010 ; BRITO; ALBERNAZ; OGAWA, 2014). Portanto, se o animal apresentar comportamentos do tipo ansiosos ele não irá se expor a um ambiente aberto e elevado do chão.

Na pesquisa realizada por Pellow *et al.*, (1985) foi relatado que os roedores tendem a entrar menos e permanecerem por menos tempo nos braços abertos indicando apreensão a ambientes abertos e desprotegidos. Todavia, segundo dados do artigo, quando realizada a administração de um fármaco ansiolítico, este promoveu um aumento no tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos, ou seja, um maior tempo gasto neste ambiente desprotegido indica redução nos comportamentos do tipo ansiosos.

Os resultados observados em nossos experimentos para os grupos estresse-omega3 (O3/E), estresse água (H2O/E), sem estresse-omega3 (O3/SE) e sem estresse-água (H2O/SE) no LCE mostraram que esses grupos permaneceram uma média de 84% do tempo nos braços fechados indicando que no caso dos nossos experimentos o Ômega 3 foi ineficaz para aumentar o tempo de exploração nos braços abertos.

Um estudo realizado por Bhatia *et al* (2011) demonstrou que os animais com deficiência de Ômega 3 apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados no TCA como a redução número de entradas e no tempo gasto no centro, e no teste de LCE, uma diminuição do tempo nos braços abertos quando comparados aos suplementados, isto sob uma observação de cinco minutos nos testes comportamentais. A dose de Ômega 3, contendo 0,5% de óleo de linhaça e 1,2% de DHA, foi administrada em fêmeas durante a gestação e lactação, e sua prole recebeu o composto durante quinze semanas após a amamentação. Visto que durante o desenvolvimento prenatal, o DHA é encaminhado para o encéfalo do filhote via circulação uteroplacental da mãe (CRAWFORD *et al.*, 1976), e pode reduzir o risco de déficits cognitivos e psicopatológicos na idade adulta (VINES *et al.*, 2012), enfatiza-se a importância da suplementação de Ômega 3 maternal para um melhor funcionamento neuronal de seus descendentes.

Na pesquisa de Ferraz *et al* (2011), relatou-se que a suplementação com Ômega 3 foi capaz de neutralizar os efeitos ansiogênicos produzidos pelo estresse, sendo que os animais passaram mais tempo nos braços abertos. Neste trabalho, o Ômega 3 foi suplementado via oral e era composto de 12% de EPA e 18% de DHA, e foi administrado desde o vigésimo primeiro dia de vida dos animais (pós-amamentação) perdurando por 15 semanas. Além disso, os animais foram suplementados sessenta e nove dias antes do início do estresse, durante este e nos testes comportamentais que foram analisados nos primeiros cinco minutos.

Já estudos realizados em humanos adultos abordam a quantidade de DHA e EPA que beneficiaria casos de distúrbios psiquiátricos. Na pesquisa de Buydens-Branchey, Branchey, Hibbeln (2008) foi administrado 2,25g de EPA e 500mg de DHA durante doze semanas, consequentemente acarretando na redução de comportamentos ansiosos e de ira em um grupo usuário de drogas abusivas. No trabalho de Mischoulon *et a.*, (2008) avaliou-se que a menor dose administrada de DHA – 1g/dia- resultou em melhores respostas ansiolíticas do que doses mais altas 2g/dia e 4g/dia- , sendo que o trabalho foi realizado durante doze semanas.

No nosso experimento os animais foram tratados com um volume diário de 0,06ml de óleo de peixe contendo 12% de EPA e 10% de DHA durante duas semanas, conjuntamente a indução do estresse. Desse modo, nota-se uma diferença de dosagem entre os cinco experimentos supracitados (tanto em humanos como roedores), todavia, o tempo da administração assemelha-se entre os trabalhos de Bhatia *et al* (2011) e Ferraz *et al* (2011) no

caso dos roedores, e Buydens-Branchey, Branchey, Hibbeln (2008) e Mischoulon *et al.*, (2008) ao avaliar humanos.

Visto que um baixo conteúdo de DHA tem efeitos críticos no desenvolvimento neuronal (CHALON, 2006; TASSONI, 2008), pode-se inferir que a administração do composto em fases mais iniciais da vida dos roedores, e que perdurem por mais tempo mostram-se mais eficaz do que a suplementação na idade adulta, como foi realizado no nosso trabalho. Além disso, para humanos, a efetividade do composto é dada se a dose é administrada por pelo menos três meses. Portanto, infere-se que o tempo de administração de Ômega 3 no nosso trabalho foi baixo se comparado a outros que obtiveram resultados, culminando para a não eficácia do tratamento.

Ademais, o número de entradas nos braços fechados no nosso experimento foi bem semelhante entre os quatro grupos, e devido a isso, estes resultados não podem ser usados como medidor de locomoção (PASE, 2013).

O EPA é importante no equilíbrio das funções imunológicas e na saúde física dos indivíduos, reduzindo citocinas pró-inflamatórias, sendo que foi relatado um aumento destas em pacientes com sintomas depressivos e ansiosos (MARQUES *et al.*, 2007). Já o DHA é concentrado nas membranas neuronais e pode alterar a fluidez dessas membranas que pode influenciar na conformação das proteínas presentes (SALEM *et al.*, 2001). Entre estas proteínas estão as que possuem funções importantes e que agem como receptores de mediadores químicos e transportadores de íons através das membranas neuronais. Ademais, uma deficiência na dieta de DHA pode levar á uma alteração na neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica (YOUNG; CONQUER, 2005) comprometendo a regulação dos sistemas neurais que controlam estados de humor (DU BOIS *et al.*, 2006; FENTON *et al.*, 2000; JACKA 2013).

Um estudo com humanos, realizado por Jacka *et al.* (2013) relatou a associação entre a alta ingestão exclusiva de DHA e a redução de distúrbios ansiosos. Já em uma revisão recente feita por Grosso *et al.* (2016) foi relatada a hipótese de que a ingestão de AGPI-O3 está associada a menor risco de depressão. Entretanto, Appleton *et al.* (2016) concluiu que não há evidências confiáveis para determinar se os efeitos do Ômega 3 são eficazes e devem ser utilizados como tratamento de distúrbios psiquiátricos.

O trabalho desenvolvido por Thesing *et al.*, (2018) foi realizado com humanos e descreveu que um baixo nível de Ômega 3 foi observado somente em pacientes com distúrbio depressivo conjuntamente com sintomas ansiosos, sendo que os indivíduos apenas com ansiedade não apresentaram diferença significativa neste quadro. O estudo revelou que a relação dos níveis de Ômega 3 e os sintomas de ansiedade severa não resultaram em diferenças entre os pacientes com ansiedade e os indivíduos controle. E, portanto, a partir desses artigos recentes infere-se que ingestão de ácidos graxos Ômega 3 está mais associado a atenuação dos sintomas depressivos, não sendo observada a mesma eficácia nos transtornos de ansiedade, o que corrobora com nossos resultados.

De acordo com Pase (2013), quando nos submetemos a situações estressantes desenvolvemos fortes emoções, todavia, o estresse acometido ao longo da vida pode culminar em alterações bioquímicas, psicológicas e comportamentais. Isto nem sempre é reproduzido nos camundongos os quais sofrem um estresse físico para simular um transtorno mental. Mesmo que fisiologicamente o desencadeamento de respostas a situações estressoras seja semelhante, os camundongos foram estressados duas horas por dia, enquanto os seres humanos são sujeitos a estresses psicológicos varias vezes ao dia, com situações relacionadas ao meio em que vivemos.

De acordo com os resultados apresentados e os artigos comparados, observa-se que a maioria dos trabalhos desenvolvidos com roedores permitiu uma melhora do quadro ansiogênico a partir da suplementação de Ômega 3. E no caso dos experimentos com humanos, os resultados são conflitantes. Isto pode ser porque existem inúmeras variáveis possíveis para a relação entre Ômega 3 e depressão ou ansiedade, sendo que um deles é o estilo de vida do indivíduo que aborda os fatores de saúde que este se sujeita (THESING *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos sob a dosagem e tempo de administração do nosso trabalho foi possível inferir que o Ômega 3 não foi capaz de reverter os comportamentos do tipo ansiosos dos camundongos machos submetidos a um protocolo de estresse crônico. Tal fato pode se dar devido principalmente ao pouco tempo de administração desta substância, visto que a maioria dos experimentos que obtiveram resultados positivos usaram no mínimo doze semanas de administração de Ômega 3 e o nosso trabalho realizou em apenas duas.. Além disso, é importante relatar que alguns artigos observaram que as doses administradas nos períodos iniciais da vida são mais eficazes em relação à idade adulta. Outro fator é a respeito do conflito dos dados em experimentos com humanos que pode significar que conosco o estilo de vida influencia nos tratamentos ansiolíticos. Ademais, os estudos realizados com depressão demonstraram maior eficácia com compostos Ômega 3 em relação ao tratamento de ansiedade. Devido a isto, novos estudos devem ser realizados para que se conheça outras características da suplementação com Ômega 3 a fim de que os indivíduos com quadros ansiosos possam obter um tratamento efetivo.

8. REFERÊNCIAS:

ABEDI, Elahe; SAHARI, Mohammad Ali. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. **Food science & nutrition**, v. 2, n. 5, p. 443-463, 2014.

AHMAD, Aneeq., *et al.* A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. **Nutritional neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 103-113, 2002.

ANDERSON, Amy L. *et al.* Dietary patterns and survival of older adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 1, p. 84-91, 2011.

ANDRADE, Priscila de Mattos Machado; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.

APPLETON, Katherine M. *et al.* ω -3 Fatty acids for major depressive disorder in adults: an abridged Cochrane review. **BMJ open**, v. 6, n. 3, p. e010172, 2016.

BHATIA, Harsharan Singh *et al.* Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28451, 2011.

BOURRE, J. M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. **Journal of nutrition health and aging**, v. 8, n. 3, p. 163-175, 2004.

BRITO, Bruno Henrique Menegati; ALBERNAZ, Juliano Caetano; OGAWA, Wataro Nelson. Estresse e ansiedade em ratos tratados com propiltiouracil (PTU) e puran T4. **AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH**, v. 2, n. 3, p. 02-09, 2014.

BUYDENS-BRANCHEY, Laure; BRANCHEY, Marc; HIBBELN, Joseph R. Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 2, p. 568-575, 2008.

CALDER, Philip C. n- 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1505S-1519S, 2006.

CHALON, S. "Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 75, no. 4-5, pp. 259-269, 2006.

CHOLERIS, E. *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.

CORTES, Matheus Lopes *et al.* Uso de terapêutica com ácidos graxos Ômega 3 em pacientes com dor crônica e sintomas ansiosos e depressivos. **Revista Dor**, 2013.

COVINGTON, Maggie B. Omega-3 fatty acids. **Atlantic**, v. 1, n. 2.0, 2004.

CLANDININ, M. T. *et al.* Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements. **Early human development**, v. 4, n. 2, p. 131-138, 1980.

CLARKE, Steven D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1129-1132, 2001.

CRAWFORD, M. A. *et al.* Essential fatty acids and fetal brain growth. **The Lancet**, v. 307, n. 7957, p. 452-453, 1976.

CRUZ, AP de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192-217, 2012.

CUNNANE, Stephen C. *et al.* Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: can we reconcile the evidence?. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 88, n. 1, p. 61-70, 2013.

DU BOIS, T.M. *et al.* Fatty acids differentially affect serotonin receptor and transporter binding in the rat brain. *Neuroscience*, v. 139, p. 1397-1403, 2006.

EDWARDS, Lindsay M. *et al.* Short-term consumption of a high-fat diet impairs whole-body efficiency and cognitive function in sedentary men. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 3, p. 1088-1096, 2011.

ERDINEST, Nir *et al.* Anti-inflammatory effects of alpha linolenic acid on human corneal epithelial cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 8, p. 4396-4406, 2012.

FEDOROVA, Irina *et al.* An n-3 fatty acid deficiency impairs rat spatial learning in the Barnes maze. **Behavioral neuroscience**, v. 123, n. 1, p. 196, 2009.

FENTON, Wayne S.; HIBBELN, Joseph; KNABLE, Michael. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 1, p. 8-21, 2000.

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

GREEN, Pnina *et al.* Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 107-113, 2006.

GRIMM, H. *et al.* Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S1, p. S59-S67, 2002.

GROSSO, Giuseppe *et al.* Dietary n-3 PUFA, fish consumption and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of affective disorders**, v. 205, p. 269-281, 2016.

HAMAZAKI, Tomohit, *et al.* The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults. A placebo-controlled double-blind study. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 4, p. 1129-1133, 1996.

HIBBELN, Joseph R. *et al.* Essential fatty acids predict metabolites of serotonin and dopamine in cerebrospinal fluid among healthy control subjects, and early-and late-onset alcoholics. **Biological psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 235-242, 1998.

INNIS, Sheila M. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. **Developmental neuroscience**, v. 22, n. 5-6, p. 474-480, 2000.

Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Part 1. Washington (DC): National Academy Press; 2002.

JACKA, Felice N. *et al.* Dietary intake of fish and PUFA, and clinical depressive and anxiety disorders in women. **British journal of nutrition**, v. 109, n. 11, p. 2059-2066, 2013.

KIECOLT-GLASER, Janice K. *et al.* Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 8, p. 1725-1734, 2011.

KIM, Yong-Ku; YOON, Ho-Kyoung. Common and distinct brain networks underlying panic and social anxiety disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, p. 115-122, 2018.

LITMAN, Burton J; Niu, S; Polozova, A; Mitchell, Drake C. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 16, n. 2-3, p. 237-242, 2001.

LUCHTMAN, Dirk W.; SONG, Cai. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: findings from animal and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 550-565, 2013.

LOTTENBERG, Ana Maria Pita. Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

MACHADO, Fabiana S. *et al.* Anti-inflammatory actions of lipoxin A 4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature medicine**, v. 12, n. 3, p. 330, 2006.

MANJI, Hussein K.; LENOX, Robert H. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 6, p. 518-530, 2000.

MARQUES, Andrea H.; CIZZA, Giovanni; STERNBERG, Esther. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, n. Supl I, p. S27-32, 2007.

MARSZALEK, Joseph R.; LODISH, Harvey F. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 633-657, 2005.

MARTIN, Clayton Antunes et al. Ácidos graxos poliinsaturados Ômega 3 e Ômega 6: importância e ocorrência em alimentos Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MENARD, Janet; TREIT, Dallas. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 4, p. 591-613, 1999.

MORGESE, Maria; TRABACE, Luigia. Maternal malnutrition in the etiopathogenesis of psychiatric diseases: role of polyunsaturated fatty acids. **Brain sciences**, v. 6, n. 3, p. 24, 2016.

MISCHOULON, David et al. A double-blind dose-finding pilot study of docosahexaenoic acid (DHA) for major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 9, p. 639-645, 2008.

OWEN, Catherine; REES, Anne-Marie; PARKER, Gordon. The role of fatty acids in the development and treatment of mood disorders. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2008.

PASE, C. S. *et al.* Influence of perinatal trans fat on behavioral responses and brain oxidative status of adolescent rats acutely exposed to stress. **Neuroscience**, v. 247, p. 242-252, 2013.

PAWLOSKEY, Robert J. *et al.* Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 8, p. 1257-1265, 2001.

PEET, Mary, GLEN, I., Horrobin, David F., *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*, Marius Press, Carnforth, UK, 1999.

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PINTO, J. F. **Nutracêuticos e alimentos funcionais**. Portugal, LIDEL, 2010.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

ROSS, Brian M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 5-6, p. 309-312, 2009.

SALEM JR, Norman *et al.* Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 945-959, 2001.

SCHNEIER, Franklin R. *et al.* Low dopamine D2 receptor binding potential in social phobia. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 3, p. 457-459, 2000.

SILVA, Ana Paula Souza *et al.* Commercial and Therapeutic Potential of Plant-Based Fatty Acids. In: **Fatty Acids**. IntechOpen, 2018.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural brain research**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.

SIMOPOULOS, Artemis P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3, p. 560s-569s, 1999.

STEIN, Dan J.; WESTENBERG, Herman GM; LIEBOWITZ, Michael R. Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry. **The Journal of clinical psychiatry**, 2002.

SU, Kuan-Pin. Biological Mechanism of Antidepressant Effect of Omega-3 Fatty Acids: How Does Fish Oil Act as a 'Mind-Body Interface'?. **Neurosignals**, v. 17, n. 2, p. 144-152, 2009.

SUBLETTE, M. Elizabeth *et al.* Meta-analysis: effects of eicosapentaenoic acid in clinical trials in depression. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 72, n. 12, p. 1577, 2011.

TASSONI, Daniella *et al.* The role of eicosanoids in the brain. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 17, n. S1, p. 220-228, 2008.

THESING, Carisha S., *et al.* Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 87, p. 53-62, 2018.

TSUKADA, Hideo *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) improves the age-related impairment of the coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow

response: a PET study in conscious monkeys. **Brain research**, v. 862, n. 1-2, p. 180-186, 2000.

UAUY, Ricardo; DANGOUR, Alan D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutrition reviews**, v. 64, n. suppl_2, p. S24-S33, 2006.

VINES, Aparecida., *et al.* The role of 5-HT1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 184-191, 2012.

VINOT, Nina., *et al.* Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20491, 2011.

WAINWRIGHT, Patricia E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 1, p. 61-69, 2002.

WU, Aiguo; YING, Zhe; GOMEZ-PINILLA, Fernando. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 751-759, 2008.

YOUDIM, Kuresh A.; MARTIN, Antonio; JOSEPH, James A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4-5, p. 383-399, 2000.

YOUNG, Genevieve; CONQUER, Julie. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 1, p. 1-28, 2005.

ZÁRATE, Rafael *et al.* Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and translational medicine**, v. 6, n. 1, p. 25, 2017.

ZIMMER, Luc., *et al.* Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of lipid research**, v. 41, n. 1, p. 32-40, 2000.

9. ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados à ansiedade, depressão, memória e sociabilidade em camundongos adultos expostos a estresse crônico”, protocolo nº 112/17, sob a responsabilidade de **Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **09 de Março de 2018**.

(We certify that the project entitled “Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados à ansiedade, depressão, memória e sociabilidade em camundongos adultos expostos a estresse crônico”, protocol 112/17, under the responsibility of Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 09th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 30/04/2018 Término: 30/04/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> (linhagem Balb C)
Número de animais	49
Peso / Idade	- / 60 dias
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA)/UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 13 de março de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU