

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biológicas

Curso de Ciências Biológicas

Marcella Macedo de Carvalho

“Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados  
à depressão em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

UBERLÂNDIA – MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biológicas

Curso de Ciências Biológicas

“Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados à depressão em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

Marcella Macedo de Carvalho

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

“Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados à depressão em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Composta pela banca examinadora:

Uberlândia, 28 de junho de 2019.

---

Prof. Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

---

Prof. Dra. Érika Renata Barbosa Neiro

---

Dra. Simone Ramos Deconte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biológicas

Curso de Ciências Biológicas

“Efeitos da suplementação com Ômega 3 sobre comportamentos relacionados à depressão em camundongos adultos expostos a estresse crônico”

Marcella Macedo de Carvalho

Uberlândia, 28 de Junho de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar pelas oportunidades e pelos desafios que a vida me impôs para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha filha, Ana Laura Macedo Montes, por ser a minha força, meu incentivo máximo para lutar por uma vida melhor para nós.

Aos meus avôs que me criaram reforçando sempre a importância dos estudos, me deram a oportunidade de estudar tranquila e cuidavam da minha filha sempre que podiam.

À minha mãezinha que do céu, deve estar muito orgulhosa.

À minha amiga Luísa Gouveia Lana, por todo o incentivo, as dicas, por sempre estar ao meu lado mostrando a importância da vida acadêmica não me deixando desistir.

À minha dupla, Victoria Maria Rossetti Pereira, por ser tão companheira, compreensiva, amiga, pelo apoio, pela paz que existe entre nós.

Às profs. Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini e Dra. Érika Renata Barbosa Neiro por serem como mães para todos nós do laboratório, por estarem disponíveis sempre que precisamos, por serem compreensivas, por terem ensinado muitas coisas a respeito de ciências e da vida, por serem as melhores em orientar alunos e pela oportunidade de trabalhar com ambas. Por serem razão e emoção.

Aos meus amigos do laboratório, Mariana, Renner, Amanda, Anna Laura, Victoria, Yago, pelo companheirismo, a paciência, a boa vontade em ajudar uns aos outros, a irmandade influenciada pelas profas.

A técnica Simone por toda a paciência e disponibilidade em me ajudar com as estatísticas.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e contribuições.

## RESUMO

As características da depressão de uma forma geral são humor triste ou irritável, alterações somáticas e cognitivas que geram grandes prejuízos à capacidade de ação global do indivíduo, alterando o afeto e as funções neurovegetativas. Ainda não são conhecidas as causas específicas do transtorno depressivo, porém alguns pesquisadores apontam para uma fisiopatologia multifuncional, disfunção hipotalâmica e de neurotransmissão. Uma possibilidade é que ocorram distúrbios na transmissão monoaminérgica, reduzindo a neurotransmissão de serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA). Em relação à neurotransmissão de dopamina, pesquisas apontam que a suplementação de omega-3 ( $\omega$ -3) na dieta de ratos gera aumento de 40% nos níveis de DA no córtex frontal, assim como na ligação com o receptor de DA, o que é apropriado para o desenvolvimento do sistema dopaminérgico e para o desempenho comportamental na idade adulta dos animais. A depressão também é associada à níveis elevados de cortisol no sangue devido à uma disfunção no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O ácido eicosapentaenoico (EPA) presente no  $\omega$ -3 pode regular a disfunção do eixo HPA reduzindo o hormônio liberador de corticotropina (CRF) e a secreção de cortisol. Esses fatores demonstram a possível ação antidepressiva do ( $\omega$ -3), modulando reações oxidativas e a produção de citocinas inflamatórias na micróglia e células neuronais. Neste sentido este projeto objetivou avaliar os efeitos do estresse crônico por restrição de movimentos bem como da suplementação com Ômega 3, sendo 10 microlitros por animal, sobre comportamentos relacionados à depressão, avaliados por meio do teste comportamental de Nado Forçado. Durante 15 dias os animais (camundongos Balb c) foram divididos em 4 grupos: sendo que o primeiro recebeu H<sub>2</sub>O, o segundo recebeu  $\omega$ -3, o terceiro H<sub>2</sub>O + estresse (ES) e o quarto  $\omega$ -3 + ES. O estresse foi gerado por um protocolo de restrição de movimento durante 2 horas e receberam  $\omega$ -3 ou água, administradas por gavagem duas vezes ao dia. No teste de Nado Forçado não houve diferença significativa entre os grupos, embora o grupo tratado com  $\omega$ -3 e que não foi exposto ao estresse tenha apresentado o menor tempo de imobilidade, sugerindo um possível efeito neuroprotetor. No protocolo utilizado em nossos experimentos, o estresse por restrição de movimento não aumentou os comportamentos relacionados à depressão e o  $\omega$ -3, na dosagem utilizada, não apresentou efeito neuroprotetor.

**Palavras chave: estresse, depressão, ômega 3, Nado Forçado**

## **ABSTRACT**

The characteristics of depression, in a general way, are sadness or irritability, somatic and cognitive changes that generate huge prejudices to the global action capacity of the individual, alternating affection and neurovegetative functions. It's not yet known the specific causes of the depressive disorder, although some researches point to a multifunctional physiopathology, hypothalamic and neurotransmission disorder. A possibility is that it occurs some disturbs in the monoaminergic transmission, reducing serotonin neurotransmission (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA). In relation to dopamine neurotransmission, researches point that omega-3 supplementation ( $\omega$ -3) on rats diet generates a 40% increase on the DA levels in the frontal cortex, such as on the DA receptor connection, which is appropriate to the dopaminergic system and behavior performance on animal adult age. Depression is also associated to high cortisol levels on the blood due to hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis malfunction. The eicosapentaenoic acid found on  $\omega$ -3 can regulate the HPA axis, reducing the corticotropin (CRF) liberating hormone and the cortisol secretion. These factors demonstrate the possible antidepressive action, modulating the oxidative reactions and the inflammatory cytokines production on the microglia and neuronal cells. In this way, this project had the objective of evaluating the effects of chronic stress by the restriction of movement, as well as the Omega 3 supplementation, being 10 microliters by animal, under the depression related behavior, studied by the behavior of Forced Swimming test. During 15 days, the animals (Balb C mouse), were divided in 4 groups: the first group received H<sub>2</sub>O, the second received  $\omega$ -3, the third received H<sub>2</sub>O + stress (ES) and the fourth received  $\omega$ -3 + ES. The stress was generated by movement restriction protocol that lasted 2 hours and received  $\omega$ -3 or water, administrated by gavage twice by day. On the Forced Swimming test there were no significant differences between groups, although they were treated by  $\omega$ -3 and the ones who weren't exposed to stress has presented the fastest immobility time, suggesting a possible neuroprotector effect. On the used protocol in our experiments, the stress by restriction of movement hasn't increased the behaviors related to depression and the  $\omega$ -3 on the used dose, hasn't presented neuroprotection.

**Key Words: Stress, depression, Omega 3, Forced Swimm**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

5-HT- Serotonina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ADT - Antidepressivos tricíclicos

AG - Ácidos graxos

AGE - Ácidos graxos essenciais

APA - American Psychiatric Association

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

DA – Dopamina

DHA –Ácido docosaexaenóico

DSM-V - Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5.<sup>a</sup> edição

EPA – Ácido eicosapentaenóico

EROS – Espécie reativa do oxigênio.

HHA – Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal

HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

IL ,IL – 2, IL – 6, IL -8, IL – 12, - Interleucinas

IMAO - Inibidores da monoamino oxidase

ISRS - Inibidores seletivos de serotonina

IRSN - Inibidores de serotonina e noradrenalina

MCP - Porção ventral da matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo dorsal e o hipotálamo medial

MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados

NA – Noradrenalina

NE – Norepinefrina

NF – Nado forçado



NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PPAR - Receptor de ativação de proliferação de peroxissomas

PUFAs - Ácidos graxos poli-insaturados

REBIR - Rede de Biotérios de Roedores

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

$\gamma$  - Interferon gama

$\omega$ -3 – ômega – 3

## SUMÁRIO

<b>1 – Introdução</b> .....	12
<b>2 – Objetivos</b> .....	19
2.1 Geral .....	19
2.2 Específicos .....	19
<b>3 – Metodologia</b> .....	20
3.1 Animais .....	20
3.2 Delineamento experimental .....	21
3.3 Indução de estresse por restrição de movimento .....	22
3.4 Administração de soluções .....	23
3.5 Teste Comportamental .....	24
3.5.1 Teste de Nado Forçado (NF) .....	24
3.6 Método de indução de morte .....	25
3.7 Análise estatística .....	25
<b>4 – Resultados</b> .....	26
<b>5 – Discussão</b> .....	26
<b>6 – Conclusões</b> .....	28
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	28

## 1. Introdução

Vários transtornos mentais atingem a população a nível mundial, como os distúrbios bipolares, demência, esquizofrenia, fobias, transtornos depressivos e ansiosos, dentre outros. Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) (2013), define-se por transtorno mental:

Síndrome caracterizada por perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento de um indivíduo que reflete uma disfunção nos processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental. Transtornos mentais estão frequentemente associados a sofrimento ou incapacidade significativos que afetam atividades sociais, profissionais ou outras atividades importantes AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013).

Enquanto a depressão atinge cerca de 322 milhões de pessoas no mundo todo por ano, os transtornos de ansiedade configuram também como importantes problemas de saúde pública, afetando 264 milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial de Saúde. Estima-se que a depressão é a maior causa de suicídios, em torno de 800 mil por ano e que cerca de 1,3 trilhões são gastos por ano no mundo em consequência dos transtornos mentais, impactando negativamente na economia mundial. Dentro deste cenário, o Brasil é o país com maiores taxas de transtornos de ansiedade no mundo e o quinto maior em depressão. Segundo especialistas, esses altos índices estão relacionados à pobreza, desemprego, estilo de vida e fatores ambientais (OPAS/OMS, 2017)

O estresse precoce, bem como traumas na infância, pode predispor os indivíduos a transtornos psicológicos, alterando o limiar de estresse e a resposta a estímulos negativos. Acredita-se que o estresse antecede os transtornos mentais, principalmente em relação à depressão e à ansiedade (KRISHNAN & NESTLER, 2010).

A palavra “estresse” indica o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam instabilidade emocional e que, ao perturbarem a homeostase, desencadeiam alterações fisiológicas, como o aumento da liberação de adrenalina, gerando manifestações sistêmicas que resultam em distúrbios fisiológicos e psicológicos (HOUAISS et al., 2001).

Ao nível fisiológico, a resposta do indivíduo ao estresse, à ansiedade e ao medo tem suas bases em reações de defesa dos animais, conservados ao longo da evolução, que ocorrem em resposta aos perigos encontrados em seu habitat (RIBEIRO & KAPCZINSK, 2000).

O estresse gera uma cascata de reações no organismo, com o intuito de que o indivíduo possa reagir ao suposto perigo, tais como: alterações cardiovasculares, elevação de pressão arterial, taquicardia, vasoconstrição na pele e nas vísceras, vasodilatação no músculo estriado esquelético, hiperventilação, dilatação da pupila, dentre outros efeitos (GUYTON, 2002). As áreas do sistema nervoso responsáveis por tais manifestações neurovegetativas de defesa ativa e comportamental são a porção ventral da matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo dorsal (MCP) e o hipotálamo medial. No eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) o Hipotálamo, quando estimulado libera o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH), Vasopressina e outros neuropeptídeos reguladores. O CRH estimula a Adenohipófise a secretar o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez estimula a síntese e a liberação de glicocorticóides pela região cortical da glândula suprarenal (Figura 1). Acredita-se que níveis cronicamente elevados de glicocorticóides, como ocorrem no estresse crônico, podem levar a danos de neurônios hipocampais, interferindo na função e na estrutura hipocampal, causando alterações de memória e cognição (VANITALLIE, 2002).

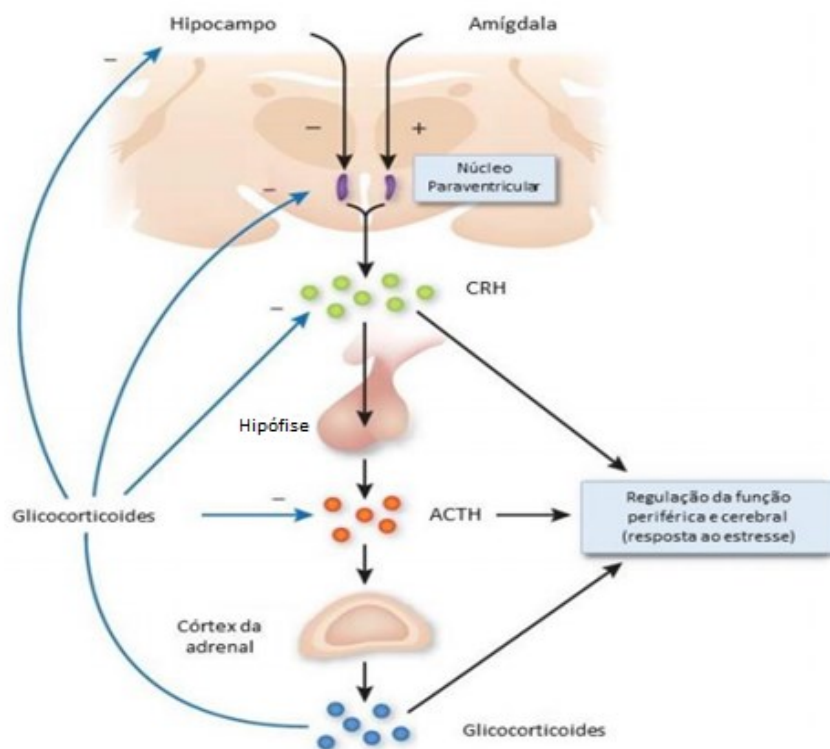


Figura: 1. Representação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Fonte: (Guyton, 2002)

Pesquisas identificaram aumentos nas taxas de glicocorticóides em pacientes com depressão, despertando interesse significativo no papel do Eixo HHA alterado, possivelmente pelo estresse, na fisiopatologia da depressão (GOURLEY et al., 2008).

As características da depressão, de uma forma geral, são: humor triste ou irritável, alterações somáticas e cognitivas que geram grandes prejuízos à capacidade de ação global do indivíduo, alterando o afeto e as funções neurovegetativas. As ocorrências duram no mínimo duas semanas, porém, na maioria dos casos, dura um tempo consideravelmente maior, sendo que na forma crônica da depressão os distúrbios de humor podem persistir por pelo menos dois anos em adultos e um ano em crianças (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A depressão crônica é diagnosticada quando pelo menos cinco sintomas estão presentes, como humor deprimido, desinteresse e desprazer pelas ações do dia a dia, relevante perda ou ganho de peso, insônia ou excesso de sono, agitação ou lentidão psicomotora, cansaço, sentimentos de excessiva culpa e

desvalia, dificuldade de concentração, pensamentos rotineiros sobre morte, em alguns casos suicídio e tentativa de suicídio (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Ainda não são conhecidas as causas específicas do transtorno depressivo, porém alguns pesquisadores apontam para uma fisiopatologia multifuncional, incluindo disfunção hipotalâmica e de neurotransmissão. Uma possibilidade é que ocorram distúrbios na transmissão monoaminérgica, reduzindo a neurotransmissão de serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA), disfunção do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), aumento do estresse oxidativo e altas taxas de citocinas pró-inflamatórias (HALVERSON & BIENENFELD, 2011).

O desequilíbrio provocado pelo estresse, culminando na liberação excessiva de CRH, ACTH e glicocorticoides, contribui para a ativação imunológica (Figura 2), gerando aumento de mediadores químicos das respostas pró inflamatórias, as citocinas, como as interleucinas (IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), interferon gama ( $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO), resultando em estresse oxidativo. O estresse oxidativo é gerado por um desequilíbrio entre as espécies reativas do oxigênio (EROs), enzimas antioxidantes e NO. Pode também ser gerado pela peroxidação lipídica, redução da atividade enzimática contra a oxidação e aumento no catabolismo de monoaminas. Vários estudos demonstram uma razão direta entre a gravidade dos sintomas da depressão crônica e o aumento do estado neuroinflamatório (KRISHNAN&NESTLER, 2010).

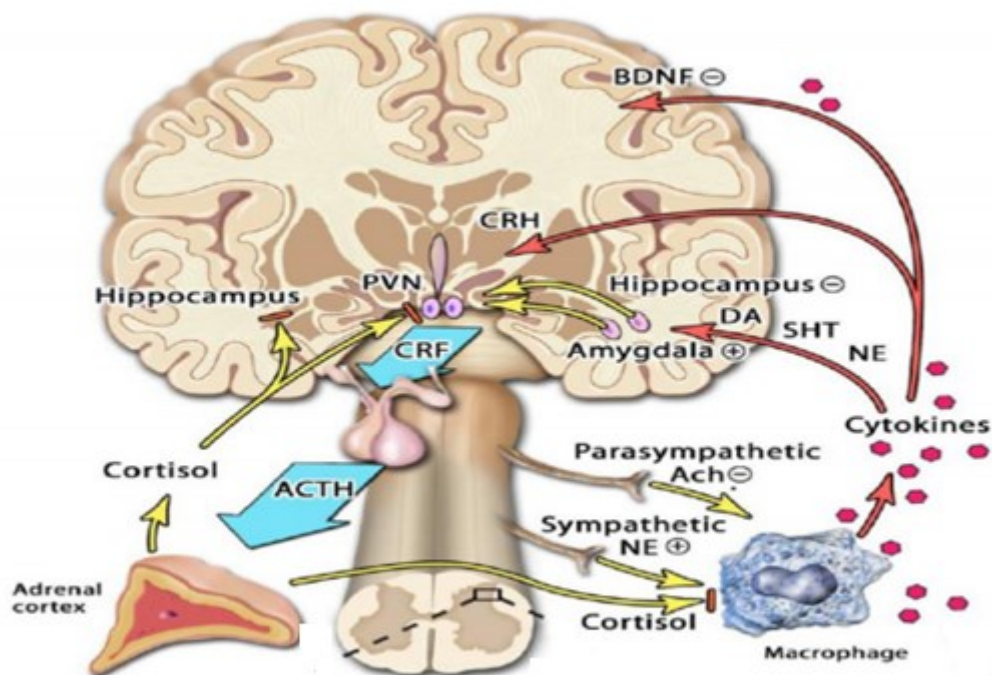


Figura: 2 Representação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e ativação imunológica. Imagem adaptada. Fonte: (Maletic, 2009)

O tratamento do transtorno depressivo baseia-se em eliminar os sintomas, resgatar a capacidade funcional e social do indivíduo, diminuir os riscos de suicídio, melhorar a qualidade de vida e impedir a recorrência da doença. A maioria dos tratamentos é feita com medicação, tais como: antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores da monoamino oxidase (IMAO), inibidores seletivos de serotonina (ISRS), inibidores de serotonina e noradrenalina (IRSN). Além das drogas, normalmente é indicado psicoterapia (BRATS, 2012).

Os mecanismos de ação desses fármacos variam, nos ADT ocorre um bloqueio de recaptura de monoaminas a nível pré-sináptico principalmente se 5-HT, NE e em menores quantidades DA. Quanto aos do tipo IMAO pouco se sabe sobre o mecanismo de ação, é sabido que a enzima monoaminoxidase (MAO) está inibida, essa enzima possui dois subtipos, A e B, que estão relacionados no metabolismo de 5-HT, NA e DA. A redução na atividade da MAO resulta em aumento na concentração desses neurotransmissores nos locais de

armazenamento no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso simpático, o aumento na disponibilidade de um ou mais neurotransmissor tem sido relacionado na ação antidepressiva. No caso dos IRSSs podemos dizer que são uma forma melhorada dos ADTs, ele atuando como um seletivo e potente receptor de 5-HT o que gera uma potencialização na neurotransmissão serotoninérgica. Os IRSNs atuam como inibidores seletivos da recptação de 5-HT e NA e pouca capacidade de inibir seletivamente a DA, porém a capacidade de recaptura de 5-HT é maior que a NA uma vez que seu principal componente não apresenta afinidade por receptores adrenérgicos alfa-1 e também não inibem a enzima MAO (MORENO et al., 1999)

Embora existam várias classes de medicamentos que tratam a depressão, a maioria apresenta efeitos colaterais que são prejudiciais aos pacientes tais como: alterações de peso, cardiovasculares, sexuais, dentre outros. Por isso, tem-se buscado cada vez mais tratamentos alternativos à base de substâncias encontradas na natureza ou nos próprios alimentos, como a geléia real (produzida pelas abelhas), o resveratrol (encontrado na casca de uva roxa) e os ácidos graxos da família do Ômega ( $\omega$ ) 3, 6 e 9 (WAITZBERG, 2008).

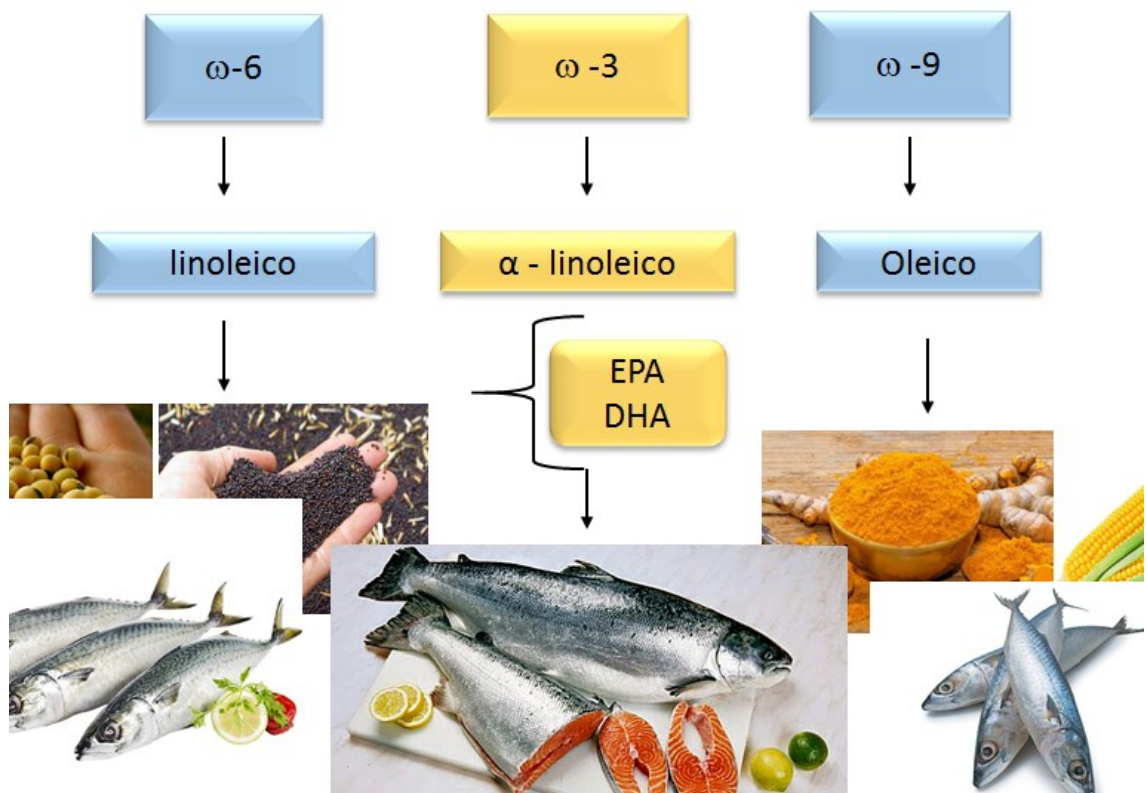
O sistema nervoso central possui o maior conteúdo de lipídios do corpo humano, sendo que 35% dos lipídios de um encéfalo adulto são ácidos graxos poli-insaturados. Estes agem na sinalização celular, regulação enzimática, síntese de eicosanóides, regulação da migração neuronal, plasticidade sináptica e modulação de citocinas que possuem atividade neuromodulatória e neurotransmissora. Acredita-se assim que possivelmente estes estejam ligados à fisiopatologia de alguns transtornos psiquiátricos (PEET&STROKES, 2005).

Os lipídios são compostos de suma importância para as funções fisiológicas, estruturais e regulatórias do organismo. Estes são constituídos por ácidos graxos (AG), ácidos carboxílicos formados por longas cadeias de átomos de carbono, unidos por ligações duplas ou simples não ramificadas. AGs são vistos como integrantes da membrana celular ou em forma de triglicerídeos, que são metabolizados no fígado em AG e glicerol. Ambos geram energia, e quando não são utilizados são reconstituídos e armazenados no tecido adiposo (WAITZBERG, 2008).



Os AGs de cadeia longa mais encontrados nas membranas biológicas são os alfa-linoleicos  $\omega$ -3: ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA); ácido linoléico  $\omega$ -6 e o ácido oléico  $\omega$ -9 (WAITZBERG, 2008).

São considerados ácidos graxos essenciais AGE aqueles que não são produzidos pela espécie humana, devendo ser adquiridos por meio de dieta. São exemplos o  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9. Os oleicos  $\omega$ -9 são encontrados em vegetais tais como milho, girassol e açafrão. Já os linoleicos  $\omega$ -6 na soja, semente de colza e semente de linhaça. Os Alfa-linoleicos (ALA), EPA e DHA são encontrados em grandes quantidades em óleos de peixes marinhos como salmão, cavala, sardinha, arenque e menhaden (Waitzberg, 2008).



Esquema 1. Ácidos graxos. Fonte: Próprio autor.

Os AG livres são transportados pelo sangue ligados à albumina ou captados e reconstituídos a triglicérides nos tecidos musculares e adiposos. Dependem da carnitina para a oxidação na mitocôndria, sendo metabolizados no fígado e no tecido adiposo. Ajudam a determinar a fluidez das membranas biológicas e apresentam inúmeras outras funções importantes. Por exemplo,  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são precursores de prostaglandinas e leucotrienos, mediadores químicos

que modulam o sistema imune e o sistema nervoso (Waitzberg, 2008).

A importância dos ácidos graxos pôde ser comprovada por Waizberg e colaboradores (2008), que observaram que esquimós têm menor incidência de doenças cardiovasculares, autoimunes e inflamatórias, devido à sua dieta rica em peixes marinhos, ricos em  $\omega$ -3. Em contrapartida, no ocidente a dieta rica em soja leva ao maior consumo de  $\omega$ -6.

Alguns estudos apontam ainda para a necessidade de ingestão de quantidades apropriadas desses ácidos graxos, para que se consiga algum benefício, uma vez que possuem funções fisiológicas opostas. Simopoulos (2000), por exemplo, recomenda reduzir o  $\omega$ -6 e aumentar o consumo de  $\omega$ -3 na dieta de adultos e recém-nascidos (numa proporção de 5:1 a 10:1 de  $\omega$ -3/  $\omega$ -6), objetivando melhor funcionamento mental e cardiovascular. Já na gravidez e lactação seria recomendado garantir uma ingestão de 300mg/dia de DHA, um dos componentes do  $\omega$  -3.

Os AG poli-insaturados (PUFA) reduzem os níveis circulatórios de citocinas pró-inflamatórias (grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes) e a resposta tecidual. O AG  $\omega$ -3 exerce efeito anti-inflamatório sem causar prejuízos às funções imunes, sendo benéfico em condições inflamatórias, pois este faz com que a secreção das prostaglandinas inflamatórias e antileucotrienos seja menos potente, ocasionando menores quantidades de mediadores inflamatórios, além de proporcionar melhor fluidez da membrana de vários tipos de células (WAITZBERG, 2008).

Em relação à neurotransmissão dopaminérgica, pesquisas apontam que a suplementação na dieta de ratos com  $\omega$ -3 gerou o aumento de 40% nos níveis de DA no córtex frontal, assim como na ligação com o receptor de DA, o que é apropriado para o desenvolvimento do sistema dopaminérgico e para um desempenho comportamental normal desses animais na idade adulta (SHALON et al., 1998).

Uma vez que a depressão está associada a níveis elevados de cortisol no sangue, devido a uma disfunção no eixo (HHA) e uma vez que o EPA presente

no  $\omega$ -3 pode regular a disfunção do eixo HHA, reduzindo a liberação de CRH e a consequente secreção de cortisol, torna-se interessante investigar uma possível ação antidepressiva do  $\omega$ -3. Neste sentido o presente trabalho visou induzir comportamentos do tipo depressivos em modelo animal, no intuito de verificar um possível efeito neuroprotetor do  $\omega$ -3 sobre tais comportamentos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Avaliar o efeito do estresse crônico sobre as alterações comportamentais de camundongos adultos suplementados com  $\omega$ -3.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Induzir comportamentos do tipo depressivos em camundongos adultos, por meio de estresse por contenção de movimentos;
- Avaliar os efeitos do estresse por contenção sobre alterações comportamentais nos animais tratados, utilizando –se o teste de Nado Forçado.
- Avaliar os efeitos da suplementação com  $\omega$ -3 sobre alterações comportamentais nos animais tratados, utilizando –se o teste de Nado Forçado.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Animais**

Para o experimento foram disponibilizados pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia camundongos machos adultos da linhagem Balb C. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $23^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ), com ciclo de luz 12h luz/ 12h escuro e com livre acesso a água e alimento, colocados em gaiolas mantidas em gabinetes ventilados (Figura 3), com dois a três animais por caixa.



Figura: 3. Caixas de criação e estante de isolamento. Fonte: REBIR. Universidade Federal de Uberlândia.



Figura: 4. Caixa de criação mini isoladora Alesco. Fonte: <https://www.alescobrasil.com.br>

### **3.2. Delineamento experimental**

Os camundongos machos adultos (60 dias) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo que os que receberam  $\omega$ -3 foram da marca B-well, na proporção de 0,5g de EPA e 0,4g de DHA em 4,2g de  $\omega$ -3, sendo o volume administrado de 10 microlitros por camundongo adulto.

**Grupo 1 (H<sub>2</sub>O):** camundongos adultos (n=12) não submetidos ao estresse e que receberam H<sub>2</sub>O.

**Grupo 2 ( $\omega$ -3):** camundongos adultos (n=12) não submetidos ao estresse e suplementados com  $\omega$ -3;

**Grupo 3 (H<sub>2</sub>O + ES):** camundongos adultos (n=12) submetidos ao estresse e que receberam H<sub>2</sub>O;

**Grupo 4 ( $\omega$ -3 + ES):** camundongos adultos (n=12) submetidos ao estresse e suplementados com  $\omega$ -3;

### 3.3. Indução de estresse por restrição de movimento

Durante 15 dias os animais passaram pelo estresse por restrição de movimento durante o período da manhã, das 10h às 12h (2 horas). O procedimento de imobilização consistia em conter o animal em um tubo cilíndrico acrílico transparente (Figura 4), de 4 cm de diâmetro e 8cm de comprimento, com orifícios para permitir a respiração e lugar para posicionar a cauda. Os camundongos não conseguiam virar a cabeça ou o corpo, experimentando assim uma situação de imobilidade.



Figura: 5 Estresse por restrição de movimento. Fonte: Próprio autor.

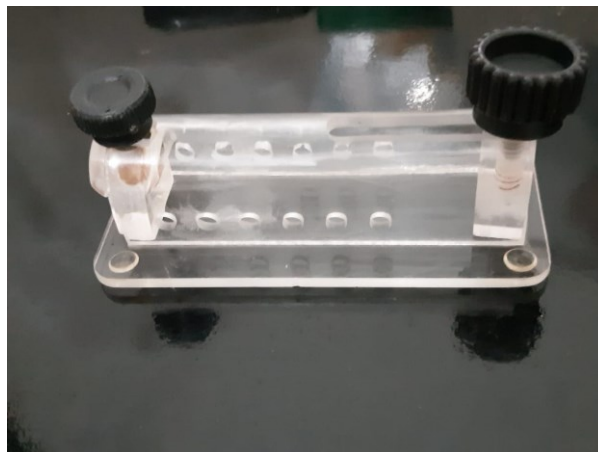


Figura: 6. Aparato de restrição de movimento. Fonte: Proprio autor.

### 3.4. Administração das soluções

As soluções pertinentes a cada grupo experimental (água deionizada ou  $\omega$ -3) foram administradas por gavagem, duas vezes ao dia, sendo a primeira 09h e 15min, ou seja, 45min antes da sessão de estresse aplicada às 10h e a segunda às 16h. O volume de água deionizada (disponibilizada pela REBIR) administrado por animal foi 10 microlitros, para os grupos controles. Para os demais grupos foi utilizado  $\omega$ -3 da marca B-well, na proporção de 0,5g de EPA e 0,4g de DHA em 4,2g de  $\omega$ -3, sendo o volume administrado também de 10 microlitros por animal.

Para o procedimento de gavagem, uma cânula guia (4cm de comprimento) com a ponta curva e arredondada foi introduzida na boca do animal (Figura 5) e gentilmente empurrada para o esôfago, com cautela para assegurar que o tubo não penetrasse inadvertidamente a traqueia.



Figura: 7 Gavagem. Fonte: Próprio autor.

### 3.5. Testes comportamentais

Após o período de 15 dias de tratamento (estresse e gavagem), foram realizados os testes comportamentais nas dependências da REBIR. O teste de nado forçado foi filmado para posterior análise e compilação dos dados.

#### 3.5.1. Teste de Nado Forçado (NF)

O Teste de Nado Forçado é frequentemente usado como modelo para demonstrar efeitos depressogênicos e antidepressivos de manipulações e tratamentos farmacológicos. O teste compreende duas fases: pré-teste e teste. Em ambas as fases, os animais foram colocados em um recipiente cilíndrico (Figura 7) com 33 cm de diâmetro, preenchido com uma coluna de água de 39 cm, sendo está limpa e com temperatura entre 25°C e 27 °C. Primeiramente foi realizado a fase de pré-teste, na qual o animal foi colocado no recipiente e mantido em nado por 15 minutos. Após 24 horas, foi realizado a fase de teste, em que o animal foi colocado novamente no recipiente com água e seus comportamentos filmados por 5 minutos. Posteriormente, o vídeo foi analisado para observação dos comportamentos de imobilidade e nado. Após cada exposição à água os animais foram secos com uma toalha de papel e devolvidos para suas caixas de criação.



Figura: 8 Teste Nado forçado (NF). Fonte: Laboratório de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

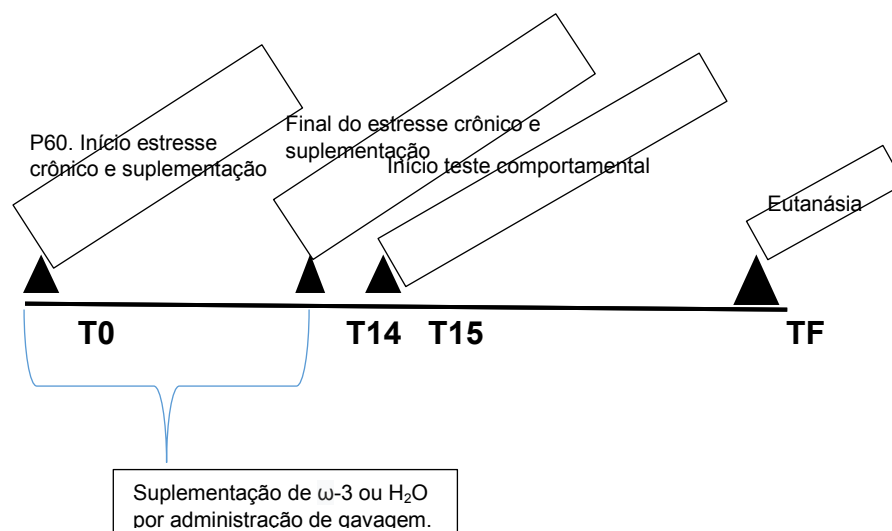


Figura: 9. Linha do tempo. Fonte: Próprio autor.

### 3.6 Método de indução de morte

Após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados utilizando-se aprofundamento de anestesia (solução de cetamina 80mg/Kg e xilazina 10mg/Kg), seguido por deslocamento cervical.



### 3.7. Análise estatística

Foram feitas as análises dos dados pelo programa estatístico Prisma:TWO WAY ANOVA seguida do pós teste Bonferroni para comparações múltiplas. Os valores foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. O nível de significância assumido foi  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

No teste do NF (Gráfico 1), os camundongos do grupo ( $\omega$ -3) tiveram o tempo de imobilidade ( $50,5 \pm 9,81$   $p > 0,05$ ), menor que os camundongos do grupo ( $H_2O$ ) ( $73 \pm 10,12$ ), embora não tenha sido significativo. Porém, os camundongos do grupo ( $\omega$ -3+ES) tiveram um tempo de imobilidade similar ( $86 \pm 12,52$   $p > 0,05$ ) ao grupo ( $H_2O + ES$ ) ( $89,5 \pm 11,54$ ).

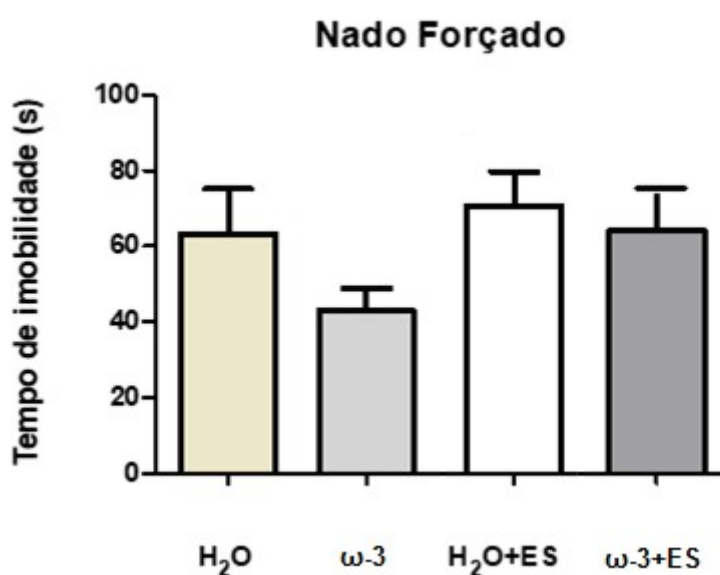


Gráfico:1 Tempo de imobilidade dos 4 grupos experimentais no teste de Nado Forçado. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  EPM.

## 5. Discussão:

A principal resposta endócrina a eventos estressantes é a secreção de glicocorticoides, cortisol em seres humanos e corticosterona em roedores. A hipersecreção desses hormônios do estresse, ou hipercotisolemia, pode

desregular os receptores de glicocorticóides no SNC, principalmente no hipocampo, gerando alterações na funcionalidade do eixo HHA, que é vista em pacientes com depressão e relatada em evidências com roedores (STERNER&KALYNCHUK, 2010; Ferrari & Villa, 2016).

Como citado anteriormente, pesquisas sugerem que, a depressão está relacionada dentre outros fatores, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias no Sistema Nervoso Central. Sabe-se que o  $\omega$ -3 tem capacidade anti-inflamatória, está envolvido na manutenção da fluidez da membrana celular, possibilitando que a célula mantenha a normalidade do seu funcionamento, além de contribuir para o bom funcionamento dos receptores, possibilitando, assim, a ligação do neurotransmissor e o desencadeamento da sinalização celular (DEACON et al., 2015).

Em nosso estudo, realizado com o objetivo de analisar um possível efeito protetor do  $\omega$ -3 em relação à comportamentos do tipo depressivos, utilizamos o teste de Nado forçado. O teste de nado forçado foi avaliado o tempo de imobilidade do animal como um efeito preditivo de comportamentos do tipo depressivo (POSSAMAI, 2013). Uma vez que o animal não depressivo parece perder o impulso natural por continuar a lutar. Quando analisamos nossos dados do Teste de Nado Forçado, vemos que o estresse de contenção, segundo o protocolo utilizado, não foi capaz de aumentar significativamente a imobilidade dos animais, em relação aos grupos que não passaram por estresse. Embora os animais que receberam suplementação com  $\omega$ -3 e que não foram submetidos ao estresse tenham tido menor tempo de imobilidade que os do grupo controle (H<sub>2</sub>O), indicando um possível efeito positivo do  $\omega$ -3 na ausência de estresse, não observamos o mesmo efeito quando comparamos o grupo  $\omega$ -3+ES com o grupo H<sub>2</sub>O + ES.

Existem outros trabalhos que creditem ao  $\omega$ -3 efeitos neuroprotetor, como no caso da suplementação de  $\omega$ -3 em fases iniciais do desenvolvimento cerebral de ratos que obteve êxito em reduzir efeitos ansiogênicos de eventos estressores (FERRAZ et al., 2011). Outro exemplo é o pesquisador Park e colaboradores, na Coréia do Sul que demonstram que indivíduos com depressão apresentam os níveis eritrocitários de  $\omega$ -3 e de EPA e DHA significativamente menores do que

em indivíduos saudáveis (PARK et al., 2012). Apesar disso, nossos resultados não demonstraram efeito benéfico do  $\omega$ -3 no tempo observado para a dosagem utilizada.

## **6. Conclusão:**

Embora nossos resultados não tenham apontado para um efeito neuroprotetor do  $\omega$ -3 em reverter possíveis comportamentos relacionados à depressão, quando avaliados pelo teste de Nado Forçado, fatores como dose da substância utilizada e tempo de observação do protocolo de indução do estresse devem ser levados em conta.

Faz-se necessário, portanto, mais estudos que busquem comprovar os efeitos benéficos do  $\omega$ -3 sobre o sistema nervoso, bem como as dosagens e associações ideais para que se obtenha esse efeito neuroprotetor.

## Referências bibliográficas

American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5<sup>th</sup> ed. 2013). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

Brats. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em saúde. Antidepressivos no Transtorno Depressivo Maior em adultos. ISSN 1983-7003; Ano VI nº 18; Março 2012.

Deacon, Gelinda et al.  $\Omega$  3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression. Critical reviews in food science and nutrition, v. 57, n. 1, p. 212-223, 2017.

Ferrari, F., & Villa, R. F. (2016). The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence.

Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, et al. Chronic w-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. Behav Brain Res. 2011;219(1):116-22

Guyton, A.C.; HALL. J.E. Tratado de Fisiologia Médica, 10<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2002.

Gourley, S. L. et al. Regionally Specific Regulation of ERK MAP Kinase in a Model of Antidepressant-Sensitive Chronic Depression. Biological Psychiatry, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 353–359, 2008.

Haverson JL. Bienenfeld D. Depression.Medscape, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/286759-overview#showall>>

Houaiss A, Villar MS, Franco FM. Dicionario da língua Portuguesa. Rio de Janeiro, 1<sup>o</sup> edição, 2001, p 1264.

Krishnan V.NestlerEJ.Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. The American Journal of Psychiatry. 2010;167(11):1305-1320.[PMC free article] [PubMed]

Maes, M. et al. Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon

which is related to immune activation. *Life Sciences*, v. 71, n. 16, p. 1837–1848, 2002.

Maletic, V. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in Bioscience*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 5291, 2009. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3598/list.htm>>

Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM. 1999. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 21, 1516-4446. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44461999000500006>>

OPAS/OMS, Folha informativa – Depressão, 2017. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095)>

Park Y, Kim M, Baek D, et al. Erythrocyte n–3 polyunsaturated fatty acid and seafood intake decrease the risk of depression: case-control study in Korea. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(1):25-31.

Peet M. Stokes C.  $\Omega$ -3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs*. 2005; 65(8): 1051-9.

Possamai, Fernanda. Teste do nado forçado repetido: avaliação dos efeitos da imipramina sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal dos ratos alojados em ambiente enriquecido. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

Ribeiro L. Kapczinsk F. Ansiedade In: Kapczinski F. q uevedo J, Izquiedo I, editores. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre. Artmed editora; 2000. P. 133-141.

Simopoulos AP.  $\Omega$ -3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002;21(6):495-505.

Shalon S. Delion –Vancassel S. Belzung C, et.al. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *Journal of Nutrition*. 1998;128(12):2512-2519. [PubMed].

Sterner, E. Y., & Kalynchuk, L. E. (2010a). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*.

Thomas, J. et al.  $\Omega$ -3 fatty acids in early prevention of inflammatory neurodegenerative disease: a focus on Alzheimer's disease. *BioMedresearchinternational*, v. 2015, 2015.

Vanietallie TB. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolim* 2002; 51(6suppl 1) : 40-45.

Waitzberg DL, Borges VC. Gorduras. In: Waitzberg DL, editor. *Nutrição oral enteral e parental na pratica clinica*. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2008. P. 55-78.

Zemdegs, Juliane Costa Silva; Pimentel, Gustavo Duarte; Priel, Margareth Rose. Ácidos graxos ômega 3 e tratamento da esquizofrenia. *ArchivesofClinicalPsychiatry*, 2010.