



ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO ENCÉFALO DE RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS COM DOSES SUPRA RECOMENDADAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6

Pedro Henrique da Silva Braga¹, Matheus Felipe Zazula²

¹Acadêmico do Curso de Psicologia, Campus Curitiba-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. pedroshbraga@gmail.com

²Orientador, Doutor, Docente no Curso de Biologia, UNICESUMAR. Pesquisador da Universidade Federal do Paraná– UFPR. matheus.zazula@unicesumar.edu.br

Resumo

O trabalho visa investigar os efeitos da suplementação crônica de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) ômega-3 e ômega-6 na estrutura e desenvolvimento do encéfalo de ratas *Wistar*, avaliando alterações na barreira hematoencefálica, no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e na morfologia e desenvolvimento de neurônios. Para isso, foram utilizadas 120 ratas *Wistar*, que foram divididas em grupos tratados com diferentes tipos de suplementação. Os grupos incluíram um controle não suplementado e grupos suplementados com compostos ricos em ômega-3 e ômega-6. Antes do acasalamento as ratas foram alocadas em gaiolas metabólicas para monitorar o consumo alimentar e hídrico. Após o período de suplementação, foram eutanasiadas em diferentes fases: pré-acasalamento, ao final da gestação, após o parto e após o desmame. Foram coletados sangue, leite e tecidos, órgãos reprodutivos e encéfalo, os quais foram analisados bioquimicamente, histologicamente e morfologicamente. Os dados coletados incluíram medições de peso e análises de estrutura celular, buscando avaliar alterações induzidas pela suplementação. Com o estudo, espera-se encontrar a identificação de mudanças na integridade da estrutura neural e encefálica, assim como neurodesenvolvimento prejudicado, buscando proporcionar maior esclarecimento a respeito do equilíbrio entre AGPIs ômega-3 e ômega-6 na saúde e preservação do encéfalo.

PALAVRAS-CHAVE: Fluxo sanguíneo cerebral; Barreira hematoencefálica; Morfologia.

1. INTRODUÇÃO

Ácidos graxos (AG) são macromoléculas lipídicas compostas por uma cadeia de átomos de carbono conectados a átomos de hidrogênio que estão ligados a um grupo ácido (-COOH). Ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) são, por sua vez, ácidos graxos que contêm mais de uma ligação dupla. Os AGPIs ômega-3 (n-3) são caracterizados por ligação dupla entre carbonos número 3 e 4 na cadeia de hidrocarbonetos. Esses ácidos graxos incluem ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido alfa-linolênico (ALA) e ácido docosaenoico (DHA). Os AGPIs n-3 são comumente encontrados em peixes, especialmente EPA e DHA. AGPIs n-6 são caracterizados por ligação dupla entre carbonos número 6 e 7 na cadeia de hidrocarbonetos. Ômega-6, como o ácido linoleico (LA) e o ácido araquidônico (AA), desempenha um papel pró-inflamatório, principalmente o ácido araquidônico (Calder, 2015; Khan et al, 2023).

AGPIs n-3 e n-6 são essenciais e constituem parte importante da alimentação, não sendo produzidos por seres humanos e outros mamíferos devido à falta de enzimas endógenas para dessaturação de ômega-3. Os ácidos graxos, de maneira geral, desempenham atividades importantes no organismo humano, desde estoque de energia e fonte energética até componentes estruturais das membranas celulares. AGPIs n-3 possuem grande interesse nutricional já que estão constantemente atribuídos com benefícios à saúde. Com o desenvolvimento do agronegócio e agricultura, dietas ocidentais modernas acabam sendo constituídas por uma quantidade excessiva de n-6, resultando em uma proporção não saudável de n-6/n-3 de 20:1, muito desequilibrada se comparada à proporção de 6:1 recomendada pela OMS (Simopoulos, 2016).



O aumento da ingestão de AGPIs n-6 na dieta ocidental resulta na produção excessiva, especificamente, de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos graxos hidroxilados e lipoxinas. Eicosanoides do AA são biologicamente ativos em pequenas quantidades, mas quando formados em excesso, podem contribuir para a formação de trombos, ateromas, doenças alérgicas e distúrbios inflamatórios, principalmente em pessoas suscetíveis. Uma dieta rica em n-6 altera o estado fisiológico para um ambiente pró-trombótico e pró-inflamatório, aumentando a viscosidade sanguínea e vasoconstrição. (Simopoulos, 2000)

Tendo em vista que n-6 tem ações pró-inflamatórias, uma dieta com proporções muito elevadas de n-6 para n-3 está associada com uma maior probabilidade de morte por doença cardiovascular, assim como a prevalência de diabetes mellitus tipo 2.

No cérebro, lipídios correspondem à 50-60% do peso total, sendo 35% apenas de n-3. DHA é responsável por 40% do total de n-3 no tecido neuronal (Dighriri et al, 2022). AGPIs regulam a estrutura e função de neurônios, células gliais e células endoteliais, por esse motivo a diversidade de AG dos fosfolipídios cerebrais podem influenciar propriedades biofísicas na membrana, como por exemplo, a fluidez. O funcionamento correto das proteínas de membrana do neurônio é dependente do potencial de membrana, ocupação do receptor, associações intermoleculares dependentes de fosforilação e composição de proteínas e lipídios (Conquer et al, 2000; Bazinet, 2014). Além disso, AGPIs apresentam papel importante na sobrevivência neuronal, neurogênese, função sináptica e na regulação da inflamação cerebral. Portanto, não é estranho uma alimentação desregulada no consumo de AGPIs estar comumente associada com distúrbios neurológicos e queda cognitiva (Bazinet, 2014).

A ingestão de n-3 aparenta ter resultados benéficos no cérebro, como um efeito neuroprotetor no envelhecimento do cérebro, freando a atrofia cerebral e proporcionando aumento do volume de matéria cinzenta (Bos et al, 2016). Outro benefício relacionado à ingestão de n-3 é o aumento do fluxo sanguíneo cerebral (FSC), reação comumente associada à AGPIs n-3 por conta de sua atividade anti-inflamatória. FSC prejudicado está geralmente associado a doenças neurodegenerativas como o Alzheimer por exemplo (Haast et al, 2015)

Estudos demonstraram uma associação entre o consumo de n-3 com a redução do risco e desenvolvimento nos sintomas de Alzheimer e demência. Pacientes com Alzheimer em estágio inicial podem sofrer atraso na perda de desempenho cognitivo e melhora na qualidade de vida quando sob uma suplementação de n-3 (Freund-Levi et al, 2006). Além disso, o estudo *Framingham Heart Study* (Schaefer et al, 2006) demonstrou uma redução de 47% no risco de desenvolvimento de demência em pacientes com alto nível de DHA plasmático. O estudo demonstrou também que a ingestão de peixes atua como uma fonte importante de DHA na dieta, tendo em vista que os pacientes com os níveis de DHA plasmático mais alto tiveram uma ingestão de peixe mais alta se comparada com os outros pacientes. Entretanto, o DHA derivado dos peixes representou menos da metade da ingestão total.

Em contrapartida, indivíduos com menor consumo e prevalência de n-3, especialmente DHA, em comparação com n-6, apresentam piora cognitiva e maiores riscos de desenvolvimento de Alzheimer (Conquer et al, 2000). É válido ressaltar que doenças neurológicas estão muito associadas com fatores genéticos e outras questões como educação e fatores socioeconômicos.

Outro tópico muito discutido quando se fala em AGPIs é a obesidade, já que o número de indivíduos obesos vem aumentando e por consequência o crescimento de problemas à saúde relacionados com a obesidade, como por exemplo, hipertensão, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Um dos principais motivos para a ocorrência



da obesidade é o desequilíbrio no metabolismo energético, no qual o hipotálamo desempenha grandes funções.

O hipotálamo é um importante componente do sistema nervoso central, recebendo sinais de hormônios periféricos e nutrientes para assim integrar o sinal e promover equilíbrio energético no corpo, regulando o comportamento alimentar, consumo de energia e metabolismo. Neurônios selecionados do hipotálamo possuem moléculas capazes de detectar o estado energético do organismo. Após a ativação ou inibição por fatores centrais e sistêmicos, como neurotransmissores, hormônios, citocinas e nutrientes, essas moléculas desempenham um importante papel na regulação de respostas neuronais, permitindo controle da homeostase energética do corpo como um todo. Portanto, a inflamação no hipotálamo está geralmente presente em indivíduos obesos ou com distúrbios metabólicos (Fang et al, 2018; Dragano et al, 2020).

O núcleo arqueado do hipotálamo é a principal área do cérebro que controla a ingestão e o consumo de energia, além de controlar o equilíbrio energético do corpo. Caso haja inflamação, o mecanismo de regulação do equilíbrio é destruído no hipotálamo. A obesidade é causada principalmente por inflamação hipotalâmica crônica de baixo grau. Várias pesquisas sugerem que os AGPIs n-3 tiveram o efeito anti-inflamatório, mas o efeito sobre a obesidade não foi claro (Fang et al, 2018).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 120 ratas da linhagem Wistar, aproximadamente 75 dias de idade, obtidas e mantidas no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Após um período de dez dias de aclimação, os animais foram distribuídos em grupos experimentais distintos:

Grupo Controle (CTLE) – fêmeas não submetidas a nenhuma intervenção experimental; Grupo Suplementado com n-3 (SPL3) - fêmeas suplementadas diariamente com 4,0 g/kg de um composto de extratos marinhos, rico em ácidos graxos n-3; Grupo Suplementado com n-6 (SPL6) - fêmeas suplementadas diariamente com 4,0 g/kg de um composto de extratos vegetais, rico em ácidos graxos n-6.

O volume de óleo correspondente ao peso de cada animal foi administrado via oral diariamente, utilizando uma pipeta de volume regulável. Após 20 dias de suplementação, as fêmeas dos quatro grupos acasalaram com machos Wistar não suplementados. Durante as fases de acasalamento, gestação e lactação a dieta foi mantida com os respectivos ácidos graxos para garantir a transferência desses compostos para os fetos em desenvolvimento, tanto pela circulação placentária quanto pelo aleitamento materno. Com a confirmação da prenhez ou não, as ratas foram separadas para a coleta dos dados.

Cinco dias antes do acasalamento, as ratas foram individualmente alocadas em gaiolas metabólicas durante 24 horas para medir o volume de urina, o peso total das fezes, e o consumo alimentar e hídrico. Durante o período experimental, a sensibilidade periférica à glicose foi avaliada por meio do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (BOGDANET et al., 2020; SMALL et al., 2022).

As ratas foram designadas para eutanásia em diferentes momentos: no dia do acasalamento (PRÉ), ao final da gestação (DG18), após o parto (DPN03) ou após o desmame (DPN21). O sangue total foi coletado e centrifugado para separação do plasma, que foi armazenado em ultra freezer para análises bioquímicas. Nessas datas também foi realizada a coleta dos macrófagos peritoneais, por meio da injeção de 10 mL de tampão PBS pH 7,4 na cavidade abdominal.

Durante a fase de lactação, o leite das ratas foi coletado nos dias DPN03 e DPN21 por ordenha manual sob estímulo de ocitocina e armazenado para análises bioquímicas.



As amostras serão submetidas ao processo de desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto) seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina de cera de abelha (3%) (Bancroft & Gamble, 2008; Carson & Hladik, 2009). Os blocos de parafina serão cortados em micrótomo utilizando-se da técnica de seccionamento seriado do encéfalo a uma espessura de 5-7 μm , para análise histológica (Kiernan, 2015; Feldman & Wolfe, 2014). Após cortado o material será submetido ao processo de desparafinação onde utilizará o xilol três ao xilol um. Logo após será feito o processo de reidratação em concentrações decrescentes de etanol (absoluto, 95%, 90%, 80% e 70%). As lâminas serão coradas utilizando Hematoxilina e Eosina (H&E) e Violeta de cresil, visando a diferenciação entre os componentes celulares e a avaliação das alterações estruturais no tecido nervoso, como por exemplo neurônios e substância cromófila (Bancroft & Gamble, 2008; Kiernan, 2015). As lâminas coradas serão analisadas em microscópio óptico, com especial atenção para a integridade do tecido neuronal, a presença de alterações na estrutura celular, alterações hipotalâmicas, apoptose, necrose, e outras possíveis lesões teciduais associadas à exposição aos ácidos graxos. (Kumar et al., 2020; Lobo et al., 2017). Posteriormente, serão fotografadas por meio de um microscópio digital, a fim de registrar e comparar as diferenças de cada grupo suplementado com AGPIs (Krishnamurthy & Weinbauer, 2014; Drury & Wallington, 1980).

3. RESULTADOS ESPERADOS

Com o presente estudo, espera-se encontrar, assim como em estudos de mesmo caráter, alterações morfológicas e funcionais no encéfalo, tais como mudanças na estrutura neural, como redução no tamanho e alterações na fluidez da membrana, e de áreas do encéfalo como o hipotálamo, aumento ou redução do volume de massa cinzenta presente, interferências no fluxo sanguíneo cerebral, tendo em vista os efeitos pró e anti-inflamatórios resultantes da suplementação de AGPIs, assim como alterações na barreira hematoencefálica.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de AGPIs n-3 tem cada vez mais ganhado atenção por conta de seus potenciais benefícios à saúde, em particular, suas propriedades anti-inflamatórias e as maneiras que sua suplementação afeta no desenvolvimento do sistema nervoso central. No encéfalo, lipídios, incluindo ácidos graxos, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e função das células. Entretanto, a literatura é escassa quando se trata de avaliar os efeitos de dosagens supra recomendadas desses ácidos graxos na estrutura do encéfalo. Dado esse contexto, o trabalho visa avaliar os potenciais efeitos da suplementação crônica de AGPIs n-3 e n-6 no encéfalo de ratos *Wistar*.

REFERÊNCIAS

BOS, Dienke J. et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human brain morphology and function: What is the evidence?. *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 3, p. 546-561, 2016.

CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.



CONQUER, Julie A. et al. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*, v. 35, p. 1305-1312, 2000.

DIGHRIRI, Ibrahim M. et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain functions: a systematic review. *Cureus*, v. 14, n. 10, 2022.

DRAGANO, Nathalia R.; MONFORT-PIRES, Milena; VELLOSO, Licio A. Mechanisms mediating the actions of fatty acids in the hypothalamus. *Neuroscience*, v. 447, p. 15-27, 2020.

FANG, Xin et al. Effects of n-3PUFAs on autophagy and inflammation of hypothalamus and body weight in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 501, n. 4, p. 927-932, 2018.

FREUND-LEVI, Yvonne et al. ω -3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Archives of neurology*, v. 63, n. 10, p. 1402-1408, 2006.

HAAST, Roy AM; KILIAAN, Amanda J. Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 92, p. 3-14, 2015.

KHAN, Imad et al. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids: Metabolism and health implications. *Progress in lipid research*, v. 92, p. 101255, 2023.

SCHAEFER, Ernst J. et al. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Archives of neurology*, v. 63, n. 11, p. 1545-1550, 2006.

SIMOPOULOS, A. P. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry science*, v. 79, n. 7, p. 961-970, 2000.

SIMOPOULOS, Artemis P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 128, 2016.