

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA
FAMÍLIA ÔMEGA-3 SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUIDUTAL DE RATOS WISTAR

*Effect of supplementation with polyunsaturated fatty acids of omega-3 family on the
expression of proteins in grey periaqueductal substance of wistar rats*

Aniely Ruckhaber Barbosa¹
Marcelo de Meira Santos Lima²
Camila Moraes Marques³
Anete Curte Ferraz⁴

RESUMO

Os ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3) encontrados em gorduras e óleos naturais, são parte de componentes estruturais significativos em fosfolipídios de membranas celulares, facilitam a formação de espinhas dendríticas e crescimento neuronal, desempenhando assim um importante papel tanto na estrutura, quanto nas funções das células. Em trabalhos anteriores, em que ratos wistar foram suplementados com óleo de peixe (ômega-3), observou-se um efeito antidepressivo que parece estar relacionado ao envolvimento do sistema serotoninérgico. A partir desses resultados, ao investigar fases específicas de suplementação decidiu-se realizar uma investigação mais aguçada sobre duas proteínas sinápticas na substância cinzenta periaqueductal (SCP): A triptofano hidroxilase (TPH) e o transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT 2). Através da técnica de imunohistoquímica, observou-se que, na presença do óleo de peixe ocorre o

1. Biomédica formada pelas Faculdades Integradas do Brasil.
2. Professor Doutor do departamento de Fisiologia e do curso de Pós-graduação em Fisiologia – UFPR
3. Professora Doutora das Faculdades Integradas do Brasil.
4. Professora Doutora do departamento de Fisiologia e do curso de Pós-graduação em Fisiologia - UFPR

Cadernos da Escola de Saúde

aumento da densidade óptica para neurônios imunorreativos para VMAT2 e a diminuição dos mesmos para TPH.

Abstract

The polyunsaturated fatty acids (omega 3), found in fats and nature oils, are part of significant structural components of cell membrane phospholipids that facilitate the formation of dendritic spines and neuronal growth, making an important role in structure and functions of cells. In previous works, in which wistar rats were supplemented with fish oil (omega 3), it was observed an antidepressant effect that is related to a serotonergic effect. From these results, to investigate specific stages of supplementation, was decided to conduct a thorough investigation on two synaptic proteins in the periaqueductal gray matter (PAG): the tryptophan hydroxylase (TPH) and the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT 2). The immunohistochemistry, technique performed in the methodology, showed that the presence of fish oil occurs increase in VMAT2 and reduced TPH.

Descritores: ácidos graxos poliinsaturados; óleo de peixe; substância cinzenta periaquidutal; triptofano hidroxilase; transportador de monoamina 2.

Descriptors: polyunsaturated fatty acids omega-3; fish oil; periaqueductal gray matter; tryptophan hydroxylase; vesicular monoamine transporter 2

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados (ômega 3) encontrados em gorduras e óleos naturais, são parte de componentes estruturais significativos em fosfolipídios de membranas celulares. Essenciais para o crescimento normal e desenvolvimento em mamíferos, facilitam a formação de espinhas dendríticas e crescimento neuronal ⁽¹⁾. Desempenham, assim, um importante papel tanto na estrutura, quanto nas funções das células ^(2,3).

Presentes na membrana de neurônios de mamíferos, eles determinam as propriedades biofísicas das membranas neuronais ^(4,5). São capazes de modificar as características físico-químicas das membranas neuronais promovendo assim, alterações na função cerebral. Por esse motivo, participam ativamente de processos de sinalização celular interferindo no funcionamento de receptores, na recaptação de neurotransmissores e na transmissão de sinais ^(4,6).

Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, em que ratos wistar foram usados como experimento, observou-se que a administração crônica de ácidos graxos poliinsaturados, durante a gestação, lactação e pós-lactação até a vida adulta desenvolveu um efeito antidepressivo ⁽⁷⁾. Posteriormente, esta suplementação foi realizada somente durante a gravidez e lactação, fase crítica no desenvolvimento do sistema nervoso central e, observou-se também nesta fase um efeito antidepressivo ⁽⁸⁾. Análise comportamental dos animais suplementados correlaciona

Cadernos da Escola de Saúde

o efeito antidepressivo do óleo de peixe à alteração do sistema serotoninérgico ⁽⁹⁾. O sistema serotoninérgico está extremamente relacionado com as funções afetivas, cognitivas e psiquiátricas. A depressão, por exemplo, tem sido correlacionada a níveis plasmáticos diminuídos de serotonina ⁽¹⁰⁾. Em modelos animais de depressão os níveis deste neurotransmissor encontram-se diminuídos em estruturas envolvidas na neurobiologia da depressão como o hipocampo ⁽¹¹⁾.

Também, sabe-se que drogas antidepressivas aumentam a neurotransmissão serotoninérgica. Como consequência, a depressão tem sido associada à diminuição dos níveis de serotonina ⁽¹²⁾. Como a depressão e a ansiedade freqüentemente ocorrem no mesmo paciente é difícil conciliar que a hipótese de níveis baixos de serotonina na depressão e a hipótese de excesso de serotonina na ansiedade, principalmente porque antidepressivos melhoram muitos tipos de patologias de ansiedade, incluindo pânico, desordem obsessiva compulsiva e desordens generalizadas de ansiedade ⁽¹³⁾.

Segundo Deakin e Graeff, existem diferentes vias serotoninérgicas implicadas na ansiedade e depressão. Especificamente, a via que se projeta do núcleo dorsal da rafe para a substância cinzenta periaquedutal. Segundo este modelo teórico a serotonina exerceria um papel ansiogênico, aumentando o comportamento de punição em roedores ⁽¹⁴⁾.

Considerando os efeitos antidepressivos apresentados pelo óleo de peixe na literatura descrita anteriormente, este trabalho objetivou investigar o efeito do óleo de peixe em uma estrutura cerebral envolvida com ansiedade. Para tanto,

Cadernos da Escola de Saúde

resolvemos estudar o efeito do óleo de peixe sobre duas proteínas sinápticas: A triptofano hidroxilase (TPH) e o transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT 2) na substancia cinzenta periaqueduta (SCP).

A triptofano hidroxilase (TPH), é uma enzima que converte triptofano em 5-hidroxitriptofano, e é sintetizada nos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos no sistema nervoso central ⁽¹⁵⁾. Sendo assim, a sua função é catalisar a hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano, que em seguida é descarboxilado, formando a serotonina. Além disso, a TPH é quem limita as taxas de serotonina no cérebro, por este motivo seu gene vem sendo estudado nas investigações de bases biológicas de transtornos psiquiátricos. ⁽¹⁶⁾.

A segunda proteína em estudo, é o transportador vesicular de monoaminas 2, responsável por uma função central na fisiologia celular. Ele é quem faz o acúmulo de neurotransmissores monoaminas em vesículas sinápticas e tem sido implicado na síntese e armazenamento de histamina ⁽¹⁷⁾. Além disso, o VMAT-2 é de extrema importância, pois facilita a captação de catecolaminas e serotonina em vesículas sinápticas e, logo, é um regulador essencial da função neuronal monoaminérgica e o responsável pelo transporte vesicular da noradrenalina, serotonina e histamina ⁽¹⁸⁾.

METODOLOGIA

Todos os experimentos contidos nesta pesquisa seguiram as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) protocolo aprovado sob o número 400.

Cadernos da Escola de Saúde

Foram utilizadas 30 ratas Wistar, obtidas no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, de aproximadamente 10 semanas de vida, como matriz para obtenção de ratos wistar machos. Elas foram divididas em dois grupos: grupo suplementação com óleo de peixe (OP) e grupo controle (C). As ratas do grupo OP receberam diariamente, via oral, uma mistura de óleo de peixe composta de 12% de ácido docosahexaenóico (DHA), 18% de ácido eicosapentaenóico (EPA) e antioxidante tocoferol, administrada, via oral, com pipeta automática de volume ajustável. O óleo de peixe foi cedido pelo Herbarium Laboratório Botânico Ltda. Já o grupo C recebeu somente água, via oral, administrada com pipeta automática de volume ajustável. O período de suplementação compreendeu uma fase de adaptação a suplementação, de 15 dias antes do acasalamento, e estendeu-se durante a gestação e lactação, até os 21 dias de vida dos filhotes. Para o acasalamento, os machos foram colocados com as fêmeas em gaiolas, na proporção de 1 para 3, onde ficaram oito dias. Após o nascimento, foram separados os filhotes machos para a formação do grupo OP e do grupo C, que permaneceram com as respectivas mães, durante o período de lactação, até os 21 dias de vida. Após 21 dias, ocorreu o desmame e os filhotes foram alojados em gaiolas, de acordo com o grupo, onde passaram a receber somente ração e água *ad libitum* até os 90 dias. Após esse período, os animais foram ortotansados para a realização da análise por imunohistoquímica.

Inicialmente, os animais foram anestesiados (200mg/kg tiopental sódico) e perfundidos transcardiacamente solução tampão fosfato 1M contendo heparina (1ml/l), seguida de solução de para formaldeído a 4% em 0,1M de tampão fosfato,

Cadernos da Escola de Saúde

pH 7,4. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos, pós-fixados na mesma solução fixadora a temperatura ambiente durante 2 horas e então foram crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% diluída em solução tampão fosfato e acondicionadas a 4 °C. Secções coronais (30 µm) foram obtidas por um criostato (Leitz, Digital 1702) e coletadas em solução anti-freezing. Após 24 horas, iniciou-se a imunohistoquímica por imersão (FREE-FLOATING). Depois de retirados da geladeira, lavou-se 3 três vezes os cortes em PBS 0,1M. Em seguida, bloqueou-se com peroxidase endógena por 10 minutos. Lavou-se uma vez em PBS 0,1M. Bloqueou-se com Blocking buffer (PBS + Triton + soro de cabra) por trinta minutos. Incubou-se o anticorpo primário (Rabbit VMAT2 e Sheep TPH- CHEMICON INTERNACIONAL) por 12 horas. No dia seguinte, lavou-se com PBS 0,1M. Incubou-se o anticorpo secundário (Biotinylated Anti-rabbit e Anti-sheep) diluído 1:200 em Blocking buffer. Lavou-se com PBS 0,1M. Adicionou-se o complexo ABC (*Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase*) e incubou-se por duas horas. Lavou-se em PBS 0,1M. Incubou-se com Kit DAB (Diaminobenzidina). Lavou-se com PBS 0,1M. Em seguida os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados para secagem durante 48 horas. Após secagem as lâminas foram desidratadas em álcool (50% - 70% - 100%) e diafanizadas em xilol. Por fim, foram cobertas com Entellan e lamínulas. As fotos das lâminas foram tiradas através de microscópio em aumento de 10X e 40X. Na SCP a densidade óptica foi avaliada semi-quantitativamente por densitometria através do software Image Pro Express.

Cadernos da Escola de Saúde

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média e submetidos ao teste “t” de Student. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Na figura 1 encontramos os resultados relativos à expressão da TPH na SCP. Podemos observar que os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram menor densidade óptica dos neurônios imunorreativos a TPH quando comparados ao grupo controle ($t=3.803$; teste t de Student; $P<0.005$).

Legenda: DMSCP: dorsomedial da SCP; DVSCP: dorsoventral da SCP; L: Lateral; VLSCP: ventrolateral da SCP; InC: núcleo intersticial de Cajal; Aq: Aqueduto.

A figura 2 expressa os resultados referentes à expressão da VMAT2 na SCP. Os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram maior densidade óptica dos neurônios imunorreativos a VMAT2 quando comparados ao grupo controle ($t=396.13$; teste t de Student; $P<0.0001$).

Legenda: DMSCP: dorsomedial da SCP; DVSCP: dorsoventral da SCP; L: Lateral; VLSCP: ventrolateral da SCP; InC: núcleo intersticial de Cajal; Aq: Aqueduto.

DISCUSSÃO

A importância da incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados nas membranas neuronais é amplamente divulgada, pois os seus inúmeros benefícios têm chamado a atenção dos estudiosos por atuarem benéficamente na atividade

Cadernos da Escola de Saúde

encefálica e em diferentes neuropatias, como a doença de Alzheimer, depressão e esquizofrenia ⁽¹⁹⁾.

Como já comentado anteriormente, em trabalhos em que a suplementação foi realizada durante a gravidez e lactação de ratos, obteve-se um efeito antidepressivo em diferentes janelas temporais. Em nosso trabalho, a fase compreendida entre gestação e lactação foi eleita como janela temporal para a realização da suplementação com óleo de peixe. Esta fase representa um momento crucial para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Logo, a incorporação do ômega-3 nesse período interfere diretamente no desenvolvimento cerebral influenciando as funções fisiológicas, incluindo a visão, cognição e promovendo a maturação sensorial e neuronal ^(8, 20).

Através de estudos prévios realizados em nosso laboratório o efeito antidepressivo provocado pelo óleo de peixe envolve a participação do sistema serotoninérgico. Também observamos em ratos submetidos a estresse crônico o efeito do óleo de peixe revertendo o comportamento ansiogênico desencadeado pelo estresse no teste do labirinto em cruz elevado (dados submetidos a publicação na revista Behavioral Brain Research). À luz do conjunto destes resultados objetivamos, neste trabalho estudar o papel da suplementação com óleo de peixe, rico em ácidos graxos da família ômega-3 sobre o sistema serotoninérgico na SCP.

Segundo Graeff, na SCP a serotonina está relacionada à emissão de comportamento tipo ansiogênico. Portanto, no trabalho realizado anteriormente, quando observamos aumento na permanência do animal nos braços fechados do

Cadernos da Escola de Saúde

labirinto em cruz elevado (comportamento ansiogênico), induzido pelo estresse de imobilidade, é possível que este comportamento reflita um efeito da serotonina na SCP ⁽¹³⁾.

No trabalho atual observamos diminuição da densidade óptica de TPH (um precursor serotoninérgico) em neurônios imunorreativos na SCP em ratos suplementados com óleo de peixe. Portanto, a partir dos resultados deste trabalho, é possível sugerir que o óleo de peixe diminui a síntese de serotonina na SCP levando o animal a apresentar um comportamento de baixa ansiedade. Esta diminuição de serotonina pode estar associada à reversão do comportamento ansiogênico em animais que foram estressados e receberam óleo de peixe concomitantemente.

Já no VMAT2, que é o responsável pelo transporte vesicular da noradrenalina, serotonina e histamina até as vesículas sinápticas, o óleo de peixe expressou um aumento dessa proteína. Como ele não é um transportador específico, não podemos saber a quem esse aumento está direcionado, logo poderia refletir um aumento de noradrenalina vesicular. No entanto, não podemos descartar a possibilidade deste transportador tentar aumentar a captação vesicular de serotonina, uma vez que esta está em concentração diminuída em função síntese diminuída. Para confirmação ou não destas hipóteses estudos posteriores como dosagem de serotonina e seus metabólitos nessa área cerebral serão necessários.

CONCLUSÃO

- 1- A fase na qual ocorreu a suplementação mostrou-se extremamente adequada para o estudo atual;

Cadernos da Escola de Saúde

- 2- O óleo de peixe diminuiu de forma eficaz o precursor da serotonina na SCP. Tal resultado pode expressar um efeito ansiolítico do óleo de peixe frente a períodos de estresse;
- 3- O óleo de peixe aumentou a expressão de VMAT2 na SCP. Novos estudos serão necessários para a devida interpretação destes dados a nível comportamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ZIMMER, L et al. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3-polyunsaturated fatty acids deficiency in rodents. **Neuroscience Letters**, V. 321, Issues 1-2, Pages 95-99, 15 March 2002.
- 2- WAINWRIGHT, P.E et al. Brain and behavioral effects of dietary n-3 deficiency in mice: a three generational study. **Dev. Psychobiology**. 27: 467–487, 1994.
- 3- ITOKAZU, N et al. Bidirectional actions of docosahexaenóico acid on hippocampal neurotransmissions in vivo. **Brain Research**, vol. 862, p. 211-216, 2000.

Cadernos da Escola de Saúde

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

- 5- JENSEN, M.M et al. Correlation between level of (n-3) polyunsaturated fatty acids in brain phospholipids and learning ability in rats. A multiple generation study. **Biochim Biophys Acta**, 1300 (3): 203-9, 1996.

- 6- AUESTAD, N and INNIS, S.M. Dietary n-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body and growth-cone fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 71, n°. 1, 312S-314s, January 2000.

- 7- NALIWAIKO, K et al. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant. **Nutr. Neurosci**, 7 (2): 91–99, april 2004.

- 8- FERRAZ, A.C et al The antidepressant role of dietary long- chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. The antidepressant role of dietary long- **Prostaglandins, Leukot. Essenti. Fatty Acids**, v. 78, p. 183-188, 2008.

- 9- Vines et al., 2012. 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, p. 184-191.

- 10- KORNUM, P. W et al. Serotonin depletion results in a decrease of the neuronal activation caused by rivastigmine in the rat hippocampus. **Brain Research**, V. 1073-1074, Pages 262-268, 2006.
- 11- VENNA, V.R et al. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p. 199-211, 2009.
- 12- COPPE, A. The biochemistry of affective disorders. **Br, J. Psychiatry**, V. 113:1237-1264, 1967.
- 13- GRAEFF, F,G et al. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology biochemistry and behavior**, V. 54, N 1, Pages 129-131, 1996.
- 14-DEAKIN, J.F.W and GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol**, 5:305-315, 1991.
- 15-BICALHO, M.A.C. **Estudo de polimorfismo do gene da triptofano hidroxilase 2 (TPH2) em idosos com depressão de início tardio**. Minas Gerais, 2007, 96 f. Dissertação (mestre em ciências biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais.

Cadernos da Escola de Saúde

- 16-ROSSI, L e TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. **Arq Bras Endocrinol Metab.** V.48, n°2, 2004.
- 17- WATSON, F et al. Transcriptional activation of the rat vesicular monoamine transporter 2 promoter in gastric epithelial cells: regulation by gastrin. **J Biol Chem.** 9; 276(10):7661–7671, 2002
- 18-BARBOSA, L. F et al. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes. **Química Nova**, v.29, n° 6, 2006.
- 19- DELATTRE, A.M. **Estudo do efeito da suplementação crônica com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 (n-3) sobre aspectos motores e bioquímicos em modelo animal de doença de Parkinson.** [dissertação]. Curitiba (Pr): Univerdade Federal do Paraná, 2008.
- 20- SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct action on the nervous system? Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty acids.** **Biomedicine and Pharmacotherapy.** V. 56, p 365-379, 2002.