

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MAURICIO BARTH

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 EM UM MODELO
ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR ANFETAMINA**

Porto Alegre

2015

MAURICIO BARTH

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 EM UM MODELO
ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR ANFETAMINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Clarissa Severino Gama

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais e meu irmão, por sempre me oferecerem suporte nas minhas escolhas e ajudando como possível.

À minha orientadora, professora Clarissa Severino Gama, por todo o conhecimento transmitido durante meu período no Laboratório de Psiquiatria Molecular e por confiar a mim um trabalho de tamanha magnitude e importância para a ciência.

À minha co-orientadora, Bruna Panizzutti, pelo apoio e por ser essencial nas etapas finais de escrita do artigo.

Ao André, por ter me acompanhado na maior parte desta jornada e sempre ter me ajudado da sua maneira, me acalmando em um dia de crise, cedendo um ombro e até mesmo o computador para eu dar andamento ao trabalho.

Aos membros do Laboratório de Psiquiatria Molecular, pelo companheirismo e disponibilidade em estender a mão sempre que solicitado. Em especial a Bruna Maria, Luiza, Giovana, Eduarda e Pamela por terem me auxiliado no andamento do modelo animal.

Um agradecimento especial ao Gabriel Fries e Carolina Gubert por serem modelos de pesquisadores comprometidos com a ciência, serem amigos muito queridos e por, mesmo estando longe, oferecerem qualquer tipo de ajuda e apoio.

Aos funcionários da UEA do HCPA, principalmente à Marta e à Fernanda, pelo auxílio fornecido sempre que necessário.

Aos amigos da turma 9, por todo o companheirismo e amizade nas horas boas e ruins durante o curso de Biomedicina e de onde tirei amizades que tenho certeza que estarão por muito tempo presentes na minha vida.

Às amigas de fora da universidade, que, durante o curso tiveram paciência pela minha ausência e me recompensavam com momentos valiosos dos quais sempre recordarei.

Ao CNPq e ao Fundo de Investimento à Pesquisa e Eventos (FIPE)/HCPA pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo.....	5
1 Introdução.....	6
1.1 Transtorno Bipolar.....	6
1.2 Fisiopatologia do TB.....	7
1.3 Ácidos graxos poliinsaturados	8
1.4 DHA e EPA	9
1.5 Modelo Animal de Mania e Anfetamina.....	10
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. Artigo Científico.....	13
RESUMO.....	15
1.INTRODUÇÃO.....	16
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
Drogas.....	17
Animais.....	18
Desenho experimental	18
Reconhecimento de objetos.....	19
Atividade locomotora.....	19
Preparo das amostras	20
Análise estatística	20
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO.....	21
5. REFERÊNCIAS.....	25
4. Conclusões E Perspectivas.....	34
5. Referências.....	35

Resumo

Introdução: Estudos demonstram que há deficiência em ácidos graxos em populações com alto risco de desenvolver o TB. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento com ômega-3 (ω -3) em um modelo animal de mania induzido por anfetamina.

Metodologia: Para o modelo de prevenção de mania, ratos Wistar de 30 dias foram tratados com ω -3 (18% EPA e 12% DHA) 0,8g/kg ou tween por 14 dias. A partir do oitavo dia, os animais receberam um composto de anfetamina (AMPH) 2mg/kg ou salina. Atividade locomotora foi avaliada no 14º dia utilizando o campo aberto e parâmetros cognitivos foram avaliados utilizando o teste de reconhecimento de objetos feito entre o 14º e 17º dia.

Resultados: No teste de reconhecimento de objetos, a AMPH prejudicou a memória declarativa a longo prazo dos animais quando comparados aos outros grupos ($p < 0,001$) e esse prejuízo cognitivo foi prevenido pela administração de ω -3. A AMPH demonstrou uma tendência em aumentar a atividade locomotora nos animais durante o teste do campo aberto que não foi prevenida pelo ω -3.

Conclusão: O ômega-3 se mostrou capaz de prevenir prejuízos na memória a longo prazo dos animais submetidos a administração de AMPH. Embora os mecanismos por trás destes resultados não estejam plenamente elucidados, o estudo acrescenta evidências para estratégias de prevenção primária.

1 Introdução

1.1 Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno mental complexo, multifatorial e potencialmente grave, associado a episódios de humor recorrentes e elevada morbidade clínica (1). Estima-se que a incidência do espectro de TB seja de 2,4% na população (2). Estudos populacionais sugerem que a prevalência do TB tipo I é semelhante entre homens e mulheres, e que o TB tipo II seja mais prevalente em mulheres sendo que o início dos sintomas, em ambos, ocorre geralmente entre o fim da adolescência e o início da vida adulta (3).

A característica essencial do TB tipo I é um curso clínico caracterizado pela ocorrência de pelo menos um episódio maníaco – definido por um período de sete dias ou mais com elevação de humor, e mais três sintomas relacionados a mania – , ou humor irritativo e mais quatro sintomas relacionados a mania, resultando em prejuízo marcante e necessidade de internação. Por outro lado, o TB tipo II é caracterizado pela presença de depressão maior e um episódio hipomaníaco – definido por um período de quatro dias ou mais com sintomas semelhantes a mania e com uma alteração leve na funcionalidade, mas sem um episódio maníaco. Os critérios para hipomania subsindrômica incluem a presença de pelo menos uma das questões de triagem para mania e falha em preencher os critérios de diagnóstico para hipomania. Estes três diagnósticos fazem parte do chamado espectro do transtorno bipolar (2).

Ambos apresentam sintomas que envolvem alterações no humor, prejuízo em habilidades cognitivas e modificações em comportamento (4, 5). A intensidade dos sintomas é variável, acarretando prejuízos no desempenho das atividades diárias e sofrimento pessoal sendo considerado um dos maiores motivos de incapacitação entre jovens (6).

O TB apresenta um prognóstico a longo prazo muito pior do que anteriormente imaginado. Os pacientes frequentemente apresentam sintomas subsindrômicos associados a prejuízos cognitivos persistentes e declínio funcional decorrentes da progressão do transtorno (7). Há evidências mostrando que os pacientes em estágios iniciais da doença apresentam desfechos clínicos muito

melhores do que aqueles com múltiplos episódios (8). Por exemplo, pacientes com maior duração de doença ou aqueles que tiveram mais de três episódios são menos propensos a responder ao tratamento farmacológico, particularmente ao lítio (9, 10). Além disso, a duração dos períodos interepisódicos diminui à medida que o número de episódios aumenta e a taxa de recorrência é maior comparada a outros transtornos psiquiátricos (11).

1.2 Fisiopatologia do TB

Estudos de neuroimagem têm identificado inúmeras alterações neuroanatômicas nos cérebros de pacientes com TB. Essas alterações incluem regiões relacionadas ao humor, como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala e podem incluir perda de massa cinzenta e anormalidades variáveis no volume dessas estruturas. Além disso, o aumento do terceiro ventrículo está associado a um maior número de episódios, mostrando que de alguma forma o curso do TB altera algumas estruturas encefálicas ao longo do tempo (12, 13).

O volume de massa cinzenta mostra-se reduzido em pacientes com TB, principalmente o córtex pré-frontal e acredita-se que isso se deva a uma redução nos níveis de fatores neuroprotetores, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (14, 15). Níveis reduzidos de BDNF foram encontrados no soro de pacientes que passavam por um episódio maníaco ou depressivo, havendo correlação com a gravidade do episódio (16). O tempo de doença também parece exercer influência nos níveis de BDNF, o que faz com que as células neuronais reduzam sua resiliência, tornando-se mais suscetíveis a estressores (17).

Em nível celular, disfunções mitocondriais e excesso na geração de espécies reativas de oxigênio gerando um quadro de excitotoxicidade já foram descritas (18, 19). Além disso, há um aumento na atividade de enzimas antioxidantes nas fases agudas da doença e normalização destas na fase eutímica, o que evidencia um desbalanço no estado redox celular (20). Estas alterações são fase-dependentes e também se agravam com o número de episódios, sendo que pacientes em estágios mais avançados possuem um maior nível de dano oxidativo (18).

Nos últimos anos, tem sido mostrado que a inflamação tem um papel significativo na fisiopatologia dos transtornos de humor, e essa relação também é

mostrada no TB, pois se evidencia alterações de citocinas pró e anti-inflamatórias. Diversos estudos têm mostrado o aumento de citocinas pró-inflamatórias durante os períodos de depressão, mania e eutímia, indicando um estado crônico de inflamação leve. Mais especificamente os níveis séricos de citocinas pró inflamatórias como Interleucina-4 (IL-4), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), receptor solúvel de interleucina-2 (sIL-2R), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), receptor solúvel de TNF-alfa tipo 1 (STNFR1) e proteína C-reativa (CRP) se mostram elevados em pacientes com TB quando comparados aos controles saudáveis(21).

Uma correlação entre o tempo de doença e os níveis de citocinas já foi relatada, sendo que pacientes com menor número de episódios possuíam maiores níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10 quando comparados aos controles, porém os pacientes com maior número de episódios apresentavam uma redução progressiva nos níveis de IL-6 e IL-10 e aumento nos níveis de TNF- α (17). Isto mostra que a progressão da doença pode gerar um estado pró-inflamatório nos pacientes com TB.

Devido a todas essas alterações, é muito importante e vem sendo enfatizada a busca por formas de prevenir o desenvolvimento e a progressão do TB. Neste aspecto, uma substância está ganhando especial atenção: os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC:PUFAs). Alguns estudos sugerem que uma dieta que seja rica em LC:PUFAs seria capaz de melhorar o prognóstico de vários transtornos psiquiátricos, inclusive o TB (22, 23).

1.3 Ácidos graxos poliinsaturados

Os ácidos graxos tem diferentes papéis fisiopatológicos no organismo, são de extrema importância para estrutura da membrana celular e processos metabólicos e são essenciais para o funcionamento do cérebro e transmissão de impulsos neurais (24).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa incluem a família de ácidos graxos ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) cujos precursores são o ácido linolênico (LA) e o ácido α -linolênico (ALA), respectivamente. Ambos possuem 18 átomos de carbono, com um grupo carboxílico em um lado da cadeia e um grupo metílico no outro lado, também conhecido como terminação ômega (ω). O LA apresenta duas ligações e a primeira está localizada no carbono 6 do grupo metílico (ω -6). Já o ALA

apresenta três ligações e a primeira é localizada no terceiro carbono do grupo metílico (ω -3) (23).

O ω -6 e ω -3 são sintetizados durante o período perinatal e seus níveis podem ser mantidos na vida adulta apenas por ingestão dietética. Assim, estes ácidos devem ser obtidos através da alimentação para que possam ser aproveitados pelos tecidos corporais. O LA é amplamente encontrado em óleos vegetais e pode ser convertido ao ácido araquidônico (ARA). O ARA é abundante nos fosfolipídios de membranas celulares e desempenha papel imunológico, dando origem a mediadores inflamatórios como eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos). Os principais sintomas de sua deficiência são retardo de crescimento, lesões de pele, insuficiência reprodutora, esteatose hepática e polidipsia, entre outros (25).

O ácido graxo α -linolênico (ALA) está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e soja, além de vegetais verdes folhosos (26)(102). Deste ácido derivam os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ambos encontrados em peixes e óleos de peixes como sardinha, salmão, bagre, atum, cavala (27).

1.4 DHA e EPA

A cadeia longa de ácido graxo EPA, participa da atividade da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e forma prostanóides da família 3 (incluindo prostaglandinas e tromboxanos) e leucotrienos de série 5, ambos exercendo papéis com propriedade anti-inflamatória. O DHA é um ácido graxo de cadeia longa composto por 22 átomos de carbono e 6 ligações, a primeira sendo localizada no carbono 3 do grupo metílico. A maioria dos lipídios do cérebro são glicerofosfolipídeos compostos principalmente por DHA e Ácido araquidônico e estes exercendo papéis importantes no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (28). DHA é necessário para a estrutura da membrana das células neuronais e influencia eventos sinalizadores que são essenciais para a diferenciação e sobrevivência neuronal (29, 30).

O mecanismo proposto para os benefícios dos ácidos graxos parece estar relacionado à incorporação destes ácidos nas membranas celulares, promovendo

mudanças na sua fluidez e função, bem como alterações na expressão gênica e produção de eicosanoides (31). Os fosfolipídios do EPA e DHA são liberados da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2, sendo metabolizados por duas vias. A primeira delas envolve as enzimas COX (ciclooxigenase) e LOX (lipoxigenase) e a segunda a via das resolvinas e protectinas (32).

Recentemente, pesquisas mostraram que o DHA, liberado das membranas celulares mediante a ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) quando em situações de dano neuronal, origina um composto denominado Neuroprotectina D1, um docosanoide com importante papel neuroprotetor no SNC (33).

Foi demonstrado que a suplementação de PUFA ω -3 em ratos melhorou parâmetros em tarefas diferentes de memória e aprendizado (34), enquanto que uma restrição desses ácidos graxos na dieta leva a uma piora nesses testes comportamentais (35). Além de mostrarem que os ácidos graxos ω -3 tem uma capacidade neuroprotetora e antioxidante (36, 37).

A deficiência dietética e baixos níveis endógenos de ácidos graxos ω -3 estão associados a um pior prognóstico de doenças psiquiátricas e alguns estudos clínicos evidenciaram que a suplementação destes ácidos foi benéfica em pacientes com depressão maior, TB e esquizofrenia (22). Além do impacto desta substância em reduzir conversão para psicose em populações com risco constatado por ensaio clínico randomizado (38) e menor conversão para transtornos psiquiátricos em geral no seguimento deste participantes por cerca de 6 anos (39).

1.5 Modelo Animal de Mania e Anfetamina

O uso de modelos animais que preencham os requisitos de validade é vital para o entendimento de doenças psiquiátricas e a busca por melhores tratamentos. A validade de face se refere ao quanto um modelo animal recapitula características importantes da doença humana como fenótipos neuroanatômicos, bioquímicos ou comportamentais. Validade de construto é o grau em que um teste mede aquilo que se propõe ou a relevância translacional do modelo construído, como alterações dopaminérgicas em modelos animais de anfetamina (AMPH). Por fim, a validade preditiva se refere ao quanto um modelo responde a um tratamento que é sabidamente eficaz para aquela determinada doença. Os modelos animais para TB

normalmente tentam mimetizar o episódio maníaco da doença, pois até o momento não se conseguiu induzir alterações de humor cíclicas em animais da mesma forma que ocorre nos pacientes. Existem várias drogas capazes de induzir sintomas semelhantes aos da mania, tais como hiperatividade, alterações do sono, déficit cognitivo, hiperlocomoção, comportamento agressivo, etc (40).

A anfetamina e a d-anfetamina são substâncias psicoestimulantes, capazes de causar diversos efeitos em seres humanos, tais como redução da fadiga e apetite, euforia, humor elevado, etc. Muitos estudos têm mostrado que psicoestimulantes como a AMPH podem produzir sintomas que se parecem com a mania em pessoas saudáveis assim como pode exacerbar sintomas ou induzir um episódio maníaco em pacientes bipolares (41-44). Além disso, também é utilizada como terapia para Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade e Narcolepsia (45). Ela é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, exercendo efeito de agonista dopaminérgico e noradrenérgico através da inibição da recaptação destes neurotransmissores, causando hiperativação de vias como a mesolímbica e a nigro-estriatal (46).

Devido a estas características farmacodinâmicas e aos sintomas induzidos, o modelo animal de mania induzido por AMPH apresenta valor de face incompleto, pois mimetiza apenas o episódio maníaco, porém possui bom valor preditivo e de construto, uma vez que além de mimetizar os sintomas maníacos, é capaz de induzir mania em indivíduos susceptíveis e o uso de drogas utilizadas no TB e o Lítio é capaz de inibir os efeitos comportamentais da AMPH (47, 48).

Sendo assim, considerando que o TB é um transtorno de etiologia multifatorial e de neurofisiopatologia complexa, utilizaremos um composto de anfetamina visando mimetizar parte dos comportamentos do transtorno no animal escolhido para ser o modelo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de prevenção do ômega-3 em um modelo animal de mania induzido por anfetamina

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar habilidades cognitivas utilizando o teste de reconhecimento de objetos
- 2) Avaliar a atividade locomotora dos animais em campo aberto

3. Artigo Científico

Periódico: Journal of Psychiatric Research

Título: Avaliação dos efeitos do tratamento com ômega-3 em um modelo animal de mania induzido por anfetamina

Normas da Revista: <http://www.journals.elsevier.com/journal-of-psychiatric-research/> e Anexo I.

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 EM UM
MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR ANFETAMINA**

Maurício Barth^{1*}, Bruna Maria Ascoli¹, Luíza Paul Gea¹, Giovana Bristot¹, Eduarda Dias da Rosa¹, Pâmela Ferrari¹, Bruna Schilling Panizzutti¹, Clarissa S Gama¹

¹Laboratório de Psiquiatria Molecular, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brasil

* Autor correspondente:

Maurício Barth

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: 55 51 3359-8845

mauricio.barthmb@gmail.com

RESUMO

Introdução: Estudos demonstram que há deficiência em ácidos graxos em populações com alto risco de desenvolver o TB. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento com ômega-3 (ω -3) em um modelo animal de mania induzido por anfetamina.

Metodologia: Para o modelo de prevenção de mania, ratos Wistar de 30 dias foram tratados com ω -3 (18% EPA e 12% DHA) 0,8g/kg ou tween por 14 dias. A partir do oitavo dia, os animais receberam um composto de anfetamina (AMPH) 2mg/kg ou salina. Atividade locomotora foi avaliada no 14^o dia utilizando o campo aberto e parâmetros cognitivos foram avaliados utilizando o teste de reconhecimento de objetos feito entre o 14^o e 17^o dia.

Resultados: No teste de reconhecimento de objetos, a AMPH prejudicou a memória declarativa a longo prazo dos animais quando comparados aos outros grupos ($p < 0,001$) e esse prejuízo cognitivo foi prevenido pela administração de ω -3. A AMPH demonstrou uma tendência em aumentar a atividade locomotora nos animais durante o teste do campo aberto que não foi prevenida pelo ω -3.

Conclusão: O ômega-3 se mostrou capaz de prevenir prejuízos na memória a longo prazo dos animais submetidos a administração de AMPH. Embora os mecanismos por trás destes resultados não estejam plenamente elucidados, o estudo acrescenta evidências para estratégias de prevenção primária.

1.INTRODUÇÃO

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno mental complexo, multifatorial e potencialmente grave, associado a episódios de humor recorrentes e elevada morbidade clínica (Kilbourne, Cornelius et al. 2004). Estima-se que a incidência do espectro de TB seja de 2,4% na população (Merikangas, Jin et al. 2011). Os sintomas do TB envolvem alterações no humor, prejuízo em habilidades cognitivas e modificações em comportamento (Martinez-Aran, Vieta et al. 2007, Grande, Goikolea et al. 2013). Os pacientes frequentemente apresentam prejuízos cognitivos persistentes e declínio funcional decorrentes da progressão do transtorno (Kapczinski, Vieta et al. 2008). Há evidências mostrando que os pacientes em estágios iniciais da doença apresentam desfechos clínicos muito melhores do que aqueles com múltiplos episódios (Tohen, Wateraux et al. 1990).

Estudos têm identificado inúmeras alterações fisiopatológicas decorrentes da progressão da doença como alterações em tamanho e volume do córtex pré-frontal e hipocampo, indicando uma perda de massa cinzenta nessas estruturas (Hajek, Carrey et al. 2005, Strakowski, Delbello et al. 2005, Abe, Ekman et al. 2015). Níveis reduzidos de BDNF foram encontrados no soro de pacientes que passavam por um episódio maníaco ou depressivo, havendo correlação com a gravidade do episódio (Cunha, Frey et al. 2006). Em nível celular, disfunções mitocondriais e excesso na geração de espécies reativas de oxigênio gerando um quadro de excitotoxicidade (Andreazza, Kapczinski et al. 2009, Rao, Harry et al. 2010). Além disso, há um quadro de desequilíbrio inflamatório, pois se evidencia alterações de citocinas pró e anti-inflamatórias. Diversos estudos têm mostrado o aumento de citocinas pró-inflamatórias durante os períodos de depressão, mania e eutímia, indicando um estado de inflamação crônica, principalmente em pacientes que se encontram em estágio tardio da doença (Kauer-Sant'Anna, Kapczinski et al. 2009, Barbosa, Bauer et al. 2014).

O tratamento padrão para o TB é o uso de estabilizadores de humor como o Lítio entre outros fármacos, que possuem eficácia relativa para maioria dos casos, porém possuem efeitos adversos por vezes indesejáveis (Miura, Noma et al. 2014). Portanto, a busca por novos alvos terapêuticos é de extrema importância para os transtornos de humor como o TB. Nesse sentido, o ômega-3 (ω -3) vem surgindo

como uma alternativa a essa questão. Ele é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa majoritariamente sintetizado durante o período perinatal e seus níveis podem ser mantidos na vida adulta apenas por ingestão dietética e cujo precursor é o ácido α -linolênico (ALA) (Marszalek and Lodish 2005). O (ALA) está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e soja, além de vegetais verdes folhosos (Heird and Lapillonne 2005). Deste ácido derivam os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA), ambos encontrados em peixes e óleos de peixes como sardinha, salmão, bagre, atum, cavala (Covington 2004).

A deficiência dietética e baixos níveis endógenos de ω -3 estão associados a um pior prognóstico de doenças psiquiátricas e alguns estudos clínicos evidenciaram que a suplementação destes ácidos foi benéfica em pacientes com depressão maior, TB e esquizofrenia (Peet and Stokes 2005). Além do impacto desta substância em reduzir conversão para psicose em populações com risco constatado por ensaio clínico randomizado (Amminger, Schafer et al. 2010) e menor conversão para transtornos psiquiátricos em geral no seguimento destes participantes por cerca de 6 anos (Amminger, Schafer et al. 2015).

O mecanismo proposto para os benefícios dos ácidos graxos parece estar relacionado à incorporação destes ácidos nas membranas celulares, promovendo mudanças na sua fluidez e função (Sinclair, Begg et al. 2007), além de otimizar funções de receptores ligados a proteína G (Wood 1990, Mitchell, Niu et al. 2003), diminuir estresse oxidativo, aumentar fatores neurotróficos (Logan 2003) e melhorar o quadro inflamatório (Serhan, Yacoubian et al. 2008).

Para avaliar os efeitos do ω -3 na prevenção do TB, utilizamos um modelo animal de mania induzido por anfetamina, uma substância psicoestimulante capaz de exercer efeito de agonista dopaminérgico e noradrenérgico através da inibição da recaptação destes neurotransmissores (Fleckenstein, Volz et al. 2007) e gerar sintomas semelhantes aos observados em um paciente em fase maníaca, tais como hiperatividade e déficit cognitivo (Logan and McClung 2015). O presente estudo tem como objetivo avaliar em roedores os efeitos da AMPH sobre alterações em parâmetros cognitivos e comportamentais possivelmente prevenidos pelo ômega-3

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Drogas

Para a administração de ômega-3, foram utilizadas cápsulas contendo óleo de peixe com 1,200 mg de óleo rico em ômega-3, composto por 18% de EPA e 12% de EPA, somando um total de 30% de ácidos graxos ômega-3. Os 70% restantes da composição consistiam de gordura saturada e monoinsaturada. O Tween foi escolhido como veículo para os animais controle por ser considerado um óleo inerte sem gerar grandes modificações no metabolismo dos animais. Para gerar o modelo de mania, foi utilizado um composto de anfetamina (AMPH) constituído de quatro sais de anfetamina que correspondem a cerca de 75%-80% de D-anfetamina e 20-25% de L-anfetamina (ADDERALL®).

Animais

Ratos machos adolescentes da linhagem Wistar (30 dias) foram obtidos de fornecedores credenciados (biotério CREAL/UFRGS), sob supervisão da Unidade de Experimentação Animal do HCPA (UEA). Os animais foram mantidos na UEA em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 24°C, umidade relativa do ar entre 40-60%, ciclo claro/escuro de 12h/12h com luzes acesas as 7h. Os animais foram alimentados com ração padrão para a espécie e água *ad libitum* e permaneceram em quarentena e aclimatação por 10 dias antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos ocorreram de acordo com os aspectos éticos adotados na universidade. Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, aprovado pela CEUA/HCPA em 08 de abril de 2014. Número do projeto: 13-0483.

Desenho experimental

Após o período de aclimatação os animais foram isolados (4-5 animal/caixa moradia) para o início dos tratamentos do modelo de prevenção à mania. Do 1º ao 14º dia os animais receberam 0,8g/kg de ômega-3 (constituídas por 18% de ácido eicosapentaenoico e 12% de ácido docosahexaenoico) via gavagem, ou Tween 0,8g/kg via gavagem (Gama, Canever et al. 2012). A partir do 8º dia até o 14º dia os animais receberam um composto de sais de anfetamina (85% D-anfetamina e 15% L-anfetamina) 2mg/kg (Clarke, Cammarota et al. 2010, Steckert, Valvassori et al. 2013) ou salina 1ml/kg via injeção intraperitoneal. Totalizando 54 animais divididos

em 4 grupos distintos de 13-14 animais cada: Tween/Salina (controle), ômega/Salina (ômega), Tween/AMPH (AMPH) e ômega/AMPH. No 14º dia, após duas horas da última administração para evitar quaisquer efeitos agudos da anfetamina, cada animal foi submetido ao teste de atividade locomotora no campo aberto (CA) e do 15º dia ao 17º os animais foram submetidos ao treino e teste de reconhecimento de objetos (RO). Ao final dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados para coleta de estruturas (Fig 1).

Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi iniciado 24 horas após a última injeção intraperitoneal, utilizando-se um “n” de 13-14 animais por grupo. O teste consistiu de 3 etapas (uma por dia) onde foi feita a habituação, o treino e o teste de memória. O aparato utilizado para o teste foi uma caixa com vidro na parte frontal para observação. A habituação dos animais no local foi feita um dia após a última administração e durou 5 minutos onde o animal podia explorar livremente o aparato. No treinamento, os ratos foram expostos a dois objetos idênticos: A e B. Os objetos foram posicionados em dois cantos adjacentes e os animais foram permitidos a explorá-los por 5 minutos totais. O teste de memória a longo prazo foi realizado 24 horas após a sessão de treino e os ratos puderam explorar o aparato por 5 minutos na presença do objeto A e um objeto C (novo) colocados nas mesmas posições dos objetos na sessão de treino. Todos os objetos apresentavam as mesmas texturas, cores e tamanhos, mas diferentes formas. Entre os testes, os objetos foram lavados com etanol 10%. A exploração é definida por cheirar ou tocar o objeto com o nariz, e, portanto é avaliado o tempo que o animal gastou para explorar o objeto novo em comparação ao conhecido (Clarke, Cammarota et al. 2010, Pinheiro, de Lima et al. 2012).

Atividade locomotora

A atividade locomotora foi avaliada em um “n” de 13-14 animais por grupo 2 horas após a última injeção intraperitoneal de AMPH ou salina, utilizando-se o Monitor de Atividade para quantificar as alterações comportamentais nos animais induzidas pela AMPH e possivelmente prevenidas pelo ômega-3. Esta atividade foi realizada em uma caixa redonda cercada por paredes de acrílico (*Open Field* redondo) com aproximadamente 50cm de altura e 80 cm de diâmetro. Os animais

foram observados por um período total de 15 minutos cada, e o experimento foi gravado na forma de vídeo e seus parâmetros analisados utilizando o software *Anymaze*.

Preparo das amostras

Imediatamente após os testes comportamentais (locomoção e reconhecimento de objetos), 2 animais por grupo foram perfundidos e seu encéfalo preservado congelado para posteriores análises de citocinas por técnica de imunofluorescência e 11-12 animais por grupo foram eutanasiados por decapitação e tiveram estruturas diferentes do cérebro isoladas - córtex pré-frontal, hipocampo, e estriado – e posteriormente congeladas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS 18.0 para. Para descrição da amostra, foram utilizadas análises descritivas. A normalidade dos dados quantitativos foi medida pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para distribuição paramétrica, as médias dos grupos foram comparadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey, apresentados como média \pm SD. *Outliers* significativos foram identificados pelo programa *GraphPad Quick Calcs* e excluídos da análise. Em todos os testes, foi considerada a significância estatística quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Na fase de treino do teste de reconhecimento de objetos não foi observada diferença significativa entre os grupos, indicando que os animais exploraram os dois objetos idênticos em tempos parecidos independente da droga que havia sido administrada (Fig 3). Entretanto, na fase de teste, foi observado que o grupo AMPH obteve um desempenho inferior, por apresentarem interesse maior no objeto familiar, em relação aos demais grupos incluindo o grupo ômega/AMPH ($p < 0,001$) (Fig. 4), demonstrando que o ômega-3 se mostrou capaz de prevenir este prejuízo na memória causado pela administração de AMPH.

No campo aberto foi observado que o grupo ômega/AMPH obteve um aumento significativo na distância percorrida ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo

controle e ao grupo ômega, mas não quando comparados ao grupo AMPH ($p=0,2$). O grupo AMPH demonstrou uma tendência a uma maior distância percorrida quando comparado ao grupo controle e ômega, mas não significativo ($p=0,5$ e $p=0,4$ respectivamente) (Fig. 2).

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que a AMPH tende a aumentar a locomoção dos ratos no teste de campo aberto em relação aos controles, porém sem uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, a AMPH foi capaz de gerar um prejuízo cognitivo significativo nos animais submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (o qual mede parâmetros de memória a longo prazo), ou seja, os animais que receberam AMPH falharam ao recordar do objeto A (velho) e por isso tem a exploração dos objetos dividida reduzindo o índice de exploração ao novo objeto (C). Esse prejuízo cognitivo é de acordo com o esperado em modelos utilizando fármacos psicotrópicos (Logan and McClung 2015).

No trabalho apresentado, o ômega-3 foi capaz de prevenir o prejuízo na memória gerado pela AMPH, indicando que os animais que receberam o ω -3 tiveram um melhor desempenho cognitivo, em tarefas que exigem uma memória a longo prazo. Essa melhora cognitiva está de acordo com outro trabalho que, utilizando o ω -3 como tratamento, conseguiu prevenir prejuízos em memória de trabalho e de longo-prazo utilizando teste de esquiiva inibitória em ratos submetidos a um modelo de esquizofrenia utilizando cetamina (Gama, Canever et al. 2012). O teste de reconhecimento de objetos é uma ferramenta útil para estudar memória declarativa em roedores porque faz uso da preferência inata destes animais por objetos novos a objetos familiares. Evidências sugerem que o hipocampo é essencial para o processamento durante este tipo de teste (Clark, Zola et al. 2000). A fase de processamento de memória que corresponde ao roedor frente a um objeto novo é chamada reconsolidação. É considerada uma fase ativa que dá lugar a reorganização de memórias já formadas para incorporação de novas informações (Milekic and Alberini 2002, Suzuki, Josselyn et al. 2004). Segundo nosso estudo, observamos que o ômega-3 foi capaz de prevenir a declínio desta habilidade em animais que receberam AMPH, embora os mecanismos por trás desta capacidade neuroprotetora do ω -3 neste modelo permanecem desconhecidos. Estudos sugerem

que o prejuízo cognitivo relacionado a hipocampo e outras regiões cerebrais podem estar associado a alterações em BDNF (Fries, Valvassori et al. 2015).

Recentemente Amminger publicou um estudo de follow-up em pacientes com alto risco para o desenvolvimento de psicose que receberam ω -3 por 12 semanas na adolescência; esses adolescentes mesmo 6 anos após a ingestão do ácido-graxo continuaram a apresentar melhores parâmetros cognitivos e funcionais quando comparados ao grupo que recebeu placebo, bem como diminuição da conversão para outros transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade (Amminger, Schafer et al. 2010, Amminger, Schafer et al. 2015). Ambos os estudos, juntamente com os resultados aqui apresentados sugerem que o ômega-3 pode estar exercendo um papel neuroprotetor no cérebro dos animais.

Entretanto, no teste de campo aberto, os animais que receberam AMPH e ômega-3 mostraram uma atividade locomotora exacerbada e significativamente diferente dos grupos ômega e controle, mas não do grupo AMPH. Diferentemente de outro estudo, que utilizou FENPROPOREX para induzir o comportamento tipo mania, onde o ômega-3 foi capaz de prevenir e reverter comportamentos de hiperatividade (Model, Gomes et al. 2014). Uma possível explicação para este resultado é devido aos efeitos antidepressivos do ω -3. Uma revisão mostrou que existem mais comprovações acerca dos efeitos antidepressivos do ω -3 do que de seus efeitos antipsicóticos em TB (Su, Matsuoka et al. 2015). Estes efeitos antidepressivos gerados pelo ômega-3 são semelhantes a fármacos inibidores da recaptação da serotonina (SSRI), estimuladores de serotonina (SSRE), inibidores de receptação de dopamina-noradrenalina (NDRI) por também interferirem diminuindo parâmetros pró-inflamatórios relacionados a neuroinflamação e aumentando níveis de fatores neurotróficos como BDNF relacionados a neuroproteção (Lu, Tsao et al. 2010). Um estudo sugeriu uma correlação entre elevados níveis de um metabólito da serotonina (5-HIAA) em pessoas com concentração alta de ω -3 no líquido cefaloraquidiano (Hibbeln 1998), o que poderia indicar um aumento de concentração de serotonina no organismo e uma possível explicação para a atividade locomotora exacerbada no grupo ômega/AMPH.

Existem muitos estudos que correlacionam a importância do ω -3 em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e transtornos de humor como depressão, ansiedade e esquizofrenia (Liperoti, Landi et al. 2009, Amminger, Schafer et al. 2010, Amminger, Henry et al. 2011, Su, Matsuoka et al. 2015). Porém há poucos

estudos demonstrando seus efeitos benéficos no TB, principalmente em relação aos sintomas maníacos. Com exceção de alguns que demonstram efeitos moderadamente positivos em relação a sintomas maníacos medidos por aumento na pontuação da escala de funcionalidade global e diminuição na escala de mania (YMRS) em jovens diagnosticados com TB (Wozniak, Biederman et al. 2007, Clayton, Hanstock et al. 2009).

Em modelos animais, estudos já demonstraram que uma suplementação de PUFA ω -3 em ratos melhorou o desempenho em tarefas diferentes que avaliam memória espacial utilizando *Water Maze* quando comparados a ratos deficientes em ω -3, mostrando que uma restrição desses ácidos graxos na dieta leva a uma piora destes parâmetros cognitivos (Lim, Hoshiba et al. 2005, Chung, Chen et al. 2008). Os possíveis mecanismos relacionados aos efeitos do ômega-3 em tratamentos no TB são variados. Segundo uma revisão recente (Balanza-Martinez, Fries et al. 2011) estudos sugerem que o ω -3 pode exercer alterações na função de membrana, alterando sua fluidez, o que pode influenciar regulação de neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, além de facilidade no transporte de glicose garantindo o aporte de energia necessária para funções neuronais (Sinclair, Begg et al. 2007); alterações em fatores neurotróficos como o aumento dos níveis de BDNF, capazes de exercer influência na plasticidade e sobrevivência neuronal (Logan 2003); quando em ambiente inflamatório o DHA pode exercer papel anti-inflamatório através da produção e ação de resolvinas e protectinas (Serhan, Yacoubian et al. 2008); proteção contra estresse oxidativo (Young and Conquer 2005, Berk, Conus et al. 2010). Além disso, DHA e EPA parecem facilitar transdução de sinal através da otimização do sinal de receptores ligados a proteína G, cujos sinais intracelulares incluem vias sensoriais para visão, olfato, paladar, toque e neurotransmissores como dopamina, serotonina, GABA e histamina e que podem exercer inúmeros papéis em habilidades cognitivas (Wood 1990, Mitchell, Niu et al. 2003).

Algumas limitações precisam ser levantadas para adequada conclusão dos dados: (1) utilização de um modelo animal que possui uma validade de face limitada, visto que ele mimetiza apenas a fase maníaca do TB, e não a ciclagem entre depressão e mania; (2) o composto utilizado não possui descrição na literatura; contudo tem presença de 75 a 80% de d-anfetamina fato que nos fez utilizar a dose que consta na literatura para d-AMPH.

Os resultados aqui apresentados mostram que o ω -3 foi capaz de prevenir um prejuízo cognitivo na memória a longo prazo. Este aspecto é de suma importância nos transtornos psiquiátricos severos, em especial na esquizofrenia e transtorno bipolar. A progressiva deterioração de funções cognitivas e funcionais nesses transtornos, atualmente, é considerada uma importante causa de dias vividos com incapacidade em idade produtiva. Por isso, aspectos que possam ajudar na prevenção dos transtornos mentais são de suma importância para a sociedade.

5. REFERÊNCIAS

Abe, C., C. J. Ekman, C. Sellgren, P. Petrovic, M. Ingvar and M. Landen (2015). "Manic episodes are related to changes in frontal cortex: a longitudinal neuroimaging study of bipolar disorder 1." Brain **138**(Pt 11): 3440-3448.

Amminger, G. P., L. P. Henry, S. M. Harrigan, M. G. Harris, M. Alvarez-Jimenez, H. Herrman, H. J. Jackson and P. D. McGorry (2011). "Outcome in early-onset schizophrenia revisited: findings from the Early Psychosis Prevention and Intervention Centre long-term follow-up study." Schizophr Res **131**(1-3): 112-119.

Amminger, G. P., M. R. Schafer, K. Papageorgiou, C. M. Klier, S. M. Cotton, S. M. Harrigan, A. Mackinnon, P. D. McGorry and G. E. Berger (2010). "Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial." Arch Gen Psychiatry **67**(2): 146-154.

Amminger, G. P., M. R. Schafer, M. Schlogelhofer, C. M. Klier and P. D. McGorry (2015). "Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study." Nat Commun **6**: 7934.

Andreazza, A. C., F. Kapczinski, M. Kauer-Sant'Anna, J. C. Walz, D. J. Bond, C. A. Goncalves, L. T. Young and L. N. Yatham (2009). "3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder." J Psychiatry Neurosci **34**(4): 263-271.

Balanza-Martinez, V., G. R. Fries, G. D. Colpo, P. P. Silveira, A. K. Portella, R. Tabares-Seisdedos and F. Kapczinski (2011). "Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder." Expert Rev Neurother **11**(7): 1029-1047.

Barbosa, I. G., M. E. Bauer, R. Machado-Vieira and A. L. Teixeira (2014). "Cytokines in bipolar disorder: paving the way for neuroprogression." Neural Plast **2014**: 360481.

Berk, M., P. Conus, F. Kapczinski, A. C. Andreazza, M. Yucel, S. J. Wood, C. Pantelis, G. S. Malhi, S. Dodd, A. Bechdorf, G. P. Amminger, I. B. Hickie and P. D. McGorry (2010). "From neuroprogression to neuroprotection: implications for clinical care." Med J Aust **193**(4 Suppl): S36-40.

Chung, W. L., J. J. Chen and H. M. Su (2008). "Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels." J Nutr **138**(6): 1165-1171.

Clark, R. E., S. M. Zola and L. R. Squire (2000). "Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus." J Neurosci **20**(23): 8853-8860.

Clarke, J. R., M. Cammarota, A. Gruart, I. Izquierdo and J. M. Delgado-Garcia (2010). "Plastic modifications induced by object recognition memory processing." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2652-2657.

Clayton, E. H., T. L. Hanstock, S. J. Hirneth, C. J. Kable, M. L. Garg and P. L. Hazell (2009). "Reduced mania and depression in juvenile bipolar disorder associated with long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation." Eur J Clin Nutr **63**(8): 1037-1040.

Covington, M. B. (2004). "Omega-3 fatty acids." Am Fam Physician **70**(1): 133-140.

Cunha, A. B., B. N. Frey, A. C. Andreazza, J. D. Goi, A. R. Rosa, C. A. Goncalves, A. Santin and F. Kapczinski (2006). "Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes." Neurosci Lett **398**(3): 215-219.

Fleckenstein, A. E., T. J. Volz, E. L. Riddle, J. W. Gibb and G. R. Hanson (2007). "New insights into the mechanism of action of amphetamines." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 681-698.

Fries, G. R., S. S. Valvassori, H. Bock, L. Stertz, P. V. Magalhaes, E. Mariot, R. B. Varela, M. Kauer-Sant'Anna, J. Quevedo, F. Kapczinski and M. L. Saraiva-Pereira (2015). "Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania." J Psychiatr Res **68**: 329-336.

Gama, C. S., L. Canever, B. Panizzutti, C. Gubert, L. Stertz, R. Massuda, M. Pedrini, D. F. de Lucena, R. D. Luca, D. B. Fraga, A. S. Heylmann, P. F. Deroza and A. I. Zugno (2012). "Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia." Schizophr Res **141**(2-3): 162-167.

Grande, I., J. M. Goikolea, C. de Dios, A. Gonzalez-Pinto, J. M. Montes, J. Saiz-Ruiz, E. Prieto, E. Vieta and P. group (2013). "Occupational disability in bipolar disorder: analysis of predictors of being on severe disablement benefit (PREBIS study data)." Acta Psychiatr Scand **127**(5): 403-411.

Hajek, T., N. Carrey and M. Alda (2005). "Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder." Bipolar Disord **7**(5): 393-403.

Heird, W. C. and A. Lapillonne (2005). "The role of essential fatty acids in development." Annu Rev Nutr **25**: 549-571.

Hibbeln, J. R. (1998). "Fish consumption and major depression." Lancet **351**(9110): 1213.

Kapczinski, F., E. Vieta, A. C. Andreazza, B. N. Frey, F. A. Gomes, J. Tramontina, M. Kauer-Sant'anna, R. Grassi-Oliveira and R. M. Post (2008). "Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment." Neurosci Biobehav Rev **32**(4): 675-692.

Kauer-Sant'Anna, M., F. Kapczinski, A. C. Andreazza, D. J. Bond, R. W. Lam, L. T. Young and L. N. Yatham (2009). "Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder." Int J Neuropsychopharmacol **12**(4): 447-458.

Kilbourne, A. M., J. R. Cornelius, X. Han, H. A. Pincus, M. Shad, I. Salloum, J. Conigliaro and G. L. Haas (2004). "Burden of general medical conditions among individuals with bipolar disorder." Bipolar Disord **6**(5): 368-373.

Lim, S. Y., J. Hoshiba, T. Moriguchi and N. Salem, Jr. (2005). "N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks." Pediatr Res **58**(4): 741-748.

Liperoti, R., F. Landi, O. Fusco, R. Bernabei and G. Onder (2009). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence." Curr Pharm Des **15**(36): 4165-4172.

Logan, A. C. (2003). "Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression." Altern Med Rev **8**(4): 410-425.

Logan, R. W. and C. A. McClung (2015). "Animal models of bipolar mania: The past, present and future." Neuroscience.

Lu, D. Y., Y. Y. Tsao, Y. M. Leung and K. P. Su (2010). "Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids." Neuropsychopharmacology **35**(11): 2238-2248.

Marszalek, J. R. and H. F. Lodish (2005). "Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 633-657.

Martinez-Aran, A., E. Vieta, C. Torrent, J. Sanchez-Moreno, J. M. Goikolea, M. Salamero, G. S. Malhi, A. Gonzalez-Pinto, C. Daban, S. Alvarez-Grandi, K. Fountoulakis, G. Kaprinis, R. Tabares-Seisdedos and J. L. Ayuso-Mateos (2007). "Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors." Bipolar Disord **9**(1-2): 103-113.

Merikangas, K. R., R. Jin, J. P. He, R. C. Kessler, S. Lee, N. A. Sampson, M. C. Viana, L. H. Andrade, C. Hu, E. G. Karam, M. Ladea, M. E. Medina-Mora, Y. Ono, J. Posada-Villa, R. Sagar, J. E. Wells and Z. Zarkov (2011). "Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative." Arch Gen Psychiatry **68**(3): 241-251.

Milekic, M. H. and C. M. Alberini (2002). "Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation." Neuron **36**(3): 521-525.

Mitchell, D. C., S. L. Niu and B. J. Litman (2003). "DHA-rich phospholipids optimize G-Protein-coupled signaling." J Pediatr **143**(4 Suppl): S80-86.

Miura, T., H. Noma, T. A. Furukawa, H. Mitsuyasu, S. Tanaka, S. Stockton, G. Salanti, K. Motomura, S. Shimano-Katsuki, S. Leucht, A. Cipriani, J. R. Geddes and S. Kanba (2014). "Comparative efficacy and tolerability of pharmacological treatments in the maintenance treatment of bipolar disorder: a systematic review and network meta-analysis." Lancet Psychiatry **1**(5): 351-359.

Model, C. S., L. M. Gomes, G. Scaini, G. K. Ferreira, C. L. Goncalves, G. T. Rezin, A. V. Steckert, S. S. Valvassori, R. B. Varela, J. Quevedo and E. L. Streck (2014). "Omega-3 fatty acids alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration." Metab Brain Dis **29**(1): 185-192.

Peet, M. and C. Stokes (2005). "Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders." Drugs **65**(8): 1051-1059.

Pinheiro, R. M., M. N. de Lima, G. R. Fries, V. A. Garcia, J. Presti-Torres, L. H. Hallmenschlager, L. A. Alcalde, R. Roesler, M. L. Andersen, J. Quevedo, F. Kapczinski and N. Schroder (2012). "Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by d-amphetamine: amelioration by valproic acid." J Neural Transm (Vienna) **119**(6): 627-637.

Rao, J. S., G. J. Harry, S. I. Rapoport and H. W. Kim (2010). "Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients." Mol Psychiatry **15**(4): 384-392.

Serhan, C. N., S. Yacoubian and R. Yang (2008). "Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators." Annu Rev Pathol **3**: 279-312.

Sinclair, A. J., D. Begg, M. Mathai and R. S. Weisinger (2007). "Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression." Asia Pac J Clin Nutr **16 Suppl 1**: 391-397.

Steckert, A. V., S. S. Valvassori, R. B. Varela, F. Mina, W. R. Resende, D. V. Bavaresco, F. Ornell, F. Dal-Pizzol and J. Quevedo (2013). "Effects of sodium butyrate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of D-AMPH." Neurochem Int **62**(4): 425-432.

Strakowski, S. M., M. P. Delbello and C. M. Adler (2005). "The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings." Mol Psychiatry **10**(1): 105-116.

Su, K. P., Y. Matsuoka and C. U. Pae (2015). "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prevention of Mood and Anxiety Disorders." Clin Psychopharmacol Neurosci **13**(2): 129-137.

Suzuki, A., S. A. Josselyn, P. W. Frankland, S. Masushige, A. J. Silva and S. Kida (2004). "Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures." J Neurosci **24**(20): 4787-4795.

Tohen, M., C. M. Waternaux and M. T. Tsuang (1990). "Outcome in Mania. A 4-year prospective follow-up of 75 patients utilizing survival analysis." Arch Gen Psychiatry **47**(12): 1106-1111.

Wood, J. N. (1990). "Essential fatty acids and their metabolites in signal transduction." Biochem Soc Trans **18**(5): 785-786.

Wozniak, J., J. Biederman, E. Mick, J. Waxmonsky, L. Hantsoo, C. Best, J. E. Cluette-Brown and M. Laposata (2007). "Omega-3 fatty acid monotherapy for

pediatric bipolar disorder: a prospective open-label trial." Eur Neuropsychopharmacol **17**(6-7): 440-447.

Young, G. and J. Conquer (2005). "Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders." Reprod Nutr Dev **45**(1): 1-28.

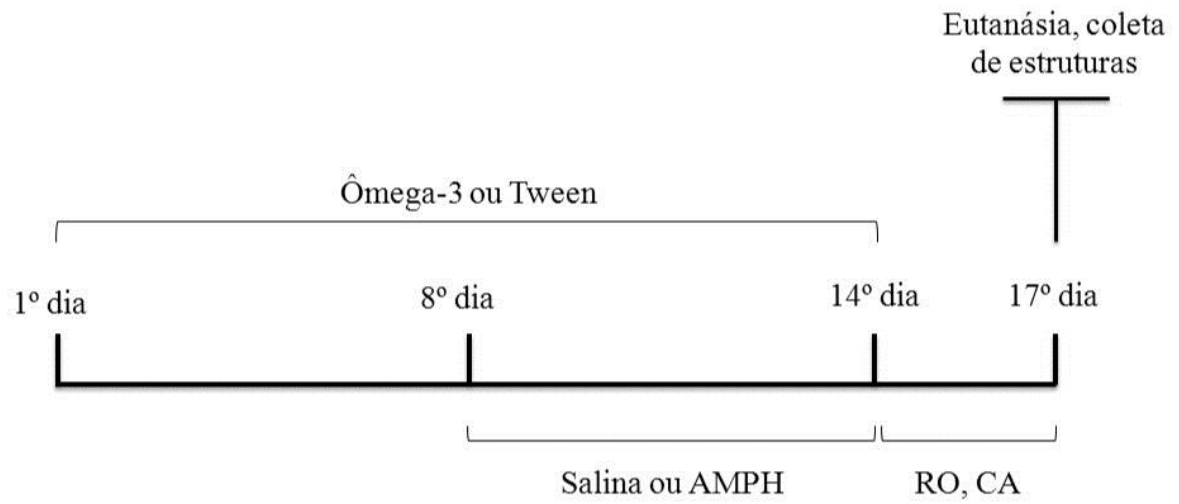
Figura 1. Desenho Experimental

Figura 2. Efeitos do ômega-3 e AMPH no teste de atividade locomotora em campo aberto. Dados expressos em média±Desvio padrão, n= 13-14 por grupo. (#) AMPH/Ômega diferiu significativamente do grupo Ômega (p=0,008). (*) Grupo AMPH/Ômega diferiu significativamente do grupo Controle (p=0,005)

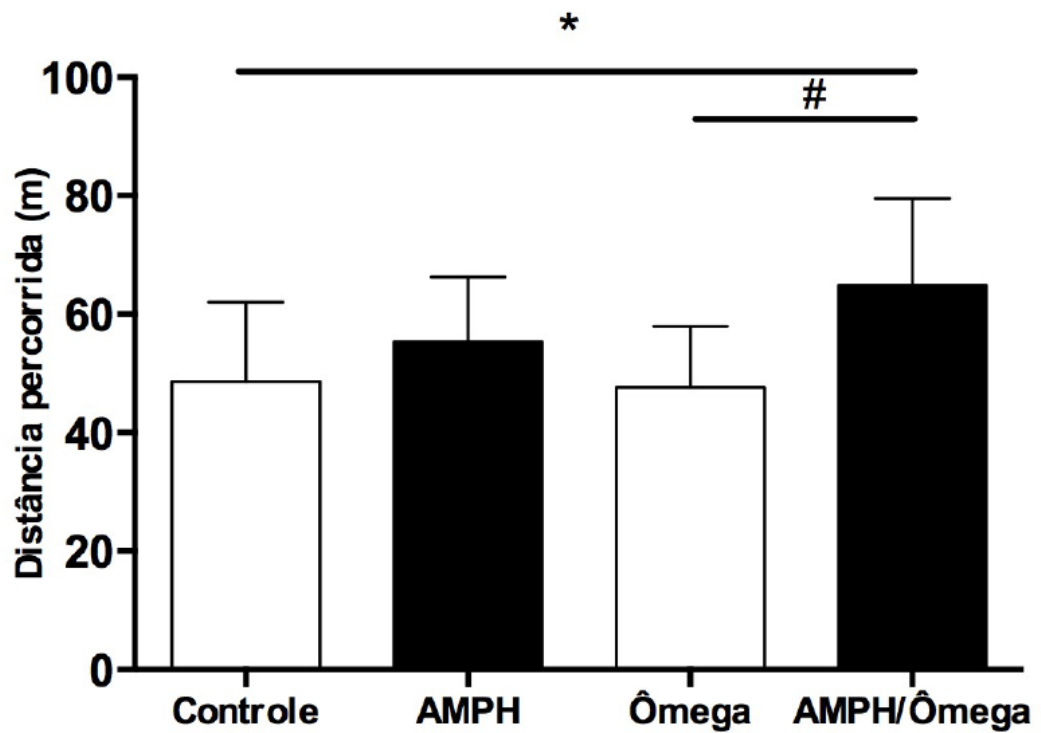


Figura 3. Efeitos do ômega-3 e AMPH na fase de treino do reconhecimento de objetos. Índice criado a partir do tempo gasto explorando o objeto A sobre o tempo gasto explorando o objeto B. Dados expressos em média±Desvio padrão, n= 13 por grupo.

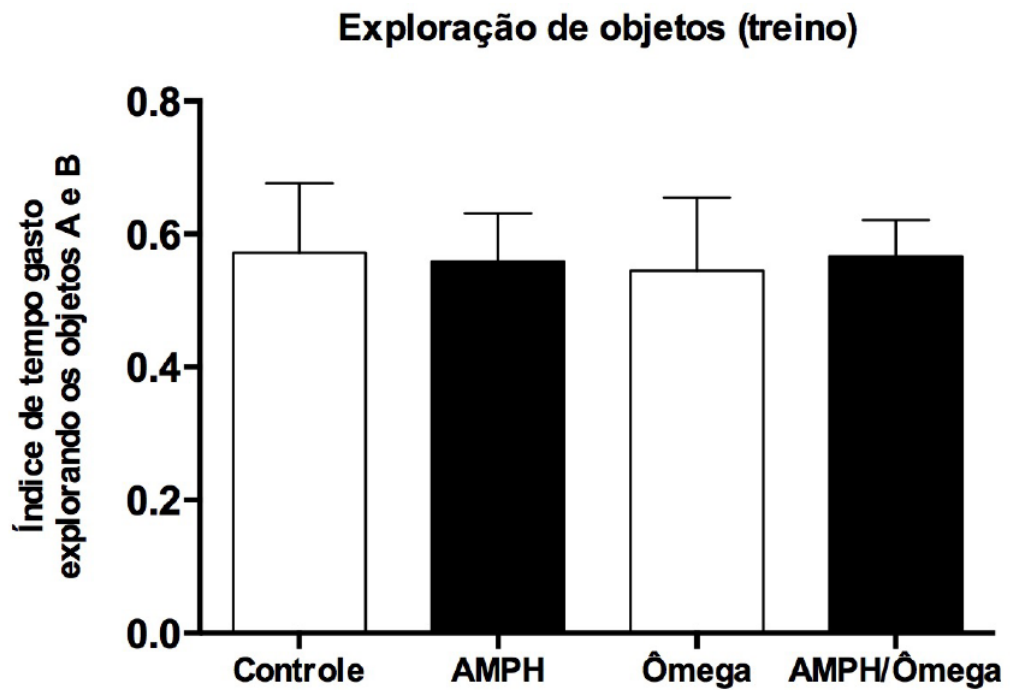
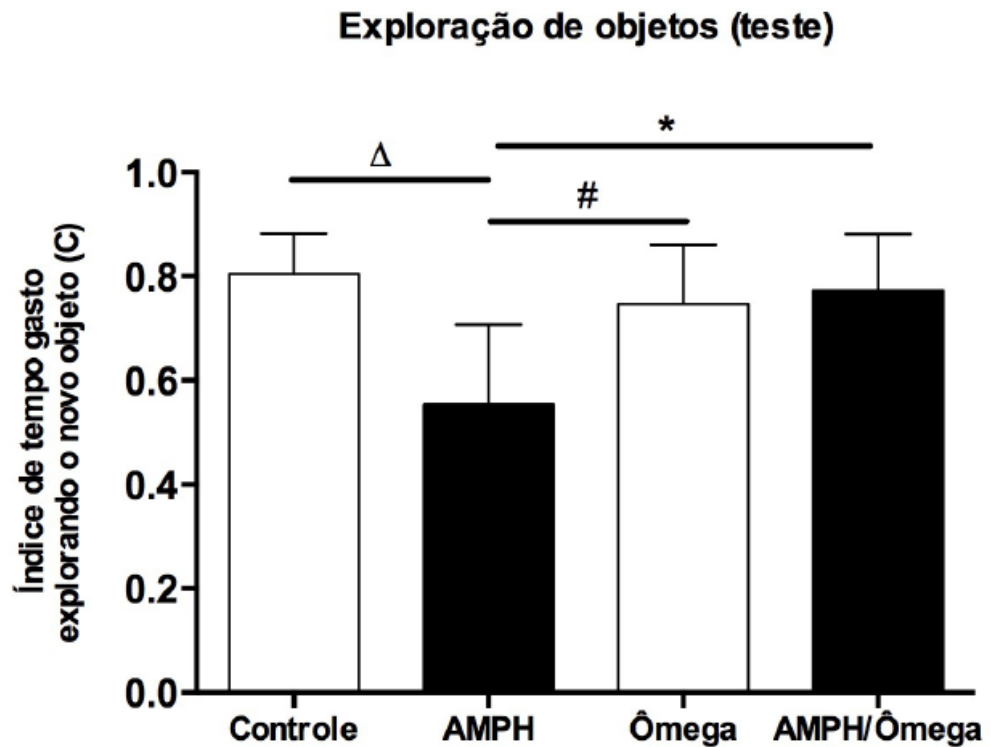


Figura 4. Efeitos do ômega-3 e AMPH na fase de teste do reconhecimento de objetos. Índice criado a partir do tempo gasto explorando o objeto novo (C) sobre o tempo gasto explorando objeto familiar (A). Dados expressos em média±Desvio padrão, n=13-14 por grupo. (*)#(Δ) O grupo AMPH explorou mais o objeto familiar e diferiu significativamente em relação a todos os outros grupos ($p < 0,001$).



4. Conclusões E Perspectivas

O estudo demonstrou que o ômega-3 foi capaz de prevenir prejuízos cognitivos relacionados a memória de longo prazo, mas não foi capaz de prevenir uma hiperatividade locomotora gerada pela AMPH. O teste de reconhecimento de objetos demonstrou que o ômega-3 possui uma alta capacidade neuroprotetora, visto que os animais não perderam a habilidade de se lembrar do objeto antigo, mesmo tendo recebido administrações crônicas de AMPH. Embora não se saiba exatamente os mecanismos por trás das ações neuroprotetoras do ω -3, o estudo é muito importante, pois lida com uma fase dos transtornos pouco elucidada pela ciência: estratégias de prevenção primária em populações com risco de desenvolver TB. Além de ser um tratamento baseado em estudos que demonstram que níveis baixos de EPA e DHA estão presentes em populações em risco muito alto de desenvolver o TB e uma suplementação destes poderia ser um potencial adjuvante em terapias de prevenção ao transtorno.

Existem muitas perspectivas para este estudo, principalmente relacionadas a elucidar por quais mecanismos o ω -3 foi capaz de prevenir o prejuízo cognitivo nos animais. Para tanto, será realizada dosagens de interleucinas pró-inflamatórias nas estruturas retiradas (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) e relacionar com dosagens de neurotrofina derivada do cérebro (BDNF) e estresse oxidativo em proteínas/lipídeos. Além disso uma parte dos animais deste modelo foi perfundida a fim de realizarmos técnicas de imunofluorescência com marcadores pró-inflamatórios.

5. Referências

1. Kilbourne AM, Cornelius JR, Han X, Pincus HA, Shad M, Salloum I, et al. Burden of general medical conditions among individuals with bipolar disorder. *Bipolar disorders*. 2004;6(5):368-73.
2. Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Archives of general psychiatry*. 2011;68(3):241-51.
3. Nivoli AM, Pacchiarotti I, Rosa AR, Popovic D, Murru A, Valenti M, et al. Gender differences in a cohort study of 604 bipolar patients: the role of predominant polarity. *Journal of affective disorders*. 2011;133(3):443-9.
4. Martinez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Goikolea JM, Salamero M, et al. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar disorders*. 2007;9(1-2):103-13.
5. Grande I, Goikolea JM, de Dios C, Gonzalez-Pinto A, Montes JM, Saiz-Ruiz J, et al. Occupational disability in bipolar disorder: analysis of predictors of being on severe disablement benefit (PREBIS study data). *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2013;127(5):403-11.
6. Alonso J, Petukhova M, Vilagut G, Chatterji S, Heeringa S, Ustun TB, et al. Days out of role due to common physical and mental conditions: results from the WHO World Mental Health surveys. *Molecular psychiatry*. 2011;16(12):1234-46.
7. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008;32(4):675-92.
8. Tohen M, Wateraux CM, Tsuang MT. Outcome in Mania. A 4-year prospective follow-up of 75 patients utilizing survival analysis. *Archives of general psychiatry*. 1990;47(12):1106-11.
9. Gelenberg AJ, Kane JM, Keller MB, Lavori P, Rosenbaum JF, Cole K, et al. Comparison of standard and low serum levels of lithium for maintenance treatment of bipolar disorder. *The New England journal of medicine*. 1989;321(22):1489-93.
10. Swann AC, Bowden CL, Calabrese JR, Dilsaver SC, Morris DD. Differential effect of number of previous episodes of affective disorder on response to lithium or divalproex in acute mania. *The American journal of psychiatry*. 1999;156(8):1264-6.
11. Kessing LV, Andersen PK, Mortensen PB. Predictors of recurrence in affective disorder. A case register study. *Journal of affective disorders*. 1998;49(2):101-8.
12. Hajek T, Carrey N, Alda M. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. *Bipolar disorders*. 2005;7(5):393-403.
13. Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular psychiatry*. 2005;10(1):105-16.
14. Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiology of disease*. 2010;37(3):596-603.
15. Abe C, Ekman CJ, Sellgren C, Petrovic P, Ingvar M, Landen M. Manic episodes are related to changes in frontal cortex: a longitudinal neuroimaging study of bipolar disorder 1. *Brain : a journal of neurology*. 2015;138(Pt 11):3440-8.
16. Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience letters*. 2006;398(3):215-9.

17. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2009;12(4):447-58.
18. Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Goncalves CA, et al. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 2009;34(4):263-71.
19. Rao JS, Harry GJ, Rapoport SI, Kim HW. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. *Molecular psychiatry*. 2010;15(4):384-92.
20. Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(6):523-9.
21. Barbosa IG, Bauer ME, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Cytokines in bipolar disorder: paving the way for neuroprogression. *Neural plasticity*. 2014;2014:360481.
22. Peet M, Stokes C. Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs*. 2005;65(8):1051-9.
23. Balanza-Martinez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabares-Seisdedos R, et al. Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder. *Expert review of neurotherapeutics*. 2011;11(7):1029-47.
24. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2000;18(4-5):383-99.
25. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annual review of cell and developmental biology*. 2005;21:633-57.
26. Heird WC, Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annual review of nutrition*. 2005;25:549-71.
27. Covington MB. Omega-3 fatty acids. *American family physician*. 2004;70(1):133-40.
28. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Progress in lipid research*. 1985;24(2):69-176.
29. Fedorova I, Salem N, Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2006;75(4-5):271-89.
30. Kim HY, Akbar M, Kim YS. Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2010;82(4-6):165-72.
31. Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 2009;109(4):668-79.
32. Mickleborough TD, Murray RL, Ionescu AA, Lindley MR. Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(10):1181-9.
33. Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *The Journal of nutrition*. 2008;138(12):2510-4.

34. Chung WL, Chen JJ, Su HM. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *The Journal of nutrition*. 2008;138(6):1165-71.
35. Lim SY, Hoshiba J, Moriguchi T, Salem N, Jr. N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatric research*. 2005;58(4):741-8.
36. Bas O, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen OA, Yaman M, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochemistry international*. 2007;50(3):548-54.
37. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*. 2004;21(10):1457-67.
38. Amminger GP, Schafer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, et al. Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of general psychiatry*. 2010;67(2):146-54.
39. Amminger GP, Schafer MR, Schlogelhofer M, Klier CM, McGorry PD. Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study. *Nature communications*. 2015;6:7934.
40. Logan RW, McClung CA. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. *Neuroscience*. 2015.
41. Meyendorff E, Lerer B, Moore NC, Bow J, Gershon S. Methylphenidate infusion in euthymic bipolars: effect of carbamazepine pretreatment. *Psychiatry research*. 1985;16(4):303-8.
42. Peet M, Peters S. Drug-induced mania. *Drug safety*. 1995;12(2):146-53.
43. Cousins DA, Butts K, Young AH. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar disorders*. 2009;11(8):787-806.
44. Young KA, Liu Y, Gobrogge KL, Dietz DM, Wang H, Kabbaj M, et al. Amphetamine alters behavior and mesocorticolimbic dopamine receptor expression in the monogamous female prairie vole. *Brain research*. 2011;1367:213-22.
45. Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Molecular psychiatry*. 2009;14(2):123-42.
46. Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:681-98.
47. Anand A, Verhoeff P, Seneca N, Zoghbi SS, Seibyl JP, Charney DS, et al. Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *The American journal of psychiatry*. 2000;157(7):1108-14.
48. Van Kammen DP, Murphy DL. Attenuation of the euphoriant and activating effects of d- and l-amphetamine by lithium carbonate treatment. *Psychopharmacologia*. 1975;44(3):215-24.