



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

JULIANA AZEVEDO DE MENESES

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE DANOS NEUROLÓGICOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À HIPÓXIA, COM O USO DA SEMENTE DE LINHAÇA SOMADO  
AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Niterói  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA AZEVEDO DE MENESES

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE DANOS NEUROLÓGICOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À HIPÓXIA, COM O USO DA SEMENTE DE LINHAÇA SOMADO  
AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura

Niterói

2010

JULIANA AZEVEDO DE MENESES

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE DANOS NEUROLÓGICOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À HIPÓXIA, COM O USO DA SEMENTE DE LINHAÇA SOMADO  
AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas

Aprovada em maio de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luís Guillermo Coca Velarde  
UFF

---

Prof. Dr. Ronald Marques dos Santos  
UFF

---

Prof. Dr. Cláudio C Filgueiras  
UERJ

---

Orientador: Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura - UFF

Niterói

2010

*À minha mãe Regina, por me ensinar  
a insistir em meus sonhos.*

*Ao meu companheiro Nicholas, pelo  
suporte emocional e acreditar sempre  
em mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à **Deus**, por fazer com que a caminhada da minha vida chegasse a esse importante patamar.

À minha **Família**, mãe, irmã e sobrinhos, pelo amor incondicional e incentivo a seguir sempre em frente, o meu agradecimento pela construção de quem sou hoje.

Ao meu companheiro **Nicholas**, que com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida.

Ao meu “pai do coração” **Sérgio Aureliano**, pelo carinho e suporte na minha formação profissional.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura**, pela credibilidade depositada em mim, pelos ensinamentos, apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos, o meu muito obrigada por permitir a concretização de um grande sonho.

À minha grande amiga **Kátia Calvi Lenzi Almeida**, por me ajudar a chegar até aqui, me incentivar e ter sempre uma palavra de carinho em todos os momentos que passei, pela sua amizade, pelo seu apoio e por tudo o que fez e faz por mim.

Ao **Prof. Dr. Guillermo Coca Velarde**, pela paciência e disponibilidade em sempre ajudar, seu conhecimento e carinho foram estatisticamente significantes.

Ao **Prof. Dr. Ronald Marques**, pela sensibilidade que o diferencia como educador.

Aos amigos **André Manoel, Carine Danielle Leite, Ludmila Cardozo, Livia Hipólito, Lavínia Leal**, pela força e ajuda, seja na parte prática ou como um gesto de carinho, e pela amizade que se construiu para além dos espaços do LabNE.

A todos do **LabNE**, Bolsistas de iniciação científica, Mestrandos, Doutorandos, funcionários...Enfim, todos que passaram e permanecem nesse lugar tão especial e que de alguma forma contribuiu para a concretização desse trabalho.

À **CAPES**, pelo auxílio concedido.

“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”

**Albert Einstein**

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
2.1 HIPÓXIA	17
2.2 ÁCIDOS GRAXOS	18
2.2.1 Ácidos graxos e neurodesenvolvimento	20
2.3 SEMENTE DE LINHAÇA	22
2.3.1 Semente de linhaça como fonte de ácidos graxos	23
2.4 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	24
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>4 HIPÓTESE</b>	28

<b>5 OBJETIVOS</b>	29
5.1 OBJETIVO GERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
6.1 MATERIAL	30
6.1.1 Semente de linhaça	30
6.1.2 Rações	30
6.1.3 Animais	30
6.1.4 Delineamento experimental	31
6.2 MÉTODOS	33
6.2.1 Preparo das rações	33
6.2.2 Coleta do leite materno	34
6.2.3 Determinação do crematócrito	35
6.2.4 Hipóxia	35
6.2.5 Enriquecimento Ambiental	36
6.2.6 Análise do desenvolvimento cognitivo	37
6.2.7 Coleta dos cérebros	39
6.2.8 Análise estatística	39
<b>7 RESULTADOS</b>	40
7.1 CREMATÓCRITO E VALOR ENERGÉTICO DO LEITE	40

7.2 PROTOCOLO DE REFERÊNCIA	41
7.3 PROTOCOLO DE APRENDIZADO	42
7.4 PESO CEREBRAL RELATIVO	42
<b>8 DISCUSSÃO</b>	49
<b>9 CONCLUSÃO</b>	57
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
<b>11 ARTIGO SUBMETIDO</b>	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AG	Ácidos Graxos
AGE	Ácidos graxos essenciais
AGPI-CL	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALA	Ácido alfa-linolênico
AP	Asfixia perinatal

BHT	Butil hidroxi tolueno
CG0	Grupo controle sem hipóxia
EA	Enriquecimento ambiental
EPA	Ácido eicosapentaenóico
GC	Grupo controle
GC00	Grupo controle sem hipóxia sem enriquecimento ambiental
GC0EA	Grupo controle sem hipóxia com enriquecimento ambiental
GCH	Grupo controle com hipóxia
GCH0	Grupo controle com hipóxia sem enriquecimento ambiental
GCHEA	Grupo controle com hipóxia com enriquecimento ambiental
GCM	Grupo controle modificado
GCM0	Grupo controle modificado sem hipóxia
GCM00	Grupo controle modificado sem hipóxia sem enriquecimento ambiental
GCM0EA	Grupo controle modificado sem hipóxia com enriquecimento ambiental
GCMH	Grupo controle modificado com hipóxia
GCMH0	Grupo controle modificado com hipóxia sem enriquecimento ambiental
GCMHEA	Grupo controle modificado com hipóxia com enriquecimento ambiental
GL	Grupo linhaça
GL0	Grupo linhaça sem hipóxia
GL00	Grupo linhaça sem hipóxia sem enriquecimento ambiental

GL0EA	Grupo linhaça sem hipóxia com enriquecimento ambiental
GLH	Grupo linhaça com hipóxia
GLH0	Grupo linhaça com hipóxia sem enriquecimento ambiental
GLHEA	Grupo linhaça com hipóxia com enriquecimento ambiental
HDL	<i>High density protein</i>
LA	Ácido linoléico
LabNE	Laboratório de Nutrição Experimental
LDL	Low Density Lipoprotein
n-3	Família ômega 3
n-6	Família ômega 6
SNC	Sistema nervoso central
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Conversão de AGPI, ALA e LA em AGPI-CL	19
<b>Figura 2.</b> Plantação de linho	22
<b>Figura 3.</b> Formas de comercialização da semente de linhaça	23
<b>Figura 4.</b> Diferenças entre gaiola padrão e gaiola para enriquecimento ambiental	25
<b>Figura 5.</b> Preparo de rações	30
<b>Figura 6.</b> Delineamento experimental	33
<b>Figura 7.</b> Processo de hipóxia	35
<b>Figura 8.</b> Gaiola para enriquecimento ambiental	36
<b>Figura 9.</b> Gaiola padrão	37
<b>Figura 10.</b> Esquema do Labirinto Aquático de <i>Morris</i>	38

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1.</b> Composição de gordura da semente de linhaça	24
<b>Quadro 2.</b> Composição das rações experimentais com 17% de proteína	33
<b>Quadro 3.</b> Composição das rações experimentais com 10% de proteína	34
<b>Tabela 1.</b> Teor de gordura e conteúdo energético do leite materno	40

## **LISTA DE QUADROS E TABELA**

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1.</b> Probabilidade de encontrar a plataforma entre os grupos com e sem hipóxia	41
<b>Gráfico 2.</b> Probabilidade de encontrar a plataforma entre os grupos com e sem enriquecimento ambiental	42
<b>Gráfico 3.</b> PCR dos animais ao 65º dia, dos grupos dietéticos estudados	43
<b>Gráfico 4.</b> PCR dos animais ao 65º dia, dos grupos com e sem hipóxia	43
<b>Gráfico 5.</b> PCR ao 65º dia dos animais do GL com e sem hipóxia	44
<b>Gráfico 6.</b> PCR ao 65º dia dos animais do GCM com e sem hipóxia	44
<b>Gráfico 7.</b> PCR ao 65º dia dos animais do GC com e sem hipóxia	45
<b>Gráfico 8.</b> PCR ao 65º dia dos animais dos grupos dietéticos distintos com hipóxia	45
<b>Gráfico 9.</b> PCR ao 65º dia dos animais dos grupos dietéticos distintos, com hipóxia mantidos em ambiente enriquecido	46

<b>Gráfico 10.</b> PCR ao 65 <sup>o</sup> dia dos animais com e sem EA	46
<b>Gráfico 11.</b> PCR ao 65 <sup>o</sup> dia dos animais do GL com e sem EA	47
<b>Gráfico 12.</b> PCR ao 65 <sup>o</sup> dia dos animais do GC com e sem EA	47
<b>Gráfico 13.</b> PCR ao 65 <sup>o</sup> dia dos animais do GCM com e sem EA	48

## RESUMO

A semente de linhaça possui uma alta concentração de ômega-3, e seu consumo associado a um ambiente enriquecido pode promover resultados distintos sobre uma lesão hipóxica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor de uma dieta a base de ômega-3 com o enriquecimento ambiental em uma lesão cerebral de ratos neonatos. Setenta e dois ratos neonatos, *Wistar*, foram divididos em 12 grupos (n=3) formados pela combinação dos fatores: Dieta (Linhaça, Controle, Controle Modificado), Hipóxia (com e sem) e Enriquecimento Ambiental (com e sem). Com até 2 horas após o nascimento, metade dos animais foram exposto ao N<sub>2</sub> 99,9% por 20 minutos para a realização da hipóxia, em seguida os animais retornaram à suas mães. Do primeiro ao segundo mês de vida, foram formados todos os grupos citados

anteriormente. Todos os animais foram mantidos em temperatura controlada (22°C), gaiolas coletivas (n=3) e ciclo claro/escuro de 12h, recebendo ração e água *ad libitum*, com exceção do grupo dietético caseína modificada que ficou em *pairfeeding* com o grupo dietético linhaça. Após 2 meses foi realizado 4 dias de testes no Labirinto Aquático de *Morris*. Ao findar os testes, os animais foram sacrificados e seus cérebros retirados para calcular o peso cerebral relativo. O leite de ratas alimentadas com linhaça mostrou uma maior quantidade de ômega-3. Apenas a linhaça pareceu ser papel crucial no aumento do peso cerebral relativo, sugerindo maior agregação desses ácidos graxos no sistema nervoso. Os resultados dos testes sugeriram que uma dieta a base de linhaça pode aumentar o fator neuroprotetor apresentado pelo enriquecimento ambiental.

Palavras-chave: Linhaça, hipóxia, enriquecimento ambiental, cérebro, ratos.

**ABSTRACT**

Flaxseed has a high content of n-3 fatty acids and its intake associated with an environmental enrichment may promote distinct results upon hypoxic brain injury. This work aimed to evaluating the neuroprotective effect of a diet based in n-3 with an enriched environmental in the neonatal rat brain injury. Seventy-two *Wistar* neonatal rats were divided into 12 groups (n=3) formed by the combination of factors: Diet (Flaxseed, Control and Modified Control), Hypóxic (with or without) and Environmental Enrichment (with or without). Within 2 hours after birth, half the animals were exposed to 99,9% N<sub>2</sub> for 20 min and then returned to its mothers. From one to two months of life, was formed all the groups mentioned above. All animals were kept under controlled temperature (22°C), collective cages (n=3) and dark/light cycle (12h), receiving chow and water *ad libitum*, except for the casein modified diets groups, which were *pair feed* with flaxseed diet groups. After 2 months was carried out 4 days of *Water Maze* tests. Finishing the tests, animals were sacrificed and their brains were obtained in order to calculate the relative brain weight. The milk of rats fed flaxseed chow showed a higher amount of n-3. Only flaxseed seems to have a crucial role in brain weight increasing, suggesting higher aggregation of fatty acids in nervous system. The results on tests suggest that a diet based on flaxseed can increase the effect neuroprotective of environmental enrichment.

Key-words: Flaxseed, hypoxic, environmental enrichment, brain, rats.

## 1 INTRODUÇÃO

A Hipóxia é uma deficiência de oxigênio nos tecidos orgânicos. Pode ser causada por uma alteração em qualquer mecanismo de transporte de oxigênio, desde as vias superiores até os tecidos (COTRAN, KUMAR & ROBBINS, 1996). Quando a hipóxia ocorre durante o parto, denominamos de Asfixia Perinatal (AP), que é um evento grave e possui uma incidência de 2 a 4 para cada mil nascidos vivos. A Organização Mundial da Saúde estima que dos 5 milhões de óbitos neonatais/ano no mundo, 19% são conseqüentes à essa lesão (COSTELLO, 1994). No Brasil, segundo França & Lanksy (2009), a AP, dentro das afecções perinatais, é responsável por 14,3% dos óbitos.

Dependendo das características do acometimento inicial, as conseqüências no sistema nervoso, variam entre a perda neuronal restrita, com danos menores, à isquemia cerebral extensa, com seqüelas que podem chegar à morte cerebral (ZINAIDA & FERRIERO, 2001).

Para um desenvolvimento fetal e pós-natal normais, todos os nutrientes são importantes, entretanto, alguns deles têm importância particular em determinados períodos do desenvolvimento do cérebro de mamíferos, como, por exemplo, os lipídeos (GEORGIEFF *et al.*, 2001). Os lipídeos formam aproximadamente 60% da

massa do tecido cerebral e por sua vez, são constituídos em grande proporção por ácidos graxos (AG) (TURATTI *et al.*, 2002).

Os AG desempenham papel essencial na fisiologia do cérebro e da retina (SIMOPOULOS & BAZAN, 2009). O ser humano, assim como os demais mamíferos, são capazes de sintetizar certos AG, porém essa capacidade é limitada quando se trata de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Por esta razão, esses, são chamados de ácidos graxos essenciais (AGE) e precisam ser consumidos como parte da dieta. Como exemplo, o ômega-3 e ômega-6 (HONSTRA, 2001).

O teor de ômega-3 na semente de linhaça é maior do que em qualquer outra oleaginosa (BRANCA & LORENZETTI, 2005). O interesse pela semente vem aumentando devido a seus efeitos fisiológicos favoráveis ao organismo, como por exemplo, a redução do colesterol total e LDL, redução do risco de câncer, diabetes entre outros (HARRIS, 1999 e TZANG *et al.*, 2009).

O desenvolvimento normal do cérebro também está associado a estímulos ambientais, e devido ao cérebro imaturo ser capaz de responder a esses estímulos (MEANEY & AITKEN, 1985), tem sido levantado a possibilidade desta estimulação proteger o cérebro de um neonato submetido à hipóxia. Na década de 1960, foi mostrado pela primeira vez que o enriquecimento ambiental (EA) melhora a recuperação funcional após lesões cerebrais. As denominações de um ambiente enriquecido e condições habitacionais enriquecidas foram originalmente adaptadas pelas pesquisas de Hebb (HEBB, 1947, 1949). Trata-se de uma estimulação envolvendo a combinação de um aumento da integração social, exercício físico e contínua exposição a tarefas de aprendizado, que produz efeitos interessantes na melhora das atividades cognitivas e motoras (KRENCH, ROSENZWEIG & BENNETT, 1960; PUURUNEN & SIVENIUS, 2002).

Considerando que a hipóxia neonatal pode causar lesões irreversíveis no cérebro afetando seu desenvolvimento; que uma dieta a base de ômega-3 na fase de gestação, lactação e infância desempenha um papel fundamental no desenvolvimento cerebral e que o enriquecimento ambiental está associado à maturação de áreas cerebrais, este trabalho objetivou avaliar o efeito de uma alimentação a base de semente de linhaça somada à exposição a um ambiente enriquecido, de ratos neonatos acometidos pela hipóxia.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### 2.1 HIPÓXIA

A hipóxia pré e perinatal é o principal contribuidor da morbidade e mortalidade dos recém nascidos e crianças (VANNUCCI, 1990), podendo ser causada por diferentes fatores de origem materna, placentária, fetal, ou durante o trabalho de parto. Tais fatores reduzem o intercâmbio de oxigênio materno à criança, conduzindo-a, freqüentemente, ao retardo mental, às apreensões e as disfunções motoras. A patogenia dessa injúria é complexa e vai desde eventos tóxicos relacionados tais como depleção de energia, liberação de amino ácidos excitatórios, liberação de espécie reativa de oxigênio e a iniciação da apoptose, a qual ocorre simultaneamente e contribui para a disfunção e a morte celular (MCDONALD & JOHNSTON, 1990). As cascatas subjacentes desses eventos são similares àquelas para o curso do Sistema Nervoso Central (SNC) maduro, mas a extensão a qual estes eventos afetam o cérebro lesado, entretanto, é influenciada profundamente pela idade. A susceptibilidade do SNC imaturo à hipóxia é pela maior parte, dependente do estado temporal e regional do processo de desenvolvimento crítico, isto é, proliferação, migração, diferenciação, mielinização assim como na regulação do fluxo e do metabolismo cerebral do sangue. A abordagem precoce é de extrema importância, porque as seqüelas podem ser variadas, dependendo da extensão do acometimento, da tolerância do recém-nascido à hipóxia e do desenvolvimento maturacional (BEILHARZ, WILLIAMS & DRAGUNOW *et al.*, 1995).

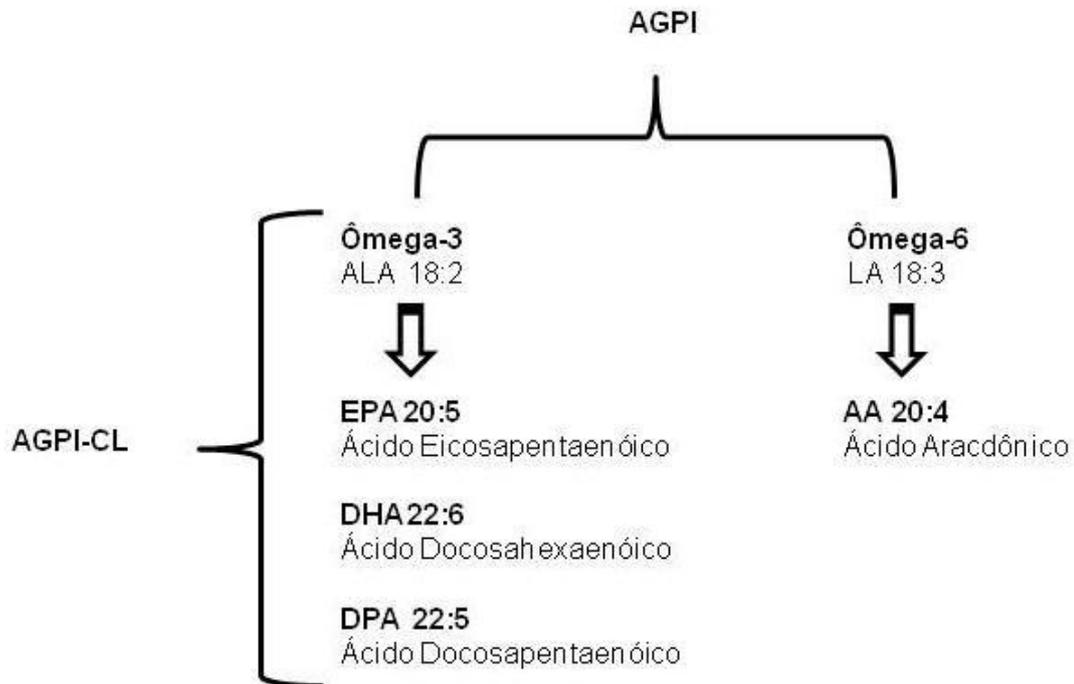
Nos mamíferos em geral, o desenvolvimento cerebral tem início na embriogênese e continua durante um período relativamente curto de vida pós-natal (ZOMIGNANI *et al.*, 2009). Nesse período o cérebro é especialmente vulnerável a qualquer agressão em função de ser a fase na qual os processos implicados no desenvolvimento cerebral ocorrem com maior rapidez. Dentre eles, merece destaque

a hiperplasia e hipertrofia do tecido nervoso, a mielinização e a organização das sinapses (ALMEIDA *et al.*, 2002), particularmente no sistema visual e hipocampo (SALIBA & MARRET, 2001).

A Encefalopatia Hipóxico Isquêmica (EHI) está intimamente relacionada à AP. Qualquer processo mórbido que envolva a presença de hipóxia, isquemia e acidose perinatal, pode desencadear uma cascata de alterações que culmina na lesão do SNC (MARGOTTO, 2002). Nas últimas duas décadas, as pesquisas experimentais feitas com o cérebro de cobaia trouxeram grande avanço aos conhecimentos da fisiopatologia da EHI, como a descoberta da morte neuronal tardia, mediada por liberação de radicais livres e agentes pró-inflamatórios. Essas descobertas apontam para a possibilidade de tratamentos mais efetivos e preventivos da hipóxia neonatal. (Almeida *et al.*, 2002; MORGANE *et al.* 1993 e 2002).

## 2.2 ÁCIDOS GRAXOS

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (YEHUDA, *et al.*, 2002). Sua composição nos alimentos é de grande importância, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) das famílias ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), aos quais se atribuem numerosos benefícios ao organismo humano. A família n-3 compreende AGPI alfa-linolênico (ALA), do qual por alongamento e dessaturação são gerados os ácidos eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). A família n-6 compreende o ácido AGPI linoléico (LA), que pode originar o ácido aracdônico (AA) (figura 1) (BELDA & POURCHET-CAMPOS, 1991).



**Figura 1. Conversão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), ácido alfa-linolênico (ALA) e ácido linoléico (LA) em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL) da família ômega-3 e ômega-6.**

Em humanos os ácidos graxos LA e ALA, são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sangüíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo (YEHUDA, *et al.*, 2002; YODIM, *et al.*, 2000). Apresentam, também, efeitos hipocolesterolêmicos e reduzem os níveis de LDL através de modificações na composição das membranas celulares e das lipoproteínas, além de induzir o aumento das excreções biliar e fecal do colesterol, reduzindo a síntese de VLDL no fígado (BRITISH NUTRITION FOUNDATIONS, 1994). São precursores de um conjunto de substâncias com atividades fisiológicas e farmacológicas denominadas eicosanóides, que abrangem as tromboxanas, prostaglandinas (que possuem efeitos hipotensores, inibem a agregação plaquetária e aumentam o HDL) e leucotrienos. O equilíbrio entre a produção de prostaglandinas e tromboxanas inibe o aparecimento de doenças cardiovasculares (MIYASAKA & PROCÓPIO, 2002; TURATI, GOMES & ATHIÉ, 2002).

Os AGPI das famílias n-6 e n-3 têm sido alvo de inúmeros estudos nas últimas décadas, os quais esclareceram muitas das funções no organismo humano e as reações envolvidas na sua formação a partir dos ácidos linoléico e alfa-linolênico. Esses estudos, também têm destacado a importância da ingestão dos AGPI, na fase gestacional (HORNSTRA, 2000; SANDERS, 1999), nos primeiros meses após o nascimento (HORNSTRA, 2000; SANGIOVANNI *et al.*, 2000; UAUY *et al.*, 2001), na terceira idade (ALBERTAZZI & COUPLAND, 2002; YEHUDA *et al.*, 2002 ) e em diversas doenças (YEHUDA *et al.*, 2002; YODIM *et al.*, 2000), principalmente degenerativas (MARTIN *et al.*, 2006), atualmente denominadas Doenças Crônicas não-Transmissíveis. Os resultados de pesquisas vêm confirmando que um aumento na ingestão de AGPI n-3 reduz a taxa total de colesterol no sangue (HARRIS, 1999), diminui o risco de doenças cardíacas (STEFFENS, 1997), artrite reumatóide (KROMANN & GREEN, 1980), reduz fatores bioquímicos relacionados com o câncer (KIMURA *et al.*, 2001), psoríase (MAYSER *et al.*, 1997) e infertilidade (CONQUER *et al.*, 2000).

Alimentos relevantes contendo n-3 são, além de peixes, alguns óleos vegetais. Os primeiros fornecem DHA e EPA, enquanto os segundos possuem ALA. O ALA é encontrado no cloroplasto de folhas de vegetais verdes, tais como o espinafre, e em sementes de linhaça, nozes e outros. Já as principais fontes de n-6 são os óleos de milho, girassol e soja, além de carne vermelha em geral (BENATTI *et al.*, 2004).

### 2.2.1 Ácidos Graxos e Neurodesenvolvimento

Os ácidos graxos da membrana celular são compostos de 21% a 36% de AGPI. O sistema nervoso é o órgão com a segunda maior concentração de lipídios, só sendo ultrapassado pelo tecido adiposo (BENATTI *et al.*, 2004). O conhecimento da importância dos AGPI, principalmente DHA e AA, no neurodesenvolvimento, foi originalmente obtido a partir de estudos com animais. Eles representam os componentes principais, cuja importância para o desenvolvimento do SNC inclui participação sobre seu crescimento, função e integridade (YODIM *et al.*, 2000). Estes ácidos são encontrados em altas concentrações no leite materno, sendo rapidamente acrescidos no cérebro durante o primeiro ano pós-natal em humanos lactentes, assim como também nos primeiros 30 dias pós-natal em ratos (BELKIND-GERSON *et al.*, 2008). Por isso, são importantes durante a gravidez e infância

sendo considerados essenciais para o desenvolvimento fetal do cérebro (AUESTAD, 2003). Assim, os dois períodos mais críticos para sua aquisição ocorrem durante o desenvolvimento fetal e após o nascimento, até que o desenvolvimento bioquímico do cérebro e da retina seja concluído. Desta forma, durante a gravidez, a mãe mobiliza DHA e AA para garantir o desenvolvimento cerebral do feto, continuando a fornecê-lo através do leite materno após o nascimento (CONNOR, 2000 ; SIMOPOULOS & BAZAN, 2009).

Estudos mostram que a nutrição intra-uterina (BARKER, 1994) e pós-natal (MOURA, *et al.*, 2002) podem influenciar na ocorrência de risco para doenças crônicas no adulto, sugerindo que o início da nutrição tem um efeito marcante em idades mais avançadas da vida. Desta forma, uma apropriada oferta no período pré e pós-natal destes ácidos é essencial para o desenvolvimento fetal e neonatal normais (INNIS, 1991; MAKRIDES, NEUMANN & GIBSON, 1996), os quais vão permitir uma função neurológica (CARLSON, 1996; MAKRIDES, NEUMANN & GIBSON, 1996), aprendizado e comportamento adequados (WAINWRIGH, 1992).

Dentro do sistema nervoso central, os fosfolipídios constituídos de n-3 e n-6 têm funções importantes na propagação do sinal neuronal, assim como na integridade e fluidez da membrana celular nervosa. Estes papéis permitem o posicionamento e funcionalidade de proteínas tais como receptores de neurotransmissores e proteínas quinases, ambos vitais para sistemas celulares sinalizadores. O equilíbrio correto de n-3 e n-6 nos fosfolipídios é essencial para a homeostase da função neuronal (YOUNG & MARTIN, 2003).

Os AG possuem importâncias específicas durante a vida fetal, quando os processos de desenvolvimento do cérebro e organogênese têm um intervalo limitado de tempo. A análise de AG dos lipídeos totais do tecido cerebral fetal tem mostrado que, durante o último trimestre da gravidez, o aumento quantitativo do total de ácidos graxos n-3 e n-6 aumenta progressivamente conforme a gestação progride. No tecido do fígado fetal, tem sido observado um aumento linear, indicando uma alta demanda por esses ácidos graxos durante o desenvolvimento intrauterino (AI, 2000).

O DHA sozinho é reconhecido pelos seus efeitos em funções cerebrais, humor e comportamento. Ele é um dos “blocos de construção” do crescimento e desenvolvimento cerebral (KLIMASZEWSKI, 2000) – as membranas celulares do cérebro são altamente enriquecidas com DHA (FEDOROVA & SALEM, 2006). Este ácido graxo é incorporado em grandes quantidades nos lipídios estruturais durante o

desenvolvimento do sistema nervoso central, de forma que um acúmulo deficiente do mesmo durante o desenvolvimento tem sido relacionado com anormalidades comportamentais (CARLSON, 2001; FEDOROVA & SALEM, 2006; HAMAZAKI, 1999; KALMIJN *et al.*, 1997; YOUNG & MARTIN, 2003;).

### 2.3 SEMENTE DE LINHAÇA

Com o nome botânico de *Linum usitatissimum* da família Linaceae, a semente de linhaça tem obtido uma atenção maior nos últimos anos. As sementes vêm do linho, uma planta de flor azul (figura 2), que é nativo da região do Mediterrâneo e no leste da Índia e têm sido usadas na culinária por milhares de anos, mas só recentemente seus benefícios na saúde foram compreendidos (FERREL,2009).



**Figura 2. Plantação de linho**

É considerada um alimento funcional, ou seja, que contém, além de suas propriedades nutricionais, várias substâncias que parecem agir contra alguma doença. Está se tornando uma alternativa popular ao tratamento farmacológico por promover benefícios na saúde e/ou reduzir o risco de doenças crônicas (BASSETT, 2009). Foi, inicialmente, muito utilizada pela indústria têxtil devido a seu alto conteúdo de fibras, e hoje já podemos observar inúmeros produtos alimentícios com a semente em sua composição, como por exemplo: massas, pães, barras de cereais, waffles, etc. São também comercializados suas sementes inteiras, moídas e o óleo da sua semente (Figura 3) (KLIMASZEWSKI,2000).



**Figura 3. Formas de comercialização da semente de linhaça. (A) semente inteira, (B) farinha, através da moagem da semente, (C) óleo e (D) óleo em cápsulas.**

A semente de linhaça é rica em proteína, lipídeos e fibras dietéticas. Sua composição centesimal mostrou cerca de 41% de lipídeos, 28% de fibras, 21% de proteína, 4% de resíduos e 6% de hidratos de carbono distribuídos entre ácidos fenólicos, açúcares, lignano e hemicelulose. Cem gramas de linhaça contém 396 Kcal, distribuídas em 109 Kcal de proteínas, e 287 Kcal de lipídeos, o que corresponde a 30,9 g de lipídeos e 24,40 g de proteínas a cada 100 gramas (ZHENG, 2005).

Inúmeras pesquisas vêm sendo feitas e já podemos relacionar a sua utilização para ajudar a combater várias patologias e desordens, incluindo: redução do lipídeo sérico (LOWRY, 2009; OOMAH & MAZZA, 2000; PACHECO, 2008; PAN *et al.*, 2009; RIEDIGER *et al.*, 2008; ZANG, 2008), proteção contra doenças cardíacas (BASSET, 2009, CARDOZO, 2009), proteção contra alguns tipos de câncer (CHEN, 2009), redução dos sintomas do climatério (BRANCA & LORENZETTI, 2005; CLAPAUCH *et al.*, 2002), diminuição do tecido adiposo subcutâneo (SILVA, 2009), desordens neurológicas (HU, YUAN & KITTS, 2007) entre outros, oferecendo benefícios potenciais à saúde (THOMPSON *et al.*, 1996).

### 2.3.1 A semente de linhaça como fonte de ácidos graxos

Dentre os ácidos graxos encontrados na semente de linhaça, as gorduras saturadas apresentam 9% de ácidos totais, as monoinsaturadas são 18% e as poliinsaturadas representam, aproximadamente, 73% dos ácidos graxos totais (quadro 1) (WEISENFELD, 2003). O n-3 constitui aproximadamente 57% dos ácidos totais desta semente, fazendo-lhe a principal fonte vegetal de ácido graxo ômega-3 existente na Natureza (OOMAH & MAZZA, 1995). Outro ácido essencial presente nesta semente é n-6 que constitui aproximadamente 16% dos ácidos graxos totais,

constituindo uma melhor relação de ômega-3/ômega-6 em fontes vegetais (WISENFELD, 2003).

Quadro 1. Composição de gorduras da semente de linhaça.

TIPOS DE GORDURAS	% TOTAL DE GORDURAS
Gorduras Insaturadas	9%
Gorduras Monoinsaturadas	18%
Gorduras Polinsaturadas	Ômega-3 -- 57%
	Ômega-6 -- 16%

Fonte: TURATTI, 2002.

O n-3 converte-se *in vivo* em dois metabólicos principais, ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) após alongação e dessaturação de suas cadeias. Da mesma forma, o n-6 converte-se em ácido aracdônico (AA). Esses três metabólitos finais (EPA, DHA e AA) é que conferem à semente de linhaça as propriedades funcionais atribuídas a ela (PRASAD, 2005).

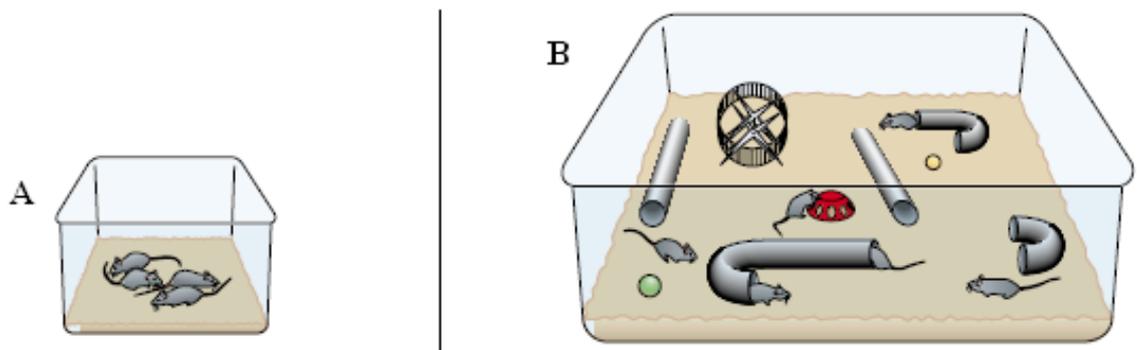
#### 2.4 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

No que se refere aos mamíferos e às aves, as pressões cotidianas enfrentadas pelos indivíduos são tão diferenciadas, que seria impossível, por mecanismos de seleção natural, o pré-estabelecimento de um repertório comportamental adaptativo e completo capaz de garantir a sobrevivência e a reprodução. Parece que a seleção natural favoreceu a plasticidade cognitiva e comportamental, tornando os indivíduos funcionalmente adaptados às contingências ambientais que enfrentam durante o desenvolvimento ontogenético. Este pressuposto leva às deduções de que a experiência interfere sobre o comportamento futuro e de que a variabilidade nos tipos de situações enfrentadas por animais, incluindo-se os humanos, acarreta diferenças psicológicas intra e interespecíficas. De fato, as experiências precoces de um animal podem influenciar seu comportamento adulto em uma série de tarefas; por exemplo, ratos criados em ambientes grandes e complexos apresentam habilidades superiores de resolução de

problemas do que aqueles criados em condições mais restritas (ROSENZWEIG, 1966).

Neste sentido, os animais não são passivos em relação às pressões do ambiente. De qualquer modo, tais pressões fazem parte dos fatores determinantes do comportamento, principalmente do período do nascimento até o início da vida adulta, quando o sistema nervoso parece mais sensível à adaptação às pressões ambientais. Por esta razão, as pesquisas sobre o enriquecimento ambiental freqüentemente têm sido focadas no sentido de investigar os impactos de diferentes condições ambientais de criação sobre a organização comportamental e/ou do sistema nervoso dos animais estudados (FERNANDEZ-TERUEL *et al.*,2002, NAKA *et al.*,2002).

O ambiente enriquecido normalmente contém: a) objetos, que os autores chamam de brinquedos, que serviriam para manipulação pelos animais (PRUSKY, REIDEL & DOUGLAS, 2000); b) túneis e abrigos, que serviriam como "locais seguros" para descanso, locomoção, alimentação e interações sociais (CHAMOVE, 1989; CLARK e GALEF , 1977; ZIMMERMANN *et al.*, 2001); rampas de acesso, ou objetos equivalentes, que serviriam para locomoção tridimensional (ver CHAMOVE, 1989); e rodas de atividade (figura 4). Além disto: a) as caixas-viveiro têm tamanhos diferentes em diferentes estudos; b) os brinquedos podem ser ciclicamente substituídos ou mantidos durante todo o período em que os animais estão sob investigação; c) a quantidade e os "tipos" de brinquedos podem variar, apesar de que eles normalmente não são bem descritos na literatura; d) os túneis e abrigos apresentados têm diferentes formas e tamanhos em diferentes estudos; e as rodas de atividade podem ter diferentes diâmetros, larguras e ainda exigir diferentes intensidades de força para se movimentarem.



**Figura 4. Diferenças entre: (A) gaiola padrão e (B) gaiola para enriquecimento ambiental. Fonte: modificado de VAN PRAAG *et al.*, 2000**

Segundo SHEPHERDSON (1998), o enriquecimento ambiental é um princípio no manejo animal que procura ampliar a qualidade de vida através da identificação e fornecimento de estímulos ambientais necessários para alcançar o bem-estar psíquico e fisiológico, estimulando comportamentos típicos da espécie, reduzindo estresse e tornando o ambiente cativo mais complexo e diverso.

A diminuição de distúrbios comportamentais, redução de intervenções clínicas, diminuição da mortalidade e aumento de taxas reprodutivas, são também alguns benefícios do enriquecimento ambiental. Aspectos estruturais do ambiente podem influenciar parâmetros fisiológicos e o comportamento dos animais (CARLSTEAD & SHEPHERDSON, 2000).

A exposição de ratos criados em grupo a ambientes enriquecidos com escadas, rodas de atividade, caixas, plataformas e outros tipos mais de estímulos resulta em aumento do peso cerebral. Em especial, os ratos criados em ambientes enriquecidos desenvolvem mais massa cortical do que seus irmãos criados em ambientes pobres - isto é, um ambiente contendo apenas alimento, água e material de ninho (ROSENZWEIG *et al.*, 1962).

As primeiras publicações de mudanças mensuráveis no cérebro, como consequência da experiência, foram recebidas com certo ceticismo (ROSENZWEIG, 1966). Entretanto, atualmente já se sabe que o enriquecimento ambiental aprimora a cognição através da plasticidade neuronal. Os ambientes enriquecidos de estimulação sensorial e de situações que exigem soluções de problemas, como localização de alimentos, são associados a grandes mudanças morfológicas nas vias sensoriais primárias, nas áreas de associação e no hipocampo (ROSENZWEIG *et al.*, 1978).

Os modelos de enriquecimento hoje apresentados têm sido eficazes para o desenvolvimento teórico do campo de pesquisas, apesar de que uma parte considerável deles é construída sobre bases intuitivas e econômicas, sem testes experimentais da funcionalidade dos estímulos de enriquecimento (WÜRBEL, 2001).

### **3 JUSTIFICATIVA**

A asfixia perinatal é um evento de alta incidência mundial e de difícil prevenção. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias que possam minimizar suas conseqüências sobre o amadurecimento pós-natal do sistema nervoso, o qual é dependente da estimulação ambiental acompanhada de uma ingestão alimentar balanceada. Este estudo pretende contribuir como um instrumento de apoio para o desenvolvimento de metodologias de tratamentos que permitam evitar e/ou minimizar as possíveis seqüelas que acometem indivíduos submetidos a eventos de asfixia perinatal.

#### **4 HIPÓTESE**

A utilização de uma dieta à base de linhaça somada ao enriquecimento ambiental tem influencia na distribuição de ácidos graxos ômega-3 sobre os fosfolípidios do cérebro de ratos neonatos submetidos à hipóxia, incrementando seu desenvolvimento cerebral como possível fator protetor de lesão hipóxica.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a ação da suplementação de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 da semente de linhaça somado ao enriquecimento ambiental sobre o sistema nervoso central e desenvolvimento da função neurológica e cognitiva, em ratos neonatos submetidos à hipóxia.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crematócrito de leite de ratas com as diferentes dietas estudadas;
- Avaliar o peso cerebral relativo (PCR) dos animais dos diferentes grupos estudados, após 65 dias de nascimento;
- Avaliar o aprendizado e memória dos diferentes grupos estudados, na versão espacial do Labirinto Aquático de *Morris*;
- Estabelecer uma correlação entre os fatores encontrados com a utilização da semente de linhaça e o enriquecimento ambiental.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

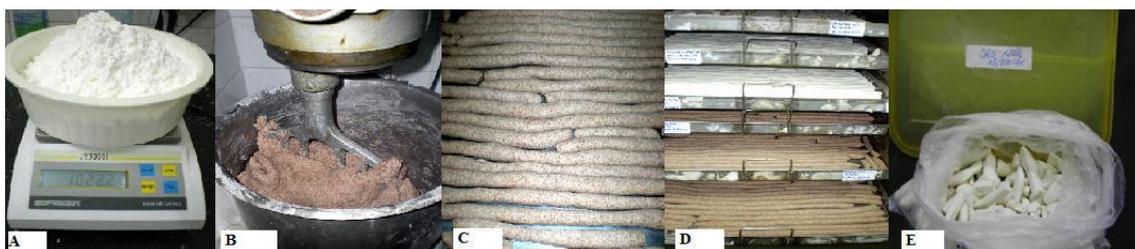
### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1 Semente de Linhaça

As amostras da linhaça foram fornecidas pela empresa Arma Zen Produtos Naturais LTDA, Rio de Janeiro – RJ, seguindo o seguinte processo de preparação: foram pesadas e trituradas em liquidificador para a obtenção da farinha de linhaça, que foi utilizada como fonte de proteína para o preparo das rações.

#### 6.1.2 Rações

Todas as rações foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental (LabNE) da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (figura 5).



**Figura 5. Preparo das rações. (A) Pesagem dos ingredientes, (B) homogeneização, (C) “pellets” formados a partir dos ingredientes homogeneizados, (D) secagem da ração em estufa e (E) ração pronta, embalada e identificada armazenada sob refrigeração até sua oferta aos animais.**

#### 6.1.3 Animais

Para os experimentos foram utilizados 72 *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem *Wistar*, oriundos do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense, local onde foram realizados os ensaios biológicos. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê

de Ética da Universidade Federal Fluminense (UFF) e todas as procedências estão de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

#### 6.1.4 Delineamento Experimental

O ensaio biológico foi desenvolvido utilizando os animais citados anteriormente (n=72), seguindo o delineamento experimental (figura 6) explicado:

Primeiramente, foi dividido em 3 grupos dietéticos (n=24)(fig. 6):

1. Grupo Linhaça (GL), recebendo ração a base de linhaça com 10% de proteína
2. Grupo Controle (GC), recebendo ração a base de caseína com 10% de proteína
3. Grupo Controle Modificado (GCM), recebendo ração a base de caseína com 10% de proteína e modificação nos teores de lipídeos e fibras em função da concentração destes nutrientes na semente de linhaça.

Ao primeiro dia de nascimento (P0) , metade dos animais destinados a cada grupo dietético, passou pelo processo de hipóxia, formando assim 6 grupos (n=12), secundariamente (fig. 6):

1. Grupo Linhaça com Hipóxia (GLH)
2. Grupo Linhaça sem Hipóxia (GL0)
3. Grupo Controle com Hipóxia (GCH)
4. Grupo Controle sem Hipóxia (GC0)
5. Grupo Controle Modificado com Hipóxia (GCMH)
6. Grupo Controle Modificado sem Hipóxia (GCM0)

Finalmente, após o desmame (21<sup>o</sup> dia) dos animais do grupo acima (com e sem hipóxia), metade de cada grupo se manteve em um ambiente enriquecido e a outra metade em ambiente padrão até o 60<sup>o</sup> dia de vida destes, formando assim os 12 grupos distintos (n=6) (fig. 6):

1. Grupo Linhaça com Hipóxia com EA (GLHEA)
2. Grupo Linhaça com Hipóxia sem EA (GLH0)
3. Grupo Linhaça sem Hipóxia com EA (GL0EA)
4. Grupo Linhaça sem Hipóxia sem EA (GL00)

5. Grupo Controle com Hipóxia com EA (GCHEA)
6. Grupo Controle com Hipóxia sem EA (GCH0)
7. Grupo Controle sem Hipóxia com EA (GC0EA)
8. Grupo Controle sem Hipóxia sem EA (GC00)
9. Grupo Controle Modificado com Hipóxia com EA (GCMHEA)
10. Grupo Controle Modificado com Hipóxia sem EA (GCMH0)
11. Grupo Controle Modificado sem Hipóxia com EA (GCM0EA)
12. Grupo Controle Modificado sem Hipóxia sem EA (GCM00)

Os neonatos estudados foram oriundos de mães que receberam as mesmas rações dietéticas (Linhaça, Caseína e Caseína Modificada, todas com 17% de proteína) durante a gestação e lactação. Após o desmame, os filhotes passaram a receber as rações experimentais com 10% de proteína, e as mães foram ordenhadas para a coleta do leite e sua análise.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (n=3/gaiola), com temperatura constante ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e iluminação controlada, ciclo claro-escuro 12/12h, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o ensaio, com exceção do GCM, que recebeu ração no sistema de *pair feeding* sendo sua oferta baseada no consumo do grupo GL no intuito de controlar diferenças de consumo alimentar identificadas em estudos anteriores. O consumo de ração e o peso corporal foram monitorados duas vezes por semana até o fim do experimento.

Ao fim de 60 dias de vida, cada filhote passou por 4 dias de testes de desenvolvimento cognitivo (*Water Maze*), ao findar dos mesmos, os filhotes foram sacrificados e seus cérebros retirados e pesados, para posterior análise.

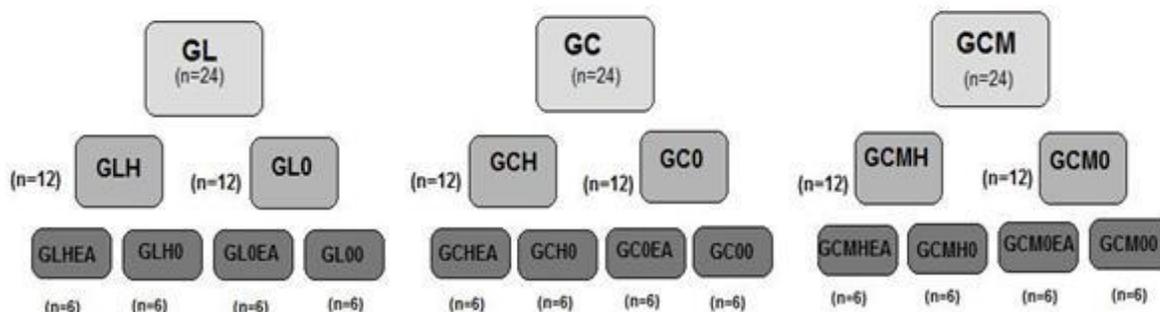


Figura 6. Delineamento Experimental

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1 Preparo das rações

Todas as rações foram preparadas adicionadas das misturas de minerais e de vitaminas segundo as normas do COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS, 1979, modificadas segundo as recomendações da AIN-93G (Quadros 2 e 3) ((REEVES *et al.*, 1993).

Devido ao alto percentual de gordura presente na semente de linhaça, foi adicionado o antioxidante Butil hidroxi tolueno (BHT) a 0,02g por cada quilo de ração a ser preparadas.

Quadro 2. Composição das rações experimentais com 17% de proteína

Nutrientes (g/100g)	Caseína	Linhaça	Caseína Modificada
Caseína <sup>1</sup>	20	14,12	20
Linhaça <sup>2</sup>	-	25	-
Amido <sup>3</sup>	52,95	45,83	49,95
Açúcar <sup>4</sup>	10	10	10
Mix Minerais <sup>1</sup>	3,5	3,5	3,5
Mix Vitaminas <sup>1</sup>	1	1	1
Óleo <sup>5</sup>	7	0	10
Celulose <sup>6</sup>	5	0	5

B-Colina <sup>1</sup>	0,3	0,3	0,3
Cistina <sup>1</sup>	0,3	0,3	0,3
Total	100	100	100
VET	355,64	388,91	372,64

<sup>1</sup>M.Cassab Comércio e Indústria Ltda. <sup>2</sup>Arma Zen Produtos Naturais Ltda., <sup>3</sup>Maisena da Unilever Bestfoods Brasil Ltda., <sup>4</sup>União, <sup>5</sup>Liza Cargill Agricultura Ltda., <sup>6</sup>Macrocel da Blanver Ltda.

Quadro 3. Composição das Rações experimentais com 10% de proteína

Nutrientes	Caseína	Linhaça	Caseína Modificada
Caseína <sup>1</sup>	11,8	5,9	11,8
Linhaça <sup>2</sup>	-	25,0	-
Amido <sup>3</sup>	61,2	54,1	58,2
Açúcar <sup>4</sup>	10,0	10,0	10,0
Mix Minerais <sup>1</sup>	3,5	3,5	3,5
Mix Vitaminas <sup>1</sup>	1,0	1,0	1,0
Óleo <sup>5</sup>	7,0	-	10,0
Celulose <sup>6</sup>	5,0	-	5,0
B-Colina <sup>1</sup>	0,3	0,3	0,3
Cistina <sup>1</sup>	0,3	0,3	0,3
Total	100	100	100
VET	355,1	387,2	370,9

<sup>1</sup>M.Cassab Comércio e Indústria Ltda. <sup>2</sup>Arma Zen Produtos Naturais Ltda., <sup>3</sup>Maisena da Unilever Bestfoods Brasil Ltda., <sup>4</sup>União, <sup>5</sup>Liza Cargill Agricultura Ltda., <sup>6</sup>Macrocel da Blanver Ltda.

### 6.2.2 Coleta do leite materno

A retirada do leite foi realizada segundo a técnica descrita por KEEN *et al.* (1981), na qual as mães foram separadas dos seus respectivos filhotes no 21º dia de lactação por 4 horas. Aos 15 minutos, antes da retirada do leite, as ratas receberam injeção intraperitoneal do anestésico Thiopentax (0,15 mL x peso corporal/100) e ocitocina (Naox) 5UI, para estimular a ejeção do leite. O mesmo foi estocado a -20°C até o momento da análise.

### 6.2.3 Determinação do crematócrito

Para esta determinação foi seguida a técnica desenvolvida por LUCAS *et al.* (1978), na qual após homogeneização do leite ordenhado (1ml), este foi transferido para tubo de ensaio e aquecido em banho-maria à 4°C, durante 10 minutos. Uma vez transcorrido o tempo, 3 alíquotas de 75µl foram centrifugadas por 15 minutos, à 3500rpm. Neste momento duas colunas puderam ser observadas, na parte superior a coluna de creme e na inferior a coluna de soro.

**Para calcular o teor de creme foi usada a seguinte fórmula:**

$$\% \text{ de Creme} = \text{Coluna de Creme (mm)} \times 100 \div \text{Coluna Total (mm)}$$

**Para calcular o teor de gordura foi usada a seguinte fórmula:**

$$\% \text{ de Gordura} = (\% \text{ de Creme} - 0,59) \div 1,46$$

**Para calcular o conteúdo energético total foi usada a seguinte fórmula:**

$$\text{Kcal/100ml de leite} = (\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) \div 10$$

### 6.2.4 Hipóxia

No período de até duas horas após o nascimento, os filhotes destinados ao insulto hipóxico (figura 7), foram separados de suas mães e colocados em câmara própria, hermeticamente fechada, recebendo 99,9% de Nitrogênio durante 20 minutos. Após esse tempo, foram recolocados junto às mães. Os animais que não sofreram esse processo foram separados de suas mães e retornaram ao fim de 20 minutos.



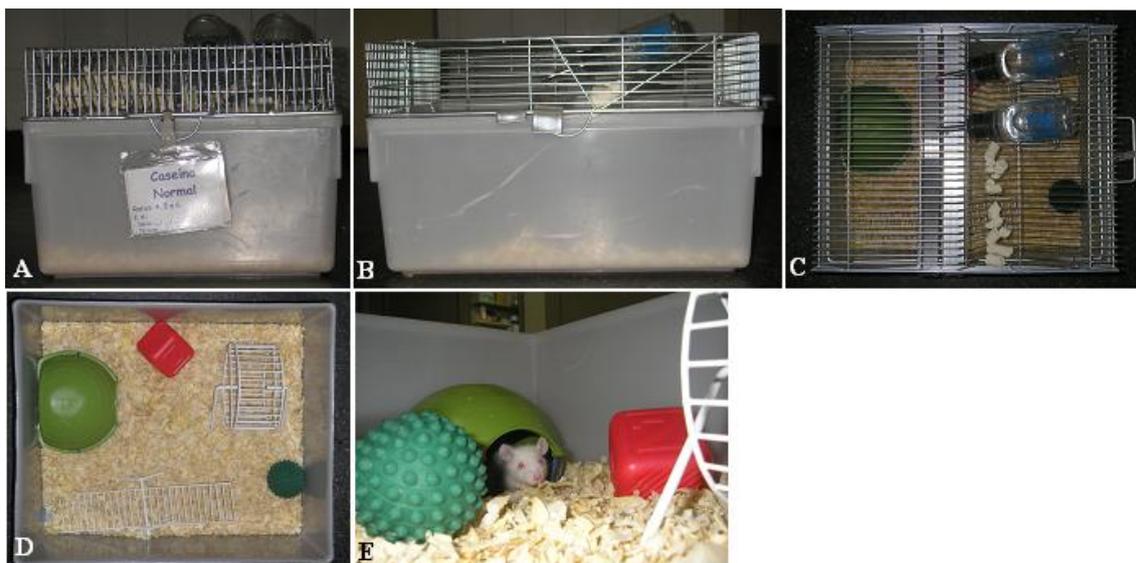
**Figura 7. Processo de hipóxia**

### 6.2.5 Enriquecimento Ambiental

Para o Enriquecimento Ambiental (figura 8) foram utilizados os seguintes objetos:

- a) Roda para exercício de metal com diâmetro de 12 cm;
- b) Abrigo de plástico com dimensões de 9,5 cm, 14,2 cm e 10,2 cm (altura, largura e profundidade, respectivamente);
- c) Gangorra de metal com dimensões de 4,5 cm, 6,0 cm e 26,0 cm (altura, largura e profundidade, respectivamente);
- d) Cubos de plástico com dimensões de 5,0 cm de aresta;
- e) Bolas de borracha com diâmetro de 6,5 cm;
- f) Plataformas de alumínio com dimensões de 33,5 cm e 3,0 cm (largura e profundidade, respectivamente);
- g) Caixa de polipropileno com tampa de metal em forma de grade, com dimensões totais em centímetros (cm) de 25,5cm, 33,5cm e 40,5cm (altura, largura e profundidade respectivamente).

Os animais não enriquecidos foram mantidos em gaiolas padrão, sem os objetos de enriquecimento ambiental (figura 9).



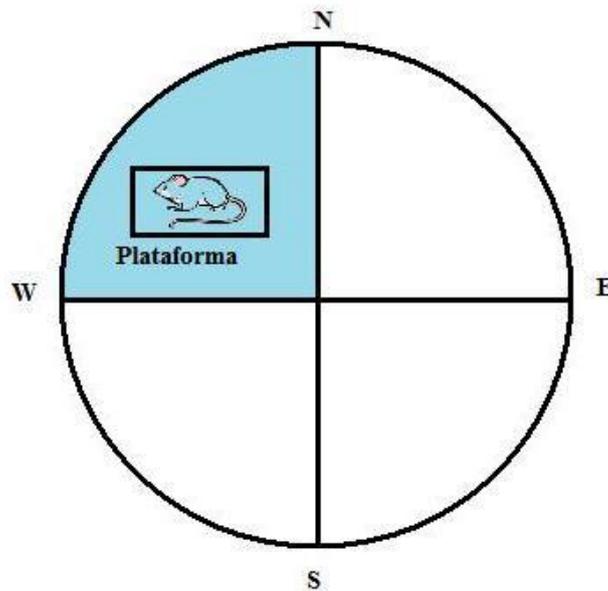
**Figura 8. Gaiola para enriquecimento ambiental. (A) Visão frontal. (B) Visão lateral. (C e D) Visualização superior. (E) Visualização interna. Destaque para os objetos de enriquecimento nas fotos C, D e E**



**Figura 9. Gaiola padrão. (A) Visão frontal. (B) Visão lateral. (C e D) Visualização superior. (E) Visualização interna.**

#### 6.2.6 Análise do desenvolvimento cognitivo

O desenvolvimento cognitivo dos animais foi aferido através da utilização do labirinto aquático de Morris (JUNIOR *et al.*,2005), o qual consta de uma piscina circular de cor preta de 1,68 m de diâmetro e 0,50 m de altura. Com água mantida em torno de  $22 \pm 1$  graus Celsius. São estabelecidos 4 pontos de partida (W, S, E e N), a partir da borda da piscina. No centro do quadrante WN delimitados por estes pontos cardinais, há um encaixe no fundo da piscina que permite a fixação de uma plataforma, que uma vez colocada, permanece a aproximadamente 2 cm abaixo do nível da água, invisível para o rato. A plataforma citada é de madeira preta e possui uma área de 11 x 14 cm para que o animal se apóie e escape da água (figura 10). Nas paredes da sala ao redor da piscina, colocam-se dicas visuais compostas de figuras geométricas e desenhos, que servem como pontos de referência externa para a localização do animal na piscina.



**Figura 10. Esquema do Labirinto Aquático de *Morris*. Pontos cardinais específicos (W, S, E e N) e local de posicionamento da plataforma (Plataforma).**

Os ratos são treinados em duas versões da tarefa do labirinto aquático seguindo os seguintes protocolos:

1- Protocolo de memória de referência

No qual os animais são treinados por três dias consecutivos com quatro tentativas para achar a plataforma. Os animais são liberados a partir de cada ponto cardinal específico (um por vez) e, portanto, observam as dicas visuais do ambiente sempre de forma aleatória. Nesta versão (espacial), a distância das dicas visuais varia a cada posição inicial, obrigando o animal a se orientar pelas relações espaciais entre as dicas para encontrar a plataforma que permanece fixa no mesmo lugar durante todo o experimento. Em cada tentativa, o animal é colocado na água, voltado para a parede da piscina, e liberado para nadar até a plataforma. Quando o animal não consegue achar a plataforma em até 60s, ele é conduzido gentilmente pelo examinador até a mesma, permanecendo ali por 20s. Nos intervalos entre uma tentativa e outra, o animal é mantido por 30s em uma caixa plástica, fora da piscina. As sessões são filmadas para posterior determinação do tempo de latência da chegada à plataforma.

## 2- Protocolo de aprendizado

É realizado no quarto dia de testes, ou seja, no dia seguinte do término do protocolo de memória de referência. Neste, os animais são liberados da posição S e submetidos a sessões de nado livre na mesma piscina, mas sem plataforma. Neste último dia, é estimado o tempo de permanência do animal no quadrante correspondente onde anteriormente estava a plataforma nos dias anteriores (WN), denominada região alvo.

### 6.2.7 Coleta dos cérebros

Depois do último teste, foi inoculado intraperitonealmente nos animais uma dose letal do anestésico Thiopentax (Tiopental Sódico) 1g ( $DOSE_{ml} = 0,15 \times PESO_{DO ANIMAL} / 100$ ), sedando-os, seguido da decapitação por guilhotina. Os cérebros foram retirados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas e pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g, para a obtenção do peso cerebral relativo (PCR) o qual foi registrado pela divisão do peso cerebral pelo peso corporal e multiplicando o resultado por cem.

### 6.2.8 Análise estatística

Utilizou-se o *Software S-Plus 8.0* para todas as análises, com os testes específicos para cada uma delas. O crematócrito, através do teste de *Wilcoxon* com significância ao nível de 0,05. Para o peso cerebral relativo entre as dietas, o Teste de ANOVA seguido do de *TuKey* com significância ao nível de 0,05 e o Teste *T-Student* com significância ao nível de 0,05. Para os testes de memória e aprendizado, foram utilizados modelos lineares generalizados para determinar os fatores que possuíram influência significativa sobre a variável resposta ao nível de 0,05.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CREMATÓCRITO E VALOR ENERGÉTICO DO LEITE

O teor de gordura no leite das mães dos animais estudados (tabela 1) apresentou maior valor no GL ( $32,18 \pm 0,20$ ), ou seja, maior acúmulo lipídico, seguido dos grupos dietéticos GCM ( $26,87 \pm 0,39$ ) e GC ( $21,11 \pm 0,66$ ). Ao avaliar o valor energético do leite dos grupos dietéticos estudados, observam-se valores superiores dos grupos GL ( $218,85 \pm 56,30$ ) e GCM ( $216,90 \pm 59,98$ ) em relação ao GC ( $168,57 \pm 55,65$ ), estabelecendo uma diferença estatística entre os mesmos (tabela 1).

**Tabela 1.** Teor de gordura e conteúdo energético do leite materno

<b>GRUPOS</b>	<b>% Gordura</b>	<b>Kcal/100ml</b>
<b>GL</b>	$32,18 \pm 0,20^a$	$218,85 \pm 56,30^d$
<b>GC</b>	$21,11 \pm 0,66^c$	$168,57 \pm 55,65^e$
<b>GCM</b>	$26,87 \pm 0,39^c$	$216,90 \pm 59,98^d$

Letras sobrescritas diferentes denotam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).  
GL – Grupo Linhaça, GC – Grupo Controle, GCM – Grupo Controle Modificado

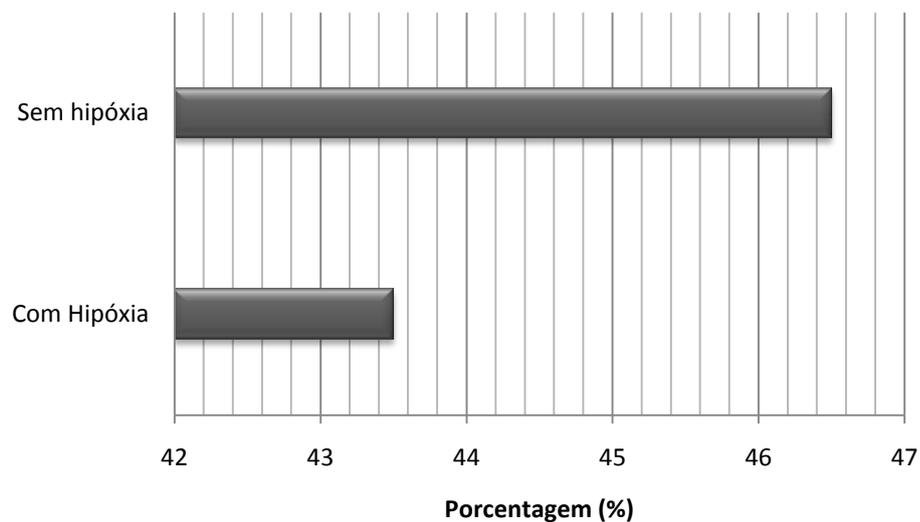
## 7.2 PROTOCOLO DE REFERÊNCIA

Esse protocolo foi avaliado de duas formas: a primeira sendo a probabilidade de encontrar a plataforma no tempo esperado (1 minuto) e, a segunda, dado que a plataforma foi encontrada o tempo de encontro.

A dieta pareceu não influenciar de forma significativa na probabilidade de encontro da plataforma, tendo os grupos dietéticos comportamentos semelhantes.

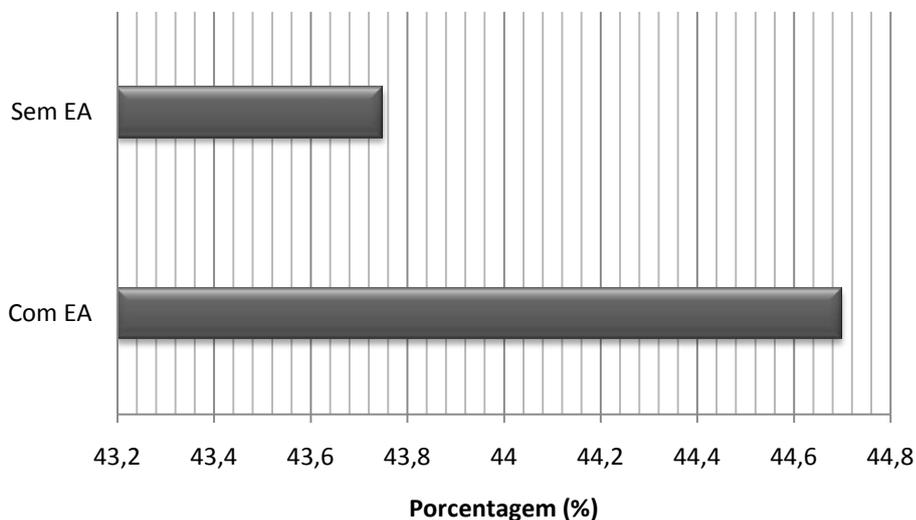
O grupo de animais experimentais que não sofreu hipóxia teve maior probabilidade (46,5%) de encontrar a plataforma, sendo o grupo que sofreu o insulto (43,5%), mais lento para tal tarefa (gráfico 1).

**Gráfico 1.** Probabilidade de encontrar a plataforma entre os grupos com e sem Hipóxia



Em relação ao ambiente enriquecido, o grupo exposto a tal processo, apresentou maior probabilidade de encontro da plataforma (44,7%) comparado ao grupo não exposto (43,7%), sendo mais rápidos para a tarefa referida (gráfico 2).

**Gráfico 2.** Probabilidade de encontrar a plataforma entre grupos com e sem Enriquecimento Ambiental



A hipóxia e o EA apresentaram influências independentes sobre as chances de achar a plataforma ( $p=0,1362$  para a interação dos fatores).

Dado que a plataforma foi encontrada, as variáveis hipóxia ( $p=0,4902$ ) e dieta ( $p>0,3472$  para todas as dietas) não pareceram influenciar no tempo de encontro da mesma, no entanto, o EA influenciou de forma significativa ( $p=0,0013$ ), apresentando menor tempo de encontro da plataforma para o grupo de animais que se mantiveram em ambiente enriquecido.

### 7.3 PROTOCOLO DE APRENDIZADO

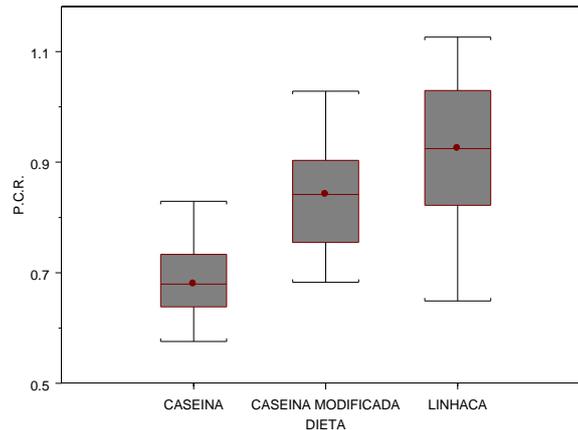
Os grupos dietéticos ( $p>0,5109$  nas comparações das dietas) e os grupos com e sem hipóxia não demonstraram, entre eles, diferenças significativas ( $p=0,4968$ ) no tempo de latência deste protocolo. Diferente dos grupos com e sem EA, apresentando maior valor de tempo de latência para os grupos enriquecidos com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0017$ ).

### 7.4 PESO CEREBRAL RELATIVO (PCR)

O PCR, ao final do experimento (65º dia), dos filhotes dos distintos grupos dietéticos, apresentaram maiores valores para o GL ( $0,91\pm 0,1g$ ), seguido dos grupos

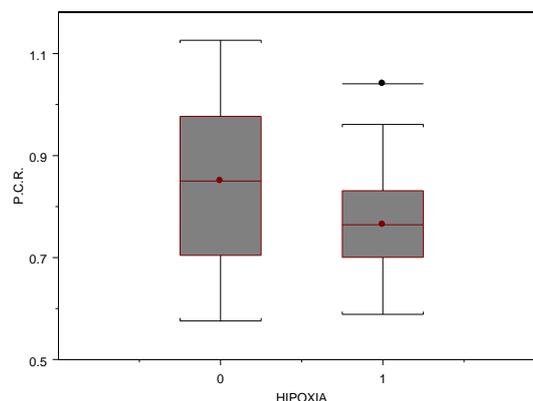
GCM ( $0,84\pm 0,09g$ ) e GC ( $0,69\pm 0,07g$ ), apresentando diferenças estatisticamente significantes ( $p= 0,000001$ ) entre eles (gráfico 3).

**Gráfico 3.** Peso Cerebral Relativo dos animais ao 65º dia, dos grupos dietéticos estudados



O PCR dos grupos estudados com e sem hipóxia apresentaram maiores valores para os animais que não sofreram hipóxia (SH) ( $0,84\pm 0,15g$ ) do que os que sofreram hipóxia (CH) ( $0,77\pm 0,10g$ ) ( $p=0,043$ ) (gráfico 4) .

**Gráfico 4.** PCR dos animais ao 65º dia, dos grupos com e sem hipóxia

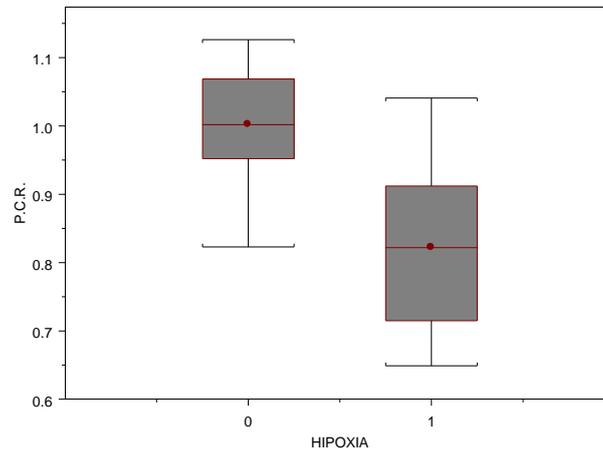


**0- animais sem hipóxia e 1- animais com hipóxia**

Esses valores foram seguidos quando os grupos dietéticos foram analisados separadamente, com o GL0 ( $0,99\pm 0,09g$ ) e GLH ( $0,82\pm 0,1g$ ) ( $p=0,001$ ) (gráfico 5),

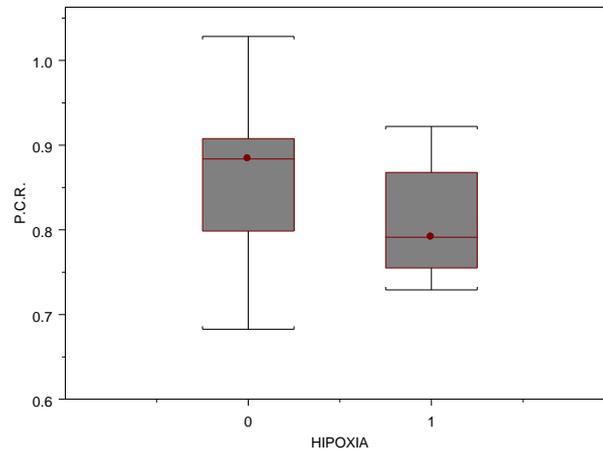
GCM0 ( $0,86\pm 0,10g$ ) e GCMH ( $0,80\pm 0,06g$ ) ( $p=0,122$ ) (gráfico 6), e GC0 ( $0,67\pm 0,05g$ ) e GCH ( $0,70\pm 0,07g$ ) ( $p=0,268$ ) (gráfico 7).

**Gráfico 5.** PCR ao 65º dia dos animais do GL com e sem hipóxia



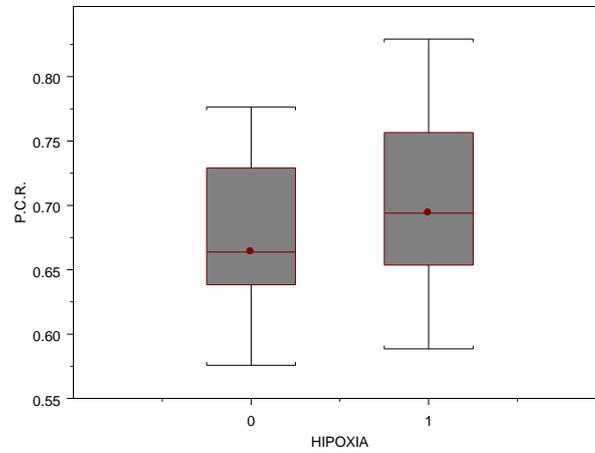
**0- animais sem hipóxia e 1- animais com hipóxia**

**Gráfico 6.** PCR ao 65º dia dos animais do GCM com e sem hipóxia



**0- animais sem hipóxia e 1- animais com hipóxia**

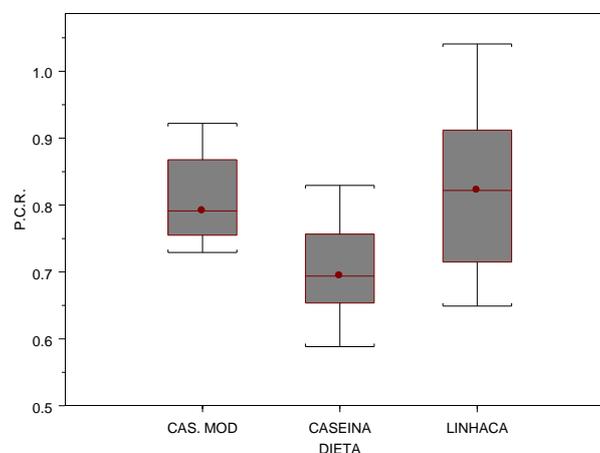
**Gráfico 7.** PCR ao 65º dia dos animais do GC com e sem hipóxia



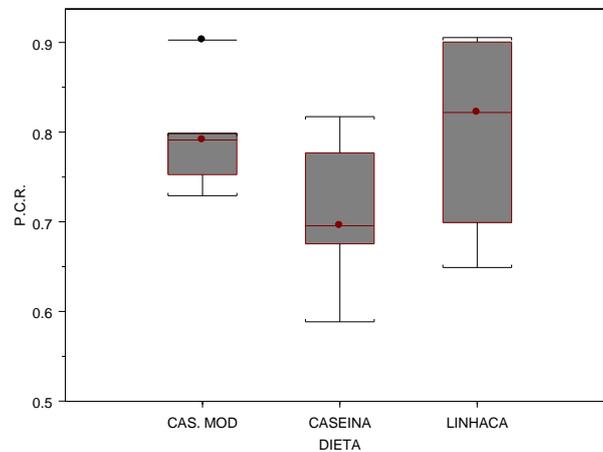
**0- animais sem hipóxia e 1- animais com hipóxia**

Entre os grupos que sofreram hipóxia GLH ( $0,82 \pm 0,12g$ ), GCH ( $0,70 \pm 0,07g$ ) e GCMH ( $0,80 \pm 0,06g$ ), observa-se uma diferença estatística entre GLH e GCH (gráfico 8) ( $p=0,005$ ), porém dividindo esses grupos em com e sem EA, mostraram-se da seguinte forma: GLHEA ( $0,79 \pm 0,10g$ ), GCHEA ( $0,70 \pm 0,08g$ ) e GCMHEA ( $0,79 \pm 0,06g$ ) ( $p=0,13$ ), não encontrando qualquer diferença significativa (gráfico 9).

**Gráfico 8.** PCR ao 65º dia dos animais dos grupos dietéticos distintos com hipóxia

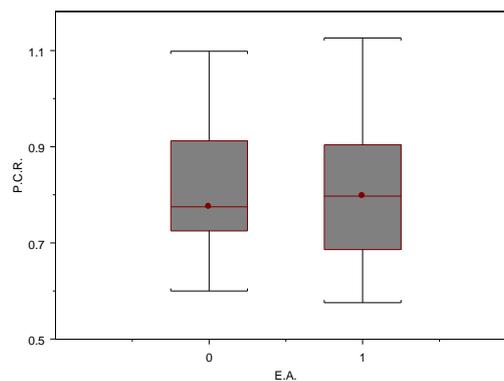


**Gráfico 9.** PCR ao 65<sup>o</sup> dia dos animais dos grupos dietéticos distintos, com hipóxia mantido em ambientes enriquecidos

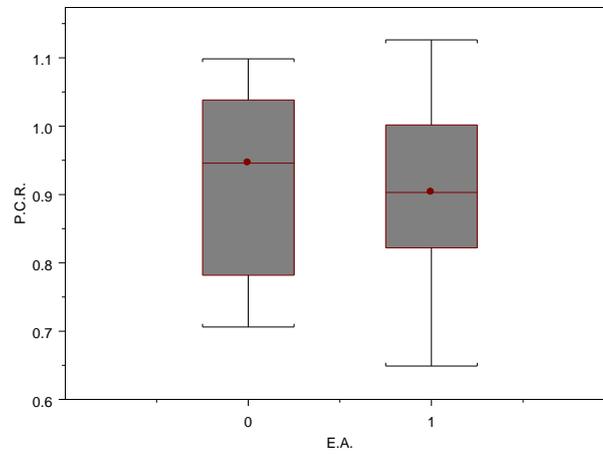


O Enriquecimento Ambiental pareceu não influenciar na variável PCR. Os animais que foram mantidos em um ambiente enriquecido (CEA) ( $0,81 \pm 0,14g$ ) e os que não foram mantidos nesse tipo de ambiente (SEA) ( $0,81 \pm 0,13g$ ) ( $p=0,95$ ), apresentaram valores muito semelhantes de PCR (gráfico 10). E quando esses grupos se separam pela dieta consumida, a diferença dos valores entre as mesmas, segue a mesma distribuição com GLEA ( $0,90 \pm 0,14g$ ) e GLSEA ( $0,91 \pm 0,13g$ ) ( $p=0,79$ ) (gráfico 11), GCEA ( $0,68 \pm 0,06g$ ) e GCSEA ( $0,69 \pm 0,06g$ ) ( $p=0,62$ ) (gráfico 12), e GCMCEA ( $0,84 \pm 0,10g$ ) e GCMSEA ( $0,82 \pm 0,06g$ ) ( $p=0,52$ ) (gráfico 13).

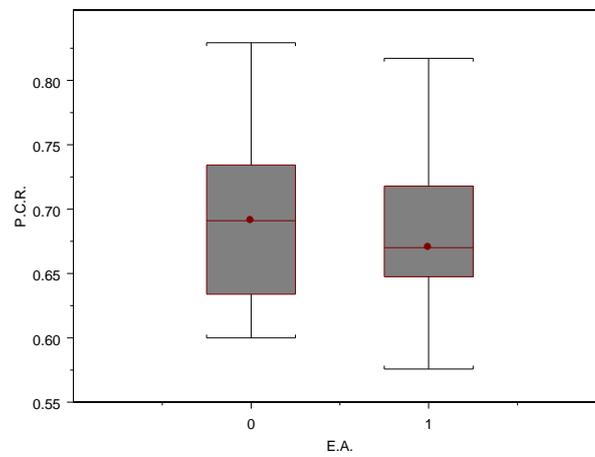
**Gráfico 10.** PCR ao 65<sup>o</sup> dia dos animais com e sem EA



**0- animais sem EA e 1- animais com EA**

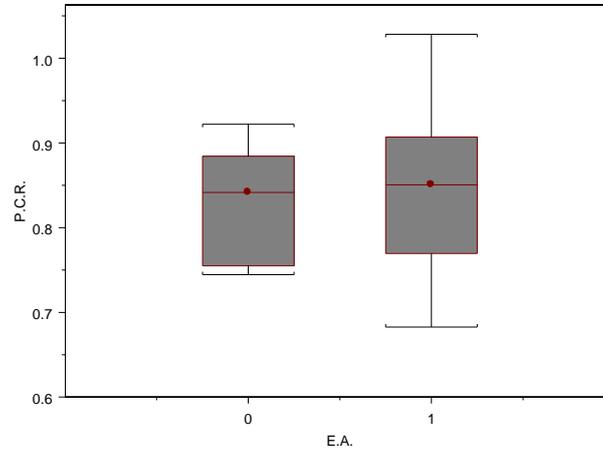
**Gráfico 11.** PCR ao 65º dia dos animais do GL com e sem EA

**0- animais sem EA e 1- animais com EA**

**Gráfico 12.** PCR aos 65º dos animais do GC com e sem EA

**0- animais sem EA e 1- animais com EA**

**Gráfico 13.** PCR aos 65<sup>o</sup> dos animais do GCM com e sem EA



**0- animais sem EA e 1- animais com EA**

## 8. DISCUSSÃO

Inúmeros estudos nos últimos 40 anos avaliaram o impacto da nutrição na infância e no desenvolvimento do sistema nervoso central. Esses estudos têm claramente demonstrado que as reduções de energia e/ou fornecimento de nutrientes essenciais durante as primeiras fases da vida, têm profundos efeitos sobre o crescimento somático, e sobre a estrutura e desenvolvimento funcional do cérebro (UAUY & DANGOUR, 2006).

Os ácidos graxos essenciais, em especial os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa n-3, são importantes para o desenvolvimento cerebral do feto, tanto durante o período pré-natal quanto pós-natal, em modelos animais e humanos (FEDOROVA & SALEM, 2006; UAUY & DANGOUR, 2006).

O feto e a placenta são inteiramente dependentes da oferta de AGE materno para seu crescimento e desenvolvimento. O terceiro trimestre de gravidez é o prazo crucial para a deposição de lipídeos no feto humano, onde requer fornecimento de AGE materno para a formação de eicosanóides desde o momento da concepção (ONGARI *et al*, 1984, HONSTRA *et al*, 1996). Existe um enriquecimento progressivo da concentração de AA e DHA dos ácidos graxos circulantes no feto durante o terceiro trimestre (VAN HOUWELLING *et al*, 1996) e um aumento significativo desses ácidos graxos no tecido cerebral fetal têm sido observado no último trimestre de gestação e período pós-natal inicial. Um total de 600g de AGE são transferidos da mãe para o feto durante os últimos dias gestacionais e primeiros dias pós-natal, e a maioria dos AGE n-3 que entram na circulação fetal são acumulados da mãe, mesmo se as concentrações de n-3 materna são baixas (UAUY & DANGOUR, 2006).

Desta forma, o estado nutricional materno dos mamíferos pode influenciar a acumulação de DHA infantil (GARCÍCA-CALATAYUD *et al*, 2005). A variabilidade

do acúmulo de DHA em cérebro humano (CLANDININ *et al*, 1980) e no sangue do cordão umbilical ao nascimento (AL *et al*, 1995; CARLSON, 2001), pode ser tomado como prova de que há uma influência de fatores maternos na quantidade de AGPI-CL transferido para o bebê. Um desses fatores é a ingestão materna de DHA (CARLSON, 2001). Harris *et al*, 1984, mostrou que o consumo materno de DHA pode aumentar a quantidade de transferência desse ácido graxo para os lactentes. Os bebês de mulheres que consomem DHA durante a gravidez (CONNOR, LOWEWNSOHN & HATCHER, 1996) ou aleitamento (GIBSN, NEUMANN & MAKRIDES, 1997) possuem mais DHA nos fosfolípidos eritrocitários em relação aos bebês de mulheres que amamentaram sem suplementação de DHA.

Como os AGE não podem ser sintetizados pelo organismo, precisam fazer parte da dieta. Conseqüentemente, seu status no desenvolvimento do feto depende de sua mãe, assim confirmado pela relação positiva entre seu consumo materno e status neonatal do mesmo (HORNSTRA,2000).

No presente estudo, o crematócrito do leite materno de ratas alimentadas com ração à base de linhaça (GL), apresentou um maior acúmulo lipídico, quando comparado aos demais grupos que receberam rações à base de caseína (GC e GCM). Isto mostra que mesmo balanceando o GCM a fim de igualar a concentração de gordura ao do GL, não foi suficiente para o leite dos animais desse grupo possuir uma porcentagem semelhante entre eles, o que enfatiza que a qualidade dos lipídeos do leite secretado está diretamente relacionada com a ingestão materna (TINOCO *et al*,2007). Outros estudos (CARLSON, 2001; CONNOR, 1999; LAYNE *et al*, 1996; UAUY & VALENZUELA, 2000) que relatam a importância de uma dieta rica em AGE nos períodos críticos do desenvolvimento e sua relação com a transferência para o leite materno corroboram com os resultados encontrados nesse estudo.

A deficiência de ômega-3 pré-natal, reduz particularmente as concentrações cerebrais de DHA, e essa quantidade reduzida não pode ser normalizada através da oferta de dietas adequadas na vida tardia (INNIS, 2008), deixando claro a importância de sua suplementação na gestação e lactação.

O lipídeo é o componente em maior quantidade no leite, perfazendo mais de 50% de suas quilocalorias (Kcal) totais. Uma parte deste nutriente é captada da circulação, onde é encontrada em grandes concentrações provenientes da dieta, e

outra é produzida na própria glândula mamária, a qual utiliza principalmente a glicose para a lipogênese (LEITE *et al.*, 2002).

O resultado das médias referente ao valor energético do leite materno (Kcal/100ml) encontrado nesse estudo, mostrou o GL com valor superior aos demais grupos, porém com diferença estatística somente em relação ao GC. Este resultado pode ser explicado pelo maior percentual de AGPI existente na ração do GL (TURATTI,2000). Levando-se em consideração que o GL apresentou maior porcentagem de gordura que o GCM e que entre eles não houve diferença estatística em relação ao valor energético, apresentando valores semelhantes para tal variável, é plausível pensar que a gordura proveniente da semente de linhaça é mais saudável, já que o GCM é balanceado em relação ao GL.

A nutrição é um dos muitos fatores que afetam o desenvolvimento do cérebro e, portanto, o desenvolvimento cognitivo de crianças (BRYAN *et al.*, 2004). Estudos com animais demonstraram que uma deficiência no cérebro de AGPI, principalmente DHA, está associada com a perda da memória e diminuição da função cognitiva (PETURSDOTTIR *et al.*, 2008), enquanto outros estudos associam a capacidade de aprendizagem com a ingestão dietética de n-3 (CARRIE'I, 2000; KALMIJN, 2000; KALMIJIN *et al.*,2004; VAN GELDER *et al.*, 2007). As bases neurobiológicas da aprendizagem e memória foram atribuídas à rede neuronal, que faz a conexão da formação hipocampal com o córtex cerebral frontal (EICHENBAUM, 1997; HENK *et al.*, 1999).

O estudo de PETURSDOTTIR (2008), mostrou que camundongos com uma dieta rica em DHA após a amamentação apresentavam cognição aumentada, altos níveis de DHA nas membranas fosfolípídicas do tecido cerebral e efetividade na incorporação de DHA no hipocampo e amígdala, áreas do cérebro que são importantes para recordação da memória recente e para uma memória a longo prazo, respectivamente.

GARCÍA-CALATAYUD (2005), mostrou que ratos jovens com um fornecimento deficiente de n-3 no período de lactação, apresentavam má memória em testes de cognição, e as conseqüências funcionais dessa deficiência alimentar foram invertidas quando foi administrado um suplemento de DHA.

Por causa da motivação de escapar da água mais rapidamente possível, o labirinto aquático de *Morris* é uma boa ferramenta para avaliar o desempenho da memória espacial e aprendizagem (D'HOOGE & DE DEYN, 2001; MORRIS, 1984).

No presente estudo, a dieta não foi um fator decisivo para a probabilidade de achar a plataforma no teste do labirinto aquático de *Morris*, mostrando comportamentos semelhantes entre os grupos estudados. WAINWRIGHT *et al.* (1999), em seu estudo, também não encontraram diferenças no desempenho do labirinto aquático em ratos suplementados com DHA, porém, muitos estudos (CARRIE'I, 2000; CHYTROVA *et al.*, 2009; JACOBSON *et al.*, 2008; KALMIJN, 2000; KALMIJIN *et al.*, 2004; VAN GELDER *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009) concordam que uma adequada suplementação de DHA, contribui para uma melhor memória e aprendizado, como citado anteriormente.

Estudos observacionais e intervencionais com gestantes e mulheres em fase de lactação, suplementadas com fórmulas de DHA, mostraram uma associação com altas performances em testes visuais e desenvolvimento neural de bebês e crianças (AUESTAD *et al.*, 2003; HIBBELN *et al.*, 2007; KRAUSS-ETSCHMANN *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2009).

CHUNG *et al.*, (2008) mostrou em seu estudo que ratos alimentados com uma dieta deficiente em DHA apresentaram uma pobre memória de referência no labirinto aquático, e que, após a suplementação com DHA o desempenho foi parcialmente resgatado, sugerindo assim com esse resultado, que o DHA é importante para o desenvolvimento e manutenção do desempenho de memória espacial e aprendizado.

De fato, há uma grande evidência sobre o envolvimento de DHA na regulação do estado emocional, atividades locomotora e exploratória e funções cognitivas em animais e seres humanos (HOOIJMANS *et al.*, 2009; FEDOROVA & SALEM, 2006). Em outro estudo, foi encontrada uma correlação positiva entre o conteúdo de DHA do cérebro e desempenho no Labirinto Aquático de *Morris* (MORIGUCHI & SALEM, 2003).

RICHARDSON (2003), em seu estudo, diz ainda, que existem evidências preliminares sugerindo que o AGPI n-3 poderia reduzir algumas dificuldades comportamentais e de aprendizagem, em crianças.

Os animais que sofreram hipóxia nesse estudo obtiveram uma menor probabilidade de encontrar a plataforma no protocolo de memória de referência do labirinto aquático, dos que não sofreram o insulto, fato justificado pelo possível déficit cerebral causado pela HI. Como hipóxia e dieta têm influências independentes do fato de achar ou não a plataforma, sugere-se que GLH tem menor probabilidade de achar a plataforma no teste referido, do que o GL0, repetindo-se assim com todas as dietas estudadas.

Nos últimos anos, tem havido uma riqueza de evidências publicadas de que o EA de ratos de laboratório estimula a plasticidade no córtex cerebral, melhora a aprendizagem e resolução de problemas em ratos normais e reduz a deficiência cognitiva de ratos lesados (ROSE *et al*, 1998).

O EA pareceu influenciar de forma positiva a probabilidade de encontrar a plataforma no protocolo de memória de referência, tendo os animais que foram mantidos em um ambiente enriquecido apresentado maior probabilidade dos que aqueles que permaneceram em ambiente padrão. Este resultado está bem documentado em alguns estudos anteriores (FEDOROVA e SALEM, 2006; PEREIRA, 2006; ROSE *et al*, 1998; SAUCIER *et al.*, 2007), tendo sempre melhor performance, os animais mantidos em ambiente enriquecido.

Os animais com cérebro intacto apresentam melhor desempenho do que os que sofreram lesão cerebral pós-natal. Além disso, os animais lesionados criados em ambiente enriquecido apresentam desempenho superior aos lesionados criados em ambiente padrão, e o efeito potencializador do EA sobre o desempenho no labirinto aquático dos animais lesionados é proporcionalmente igual ao efeito potencializador exercido sobre os animais não lesionados (SCWARTZ, 1964). De fato, com a independência da influência das variáveis estudadas, sugere-se que o grupo que sofreu hipóxia com EA, teve maior probabilidade do que o grupo que sofreu hipóxia e não foi mantido em EA. SCHWARTZ (1964) foi o primeiro a relatar tal fato, estudando a melhora de um dano cerebral após o EA, outros autores corroboram este estudo (PEREIRA, 2006; SAUCIER *et al.*, 2007).

Dado que a plataforma foi encontrada, a dieta não influenciou no tempo de encontro, ou seja, todas as dietas estudadas mantiveram tempos semelhantes de encontro da plataforma, fato que se repete com os animais com e sem hipóxia. Há evidências consistentes de que HI neonatal resulta em déficits de memória em várias tarefas, como Labirinto aquático (ALMLI *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001), porém como não houve diferença no tempo de encontro da plataforma dos animais que sofreram a hipóxia e os que não sofreram, de alguma forma os possíveis déficits dos animais que foram lesionados, foram supridos, fazendo com que seus tempos fossem semelhantes àqueles sem a lesão.

Logo, o EA foi o único fator que teve alguma influência no tempo de encontro da plataforma, apresentando um menor tempo para os animais enriquecidos, dado que a plataforma foi encontrada.

Já que as variáveis possuem influências independentes, sugere-se que o grupo que sofreu hipóxia com EA teve um menor tempo de encontro da plataforma do que o grupo que sofreu hipóxia e não foi exposto ao EA. Com esse resultado,

entende-se que o EA pode ter sido decisivo na reversão de um possível déficit causado pela hipóxia, fato já descrito na literatura (LEGGIO *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-CUÉ *et al.*, 2002).

No protocolo de aprendizado do presente estudo, não foi encontrada diferença no tempo de latência entre as dietas, entretanto, FEDOROVA e SALEM (2006) mostraram um menor tempo de latência em ratos deficientes de DHA, sugerindo com esse resultado que a aprendizagem e a memória são funções relacionadas ao estado de ácidos graxos essenciais no cérebro.

Nesse mesmo protocolo, o tempo de latência foi semelhante entre os grupos com e sem hipóxia, e, significativamente, diferentes entre os grupos com e sem EA, apresentando maiores valores para o grupo enriquecido. Fato que nos leva a sugerir o mesmo fator neuroprotetor do EA em relação à hipóxia, tendo os animais com hipóxia, mantidos em EA, maior tempo de latência do que os animais com hipóxia sem EA.

Estudos encontraram uma recuperação da memória utilizando o EA iniciado de dois (PUURUNEN *et al.*, 2001) a três (JOLKONEN *et al.*, 2003) dias após a isquemia global em ratos adultos, no labirinto aquático.

Antes de 1960, os cientistas consideravam o encéfalo como imutável, sujeito apenas ao controle genético. Entretanto, no início dos anos 60, alguns pesquisadores especulavam seriamente que influências ambientais podiam ser capazes de alterar a estrutura cerebral. Por volta de 1964, dois laboratórios de pesquisa demonstraram que a morfologia e a química ou a fisiologia do cérebro poderia ser modificada pela experiência (BENNETT *et al.* 1964, HUBEL & WIESEL, 1965). Desde então, a capacidade do cérebro a responder a estímulos ambientais, especificamente ao "enriquecimento", tornou-se um fato aceito por neurocientistas, educadores e outros. De fato, a demonstração de que o EA pode modificar componentes estruturais do cérebro de rato, em qualquer idade, alterou suposições prevalentes a respeito da plasticidade cerebral (DIAMOND *et al.* 1964, DIAMOND, 1988).

A melhor avaliação do desenvolvimento neonatal se dá pelo crescimento cefálico. O final da gestação e início da vida são períodos de mielinização, que levam a um rápido aumento tanto no número de células, quanto na área dendrítica do tecido cerebral. O peso do cérebro encontra-se, portanto, associado a seu

desenvolvimento, sugerindo que a incorporação de ácidos graxos aos tecidos cerebrais influencia esse desenvolvimento (COCCHI *et al.*, 1996).

Estruturalmente, AA e DHA são elementos essenciais das membranas neuronais, o que corresponde a 15/20% da massa seca do cérebro e mais de 30% da retina. Ambos são cruciais para o crescimento do cérebro, e algumas deficiências estão associadas com o baixo peso ao nascer e redução da circunferência da cabeça (UAUY *et al.*, 2001).

As médias do PCR dos animais que receberam as dietas utilizadas nesse estudo mostraram-se superiores para o GL comparando-se aos demais grupos, fato que pode ser explicado pelo teor de AGPI na ração a base de linhaça, estando assim de acordo com a literatura. Ou seja, uma vez que o tecido cerebral apresenta uma alta concentração de lipídeos de membrana (BENATTI *et al.*, 2004; YOUNG & MARTIN, 2003), a ingestão maior dos AGPI fez com que suas concentrações e, conseqüentemente, os pesos cerebrais relativos fossem maiores (LENZI-ALMEIDA, 2007; LOPES, 2008). Esse resultado pode ser um indicativo de melhor desenvolvimento cerebral nos animais do GL, sugerindo uma maior incorporação de ácidos graxos no cérebro desses animais, incentivado pelo conhecimento de que uma adequada suplementação de DHA durante o período pré e pós natal, é essencial para otimizar o desenvolvimento e funções do SNC (OZIAS, 2007).

Segundo CARLSON (2002), mães alimentadas com alimentos contendo ácidos graxos n-3 na gestação e lactação geram crias com maior peso cerebral relativo, devido ao maior conteúdo de DHA absorvido pelo cérebro no período de desenvolvimento do SNC.

Ainda são poucos os estudos que relacionam o crescimento cefálico e peso cerebral relativo, com o aumento da ingestão de AGE, porém trabalhos semelhantes a este (LENZI-ALMEIDA, 2007; LOPES, 2008), corroboram os resultados apresentados aqui.

LENZI-ALMEIDA (2007) em seu experimento encontrou uma alta concentração de ácido alfa-linolênico (LA) em torno de  $46,15 \pm 0,64$  (%) na ração com semente de linhaça, superior à ração à base de caseína que apresentou um teor de  $5,38 \pm 0,19$  (%) desse mesmo ácido graxo, assim como foi verificado também um teor de DHA no cérebro de ratos recém-natos provenientes de mães alimentadas com semente de linhaça em torno de  $14,33 \pm 0,25$  (%), superior ao teor

encontrado no cérebro de recém-natos provenientes de mães alimentadas com caseína, que ficou na faixa de  $10,41 \pm 0,06$  (%).

O PCR dos animais que sofreram hipóxia apresentou menor valor em relação ao grupo que não foi exposto ao processo, caracterizando a efetividade do mesmo. Ou seja, o processo hipóxico realizado pode ter causado um atraso no desenvolvimento cerebral e morte celular. Os grupos dietéticos separados, com e sem hipóxia se comportaram de maneira semelhante, tendo menores valores de PCR os grupos dietéticos distintos que sofreram o processo. Porém, quando analisados apenas os grupos dietéticos que sofreram o insulto hipóxico, o GLH obteve maiores valores de PCR, comparado ao GCH e GCMH, o que levanta a hipótese da relação da ingestão de AGE com um possível fator neuroprotetor.

Não foram encontrados trabalhos que relacionem PCR, hipóxia e AGE, porém é sabido que um cérebro acometido pela hipóxia apresenta lesões significantes, como a morte celular.

O EA por si só, pareceu não influenciar qualquer alteração do PCR dos animais estudados, fato que mesmo não indo de encontro com alguns autores (ALTMAN *et al*, 2000; DIAMOND, KRECH & ROSENZWEIGH, 1964; ROSENZWEIG *et al.*, 1962), corrobora outros estudos (SMITH & CORROW, 2005, LOPES, 2008).

## 9. CONCLUSÃO

A alta concentração de ácidos graxos ômega-3 presentes na ração de linhaça, mostrou-se fundamental na transferência do mesmo para o leite materno, fazendo com que o crematócrito e valor energético do leite de ratas alimentadas com ração de linhaça, tivessem maiores valores comparados com os grupos controles, assegurando assim, uma oferta ideal de ácidos graxos ômega-3 do leite materno para os filhotes.

A utilização da semente de linhaça como um fator neuroprotetor às funções cognitivas, não demonstrou resultados significativos nesse estudo, já o enriquecimento ambiental, apresentou-se positivo para esse quesito.

A suplementação da linhaça como fonte de ácidos graxos ômega-3 na gestação, lactação e infância, influenciou de forma significativa os valores de PCR de animais com ou sem lesão cerebral, sugerindo uma ação positiva na incorporação de ácidos graxos ômega-3 pelo cérebro dos animais que consumiram essa ração, e seu consumo associado ao EA parece potencializar esse efeito, contribuindo com um melhor desenvolvimento cerebral.

Os resultados sugerem que uma dieta a base de linhaça pode potencializar o fator neuroprotetor do EA, e que somados, apresentam-se como uma poderosa ferramenta para combater o déficit cognitivo seguido de uma lesão cerebral.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTAZZI, P & COUPLAND, K. Polyunsaturated fatty acids: Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention? *Maturitas*, v. 42, n.1, p.3-22, 2002.

ALMEIDA, *et al.* Nutritional and brain function. A multidisciplinary virtual symposium. *Nutritional Neuroscience*. 5(5):311-20, 2002.

AL, M *et al.* Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acids status. *Br J Nutr*, 74: 55-68, 1995.

AL, MD; VAN HOUWELINGEN, AC; HONSTRA, G. Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*, 71 (1 suppl):285s-91s, 2000.

ALMLI, CR *et al.* BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 166:99-114, 2000.

AUESTAD N. *et al.* Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics*, 83:177, 2003.

BARKER, DJP: Mothers, babies and disease in later life. London: *BMJ Books*, 1994.

BASSET, CM. Experimental and clinical research findings on the cardiovascular benefits of consuming flax seed. *Applied Physiology, Nutrition, & Metabolism*. 34(5):965-74, 2009.

BEILHARZ, EJ *et al.* Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-hischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res. Mol. Brain Res*, 26:208-214, 1995.

BELDA, MCR & POURCHET-CAMPOS, MA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.11, n.1, p.5-35, 1991.

BELKIND-GERSON, J. *et al.* Fatty Acids and Neurodevelopment. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*, 2008.

BENATTI, P. *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J. of the Am. College of Nutrition*, 23(4):281–302, 2004.

BENNETT, EL *et al.* Chemical and anatomical plasticity of the brain. *Science*, 164:610-619, 1964.

BRANCA, F & LORENZETTI, S. Health Effects Of Phytoestrogens. *Forum Nutr, Itália*, 57:100-111, 2005.

BRITISH NUTRITION FOUNDATIONS. Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance; the fatty acids: nutritional and physiological significance; *the report of the British Nutrition Foundation's Task Force*. London: Chapman & Hall, p.211, 1994.

BRYAN, J *et al.* Nutrientes for cognitive development in school-aged children. *Lead Review Article*, 295-306, 2004.

CARDOZO, LFM. Efeitos do consumo materno e semente de linhaça durante a lactação na próstata de ratos na idade adulta. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente), Universidade Federal Fluminense, 2009.

CARLSON S: LCPUFA and functional development of pattern ant term infants. In : Bindels JG, Goedhart AC, Visser HKA, eds. Recent developments in infant nutrition. Dordrecht, Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*,: 218-24, 1996.

CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Semin Neonatol*, 6: 437-449, 2001.

CARLSTEAD, K & SHEPHERDSON, D. Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: MOBERG, G. P., MENCH, J. A. The Biology of animals stress: basic principles and implications for animal welfare. *CAB International*, 337-354, 2000.

CARRIE'I, GUESNET, P; BOURRE, J-M; FRANCE'S H. Diets containing long chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behavior differently during development than ageing in mice. *Br J Nutr*, 83:439-447, 2000.

CHAMOVE, AS. Cage design reduces emotionality in mice. *Laboratory Animals*, v. 23, p. 215-219, 1989.

CHEN J. Flaxseed and pure secoisolariciresinol diglucoside, but not flaxseed hull, reduce human breast tumor growth (MCF-7) in athymic mice. *Journal of Nutrition*. 139(11):2061-6, 2009.

CHOU, IC *et al.* Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Stroke*, 32:2192-2197, 2001.

CHUNG, WL; CHEN, JJ; SU, H M. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficiente male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr*, 138:1165-1171, 2008.

CHYTROVA, G; YING, Z; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Research*, 2009. *Doi:10.1016/j.brainres.2009.05.018*.

CLANDININ MT, *et al*. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid

CLAPAUCH, R. *et al*. Fitoestrogênios: Posicionamento Do Departamento De Endocrinologia Feminina Da Sociedade Brasileira De Endocrinologia E Metabologia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46(6):679-695, 2002.

CLARK, MM & GALEF, BG Jr. The role of the physical rearing environment in the domestication of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Animal Behaviour*, 25:298-316, 1977.

COCCHI, M *et al*. Effect of C 18:3(n-3) dietary supplementation on the fatty acid composition of the rat brain. *Acta Vitamin Enzymol*, 6(3):151-6, 1996.

CONNOR, WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 7 (suppl):171S-5S, 2000.

CONNOR, WE; LOWEWNSOHN, R; HATCHER, L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids*, 31: s183, 1996.

CONQUER, JA. *et al*. Effects of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids*, 35, 149-154, 2000.

COSTELLO, AM & MANANDHAR, D.S. Perinatal asphyxia in less developed countries. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*, 71: F1-3, 1994.

COTRAN, RS, KUMAR, V, ROBBINS, ST. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 5ª edição, RJ, Guanabara Koogan, 1996.

D'HOOGE, R. & DE DEYN, P. P. Applications of the morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36: 60-90, 2001.

DIAMOND, M. C. Enriching heredity. *The Free Press*, New York, 1988.

DIAMOND, MC; KRECH, D; ROSENZWEIG, MR. The effects of an enriched environment on the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 123:111-119, 1964.

DIAMOND, MC. Enriching heredity. *The free press*, New York, 1988.

EICHENBAUM, H. Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol*, 48:5487-5572, 1997.

FEDOROVA, I & SALEM, N JR. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75: 271–289, 2006.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A *et al.* Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73:233-245, 2002.

FERREL, BA. Flaxseeds: Ask the doctor. *Healthy years*. 7(1):8 (Brief Article), 2009.

FRANÇA, E & LANKSY, S. Mortalidade infantil no Brasil in Informe de Situação e Tendências. Tema: Demografia e Saúde. Brasília /DF: *Ripsa*, 2009.

GARCÍA-CALATAYUD, S *et al.* Brain docosahexaenoic acid status and learning in Young rats submitted to dietary long-chain polyunsaturated fatty acid deficiency and supplementation limited to lactation. *Pediatric Research*, 57(5), 2005.

GEORGIEFF, MK; RAO, R. The role of nutrition in cognitive development. In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. Nelson, C.A. ed. MIT press, London, 2001.

GIBSN, RA.; NEUMANN, MA.; MAKRIDES, M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *Eur J Clin Ntr*, 51: 578-584, 1997.

HAMAZAKI, T. Administration of Docosahexaenoic Acid Influences Behavior and Plasma Catecholamine Levels at Times of Psychological Stress. *Lipids*, 34:33-37, 1999.

HARRIS, WS. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceremia: focus on fish oil. *Clinical Cardiology*, v.22, (suppl.II): p.40-3, 1999.

HEBB, DO. The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am. Psychol*, 2:306-307, 1947.

HEEB, DO. *The organization of behavior. A neuropsychological theory*. Wiley, Chapman and Hall, London. 1949.

HENKE, K *et al.* Human hippocampus associates information in memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:5884-5889, 1999.

HIBBELN, JR *et al.* Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet*, 369:584-587, 2007.

HONSTRA G, AL MD, VAN HOUWELINGEN AC. Essential fatty acids, pregnancy and pregnancy outcome. In: Bindels JC, Goededhart AC, Visser HKA, eds. *Recent Developments in Infant Nutrition*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 51–63, 1996.

HOOIJMANS, CR *et al.* DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Neurobiolog*, 33:482-498, 2009.

HORNSTRA G. Essential fatty acids in mothers and their neonates. *Am J Clin Nutr*, v.71, p.1262-9, 2000.

HU, C, YUAN, YV, KITTS, DD. Antioxidant Activities Of The Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside, Its Aglycone Ecosolariciresinol And The Mammalian Lignans Enterodiol And Enterolactone In Vitro. *Food And Chem Tox*, 45:2219 -27, 2007.

HUBEL, DH & WIESEL, TN. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28: 1041-1059, 1965.

IKEDA, T *et al.* Selective and long-term impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insults in rats. *Behavioural Brain*, 118:17-25, 2001.

INNIS, SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid res.*, 30:39-103, 1991.

INNIS, SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Research*, 1237:35-43, 2008.

JACOBSON, JL. *et al.* Beneficial effects of a polyunsaturated fatty acid on infant development: evidence from the inuit of arctic Quebec. *J Pediatr*, 152:356-364, 2008.

JIANG, LH *et al.* The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem*, 20:735-741, 2009.

JOHANSSON, BB. Environmental influence on recovery after brain lesions – experimental and clinical data. *J Rehabil Med*, 11-16, 2003.

JOLKONEN, J *et al.* Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor desities. *Behavior Brain Research*, 138:187-200, 2003.

JUNIOR, JGS *et al.* Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisitum arvense* with demonstrated antioxidant properties in vitro. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81:593-600, 2005.

KALMIJIN, S *et al.* Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology*, 62:275-280, 2004.

KALMIJIN, S *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids, Antioxidants, and Cognitive Function in Very Old Men. *American Journal of Epidemiology*, 145(1):33-41, 1997.

KALMIJIN, S. Fatty acid intake and risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies. *J. Nutr. Health Aging*, 4:202-207, 2000.

KEEN, CL *et al.* Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J nutrition*, 11:226-230, 1981.

KIMURA, Y *et al.* Effects of carp and tuna oils on 5-fluorouracil-induced antitumor activity and side effects in sarcoma 180-bearing mice. *Lipids*, 36, 353-359, 2001.

KRAUSS-ETSCHAMANN, S *et al.* Nutrition and health lifestyle (NUHEAL) Study group. Effects of fish oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr*, 85:1392-1400, 2007.

KRECH, D; ROSENZWEIG, MR & BENNET, EL. Effects of Environmental Complexity and Training on Brain Chemistry. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 53:509-519, 1960.

KROMANN, N. & GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. *Acta of the Medicine Scandinavica*, 280, 410-406, 1980.

LAYNE, KS *et al.* Normal subjects consuming physiological levels of 18:3 (n-3) and 20:5 (n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *J Nutr*, 126:2130-2140, 1996.

LEGGIO, MG *et al.* Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163:78-90, 2005.

LEITE, MS; AZEREDO, VB; CARMO, MGT; BOAVENTURA, GT. Utilização da multimistura durante a lactação e seus efeitos na produção e composição do leite materno de ratas. *Rev Nutr*, 15(2):211-221, 2002.

LENZI-ALMEIDA, KC. A incorporação de ácidos graxos *ômega-3*, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Patologia). Universidade Federal Fluminense, 2007.

LOPES, CAJ. Comportamento de ratos alimentados com linhaça submetidos ao enriquecimento ambiental. Monografia (Graduando de Biomedicina). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

LOWRY, F. Flaxseed reduces blood lipids. *Am J Clin Nutr*, 90:288-297, 2009.

LUCAS, A; GIBBS, JAH; LYSTER, RLJ. BAUM, JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J*, 1: 1018-1020, 1978.

MACDONALD, J.W., JOHNSTON, M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.*, 1990.

MAKRIDES M, NEUMANN MA, GIBSON RA. IS DIETARY DOCOSAHEXAENOIC ACID ESSENTIAL FOR TERM INFANTS? *LIPIDS*. 31 (1):115-119, 1996.

MARGOTTO, PR. Síndrome Hipóxico Isquêmica no recém nascido: neuropatologia, aspectos clínicos e estratégias de prevenção. *Perinatologia Clínica*, 2/3; 387:414, 2002.

MARTIN, CA. *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 19, n. 6, 2006.

MARTINÉZ-CUÉ, C *et al.* Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res*, 134:185-200, 2002.

MAYSER, P *et al.* Ômega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38, 539-547, 1997.

MEANEY, MJ & AITKEN, DH. The Effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Development Brain Research*, 22:301–304, 1985.

MIYASAKA, CK.; PROCÓPIO, J. *Entendendo a gordura – os ácidos graxos*. São Paulo: Manole, 2002.

MORGANE, PJ *et al.* Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*,17:91-128, 1993.

MORGANE, PJ; MOKLER, DJ; GALLER JR. Effects of Prenatal Protein Malnutrition on the Hippocampal Formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26:471-83, 2002.

MORIGUCHI, T.; SALEM Jr, N. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem*, 87:297-309, 2003.

MORRIS, R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11:47-60, 1948.

MOURA, AS *et al.* Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 5, 2002

NAKA, F.; SHIGA, T.; YAGUCHI, M.; OKADO, N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Research*, 924:124-126, 2002.

ONGARI MA, RITTER JM, ORCHARD MA, WADDELL KA, BLAIR IA, LEWIS PJ. Correlation of prostacyclin synthesis by human umbilical artery with status of essential fatty acid. *Am J Obstet Gynecol*, 149: 455–460, 1984.

OOMAH, BD, MAZZA G. Flaxseed proteins: A review. *Food Chem*, 48:109-114, 1993.

OOMAH, BD; KENASCHUK, EO; MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 43: 2016-19, 1995.

OZIAS, MC; CARLSON, SE; LEVANT, B. Maternal Parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. *J Nutr*, 137:125-129, 2007.

PACHECO, JT. A influência da semente de linhaça como fonte de fitoestrógenos nos indicadores cardiovasculares e na menopausa de ratas castradas. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas), 2008.

PAN, A. *et al.* Meta-analysis of the effect of flaxseed intervention on blood lipids. *American Journal of Clinic Nutrition*. 90(2):288-97, 2009.

PEREIRA, OL *et al.* Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of learnin and memory*, 87,101-108, 2006.

PETURSDOTTIR, AL *et al.* Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on brain lipid fatty acid composition, learning, ability and memory of senescence-accelerated mouse. *Journal of Gerontology*, 63(11):1153-1160, 2008.

PRASAD, K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Ather*, 179; 269–75, 2005.

PRUSKY, G. T.; REIDEL, C.; DOUGLAS, R. M. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behavioural Brain Research*, 114:11-15, 2000.

PUURUNEN, K.; SIVENIUS, J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral in insult. *Rev. Neurosci*, 13:347-364, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.F. AIN-93 purified diet of laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodents diet. *J Nutrition*, 123: 1939-1951, 1993.

RICHARDSON, AJ. The importance of omega-3 fatty acidas for behavior cognition and mood. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 43(2):92-98, 2003.

RIEDIGER, ND *et al.* Low n-6: n-3 fatty acid ratio, with fish- or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. *Eur J Nutr*. v. 41:153-160, 2008.

ROSE, F. D.; ATTREE, E. A.; BROOKS, B. M.; JOHNS, D. A. Virtual environments in brain damage rehabilitation: a rationale from basic neuscience. *Stud Health Technol Inform*, 58:233-242, 1998.

ROSENZWEIG, MR *et al.* Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 55:429-437, 1962

ROSENZWEIG, MR. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *American Psychologist*, v. 21:321-332, 1966.

ROSENZWEIG, MR *et al.* Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Research*, v. 153:563-576, 1978.

SALIBA, E; MARRET, S. Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors. *Seminars in Neonatology*, 6:121-33, 2001.

SANDERS, T.A.B. Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation and infancy. *Am J Clin Nutr.* v. 70(3 Suppl), p. 555-9, 1999.

SANGIOVANNI, JP *et al.* Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy full term infants: a systematic review. *Early Hum Dev.* v. 57, n.3, p.165-88, 2000.

SAUCIER, DM *et al.* Enriched environment and the effect of age on ischemic brain damage. *Brain Research*, 1170:31-38, 2007.

SCHWARTZ, S. Effect of neonatal cortical lesions and early environmental factors on adult rat behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 57:72-77, 1964.

SHEPHERDSON, DJ. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In SHEPHERDSON, DJ, MELLEEN, JD, HUTCHINS, M. *Second Nature: environmental enrichment for captive animals.* Washington d. C.: *Smithsonian Institution press*, p.1-12, 1998.

SILVA, MGP. Composição corporal e perfil lipídico de ratos wistar usando a semente de linhaça em ambiente enriquecido. Monografia (Graduação em Nutrição), Universidade Federal Fluminense, 2009.

SMITH, A. L. & CORROW, D. J. Modifications to Husbandry and Housing Conditions of Laboratory Rodents for Improved Well-being. *ILAR Journal*, 46(2):140-147, 2005.

SIMOPOULOS, AP & BAZAN, NG. *Omega-3 Fatty Acids, the Brain and Retina.* Basel: Karger, 2009.

STEFFENS, W. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151,97-119, 1997.

THOMPSON, L.U., RICKARD, S.E., ORCHESON, L.J., SEIDL, M.M. Flaxseed and its lignan and components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis, Oxford*, 17:1373-1376, 1996.

TINOCO, S.M.B. *et al.* The importance of essential fatty acids and the effect of *trans* fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. *Cad Saúde Pública* (Rio de Janeiro), 23(3):525-534, 2007.

TURATTI, JM; GOMES, RAR; ATHIÉ, I. Lipídeos: Aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: *ITAL*. p. 78, 2002.

TZANG, BS *et al.* Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry*, 114:1450-1455, 2009.

UAUY R & DANGOUR AD. Nutrition in Brain Development and Aging: Role of Essential Fatty Acids. *Nutrition Reviews*, vol 64, no. 5, s24-33, 2006.

UAUY, R *et al.* Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*. v. 36, n. 9, p.885-95, 2001.

UAUY, R & VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, 16(7/8):680-684, 2000.

VAN GELDER, BM *et al.* Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr*, 85:1142-1147, 2007.

Van HOUWELINGEN AC *et al.* Essential fatty acid status of fetal plasma phospholipids: similar to postnatal values obtained at comparable gestational ages. *Early Hum Dev*, 46:141-152, 1996.

VAN PRAAG, H. *et al.* Neural Consequences Of environmental Enrichment. *Nature Reviews*, v.1:191-198, 2000.

VANNUCCI, RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr. Res*, 27: 317-326, 1990.

WAINWRIGHT, P.A.: DO ESSENCIAL FATTY ACIDS PLAY A ROLE IN BRAIN AND BEHAVIORAL DEVELOPMENT? *NEUROSCI BIOBEHAV VER*, 16: 193-205, 1992.

WAINWRIGHT, P. E.; XING, H. C.; WARD, G. R. Water maze performance is unaffected in artificially reared rats fed diets supplemented with arachdonic acid and docosahexaenoic acid. *J Nutr*, 129:1079-1089, 1999.

WEISENFELD, P.W. *et al.* Flaxseed increased alfa linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachdonic acid in serum and tissue of rats dams and offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 41:841-55, 2003.

WÜRBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*, 24(4):207-211, 2001.

YEHUDA, S. *et al.* The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging*. v. 23, n.5, p.843-53, 2002.

YOUDIM, KA; MARTIN, A; JOSEPH, AMJ. Essential fatty acids and the brain: Possible Health Implications. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 18:383-399, 2000.

YOUNG, C & MARTIN, A. Omega-3 em transtornos de humor: revisão. *Rev. Bras. Psiquiatr*, 25(3):184-7, 2003.

YU, H. *et al.* Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int J Dev Neurosci*, 2009. *Doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.12.00*.

ZHANG, W *et al.* Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolemic subjects. *Br J Nutr*, 99:1301-1309, 2008.

ZHENG, Y *et al.* Energy analysis in the screw pressing of whole and dehulled flaxseed. *Journal of Food Engineering*. 66:193-202, 2005.

ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WÜRBEL, H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behavioural Brain Research*, 121:11-20, 2001.

ZINAIDA, SV & FERRIERO, D.M. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Seminars in Neonatology*, 6 : 99-108, 2001.

ZOMIGNANI, AP.; ZAMBELLI, HJL.; ANTONIO, MARM. Desenvolvimento cerebral em recém-nascidos prematuros. *Ver Paul Pediatr*, 2:198-203, 2009.

[anterior](#) | [próxima](#) | [Voltar para as mensagens](#)

[Marcar como não lida](#) | [Imprimir](#)

Apagar Responder Encaminhar Spam Mover...

**Submission Confirmation**

Segunda-feira, 22 de Março de 2010 21:41

De: "Behavioural Brain Research" <bbr@elsevier.com>

Para: jazevedom@yahoo.com.br

Dear Juliana Azevedo,

Your submission entitled "Behavioral analysis of Wistar rats fed with a flaxseed based diet added to an Environmental Enrichment, in Open Field Test." has been received by Behavioural Brain Research

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bbr/>.

Your username is: Juliana Azevedo

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/BBR/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/BBR/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Behavioural Brain Research

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**Behavioral analysis of *Wistar* rats fed with a flaxseed based diet added to an  
Environmental Enrichment, in *Open Field Test*.**

Juliana Azevedo de Meneses<sup>1</sup> MD, Cristiano Abirached Junqueira<sup>2</sup>, Luis Guillermo Coca Velarde<sup>3</sup> PhD, Gilson Teles Boaventura<sup>4</sup> PhD

Affiliation of all authors

<sup>1</sup>Student of the Pos graduation Program in Sciences Medicine, UFF. <sup>2</sup>Graduate in Biomedicine, UniRIO. <sup>3</sup>Associate Professor, Department of Statistical, UFF. <sup>4</sup>Associate Professor, Department of Nutrition and Dietary, UFF, Niterói, RJ, Brazil.

Pages: 20

Tables: 1

Figures: 3

Corresponding author & Complete mailing address:

Juliana Azevedo de Meneses

Rua Lemos Cunha 345, apartamento 502

Icaraí, Niterói – RJ- Brazil. CEP 24230-131

E-mail: [jazevedom@yahoo.com.br](mailto:jazevedom@yahoo.com.br)

Phones: (55-21) 26121433, (55-21) 81557143

## Abstract

Flaxseed has a high content of N-3 fatty acids and its intake associated with an environmental enrichment may promote distinct behavioral results upon habituation and animal behavior. This work aimed to evaluating animal behavior under the use of these two tools in the *Open Field Test*. Thirty-six male *Wistar* rats were divided into 6 groups (n=6): FEEG, receiving chow made up of flaxseed and kept in enriched environment; FSEG, receiving flaxseed based diet and kept in a standard environment; CEEG, receiving casein based diet and kept in enriched environment; CSEG, receiving casein based chow and kept in standard environment; MCEEG, receiving chow made up of casein but modified so as to provide the same content of fibers and lipids found in flaxseed diet and kept in enriched environment; MCSEG, receiving modified casein based diet and kept in standard environment. All animals were kept under controlled temperature, collective cages and dark/light cycle, receiving chow and water *ad libitum*, except for MCEEG and MCSEG, which were pair fed with FEEG and FSEG, respectively. Chow intake and animal body weight were evaluated twice in a week. Animals were maintained in these groups from the first until the second month of life, by the time when 3 day tests in *Open Field Test* began. Finishing the tests, animals were sacrificed and their brains were obtained in order to calculate the relative brain weight. Our results show an interplay between flaxseed and environmental enrichment in habituation to a new environment, making the animals more manageable.

**Keywords:** DHA; environmental enrichment; open field test; rat; behavioral

## 1. Introduction

Currently, environmental enrichment is a very common means of improving animal well-being, especially for laboratory animals. Although environmental enrichment seems to

be a possible way for improving the well-being of animals, the consideration of housing laboratory animals should not only focus solely on animals well-being, manpower and economics but also on the precision and accuracy of the experimental results [1].

Environmental Enrichment (EE) has been drawing attention of many studies on the grounds that besides it can be used as a tool for recuperation of lesions and cerebral diseases [2], it can also imitate natural habitat of experimental animals, causing improvement in welfare under laboratorial environment [3,4]. Countless studies have shown its effects under behavior development and cognitive skills acquisition [5]. In fact, precocious interventions can affect sociability, learning, physical development and neurogenesis in some species of rodents [6]. For that reason, researches on environmental enrichment have often focused in investigating the impacts of different environmental conditions of breeding upon behavioral organization and/or nervous system of studied animals [7,8].

The Canadian psychologist Donald O. Hebb was the first researcher to be interested in environmental enrichment impact upon behavior in the last century. He discovered that animals bred in large environment and with wide range of objects and spatial configurations presented more superior learning skills than animals bred in laboratories in smaller and not enriched environments [7]. Environmental enrichment produces effects that go beyond behavioral/physiological outcomes; it offers responses in cerebral plasticity, which varies from biochemical parameters to dendritic trees, gliogenesis, neurogenesis and finally improvement of learning and memory [2].

DHA is known for its effects upon cerebral function, humor and behavior. It acts as one of the “building blocks” of cerebral growth and development – cell membranes of brain are highly enriched with DHA [9]. This fatty acid is incorporated in high amount into structural lipids during central nervous system development, being a deficient accumulation related with behavioral abnormalities [9,10,11,12,13]. Furthermore, many animal studies

show that this acid improves learning, visual processes, memory and concentration [9,11,13]. Consequently, it is not controversial that DHA can affect cerebral and behavioral functions and that its intake leads to fetal development [14,15].

Flaxseed also contributes to behavioral response as it contains high content of alpha linolenic acid (C18:3n-3, ALA), which is a long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), essential, from n-3 series, that is converted to eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA), two compound known by their benefits upon cardiac health, arthritis, thrombotic diseases and, especially, cerebral functions [16].

A powerful tool to measure behavior is the Open Field Test. Since its introduction, 80 years later, it has reached the status of one of the most used instrument in animal psychology. This popularity stems from its simplicity and agility to measure behavior and wide applicability, which is generally accepted as interpretation [17].

Considering that not only enrichment environmental but also flaxseed exerts related functions upon cerebral physiology, especially in habituation and behavior, this study aimed at evaluating the behavior of rats fed with flaxseed in a enrichment environmental using the *Open Field Test*.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Animals*

Thirty-six males *Rattus norvegicus* were used in the biological assay, *albinus* variety, *Rodentia mammalia*, *Wistar* strain, offspring (F1), stemmed from Experimental Nutrition laboratory (LABNE), males, offspring (F1), stemmed from Experimental Nutrition Laboratory (LABNE) from Nutrition and dietetic department of Nutrition College at

Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil. Animals came from other generation (F0), fed with the respective chow at the moment of the monogamic match. The protocol of this experiment was approved by the Ethics Committee in Research from Federal Fluminense University (UFF). All procedures were carried out in accordance with the norms from Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

### *2.2 Experimental design*

Pups were divided into three groups (n=12) according to the chow received by F<sub>0</sub>: Flaxseed group (FG), receiving chow made up of casein with 25% of flaxseed, Control group (CG), receiving casein based chow, Modified Control group (MCG), receiving chow made up of casein added to 4% of fibers and 2% of soy oil, aiming at reaching the same amount of these nutrients in flaxseed chow. These dietetic groups were divided into 6 groups: FG with EE (FEEG), FG without EE (FSEG), CG with EE (CEEG), CG without EE (CSEG), MCG with EE (MCEEG) and MCG without EE (MCSEG). Animals received diet and water *ad libitum*, except for MCEEG and MCSEG, which were maintained in a pair feeding scheme with FEEG and FSEG, respectively. Chow intake and animal body weight were evaluated twice in a week throughout the experiment. All animals were kept under controlled temperature (22°C), and dark/light cycle (12/12h).

### *2.3 Environmental Enrichment*

Animals subjected to this process were maintained 24 hours per Day in a propylene cage with total dimensions of 25.5 cm, 33.5 cm and 40.5 cm (height, width and profundity, respectively), with a unit of each object: metal wheel for exercise with 12 cm diameter, plastic shelter with dimensions of 9.5 cm, 14.2 cm and 10.2 cm (height, width and profundity, respectively), metal seesaw with dimensions of 4.5 cm, 6.0 cm and 26.0 cm (height, width and profundity, respectively), plastic cubes with dimensions of 5.0 cm edge and rubber balls with 6.5 cm diameter. Such objects were alternated at random twice per week. Animals

without enriched environment were kept in similar cages without these objects. Three animals were placed in each cage.

#### *2.4 Behavioral analysis*

*Open-field test* was used for behavioral analysis, in which a square arena with 33.0 cm of height and 80.5 cm in each side, divided into 16 quarters. The analyses were performed at the end of the period of enriched environment always at the same time, with 24 hours interval, once a Day, during three consecutive days.

Each animal, separately, was allocated at the center of the arena and had its behavior registered for 4 minutes. The behavioral variables were measured according to duration (in seconds) at three degrees of activity [18] (Van De Weerd, 1996): high activity: walk and run; low activity: sit down, including small movements of head and feet and inactivity: no movement (“*freezing*” and “*resting*”). A software for behavioral register was used “X-Plo-Rat 2005 for Windows” (version 1.1.0 developed by Exploring behavior laboratory from São Paulo University, Philosophy college, sciences and arts of Ribeirão Preto, Ribeirão preto, SP, Brazil).

#### *2.5 Brain measurement*

After the last test, animals received intraperitoneally a lethal dose of Thiopentax (sodium Thiopental) 1g ( $\text{DOSE}_{\text{ml}} = 0.15 \times \text{animal weight g}/100$ ), sedating them and decapitating with a guillotine. Brains were excised and weighted in a analytic scale, Bosch, S 2000 model, with precision of 0.0001g in order to obtain relative cerebral weight (RCW) that was registered by the division of cerebral weight by body weight and multiplying this result by 100.

#### *2.6 Statistical analysis*

*S-Plus* (version 6.0) software was used to analyze all answer variables. For *Open-field test* results in each Day of the test, *Kruskal-Wallis rank sum test* was used to test differences

among dietetic groups and *Exact Wilcoxon rank-sum test* to evaluate differences between EEG and SEG. Significance level established for both situations was  $p < 0.05$ . For relative brain weight, *Kruskal-Wallis rank sum test* was used to verify statistical differences with significance level of  $p < 0.005$  for diet and EE.

### 3. Results

At the first Day of test, diet was the unique factor interfering ( $p < 0.03$ ) with the duration of animal activity in the *Open-field* arena, more precisely in the inactivity response variable (Fig. 1). FG presented higher inactivity ( $10 \pm 8s$ ), followed by CG ( $6 \pm 18s$ ) and MCG ( $3 \pm 4s$ ).

At the second Day, both diet and EE promoted differences among the groups. The high activity was influenced by diet ( $p < 0.02$ ), while inactivity was influenced by diet ( $p < 0.03$ ) and EE ( $p < 0.01$ ). FG (Fig.2a) was the group with the lowest activity ( $36 \pm 20s$ ), above this was MCG ( $54 \pm 17s$ ), and after the CG ( $58 \pm 19s$ ). Conversely, in inactivity (Fig. 2b), FG ( $19 \pm 20s$ ) was superior when compared to CG ( $8 \pm 22s$ ) and MCG ( $5 \pm 10s$ ). EEG was the most inactive ( $15 \pm 19s$ ) (Fig. 2c), comparing to SEG ( $7 \pm 17s$ ). When the analysis was concentrated in each dietetic group (Fig 2d), it was perceived that FG was the only one that did not follow the previous result, being FEEG ( $20 \pm 9s$ ) similar to FSEG ( $17 \pm 28s$ ). However, within CG, the CEEG ( $15 \pm 31s$ ) and CSEG ( $1 \pm 1s$ ), and within MCG; MCEEG ( $9 \pm 6s$ ) and MCSEG ( $2 \pm 2s$ ) behaved likewise FG concerning inactivity at the second day of test.

At the third Day of test, the last one, diet was not significant to activities during the test. Nevertheless, EE interfered with low activity more specifically ( $p < 0.03$ ) and inactivity ( $p < 0.01$ ). SEG stayed more time sit, making small movements with head and feet ( $194 \pm 12s$ ) in relation to EEG ( $186 \pm 11s$ ) (Fig. 3a). The opposite is observed in inactivity, where

SEG presented a low duration ( $4 \pm 4$ ), whereas EEG presented more pronounced inactivity ( $19 \pm 7$ ) (Fig.3b). Low physical activity is similar concerning different dietetic groups, CG - CEEG,  $182 \pm 3$ ; CSEG,  $192 \pm 5$  and FG - FEEG  $179 \pm 11$ ; FSEG,  $196 \pm 7$ , except for MCG, with MCEEG ( $197 \pm 9$ ) surpassing MCSEG ( $193 \pm 20$ ), implying that animals in not enriched environment had bigger values than enriched ones (Fig 3c). However, inactivity follows the same pattern inside the three groups: MCG - MCEEG ( $9 \pm 6$ ) and MCSEG ( $4 \pm 5$ ), CG - CEEG ( $13 \pm 12$ ) and CSEG ( $3 \pm 4$ ), and FG – FEEG ( $34 \pm 19$ ) and FSEG ( $5 \pm 4$ ) (Fig. 3d).

As far as cerebral development is concerned, there was influence of the sort of chow consumed ( $p < 0.05$ ) upon this response variable (table 1). Experimental group (FG) obtained the biggest relative cerebral weight ( $0.63 \pm 0.05$ ), followed by MCG ( $0.56 \pm 0.05$ ) and by CG ( $0.50 \pm 0.03$ ). When enriched animals were compared to non-enriched ones, there is a huge numerical difference in the percentage, but not statistically significant, suggesting a better response with environmental enrichment groups.

#### 4. Discussion

*Open-field* tests behavioral effects in non-familiar environments, measuring animal emotional activity [19]. Animals that present low levels of activities (locomotion) in this new environment are classified as more emotive than animals with opposite behavior [17, 20]. Furthermore, high activity implies environmental exploration, whereas its decrease or opposite activities indicate habituation [18]. In our study, among the three diets, FG is more familiar to new environments. Analyzing total time of inactivity during the day so as to calculate the percentage in which each group contributed to this finding, it was observed that FG had percentage equal or bigger than 55%, being followed by CG (25-30%) and MCG (maximum of 17%). This information agrees with Hamazaki *et al.* [12], who described DHA

as a facilitator of habituation. Likewise, Fedorova & Salem [9] state that habituation makes animals less stressed, a beneficial effect of DHA.

In the same way of DHA, one of the benefits of EE is to accelerate habituation process [21]. In our study, enriched animals showed less activity level than animals in standard environment, even considering different dietetic approaches. In two out of three days of test, EE obtained significance when EEG was compared to SEG. It's important to highlight that at the second day despite behaving similar to FEEG, FSEG presented level of inactivity much more similar to CSEG, emphasizing the importance of EE apart from the presence of flaxseed in the diet.

FG showed relative brain weight superior to all other groups due to high concentration of lipids in the cell membranes [10, 22]. This correlation can be accounted for the fact that a diet rich in polyunsaturated fatty acids may increase the aggregation of fatty acids to brain, reflecting directly in the bigger weight of this organ.

Values resulting from EE did not cause expressive alteration in RCW. However, it was partially expected because although rats submitted to this kind of treatment present higher RCW [23], many studies attribute opposite effects to environmental enrichment [24]. Taking this into account, Baumans [25] states that the adoption of this protocol needs detailed analysis in a way that its benefits to quality of laboratory animals did not alter experimental data.

## **5. Conclusion**

Both flaxseed and environmental enrichment proved to be beneficial to quality of animal life. However, EE did not interfered with emotional aspect, made animals more manageable, getting easily used to new situations and causing improvement in welfare under laboratorial environment. Flaxseed produced cooperation of animals and resulted in more

natural emotional state, but influenced in relevant variables inside the study. Consequently, its use in an experimental work requires caution depending on the expected result. On the other hand, our data suggest that animals fed with flaxseed had a better development provided that bigger relative cerebral weight accounted for better incorporation of essential fatty acids in the brain.

## References

1. Tsai P –P, Pachowsky U, Stelzer HD *et al.* Impact of environmental enrichment in mice. 1: Effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim* 2002;**36**: 411-419
2. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000;**1**: 191-198
3. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J* 2005;**46 (2)**: 162-170
4. Balcome JP. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Lab Anim* 2006;**40**: 217-235
5. Zimmermann A. *et al.* Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 2001;**121**:11-20
6. Escorihuela RM, Tobeña A. Fernández-Teruel A. Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav and Brain Res* 1994;**61**: 169-173
7. Fernández-Teruel A. *et al.* Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Be* 2002;**73**: 233-245
8. Naka,F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res* 2002;**9**: 124-126
9. Fedorova I, Salem N Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *PLEFA* 2006;**75**: 271–289

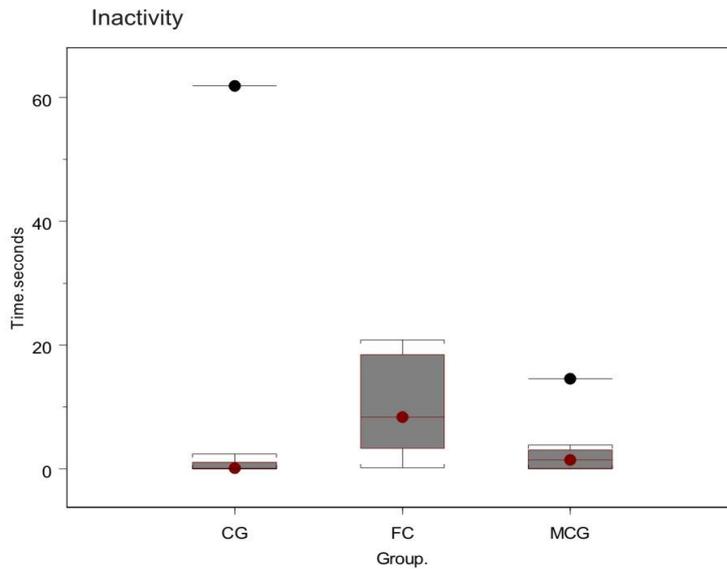
10. Young C, Martin A.. Omega-3 em transtornos de humor: revisão. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;**25** (3): 184-7
11. Carlson SE. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Semin Neonatol* 2001;**6**: 437-449
12. Hamazaki T. Administration of Docosahexaenoic Acid Influences Behavior and Plasma Catecholamine Levels at Times of Psychological Stress. *Lipids* 1999;**34**: 33-37
13. Kalmijn S *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids, Antioxidants, and Cognitive Function in Very Old Men. *Am J Epidemiol* 1997;**145** (1): 33-41
14. Simopoulos AP, Bazan NG. *Omega-3 Fatty Acids, the Brain and Retina*. Basel: Karger, 2009
15. Silva DRB, Júnior PMF, Soares EA. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2007;**7** (2):123-133
16. Tinoco SMB, Sichieri R, Moura AS, *et al.* A importância dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Cade Saúde Pública* 2007;**23** (3):525-534
17. Walsh RN, Cummins RA. The Open Field Test: A critical review. *Psychol Bull* 1976;**83** (3): 482-504
18. Van De Weerd HA. Environmental enrichment for laboratory mice: preferences and consequences. *University of Utrecht* 1996.
19. Hall CS. Temperament: a survey of animal studies. *Psychol Bull* 1941;**38**: 909-943
20. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973;**21**: 205-235
21. Van De Weerd HA *et al.* Effects of environmental enrichment for mice: Variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci* 2002;**5**: 87-109
22. Benatti P *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr* 2004;**23** (4): 281-302

23. Rosenzweig MR. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am Psychol* 1966;**21**: 321-332
24. Smith AL, Corrow DJ. Modifications to Husbandry and Housing Conditions of Laboratory Rodents for Improved Well-being. *ILAR J* 2005;**46** (2): 140-147
25. Baumans V. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents and Rabbits: Requirements of Rodents, Rabbits, and Research. *ILAR J* 2005;**46** (2): 162-170

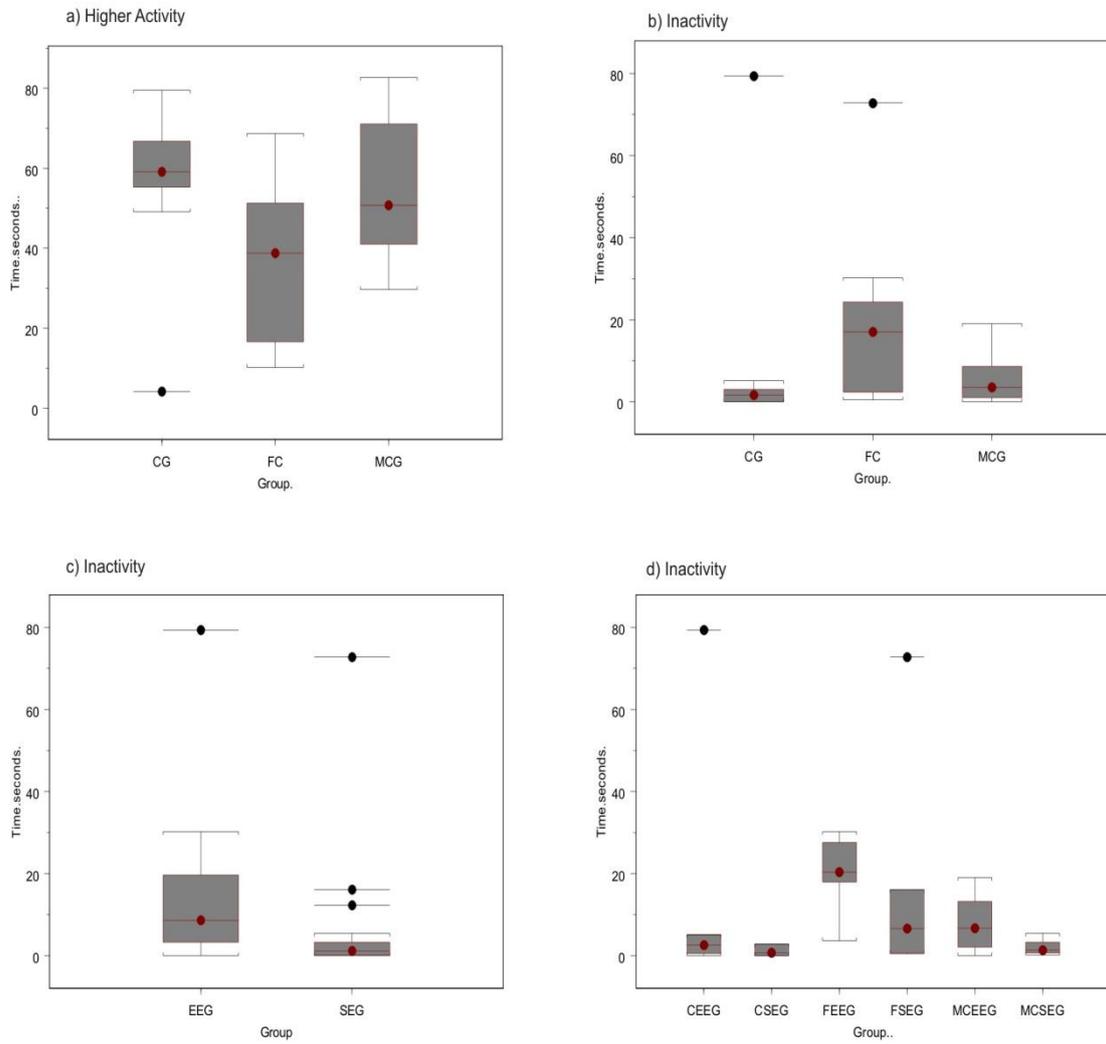
Table 1 – Relative Cerebral Weight of the animals studied

Group	RCW (%)
<b>FG</b>	$0,63 \pm 0,05^a$
<b>CG</b>	$0,50 \pm 0,03^b$
<b>CMG</b>	$0,56 \pm 0,05^c$

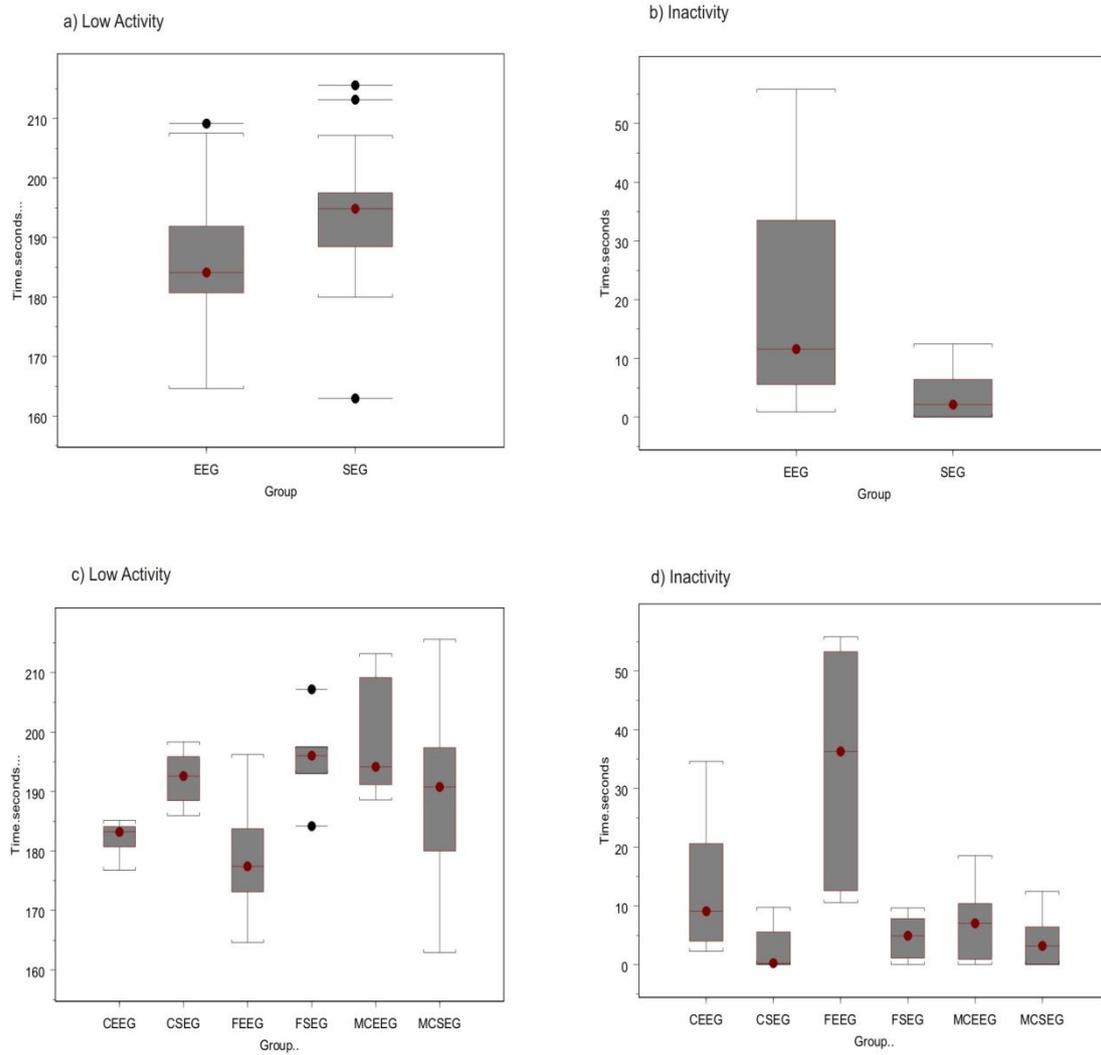
FG – Flaxseed Group (n=6), CG – Control Group (n=6) and CMG – Control Modified Group (n=6).  
Different letters denote statistical difference ( $p \leq 0,05$ )



**Fig. 1 Inactivity on first day test for CG (Control Group), FG (Flaxseed Group) and MCG (Modified Control Group)**



**Fig.2 Second day tests for (a) Higher Activity between , (b) Inactivity between CG,FC and MCG, (c) Inactivity between EEG and SEG and (d) Inactivity between CEEG, CSEG, FEEG, FSEG, MCEEG and MCSEG.**



**Fig.3 Third day tests for (a) Low Activity between EEG and SEG, (b) Inactivity between EEG and SEG, (c) Low Activity between CEEG, CSEG, FEEG, FSEG, MCEEG and MCSEG and (d) Inactivity between CEEG, CSEG, FEEG, FSEG, MCEEG and MCSEG.**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)