



A INFLUÊNCIA DO ÔMEGA-3 SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM MODELO DE OVARIETOMIA BILATERAL EM RATAS WISTAR

Iasmine Berbigier de Oliveira¹
Renata Vinholes Oliveira da Rocha²
Alessandra Hubner de Souza³

Resumo

A menopausa induz uma série de alterações pela baixa estrogênica, levando a irritabilidade, depressão, dificuldades de memória e cognição, entre outros. Ao ômega-3 têm sido atribuídos diversos benefícios, podendo citar melhora da depressão e efeitos antioxidantes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o ômega-3, como um recurso alternativo para melhorar os sintomas da menopausa como a depressão e ansiedade, dificuldades de memória e cognição em ratas ovariectomizadas (OVX) através de testes comportamentais e medidas de glutamato. Para o modelo experimental foram usadas fêmeas Wistar, pesando 200/300g, divididas em 4 grupos sendo: controle sham-operated água (SO-A n=6), sham-operated ômega (SO-O n=5), controle OVX água (OVX-A n=6) e OVX ômega (OVX-O n=5). As ratas receberam 20 dias de tratamento via gavagem, antes e depois da cirurgia. Nos testes de nado forçado, labirinto em cruz elevada e campo aberto, para avaliar ansiedade e depressão, os animais OVX-A demonstraram comportamento mais ansioso e depressivo, enquanto o ômega-3 modulou positivamente esses comportamentos. Na dosagem de glutamato, sugere-se que o mesmo melhora memória e cognição no grupo SO-O, e não no OVX-O. Em conclusão, o ômega-3 demonstrou efeito antidepressivo e ansiolítico na menopausa, bem como parece melhorar memória e cognição em animais não menopausados. Sugere-se novas pesquisas para verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 em todas as fases da vida.

Palavras chave: depressão; glutamato; comportamento.

INTRODUÇÃO

Na mulher, os anos reprodutivos normais caracterizam-se por modificações cíclicas mensais na secreção de hormônios femininos e por alterações físicas nos órgãos sexuais. As alterações cíclicas são chamadas de ciclo menstrual que por volta dos 40 a 55 anos de idade, passam por um período de transição apresentando irregularidades, até o momento do término da ovulação e, com isso, a redução da produção dos hormônios sexuais femininos até quase zero, caracterizando-se a menopausa (GUYTON; HALL, 2011).

É considerada menopausa a interrupção da menstruação por mais de 12 meses, que é decorrente da perda da atividade folicular ovariana ou à remoção cirúrgica dos ovários, sendo espontânea ou iatrogênica, respectivamente, e as alterações por ela provocadas, principalmente a diminuição na produção de estrogênio, levam a significativas implicações fisiológicas (BLAKE, 2006; DAVIS et al., 2015; SPRITZER; WENDER, 2007).

O estrogênio é um hormônio esteroide, sendo o principal responsável pelas características físicas e sexuais femininas, influenciando no funcionamento de todo o corpo, sendo principalmente sintetizado a partir do colesterol pelo ovário e nos tecidos periféricos. Na menopausa, essa síntese fica restrita aos tecidos periféricos e dependente de ação enzimática (SAFOURY et al., 2010).

A atividade antioxidante do estrogênio possui efeito benéfico e protetor para vários órgãos, além de colaborar para um sistema arterial mais saudável (AL-AZZAWI; PALACIOS, 2009; KAWAZAKI; CHAUDRY, 2012).



A baixa estrogênica traz uma série de sintomas fisiológicos como sintomas vasomotores, como os fogachos e suor frio a noite, distúrbios do sono, redução da lubrificação vaginal, dor durante as relações sexuais, alteração na manutenção da homeostase do colágeno da pele, dos ossos e dos ligamentos de suporte do aparelho reprodutor feminino, aumento e urgência da frequência urinária. Pode levar ainda, a quadros de irritabilidade, depressão, dificuldade de concentração e diminuição da memória (AL-AZZAWI; PALACIOS, 2009; SUSSMAN et al., 2015).

Todos os sintomas da menopausa podem ser inibidos ou controlados a partir da reposição hormonal, que pode ser natural, com fitoestrogênios encontrados em plantas e alimentos, ou sintética, com fármacos com características semelhantes ao estrogênio desenvolvidos em laboratório (FERNANDES et al., 2008).

Muitas vezes a reposição hormonal com base sintética apresentam efeitos colaterais e contraindicações, como histórico familiar de câncer de mama, tromboembolismo e insuficiência renal e hepática grave, onde a busca por alternativas que tratem ou amenizem os sintomas da menopausa é cada vez maior (MARTIN et al., 2010; SANCHES et al., 2010).

A isoflavona é abundantemente encontrada na soja, rica em ácidos graxos e poli-insaturados como o ácido linolênico (ômega-3) e ácido linolênico (ômega-6). As isoflavonas são fitoestrógenos não hormonais, com estrutura semelhante a dos hormônios estrogênicos humanos, que apresentam atividade antioxidante e moduladora seletiva de receptores de estrogênio, sem efeitos colaterais (SANCHES et al., 2010).

Ômega-3 é formado por ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e constitui-se de ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosaheptaenóico (DHA) e ácido alfa-linolênico. Tanto o EPA, quanto o DHA são encontrados em peixes gordos, já o ácido alfa-linolênico está presente em óleos vegetais. Ao ômega-3 têm sido atribuídos potenciais efeitos contra o câncer, benefícios na função cognitiva, depressão, processos imunes e inflamatórios e também no sistema cardiovascular, demonstrando benefícios em dislipidemia e função cardíaca (BELLO et al., 2013).

Estudo recente de LOSURDO e colaboradores (2014), demonstrou que a suplementação com ômega-3 após a menopausa induzida é capaz de reverter a disfunção endotelial e o estresse oxidativo.

Em estudo que avaliou a atividade do ômega-3 como antidepressivo em modelos experimentais de depressão, comparado ao tratamento padrão com antidepressivo fluoxetina, observou-se atividade antidepressiva quando usado sozinho e apresentou um efeito antidepressivo significativamente maior quando associado à fluoxetina, comparado ao uso isolado de fluoxetina (LAKHWANI et al., 2007).

Logo, este trabalho teve por objetivo realizar as medidas de glutamato no líquido dos animais e comparar o nível de neurotransmissor com o comportamento depressivo e ansioso dos animais menopausados, bem como verificar o efeito do ômega-3 em modelo de depressão e ansiedade nas ratas menopausadas e não castradas (nado forçado e labirinto em cruz elevada) e avaliar os efeitos do composto sobre a locomoção espontânea das ratas em campo aberto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar (200/300 gramas) que não tenham tido gestação, provenientes do biotério da Central de Laboratórios da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/Canoas), mantidos conforme orientação, com aprovação pela CEUA/ULBRA, protocolo: 2015.31.

Os animais foram anestesiados (cetamina 95 mg/kg e xilasina 8 mg/kg) via intraperitoneal, e divididos em dois grupos, ambos passando por intervenção cirúrgica, em um



grupo realizou-se a retirada bilateral ovariana (OVX) e o outro grupo (SO, SHAM-OPERATED), foi realizada somente a manipulação do ovário, sem sua remoção, passando apenas pelo estresse cirúrgico (BAKER et al., 1979; MORGAN-MARTINS, 2003; MORGAN-MARTINS et al., 2011). Após este procedimento os animais receberam dipirona 180 mg/Kg de peso, administrada via gavagem, duas vezes ao dia, durante três dias, conforme REZENDE et al. (2008).

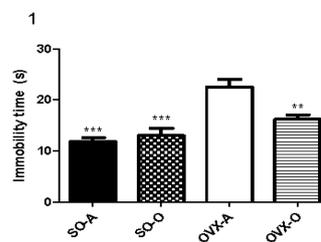
Os animais foram subdivididos em 4 grupos: controle SHAM-OPERATED água (SO-A), grupo SHAM-OPERATED ÔMEGA-3 (500mg/kg) (SO-O), grupo controle ovariectomizado água (OVX-A) e grupo ovariectomizado ÔMEGA-3 (500mg/kg) (OVX-O), e receberam tratamento via oral por 20 dias antes da cirurgia e por mais 20 dias após a cirurgia.

Foram realizados testes comportamentais como nado forçado, labirinto em cruz elevado e campo aberto no 40º e para análises dos níveis de glutamato, os animais foram anestesiados, retirando-se amostras de líquido. Para testes posteriores, foram retiradas amostras de sangue da veia cava inferior, realizando-se morte por exsanguinação, e coleta de amostras do fígado e cérebro para análises de lipoperoxidação e das enzimas antioxidantes.

RESULTADOS

No teste de nado forçado, o grupo OVX-A apresentou tempo de imobilidade significativamente maior em relação aos grupos SO-A, SO-O e OVX-O, o que sugere um comportamento depressivo das ratas menopausadas, o que concorda com o estudo de Walf e Frye (2007) que demonstrou que a ovariectomia aumentou o tempo de flutuação em ratos jovens e adultos, comparados ao controle.

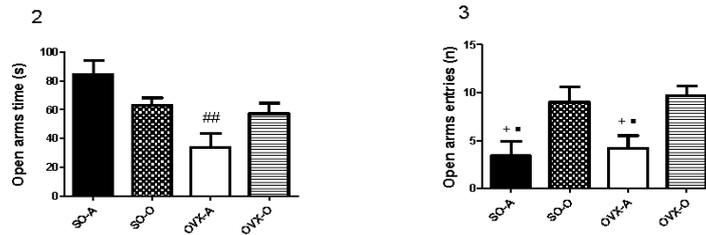
Figura 1: Análise comportamental no teste do nado forçado, sobre o tempo de imobilidade em segundos. **p<0,01 comparado ao OVX-A. ***p<0,001 comparados ao OVX-A. Estatística ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newmann-Keuls. n= 5-6.



No teste de labirinto em cruz elevado, o grupo OVX-A permaneceu um tempo significativamente menor no braço aberto, comparado ao grupo SO-A, sugerindo um comportamento mais ansioso do grupo menopausado. No quesito número de entradas no braço aberto, tanto o grupo SO-A, quanto o grupo OVX-A, tiveram um número de entradas significativamente menor que os grupos SO-O e OVX-O. Considerando que a maior atividade nos braços abertos está relacionada a um comportamento menos ansioso, e que menor atividade nos braços abertos está relacionada a um comportamento mais ansioso, pode-se supor que a menopausa desenvolve comportamento ansiogênico, bem como o ômega-3 demonstra efeito ansiolítico, tanto nas ratas menopausadas, quanto nas ratas normais, concordando com estudo de Perveen et al. (2013), onde afirmam que o consumo de ômega-3, além de reduzir os sintomas depressivos, pode ser útil também no tratamento de transtornos de ansiedade.

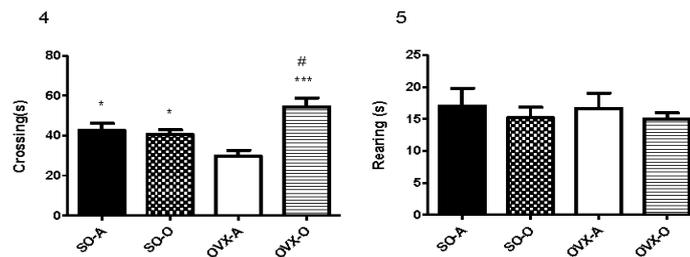


Figura 2: tempo de permanência nos braços aberto em segundos; (3) número de entradas nos braços abertos; ## $p \leq 0,01$ comparado ao SO-A + $p \leq 0,05$ comparados ao OVX-O, * $p \leq 0,05$ comparados ao SO-O. Estatística ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newmann-Keuls. n= 5-6.



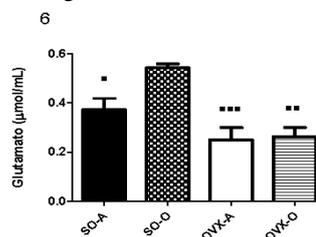
No teste comportamental de campo aberto, no parâmetro de locomoção motora horizontal (crossing), o grupo OVX-A se locomoveu significativamente menos comparado aos grupos OVX-O, SO-A e SO-O, sugerindo comportamento mais ansioso por parte do grupo ovariectomizado. Nesse mesmo critério, o grupo SO-A também se locomoveu significativamente menos comparado ao OVX-O. Assim, pode-se supor que, ainda que no período de menopausa, o ômega-3 pode contribuir no comportamento ansioso, demonstrando atividade ansiolítica, mesmo quando comparado ao grupo não menopausado. Já no parâmetro de locomoção motora vertical (rearing), não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 3: Número de locomoções horizontais e (5) número de locomoções verticais. * $p \leq 0,05$ comparados ao OVX-A. *** $p \leq 0,001$ comparado ao OVX-A. # $p \leq 0,05$ comparado ao SO-A. Estatística ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newmann-Keuls. n= 5-6.



Na dosagem de glutamato, o grupo SO-O apresentou quantidade significativamente maior desse neurotransmissor quando comparado aos grupos OVX-A, OVX-O e SO-A. Esse resultado sugere que o ômega-3 foi capaz de aumentar a quantidade do neurotransmissor glutamato, apenas no grupo falso-operado.

Figura 4: Análise estatística da dosagem de glutamato. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ comparados ao grupo SO-O. Estatística ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newmann-Keuls. n= 5-6.



CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a suplementação de ômega-3 pré e pós menopausa demonstra efeito antidepressivo e ansiolítico.

Também, que o glutamato pode ser o responsável pela melhora de memória e cognição atribuída ao ômega-3, mas não na menopausa. E ainda, o glutamato pode não estar diretamente envolvido na modulação da depressão.



Assim, mais estudos com outros delineamentos experimentais são importantes para discutir diferenças entre doses, períodos de suplementação e efeitos positivos e adversos da utilização de ômega-3, não só na menopausa, mas também em outras fases da vida.

REFERÊNCIAS

AL-AZZAWI, Farook; PALACIOS, Santiago. Hormonal changes during menopause. **Maturitas**, European, v. 63, p.135–137, jun. 2009.

BAKER, Henry J.; LINDSEY, J. Russell; WEISBROTH, Steven H. **The laboratory rat biology and disease**. 1. ed. New York: Academic Press, 1979. 445 p.

BELLO, Kayode J; FANG, Hong; FAZELI, Parastoo, et al. Omega-3 in SLE: a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of endothelial dysfunction and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**, New York, v. 33, n. 11, p. 2789–2796, nov. 2013.

BLAKE, Jennifer. Menopause: evidence-based practice. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, Canada, v. 20, n.6, p. 799-839, dec. 2006.

DAVIS, Susan R.; LAMBRINOUDAK, Irene; LUMSDEN, Maryann, et al. Menopause. **Nature**, USA, v. 1, p. 1-19, abril 2015.

FERNANDES, César Eduardo; PINHO-NETO, João Sabino de Lima; GEBARA, Otavio Celso Eluf, et al. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 91, n. 1 supl. 1, p. 1-23, 2008.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John Edward. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1042 p.

KAWASAKI, Takashi; CHAUDRY, Irshad H.. The effects of estrogen on various organs: therapeutic approach for sepsis, trauma, and reperfusion injury. Part 2: liver, intestine, spleen, and kidney. **J Anesth**, USA, v.26, p. 892–899, jun. 2012.

LAKHWANI, Lalit; TONGIA, Sudheer K; PAL, Veerendra S., et al. Ômega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in wistar rats. **Acta Pol Pharm**, India, v. 64, n. 3, p. 271-276, jun. 2007.

LOSURDO, Pasquale; GRILLO, Andrea; PANIZON, Emiliano, et al. Supplementation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Prevents Increase in Arterial Stiffness After Experimental Menopause. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, Italy, v. 19, n. 1, p. 114-120, sep. 2014.

MARTIN, Richard M; WHEELER, Benedict. W; METCALFE, Chris, et al. What was the immediate impact on population health of the recent fall in hormone replacement therapy prescribing in England? Ecological study. **J Pub Health**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 555-564, march 2010.

MORGAN-MARTINS, Maria Isabel. **Docente da UFRGS**: Reposição de Estrogênio Diminui o Dano Oxidativo, Aumenta a Atividade das Enzimas Antioxidantes e melhora a Função Cardíaca em Ratas. 2003. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

MORGAN-MARTINS, Maria Isabel; JACQUES, Simone Iahnig; HARTMANN, Renata Minuzzo, et al. Protection of estrogen in portal hypertension gastropathy: an experimental model. **Arq Gastroenterol**, São Paulo, v. 48, p. 211-216, sept. 2011.



PERVEEN, Tahira; RAZI, Faiza; HAIDER, Saida, et al. Antidepressant and Anxiolytic Effects of Cod Liver Oil in Rats. **Pak Vet J**, Pakistan, v. 33, n.1, p. 57-59, July 2013.

SAFOURY, Omar El; RASHID, Lila; IBRAHIM, Magdy. A study of androgen and estrogen receptors α , β in skin tags. **Indian J Dermatol**, Egypt, v. 55, n. 1, p. 20-24, Mar. 2010.

SANCHES, Tatiane Rodrigues; GOMES, Aline Bernardes; LOPES, Veridiana Alves, et al. Avaliação dos sintomas climatéricos na mulher em menopausa e pós-menopausa em uso de proteína isolada de soja. **J Health Sci Inst**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 169-173, Mar. 2010.

SPRITZER, Poli Mara; WENDER, Maria Celeste Osório. Terapia hormonal na menopausa: quando não usar. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 51, n. 7, p. 1058-1063, Out. 2007.

SUSSMAN, Matthew; TROCIO, Jeffrey; BEST, Craig, et al. Prevalence of menopausal symptoms among mid-life women: findings from electronic medical records. **BMC Women's Health**, USA, v. 15, p. 58, Jul. 2015.

WALF, Alicia A; FRYE, Cheryl A. Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. **Pharmacol Biochem Behav**, USA, v. 86, p. 407-414, Febr. 2007.