

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**Simone de Azevedo Bach**

**A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva**

**Porto Alegre, 2012**

Simone de Azevedo Bach

**A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Nutrição à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nutr. Martine Elisabeth Kienzle Hagen

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nutr. Júlia Dubois Moreira

Porto Alegre, 2012

Simone de Azevedo Bach

**A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Nutrição à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2012

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso “**A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva**”, elaborado por Simone de Azevedo Bach, como requisito parcial para obtenção de Grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Guerini de Souza

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Matté

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martine Elisabeth Kienzle Hagen

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha família. À minha mãe pela educação, carinho e apoio em todos os momentos da minha formação. Às minhas avós que são exemplos de amor e força. Aos meus irmãos, Patrícia, Alexander e Pedro, pessoas com personalidades admiráveis, sempre me mostrando o melhor caminho e me ajudando no que for preciso. Aos meus cunhados, Fábio e Maximília, pela disponibilidade e estímulo, sendo como irmãos de coração. A minha sobrinha Fernanda, pelos sorrisos e pela pureza, me transmitindo alegria e paz. Ao Sushi, pela fidelidade canina e companheirismo em todos os momentos. Aos demais familiares, também sempre presentes, pelo incentivo e animação.

Agradeço as minhas orientadoras Prof. Dra. Ingrid Dalira Schweigert Perry e Prof. Dra. Martine Elisabeth Kienzle Hagen por todo conhecimento passado durante a graduação e pela ajuda durante todo este período, sempre com muita paciência, disponibilidade e compreensão.

Agradeço a Prof. Dra. Júlia Dubois Moreira, que foi muito mais que uma co-orientadora, me abrindo às portas do Departamento de Bioquímica, sempre com muita dedicação, transmitindo seu conhecimento e me passando todo o seu amor pela pesquisa e pela nutrição.

Agradeço ao pessoal do laboratório 26/28 da Bioquímica. Em especial, ao Prof. Dr. Diogo O. Souza, pela oportunidade. À Gisele Hansel, Marcelo Ganzella e Pablo Pandolfo, pelo conhecimento e disponibilidade nos momentos em que a Júlia não podia estar presente. À Amaranta Ramos, Letícia Traub e Letícia Vicari pela ajuda e companheirismo. Aos funcionários do biotério, pela atenção e apoio, sendo eles parte da conclusão deste trabalho.

Agradeço a UFRGS pelo ensino de excelência e pelo estímulo a pesquisa. Ao CNPq pelo financiamento a pesquisa. A todas as professoras e professores do Curso de Nutrição da UFRGS, por todo o ensinamento transmitido, dividindo suas experiências profissionais e de vida. Aos meus colegas e amigos do Curso de Nutrição, pelo companheirismo e pela força.

Agradeço ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela excelência em saúde e por ter me propiciado uma vivência clínica extremamente rica. A todos os profissionais do hospital e da UBS, em especial as nutricionistas que me supervisionaram e me auxiliaram

durante o período do internato, ajudando na minha formação profissional e no processo de aprendizado.

Agradeço a equipe da empresa Acquaticus pelo apoio e disponibilidade durante o período de coleta de dados e durante todo o internato. À minha chefe Flávia Gomes Martinez, pela compreensão e estímulo durante este período. Aos meus pacientes, pelo carinho e incentivo para conclusão da minha segunda formação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todas as pessoas que de certa forma me ajudaram a concluir esta etapa. Aos meus amigos e amigas que me ensinaram a ver a beleza nas pequenas coisas, me ajudando a crescer como pessoa e como profissional. Cada um (a) tem um papel especial e ter vocês presentes na minha vida faz toda a diferença!

## RESUMO

Estudos estão sendo feitos para avaliar os efeitos dos ácidos graxos essenciais ômega - 3 ( $\omega$ 3) no Sistema Nervoso Central (SNC), já que estes estão envolvidos no desenvolvimento e funcionamento adequado do cérebro. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos ácidos graxos  $\omega$ 3 na formação da memória e nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo de ratos, por meio de um modelo de privação dietética de ácidos graxos  $\omega$ 3 desde a gestação até a idade adulta. Ratas Wistar fêmeas foram divididas em dois grupos: dieta ômega-3 e dieta deficiente em  $\omega$  3 e receberam dietas isocalóricas. Após o desmame, os filhotes machos permaneceram com a mesma dieta materna até a idade adulta (60 dias de vida), quando foram submetidos à análise comportamental pela tarefa de esQUIVA inibitória para avaliar a formação da memória aversiva. Doze horas após o treino na esQUIVA inibitória, os animais foram sacrificados, o hipocampo foi dissecado, sendo utilizado para avaliar: 1) perfil lipídico por cromatografia a gás; 2) e os níveis de BDNF por ensaio Elisa. A dieta deficiente em ácidos graxos  $\omega$ 3, desde o período de desenvolvimento do SNC durante a gestação até a vida adulta, levou a déficits na memória aversiva de longa duração, estando relacionada com a redução dos níveis de ácido docosahexanoico (DHA $\omega$ 3), aumento do ácido docosapentaenoico (DPA $\omega$ 6) e redução dos níveis de BDNF no hipocampo dos ratos. Nossos resultados mostram a importância dos ácidos graxos  $\omega$ 3 na manutenção dos níveis adequados de DHA $\omega$ 3 e de BDNF no hipocampo, bem como seus efeitos na persistência da memória após uma tarefa de memória aversiva. Desta forma, podemos concluir que os ácidos graxos  $\omega$ 3 possuem um papel importante no processo de formação da memória, sendo necessários mais estudos para identificar os mecanismos neuroquímicos e bioquímicos envolvidos neste processo.

Palavras- Chaves: Omega-3, BDNF, Hipocampo, Memória.

## ABSTRACT

Studies are underway to evaluate the effects of essential fatty acids omega -3 ( $\omega$ 3) in the Central Nervous System (CNS), as they are involved in the development and proper functioning of the brain. The aim of this study was to investigate the influence of  $\omega$ 3 fatty acids in memory formation and the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus of rats, using a model of dietary  $\omega$ 3 fatty acids deprivation from pregnancy to adulthood. Female Wistar rats were divided into two groups: dietary omega-3 and deficient diet  $\omega$ 3 and fed an isocaloric diet. After weaning, male offspring were kept with the same maternal diet until adulthood (60 days old), when they were analyzed by inhibitory avoidance task to assess the aversive memory formation. Twelve hours after the inhibitory avoidance training, the animals were sacrificed, the hippocampus was dissected, being used to evaluate: 1) lipid profile by gas chromatography, 2) and BDNF levels by ELISA assay. A diet deficient in  $\omega$ 3 fatty acids, since the period of CNS development during pregnancy to adulthood, led to deficits in long-term aversive memory, being related to reduced levels of docosahexaenoic acid (DHA  $\omega$ 3), increased docosapentaenoic acid (DPA  $\omega$ 6) and reduced levels of BDNF in hippocampus of rats. Our results show the importance of  $\omega$ 3 fatty acids in maintaining adequate levels of DHA  $\omega$ 3 and BDNF in the hippocampus, as well as its effects on the persistence of memory after an aversive memory task. Although, we can conclude that  $\omega$ 3 fatty acids play an important role in the process of memory formation. More studies are necessary to identify the biochemical and neurochemical mechanisms involved in this process.

**Key words:** Omega-3, BDNF, Hippocampus, Memory.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ALA – ácido  $\alpha$ -linolênico

AMPA –  $\alpha$ -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

ARA – ácido araquidônico

BDNF – fator neurotrófico derivado do encéfalo

CaMKII – enzima cinase dependente de cálcio e calmodulina tipo II

DHA – ácido docosahexaenoico

DNA – ácido desoxirribonucléico

DPA – ácido docosapentaenoico

DRI – Ingestão Diária Recomendada (do inglês Dietary Reference Intakes)

EPA – ácido eicosapentaenoico

GluRs – receptores de glutamato

iGluRs – receptores ionotrópicos de glutamato

LA – ácido linoleico

LC-PUFA – ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

LTM – memória de longa duração (do inglês *long-term memory*)

LTP – potenciação de longa duração (do inglês *long-term potentiation*)

mGluRs – receptores metabotrópicos de glutamato

mRNA – RNA mensageiro

NMDA – N-metil-D-aspartato

NPD1 – Neuroprotectina D1

PLA2 – fosfolipase A2



RNA – ácido ribonucléico

SNC – sistema nervoso central

SRC – família de proteínas cinase citosólicas

STM – memória de curta duração (do inglês *short-term memory*)

TrkB – receptor tirosina cinase B

$\omega 3$  – ácidos graxos da série ômega-3

$\omega 6$  – ácidos graxos da série ômega-6

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras Referencial Teórico

Figura 1 – Reações de dessaturação e alongamento dos ácidos graxos.....13

### Figuras Artigo Original

Figura 1 - A tarefa de esquivas inibitória foi utilizada para avaliar a LTM. A memória foi avaliada 1,5 h, 24 h e 7 dias após a sessão de treino.  $\omega 3$  - dieta adequada em  $\omega 3$ ; D - dieta deficiente em  $\omega 3$ .  $\omega 3$ , n = 20; D, n = 20. Os resultados foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil, teste de Wilcoxon foi utilizado para análise dentro dos grupos e Mann Whitney foi usado para a análise entre os grupos (\* p <0,05 em relação à respectiva sessão de treino; # p <0,05 em relação ao respectivo grupo  $\omega 3$ ).....42

Figura 2 - O conteúdo de BDNF hipocampal encontrado em animais submetidos ao contexto sem choque nas patas (basal) e 12 horas após a sessão de treino (12h de choque).  $\omega 3$  - dieta adequada em  $\omega 3$ ; D - dieta deficiente em  $\omega 3$ .  $\omega 3$ , n = 8; D, n = 7. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e Two-way ANOVA e Bonferroni como *post-hoc* foram utilizados (\* p <0,05 em relação a ambos os grupos  $\omega 3$ ).....43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de Ácidos Graxos Hipocampal.....	39
Tabela 2. Composição das Dietas.....	40
Tabela 3. Composição de Ácidos Graxos dos Lipídios das Dietas.....	41

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
1.1 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.....	12
1.1.1 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	14
1.2 BASES MOLECULARES DA MEMÓRIA.....	16
1.2.1 BDNF E MEMÓRIA.....	17
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>4 REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
<b>5 ARTIGO ORIGINAL: A PRIVAÇÃO DIETÉTICA DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 ALTERA O PERFIL LIPÍDICO E REDUZ O CONTEÚDO DE BDNF NO HIPOCAMPO DE RATOS: IMPLICAÇÕES SOBRE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA AVERSIVA DE LONGO PRAZO.....</b>	<b>27</b>
<b>APÊNDICE A – Normas da Revista Brain Research.....</b>	<b>48</b>

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

Desde a década de 20 os ácidos graxos essenciais vêm sendo estudados, devido à constatação de que a deficiência dos mesmos pode causar alterações nos indivíduos, tornando-os fundamentais para o funcionamento do organismo (BURR e BURR, 1929). Desde então, os ácidos graxos ômega-6 ( $\omega 6$ ) vem sendo estudados, enquanto os ácidos graxos ômega-3 ( $\omega 3$ ) começaram a receber uma atenção especial na década de 70.

Ácidos graxos com duas ou mais ligações duplas em sua estrutura são conhecidos como ácidos graxos essenciais poliinsaturados. Seu nome leva em consideração o número de carbonos e de insaturações da molécula e a posição da primeira ligação dupla em relação à extremidade metil, considerado o carbono Omega ( $\omega$ ). Os ácidos graxos com ligações duplas nos carbonos omega-6 ( $\omega 6$ ) e omega-3 ( $\omega 3$ ) são importantes para o bom funcionamento do organismo e são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados endogenamente pelo homem. Devido a isto, os ácidos linoleico (LA 18:2 $\omega 6$ ) e  $\alpha$ -linolênico (ALA 18:3 $\omega 3$ ) devem estar presentes na dieta para que possam ser utilizados pelos tecidos corporais, através de enzimas específicas do fígado e dos astrócitos que agem sobre eles, dando origem a ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), compostos considerados fundamentais no processo inflamatório e na defesa do organismo (MARSZALEK e LODISH, 2005) (Figura 1).

O ácido graxo linoleico (LA 18:2  $\omega 6$ ) é considerado nutriente essencial há bastante tempo (BURR e BURR, 1929; HANSEN *et al.*, 1962), sendo encontrado em abundância em óleos vegetais e podendo dar origem ao ácido araquidônico (ARA 20:4 $\omega 6$ ). O ARA está presente nos fosfolipídios das membranas celulares e possui um papel importante no sistema imunológico, originando mediadores inflamatórios como os eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos). Sintomas como retardo de crescimento, lesões de pele, insuficiência reprodutora, esteatose hepática e polidipsia estão relacionados à deficiência de ácido graxo linoleico (MARSZALEK e LODISH, 2005).

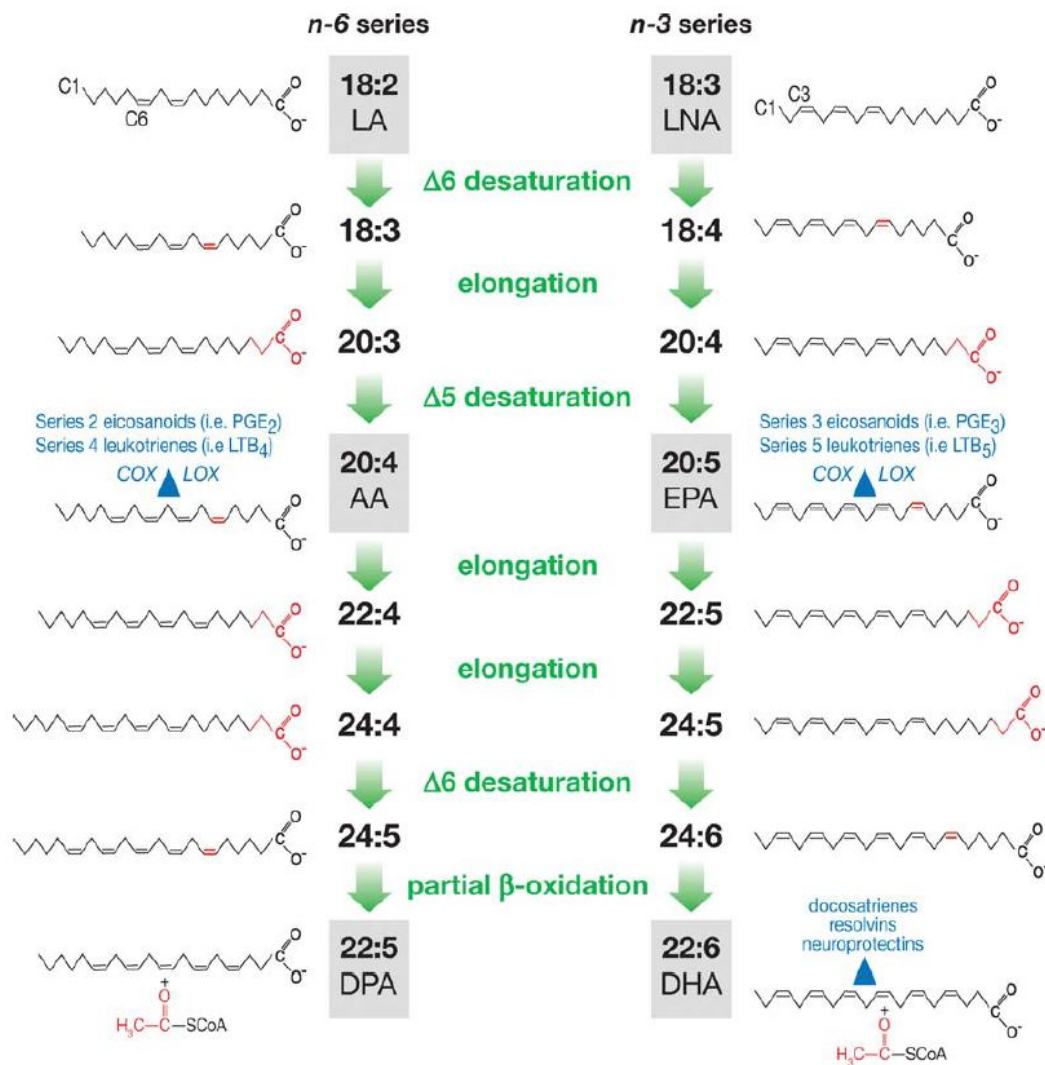


Figura 1: Reações de dessaturação e alongamento dos ácidos graxos essenciais (MARSZALEK e LODISH, 2005).

O papel do ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (ALA 18:3 $\omega$ 3) foi evidenciado mais recentemente, sendo encontrado em óleos vegetais como canola, linhaça e soja (HEIRD e LAPILLONNE, 2005). Os ácidos eicosapentaenoico (EPA 20:5 $\omega$ 3) e docosaexaenoico (DHA 22:6 $\omega$ 3) derivam desse ácido graxo, e são encontrados nos óleos de peixes, como salmão, sardinha, atum, cavalinha, arenque (SIOEN *et al.*, 2007; SIDHU, 2003) e anchoíta (MASSA *et al.*, 2012). Eles também são componentes dos fosfolipídios de membrana e possuem diversas funções no organismo. O EPA, assim como o ARA, também pode originar eicosanoides, entretanto com uma ação mais antiinflamatória no nosso organismo

(MARSZALEK e LODISH, 2005). Já o DHA é amplamente encontrado nas membranas celulares cerebrais e na retina, tendo uma função importante nestes sistemas. Deficiências visuais e problemas de aprendizado estão relacionados à deficiência destes ácidos graxos (HOLMAN *et al.*, 1982).

Os ácidos graxos  $\omega 6$  e  $\omega 3$ , para dar origem aos seus respectivos PUFAs, disputam pelas mesmas enzimas que os dessaturaram (dessaturases) e alongam (elongases) no fígado. Devido a isto, devem estar em equilíbrio na nossa alimentação, sendo considerada ideal uma relação  $\omega 6$ :  $\omega 3$  de 5:1 para que se tenha um melhor aproveitamento de ambos pelo organismo (MARSZALEK e LODISH, 2005; HEIRD e LAPILLONNE, 2005).

De acordo com as Recomendações Diárias de Ingestão (*Dietary Reference Intakes - DRIs*) a recomendação para ácidos graxos ômega-6 é de 17g/dia para homens e 12g/dia para mulheres, enquanto a recomendação de ácidos graxos ômega-3 é de 1,6g/dia para homens e 1,1g/dia para mulheres. Para a população em geral, a Organização Mundial da Saúde indica como adequada a ingestão de uma a duas porções de peixes por semana ou a ingestão de fontes vegetais de ALA para atingir a recomendação de ácidos graxos ômega-3 (WHO/FAO, 2003). Não existe, ainda, uma recomendação estabelecida pelas DRIs para EPA e DHA. Pesquisadores recomendam a ingestão total de EPA + DHA/dia em torno de 0,5g/dia a 1,8g/dia, sem especificar as quantidades ideais de consumo para cada tipo de ácido graxo ômega-3 (KRIS- ETHEERTON *et al.*, 2009). Esta recomendação pode passar a falsa ideia de que tanto o EPA como o DHA possuem a mesma função biológica. Sendo assim, uma recomendação de consumo específica para cada tipo de ácido graxo ômega-3 se torna extremamente necessária.

### 1.1.1 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O ácido docosaenoico (DHA 22:6 $\omega 3$ ) é o ácido graxo mais amplamente encontrado no SNC, tanto na retina como no cérebro (MARSZALEK e LODISH, 2005). O DHA, após ser absorvido no intestino e chegar ao fígado, chega ao cérebro ligado à albumina pela corrente sanguínea, passando a barreira hemato-encefálica pela ação de proteínas

específicas de transporte (OWADA *et al.*, 2006). Além disso, os astrócitos também possuem as enzimas necessárias para sintetizar DHA (WILLIARD *et al.*, 2001).

O DHA tem papel importante durante o desenvolvimento cerebral no período pré-natal, participando ativamente da sinaptogênese (MARTIN e BAZAN, 1992). Este ácido graxo, durante a gestação, passa da mãe para o feto através da barreira placentária, e após o nascimento, é fornecido através do leite materno e alimentação que a criança venha a receber. O período de maior crescimento cerebral humano, que ocorre do terceiro trimestre de gestação até o 18º mês de vida, está correlacionado com o aumento de DHA nos fosfolípidios de membrana do cérebro (LAURITZEN *et al.*, 2001). O DHA está presente nos fosfolípidios de membrana sináptica, principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, e nos plasmalogênios, compostos que possuem um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo (ANDRÉ *et al.*, 2005; FAROOQUI e HORROCKS, 2001). A quantidade de DHA nos fosfolípidios de membrana chega a 50% do total de ácido graxos insaturados no cérebro e retina de ratos adultos (GARCIA *et al.*, 1998). Um fornecimento inadequado de ácidos graxos  $\omega$ 3 no período pré e pós-natal leva a diminuição do conteúdo de DHA nos tecidos neurais e um aumento de ácido docosapentaenoico (DPA 22:5 $\omega$ 6), levando a déficits cognitivos e comportamentais em modelos animais (LIM *et al.*, 2005; NIU *et al.*, 2004). Já o suprimento de DHA através do leite materno tem mostrado um papel importante no desenvolvimento mental em crianças (HIBBELN *et al.*, 2007).

O DHA tem influência na atividade de várias proteínas de membrana (canais iônicos, transportadores e enzimas) e vesículas sinápticas, tendo um papel na modulação de vários sistemas de neurotransmissores. Estudos mostram que a privação de ácidos graxos  $\omega$ 3 afeta os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico (ZIMMER *et al.*, 2000; DELION *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 2010).

Em relação ao sistema glutamatérgico, foi demonstrado que a privação de ácidos graxos ômega-3 afeta a liberação de glutamato, reduzindo esta liberação em animais deficientes em DHA (MOREIRA *et al.*, 2010). Além disso, a privação de ácidos graxos ômega-3 durante o desenvolvimento resulta em diminuição acentuada das sinapses e redução das subunidades do receptor de glutamato no hipocampo de filhotes com 18 dias de idade com disfunção concomitante da potenciação de longa duração, um mecanismo celular subjacente ligado à aprendizagem e memória (CAO *et al.*, 2009).



Estudo mostrou que a privação de ômega-3 está relacionada a déficits de memória na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos adultos (MOREIRA *et al.*, 2010). Já, um estudo em humanos encontrou um declínio cognitivo mais lento em indivíduos adultos suplementados com DHA, mostrando talvez que uma suplementação mesmo tardia possa ter efeito importante na cognição (DANTHIIR *et al.*, 2011).

Além do papel sobre a funcionalidade cerebral, os ácidos graxos ômega-3 também possuem um importante papel neuroprotetor em algumas doenças neurodegenerativas. Em situações de dano neuronal e mediante ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), este ácido graxo pode dar origem a um composto denominado Neuroprotectina D1 (NPD1), um docosanoide que tem um papel neuroprotetor no SNC. A NPD1, ao interagir diretamente com o DNA, pode ativar cascatas de sinalização celular anti-apoptóticas, prevenindo assim a morte neuronal (STARK e BAZAN, 2011).

## 1.2 BASES MOLECULARES DA MEMÓRIA

A concepção de memória existe desde o tempo de Aristóteles, mas somente nos últimos 50 anos os cientistas têm estudado a anatomia e as bases celulares ligadas ao processo complexo de formação de memória (SIEGEL *et al.*, 2006). As bases neuronais da memória podem resultar de modificações sinápticas, que por sua vez levam a ativação da conversão da atividade neuronal em segundos mensageiros intracelulares, causando alterações em proteínas sinápticas já existentes (BEAR *et al.*, 2007). A memória está envolvida com as regiões do neocórtex e estruturas do lobo médio temporal, especialmente o hipocampo. A estimulação elétrica de alta frequência de uma via excitatória no hipocampo produz um aumento de longa duração no potencial excitatório das sinapses estimuladas. Este efeito é conhecido como potenciação de longa duração (do inglês *long-term potentiation* ou LTP) (LISMAN, 2002; BEAR *et al.*, 2007) e ela consiste de um aumento de respostas pós-sinápticas durante muitas horas, dias ou semanas após uma breve estimulação repetitiva de aferentes pré-sinápticos (IZQUIERDO *et al.*, 2008; BARNES *et al.*, 1979).

Lesões no lobo temporal, principalmente na região do hipocampo, têm sido relacionadas a dificuldades de aprendizado. Estudos clínicos antigos, juntamente com estudos experimentais com animais, sugerem que a região do hipocampo é crucial no processo de

formação e consolidação da memória de curta duração em memória de longa duração (HALGREN *et al.*, 1978, BEKINSCHTEIN, 2010). Uma das regiões mais estudadas do hipocampo é a região CA1, considerada como uma das mais importantes para a formação de memória devido a uma sequência de eventos moleculares que ocorrem nesta região (ZOLA-MORGAN *et al.*, 1986; IZQUIERDO *et al.*, 2008).

Estudos mostram que o processo de memória ocorre em pelo menos duas fases, sendo uma independente de síntese de proteínas e mRNA (memória de curta duração – 1h a 3h pós evento) e uma dependente da síntese proteica e de mRNA, que dura várias horas a dias, semanas ou mais (memória de longa duração) (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

A suplementação dietética de DHA facilita a plasticidade sináptica na região do hipocampo após um protocolo de LTP. O aumento da transmissão sináptica pode fornecer uma correlação fisiológica para a aprendizagem e melhora da memória espacial observada após a suplementação com DHA (CONNOR *et al.*, 2012). Além disso, os ácidos graxos  $\omega 3$  estão envolvidos no metabolismo energético cerebral, melhorando a geração de ATP mitocondrial na área CA1 do hipocampo, estando relacionados com a ativação neuronal nesta região (HARBEBY *et al.*, 2012).

Alguns estudos relacionam os ácidos graxos  $\omega 3$ , principalmente o DHA, com o sistema glutamatérgico, estando este sistema relacionado a diversas atividades cerebrais, como memória, aprendizado, desenvolvimento e envelhecimento cerebral (IZQUIERDO *et al.*, 2006; TZINGOUNIS e WADICHE, 2007). A suplementação de DHA é capaz de reverter a diminuição de subunidades de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA que ocorre em animais envelhecidos (DYALL *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* mostram que o DHA pode regular o transporte de glutamato de maneira dose-dependente em situações de dano cerebral, além de participar da modulação dos transportadores de glutamato (GRITAL *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*; 2010; BERRY *et al.*, 2005). O aumento de DHA também se mostrou capaz de restaurar a LTP em hipocampo de ratos envelhecidos, além de normalizar a liberação de glutamato que estava reduzida nestes animais (MCGAHON *et al.*, 1999).

### 1.2.1 BDNF E MEMÓRIA

A formação de memória e LTP são dependentes da síntese do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina relacionada com a plasticidade sináptica e fundamental para o desenvolvimento cerebral, modulação das sinapses e arborização dendrítica (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2008). O aprendizado e a memória de longa duração dependem da síntese de proteínas na região CA1 do hipocampo, como o aumento da expressão da neurotrofina BDNF (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; ROSSATO *et al.*, 2007).

O BDNF, quando ativa seus receptores tirosina cinase B (TrkB), leva a ampliação da sinalização glutamatérgica por aumento da fosforilação dos receptores NMDA (subunidades NR1 e NR2), contribuindo assim para a formação da memória (KAFITIZ *et al.*, 1999). Além disso, os receptores TrkB ativam a via da ERK, necessária para a neuritogênese (SELCHER, 2003, SHARMA *et al.*, 2006, ALONSO, 2004).

O BDNF regula a sobrevivência e a diferenciação de populações específicas de neurônios no desenvolvimento e no cérebro adulto (POO, 2001; ALONSO *et al.*, 2002). Ele é importante para a neuritogênese como um todo, mas particularmente para a geração de alterações morfológicas em sinapses da região CA1 que determinam manutenção em longo prazo da LTP (SANTI *et al.*, 2006, REX *et al.*, 2007, LYNCH *et al.*, 2007). É importante ressaltar que a sinalização da mTOR, estimulada por BDNF e ERKs, é crucial para a LTP, sugerindo que a sinalização BDNF / TrkB no hipocampo desempenha um papel crucial na aprendizagem e na memória (TANG *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2003).

O efeito do BDNF sobre a plasticidade sináptica e mecanismos moleculares da memória envolve a ativação de vias de sinalização celular, como a via das MAPK, PI3K e mTOR, além de proteínas cinase citosólicas, como a proteína FYN (YAMADA *et al.*, 2003; SALTER e KALIA, 2004; TANG *et al.*, 2002).

Dietas adequadas em ácidos graxos  $\omega$ 3 promoveram a maturação de neurônios e neurogênese em ratos adultos e restauraram os níveis de BDNF no hipocampo de ratos em um modelo de trauma cerebral (WU *et al.*, 2008). Estudo mostra que a suplementação de ácidos graxos  $\omega$ 3 pode fornecer proteção contra plasticidade reduzida e capacidade de aprendizagem diminuída após dano oxidativo, normalizando níveis de BDNF e modulando atividade da proteína de ligação cAMP-elemento responsivo (CREB) (WU *et al.*, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar de termos muitas evidências acerca do papel do BDNF sobre os processos de formação da memória, bem como possíveis vias de sinalização envolvidas, é de grande importância entendermos de que maneira alguns componentes dietéticos, como os ácidos graxos ômega-3, podem influenciar os níveis de BDNF, bem como saber os efeitos da ingestão de  $\omega$ 3 na formação da memória de curta e longa duração. Este conhecimento pode ser útil no futuro, tanto na prevenção como no tratamento de doenças neurodegenerativas onde a perda da memória seja um fator relevante, como na doença de Alzheimer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência dos ácidos graxos  $\omega 3$  na formação da memória e nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos, por meio de um modelo de privação dietética de ácidos graxos  $\omega 3$  desde a gestação até a idade adulta.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da privação dietética de ácidos graxos  $\omega 3$  sobre a memória aversiva em ratos Wistar, utilizando a tarefa de esquiva inibitória;
- Analisar a influência da privação dietética de ácidos graxos  $\omega 3$  no perfil de ácidos graxos hipocampal por meio de cromatografia gasosa;
- Verificar a influência da privação dietética de ácidos graxos  $\omega 3$  sobre o conteúdo de BDNF hipocampal, tanto no nível basal como após a tarefa de esquiva inibitória por meio de ensaio ELISA.

#### 4 REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

ALONSO, M.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. **Cell Mol Neurobiol.** v. 22(5-6):663-74, 2002.

ALONSO, M.; MEDINA, J.H.; POZZO-MILLER, L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Learn Mem.** v. 11(2):172-8, 2004.

ANDRÉ, A. ; JUANÉDA, P.; SÉBÉDIO, J.L.; CHARDIGNY, J.M. Plasmalogen metabolism-enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. **Biochimie.** v. 88, p. 103-111. 2005.

BANTLE, J.P.; WYLIE-ROSETT, J.; ALBRIGHT, A.L.; APOVIAN, C.M.; CLARK, N.G.; FRANZ, M.J.; HOOGWERF, B.J.; LICHTENSTEIN, A.H.; MAYER-DAVIS, E.; MOORADIAN, A.D.; WHEELER, M.L. Nutrition recommendations and Interventions for Diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabet Care.** Alexandria VA, v. 31, p. 561-578, jan. 2008.

BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. **J Comp Physiol Psychol.** v. 93: 74–104, 1979.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience: Exploring the Brain.** 3<sup>a</sup> edition. Chapter 25: Molecular Mechanisms of Learning and Memory. 2007.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M. BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron.** v. 53, n 2, p. 261-77, 2007.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist.** v. 14, n.2, p.147-56, 2008.

BEKINSCHTEIN, P.; KATCHE, C.; SLIPCZUK, L.; GONZALEZ, C.; DORMAN, G.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. **Neurotox Res.** v. 18, n3-4, p.377-85, 2010.

BERRY, C.B.; HAYES, D.; MURPHY, A.; WIESSNER, M.; RAUEN, T.; MCBEAN, G.J. Differential modulation of glutamate transporters GLT-1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. **Brain Res.** v. 1037, p. 123-133. 2005.

BURR, G.O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J Biol Chem Baltimore MD.** v. 82, p. 345-367. 1929.

CAO, D.; KEVALA, K.; KIM, J.; MOON H.S.; JUN, S.B.; LOVINGER, D.; KIM, H.Y. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **J Neurochem.** v. 111, n 2, p. 510-21, 2009.

CONNOR, S.; TENORIO, G.; CLANDININ, M.T.; SAUVÉ, Y. DHA supplementation enhances high-frequency, stimulation-induced synaptic transmission in mouse hippocampus. **Appl Physiol Nutr Metab.** v. 37, n.5, p. 880-7, 2012.

DANTHIIR, V.; BURNS N.R.; NETTELBECK, T.; WILSON, C.; WITTERT, G.. The older people, omega-3, and cognitive health (EPOCH) trial design and methodology: A randomised, double-blind, controlled trial investigating the effect of long-chain omega-3 fatty acids on cognitive ageing and wellbeing in cognitively healthy older adults. **Nutrit Journal.** v. 10, p. 1-18, 2011.

DELION, S.; CHALON, S.; GUILLOTEAU, D.; BESNARD, J.C.; DURAND, G. Alpha-linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. **J Neurochem.** v.66, p. 1582-1591, 1996.

DYALL, S.C.; MICHAEL, G.J.; WHELPTON, R.; SCOTT, A.G.; MICHAEL-TITUS, A.T. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age related decrease in GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. **Neurobiol Aging.** New York NY. v. 28, n. 3, p. 424-439. 2006.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. **J Mol Neurosci.** Totowa NJ. v. 16, p. 263-272. 2001.

GARCIA, M.C.; WARD, G.; MA, Y.C.; SALEM, N. JR.; KIM, H.Y. Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylethanolserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. **J Neurochem.** New York NY. v. 70, p. 24-30. 1998.

GRINTAL, B.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; LAVIALLE, M.; VANCASSEL, S.; BRETON, S.; DENIS, I. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. **J Neurochem.** New York NY, v. 54, n. 8, p. 535-543. Jul. 2009.

HALGREN, E.; WALTER, R. D.; CHERLOW, A. G.; CRANDALL, P. H. Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. **Brain.** v. 101, p. 83-117, 1978.

HANSEN, A.E.; STEWART, R.A.; HUGHES, G.; SODERHJELM, L. The relation of linoleic acid to infant feeding. **Act of paediatric.** v. 51, n. 137, p. 1-41. 1962.

HARBEY, E.; JOUIN, M.; ALESSANDRI, J.M.; LALLEMAND, M.S; LINARD, A.; LAVIALLE, M.; HUERTAS, A.; CUNNANE, S.C.; GUESNET, P. n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v. 86, n. 6, p. 211-20, 2012.

HEIRD, W.C.; LAPILLONNE, A. The role of essential fatty acids in development. **Annu Rev Nutr.** Palo Alto CA. v. 25, p. 549-571. 2005.

HIBBELN, J. R.; DAVIS, J.M.; STEER, C.; EMMETT, P.; ROGERS, I.; WILLIAMS, C.; GOLDING, J. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. **Lancet**. v. 369, n. 9561, p. 578-585, fev. 2007.

HOLMAN, R.T; JOHNSON, S.B.; HATCH, T.F. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. **Am J Clin Nutr**. Bethesda MD. v. 35, n. 3, p. 617-623. 1982.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**. v. 68, n.3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R., ROSSATO, J.I; BONINI, J.S; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**. v. 29, n.9, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R., ROSSATO, J.I; BONINI, J.S; MELLO, P.; BENETTI, F.; COSTA, J.C.; MEDINA, J.H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An Acad Bras Cienc**. v. 80, n.1, p. 115-27, 2008.

KAFITZ, K.W.; ROSE, C.R.; THOENEN, H.; KONNERTH, A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. **Nature**. v. 401(6756), p. 918-21, 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; GRIEGER, J.A.; ETHERTON, T.D. Dietary reference intakes for DHA and EPA. **Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids Edinburgh**. v. 81, n. 2-3, p. 99-104, ago./set. 2009.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; MICHAELSEN, K.S. The essentiality of long chain omega-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog Lipid Res**. v.40, p. 1-94. 2001.

LICHTENSTEIN, A.H.; APPEL, L.J.; BRANDS, M.; CARNETHON, M.; DANIELS, S.; FRANCH, H.A.; FRANKLIN, B.; KRIS-ETHERTON, P.; HARRIS, W.S.; HOWARD, B.; KARANJA, N.; LEFEVRE, M.; RUDEL, L.; SACKS, F.; VAN HORN, L.; WINSTON, M.; WYLIE-ROSETT, J. .Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, Dallas TX, v. 114, n. 1, p. 82-96, jul. 2006.

LIM, S.Y.; HOSHIBA, J.; SALEM, N. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. **J Neurochem**. New York NY. v. 95, n. 3, p. 848-857. 2005<sup>a</sup>.

LIM, S.Y.; DOHERTY, J.D.; MCBRIDE, K.; MILLER-IHLI, N.J.; CARMONA, G.N.; STARK, K.D.; SALEM, N. JR. Lead exposure and (n-3) fatty acid deficiency during rat neonatal development affect subsequent spatial task performance and olfactory discrimination. **J Nutr Bethesda MD**. v. 135, n. 5, p. 1019-1026. 2005<sup>b</sup>.



- LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nat Rev Neurosci.** v. 3, n.3, p.175-90, 2002.
- LYNCH, G.; REX, C.S.; GALL, C.M. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. **Neuropharmacol.** v. 52, n.1, p. 12-23, 2006.
- MARSZALEK, J.R. e LODISH, H.F. Docosahexaenoic Acid, Fatty Acid-Interacting Proteins, and Neuronal Function: Breastmilk and Fish are Good for You. **Ann Rev Cell Dev Biol.** Palo Alto CA, v. 21, p. 663-657, 2005.
- MARTIN, R.E., BAZAN, N.G. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. **J. Neurochem.,** New York NY. v. 59, p. 318-325. 1992.
- MASSA, A.E. , MANCA, E. , YEANNES, M.I . Desenvolvimento de método de índice de qualidade para o biqueirão (*Engraulis anchoita*) armazenados em gelo: avaliação de sua vida de prateleira por métodos químicos e sensoriais. **Aliment Sci Tecno Int.** v. 18, n.4, p. 339-51, 2012.
- MCGAHON, B.M.; MARTIN, D.S.; HORROBIN, D.F.; LYNCH, M.A. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids. **Neuroscie.** v. 94, n.1, p.305-14, 1999.
- MOREIRA, J.D.; KNORR, L.; GANZELLA, M.; THOMAZI, A.P.; SOUZA, C.G.; SOUZA, D.G.; PITTA, C.F.; SOUZA, T.M.; WOFCHUK, S.; ELISABETSKY, E.; VINADÉ, L.; PERRY, M.L.S.; SOUZA, D.O. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: Relevance for behavior alternations. **Neurochem Int.** v. 56(6-7), p. 753-9, 2010.
- NIU, S.L.; MITCHELL, D.C.; LIM, S.Y.; WEN, Z.M.; KIM, H.Y.; SALEM, N.; LITMAN, B.J. Reduced G-protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. **J Biol Chem.** v. 279, n.30, p. 31098-31104, 2004.
- OWADA, Y.; ABDELWAHAB, S.A.; KITANAKA, N.; SAKAGAMI, H.; TAKANO, H.; SUGITANI, Y.; SUGAWARA, M.; KAWASHIMA, H.; KISO, Y.; MOBARAKEH, J.I.. Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. **Eur J Neurosci.,** n.24, p. 175-187, 2006.
- POO, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci.** v. 2, n.1, p. 24-32, 2001.
- REX, C.S.; LIN, C.Y.; KRAMÁR, E.A.; CHEN, L.Y.; GALL, C.M.; LYNCH, G. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. **J Neurosci.** v. 27, n.11, p.3017-29, 2007.
- ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, R.M.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem.** v. 14, p. 36-46, 2007.
- SALTER, M.W.; KALIA, L.V. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. **Nat Rev Neurosci.** v. 5, n. 4, p. 317-28, 2004.

SANTI, S.; CAPELLO, S.; RICCIO, M.; BERGAMI, M.; AICARDI, G.; SCHENK, U.; MATTEOLI, M.; CANOSSA, M. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. **EMBO J.** v. 25, n. 18, p. 4372-80, 2006.

SELCHER, J.C.; WEEBER, E.J.; CHRISTIAN, J.; NEKRASOVA, T.; LANDRETH, G.E.; SWEATT, J.D. A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1. **Learn Mem.** v.10, n.1, p.26-39, 2003.

SHARMA, S.K.; SHERFF, C.M.; STOUGH, S.; HSUAN, V.; CAREW, T.J. A tropomyosin-related kinase B ligand is required for ERK activation, long-term synaptic facilitation, and long-term memory in aplysia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 103, n. 38, p. 14206-10, 2006.

SIDHU, K.S. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. **Regul Toxicol Pharmacol.** v. 38, n. 3, p.336-44, 2003.

SIEGEL, G.J.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.T.; PRICE, D.L. **Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** 7<sup>a</sup> edition. Chapter 53: Learning and Memory. 2006.

SIOEN, I., DE HENAUW, S., VERBEKE, W., VERDONCK, F., WILLEMS, J.L., VAN CAMP, J. Fish consumption is a safe solution to increase the intake of long-chain n-3 fatty acids. **Public Health Nutr.** v. 11, n. 11, p. 1107-16, 2008.

STARK, D.T.; BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models. **Mol Neurobiol.** v. 43, n. 2, p. 131-8, 2011.

TANG, S.J.; REIS, G.; KANG, H.; GINGRAS, A.C.; SONENBERG, N.; SCHUMAN, E.M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 99, n. 1, p. 467-72, 2002.

TZINGOUNIS, A.V.; WADICHE, J.I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 8, p. 935-947, dez. 2007.

WHO/FAO Expert Consultation, 2003. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases.** WHO Technical Reports Series. 916.

WILLIARD, D.E.; HARMON, S.D.; KADUCE, T.L.; PREUSS, M.; MOORE, S.A.; ROBBINS, M.E.; SPECTOR, A.A. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. **J Lipid Res.** Bethesda MD. v. 42, n. 9, p. 1368-1376. 2001.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscie.** v. 155, p. 751-759, 2008.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. **J Neurotraum.** v. 21, p. 1457–1467, 2004.

YAMADA, K.; NABESHIMA T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. **J Pharmacol Sci.** v. 91, n.4, p. 267-70, 2003.

ZIMMER, L.; DELION- VANCASSEL S.; DURAND, G.; GUILLOTEAU, D.; BODARD, S.; BESNARD, J.C; CHALON, S. . Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **J Lipid Res.** v. 41, n. 1, p. 32-40, 2000.

ZOLA- MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to the CA1 field of the hippocampus. **J Neuroscien.** v. 6, p. 2950–2967, 1986.

## **5 ARTIGO CIENTÍFICO**

Artigo escrito segundo as normas da revista Brain Research

Deficiência dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva.

Simone de Azevedo Bach<sup>a</sup>, Júlia D. Moreira<sup>a,d</sup>, Letícia Vicari de Siqueira<sup>a</sup>, Alexandre P. Müller<sup>a</sup>, Vanessa Marques Lague<sup>a</sup>, Jean P. Oses<sup>b</sup>, Andréia Quatrim<sup>c</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>c</sup>, Marcos L. S. Perry<sup>a</sup>, Diogo O. Souza<sup>a</sup>, Martine Elisabeth Kienzle Hagen<sup>d</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Psicologia, Centro de Ciência Biológica e Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Almirante Barroso 1202, CEP 96010-280, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência do Alimento, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Professora adjunta do Curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Contato do autor: Tel: +55 51 33085559; fax: +55 51 33085540.

Correio eletrônico: [juliamoreira@gmail.com.br](mailto:juliamoreira@gmail.com.br) (J. D. Moreira)

## Resumo

Os ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$  3 são de suma importância para o desenvolvimento e a adequada função cerebral. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos ácidos graxos  $\omega$  3 na formação da memória aversiva e os níveis de BDNF no hipocampo. Ratas Wistar fêmeas foram divididas em dois grupos: dieta ômega-3 ( $\omega$  3) ou dieta deficiente em  $\omega$  3 (D) e receberam dietas isocalóricas. Após o desmame, os filhotes machos foram mantidos com a mesma dieta materna até a idade adulta (60 dias de vida), quando foram submetidos à análise comportamental pela tarefa de esquiava inibitória para avaliar a formação da memória aversiva. Doze horas após o treino na esquiava inibitória, os animais foram sacrificados, o hipocampo foi dissecado, sendo utilizado para avaliar: 1) perfil lipídico por cromatografia a gás; 2) e os níveis de BDNF por ensaio Elisa. O grupo D apresentou déficits de memória, observando uma extinção da memória persistente de longa duração (7 dias após o treino), em conjunto com uma diminuição do conteúdo de DHA (22:6  $\omega$ 3), dos níveis de BDNF e aumento dos níveis de DPA (22:5  $\omega$ 6) no hipocampo. Os resultados sugerem que os ácidos graxos  $\omega$ 3 são importantes na síntese de BDNF, o que pode influenciar na persistência da memória. Mais investigações precisam ser realizadas para elucidar a influência dos ácidos graxos  $\omega$ 3 na melhora da cognição e função cerebral.

**Palavras-chaves:** Omega-3, BDNF, Hipocampo, Memória.

## Abstract

The  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids are extremely important for proper brain function and development. The aim of this study was to evaluate the influence of  $\omega$ 3 fatty acids in aversive memory formation and BDNF content in the hippocampus. Female Wistar rats were divided into two groups: dietary omega-3 ( $\omega$  3) or deficient diet  $\omega$  3 (D) and fed an isocaloric diet. After weaning, male litters were kept with the same maternal diet until adulthood (60 days after birth), when they were submitted to inhibitory avoidance task to evaluate aversive memory formation. Twelve hours after training session, animals were sacrificed, the

hippocampus was dissected and used to assess: 1) lipids profile by gas chromatography; 2) and BDNF levels by ELISA assay. Group D presented memory deficits in persistence of memory, seen in 7 days; they also presented a decreased in DHA (22:6  $\omega$ 3) content and in BDNF levels in the hippocampus, with a concomitant increase in DPA (22:5  $\omega$ 6). The results suggest that  $\omega$ 3 fatty acids are important to the synthesis of BDNF, which may influence the persistence of memory. More investigations need to be performed to elucidate the influence  $\omega$  3 fatty acids in improving cognition and brain function.

**Key words:** Omega-3, BDNF, Hippocampus, Memory.

## 1. Introdução

Os processos de formação da memória podem ser divididos, de maneira simplista, em duas fases: uma fase independente da síntese de proteína e mRNA que dura de 1-3h (memória de curto prazo) e uma fase dependente da síntese de proteína de mRNA e que dura de várias horas a dias, semanas ou até mais (memória de longo prazo) (Izquierdo e Medina 1997; McGaugh, 2000). Muitos eventos moleculares no hipocampo influenciam a formação da memória e são importantes na restauração da Potenciação de Longa Duração (LTP), considerada um modelo das bases moleculares da memória (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2008; Lisman et al., 2002).

Estudos têm mostrado relação importante entre dieta com LC-PUFAs  $\omega$ 3, saúde cerebral e memória, já que os ácidos graxos ômega-3 parecem ter um papel fundamental no desenvolvimento cerebral (Moreira et al., 2010; Marszalec et al., 2005; Martin e Bazan, 1992). Entre os PUFAs  $\omega$ 3, o DHA (docosaenoico) é o ácido graxo mais abundante no SNC e tem papel importante na função cerebral, tanto durante o desenvolvimento cerebral no período pré-natal como também no pós-natal, participando ativamente da sinaptogênese e arborização dendrítica (Martin e Bazan, 1992).

O período de maior crescimento cerebral humano, que se estende do terceiro trimestre de gestação até o 18º mês de vida, está correlacionado com o aumento de DHA nos fosfolipídios de membrana do cérebro (Lauritzen et al., 2001). Um fornecimento inadequado de ácidos graxos  $\omega$ 3 no período pré e pós-natal leva à diminuição do conteúdo de DHA nos

tecidos neurais, levando a déficits cognitivos e comportamentais em modelos animais, e o suprimento de DHA através do leite materno tem mostrado melhora no desenvolvimento mental em crianças (Hibbeln et al., 2007; Lim et al., 2005; Niu et al., 2004).

O DHA está presente nos fosfolipídios de membrana sináptica, principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, e nos plasmalogênios, compostos que possuem um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo (André et al., 2005; Farooqui e Horrocks, 2001). A quantidade de DHA nos fosfolipídios de membrana chega a 50% do total de ácido graxos insaturados no cérebro e retina de ratos adultos (Garcia et al., 1998). Um fornecimento inadequado de ácidos graxos  $\omega 3$  no período pré e pós-natal leva à diminuição do conteúdo de DHA nos tecidos neurais e um aumento de ácido docosapentaenoico (DPA 22:5 $\omega 6$ ), levando a déficits cognitivos e comportamentais em modelos animais (Lim et al, 2005; Niu et al, 2004).

A formação de memória e LTP dependem da síntese do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina relacionada com a plasticidade sináptica e fundamental para o desenvolvimento cerebral, modulação das sinapses e arborização dendrítica (Bekinschtein et al., 2008). O processo de aprendizado/ formação da memória e sua persistência/manutenção dependem da síntese de proteínas na região CA1 do hipocampo, como o aumento da expressão da neurotrofina BDNF (Bekinschtein et al., 2007; Rossato et al., 2009).

O BDNF, quando ativa seus receptores tirosina cinase B (TrkB), leva a ampliação da sinalização glutamatérgica por aumento da fosforilação dos receptores NMDA, contribuindo assim para a formação da memória (Kafitiz et al., 1999). O efeito do BDNF sobre a plasticidade sináptica e mecanismos moleculares da memória envolve a ativação de vias de sinalização celular, como a via das MAPK, PI3K, FYN e mTOR (Yamada et al., 2003; Salter e Kalia, 2004; Tang et al. 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da privação de ácidos graxos  $\omega 3$  desde a gestação até a idade adulta na memória de longa duração em uma tarefa de memória aversiva, e avaliar o perfil lipídico hipocampal bem como os níveis de BDNF no hipocampo dos ratos.



## 2. Resultados

O perfil de ácidos graxos do hipocampo foi demonstrado na Tabela 1. Somente os ácidos graxos com teores maiores do que 0,5% foram considerados. O grupo deficiente em  $\omega 3$  (D) teve uma diminuição de 24% no conteúdo de DHA (22:6  $\omega 3$ ) ( $p < 0,05$ ) no hipocampo de ratos adultos quando comparado ao grupo da dieta ômega-3 ( $\omega 3$ ). Também foi observado um aumento concomitante do ácido docosapentaenoico (DPA 22:5  $\omega 6$ ) no conteúdo de ácidos graxos do hipocampo dos animais do grupo D ( $p < 0,05$ ).

A tarefa de esQUIVA inibitória utilizando um choque 0,7 mA de intensidade foi realizada com o intuito de avaliar a persistência da memória (Figura 1), bem como evitar possíveis confusões de interpretação, uma vez que já foi demonstrado que com intensidades de choque menores, os animais submetidos a estas dietas têm um aprendizado diferente (Moreira et al., 2010). A persistência da memória (7 dias após a sessão de treino), observada no grupo  $\omega 3$ , foi abolida no grupo D ( $p < 0,001$ , em comparação com grupo  $\omega 3$ ). Em relação às sessões de testes 1,5h e 24h após treino houve diferença significativa no tempo de latência em relação ao treino em ambos os grupos, sem diferença significativa entre eles.

O conteúdo de BDNF no hipocampo, medido 12h após a sessão de treino em animais submetidos ao contexto sem choque nas patas, estava reduzido no grupo D quando comparados com grupo  $\omega 3$  (Figura 2,  $p < 0,05$ ). Em relação aos animais que foram submetidos ao contexto com o choque, o conteúdo BDNF permaneceu reduzido no grupo D quando comparado ao grupo  $\omega 3$ , mostrando que o conteúdo de BDNF manteve o mesmo padrão em relação às dietas, independentemente do choque.

## 3. Discussão

No presente estudo, observou-se que a deficiência de ácidos graxos  $\omega 3$  aboliu a persistência de memória (presente no grupo  $\omega 3$ ), possivelmente relacionada com a diminuição no conteúdo de DHA e de BDNF no hipocampo, apontando para a relevância de que uma dieta com ácidos graxos  $\omega 3$  ajuda na plasticidade cerebral e na persistência da memória.

Estudos demonstraram que a redução de ácidos graxos  $\omega 3$  na dieta alterou o perfil de ácidos graxos nas estruturas cerebrais, especialmente na região do hipocampo, com uma redução no DHA  $\omega 3$  e um aumento na DPA  $\omega 6$  nos fosfolipídios de membranas (Miyazawa et al., 2010; Aid et al., 2003; Chung et al., 2008; Mathieu et al., 2008; Fedorova et al., 2009), levando a déficits cognitivos e comportamentais em modelos animais (Lim et al., 2005; Niu et al., 2004) e resultando em uma diminuição na formação da memória e LTP (Moriguchi et al., 2000; Garcia-Calatayud et al., 2005; Chung et al., 2008; Cao et al., 2009; Fedorova et al., 2009). Em nosso estudo, observou-se que a abolição da persistência da memória após um estímulo aversivo também foi associada com uma diminuição dos níveis de DHA  $\omega 3$  hipocampal e aumento no teor de DPA  $\omega 6$  nos animais deficientes em  $\omega 3$ .

No presente estudo, foi mostrado que ambos os grupos após um choque com intensidade de 0,7 mA apresentaram desempenho semelhante em 1,5 h e 24 horas após a sessão de treino, mas a persistência da memória foi abolida no grupo D. Estudo anterior, utilizando o mesmo protocolo dietético, porém com um choque mais fraco (0,4 mA), mostrou que ratos deficientes em  $\omega 3$  também apresentam prejuízo na performance da tarefa de esQUIVA inibitória em comparação com o grupo  $\omega 3$ , tanto na memória de curta duração quanto na persistência da memória (Moreira et al., 2010).

Em nosso estudo, observou-se também que o conteúdo de BDNF do hipocampo foi reduzido no grupo deficiente em  $\omega 3$ , independentemente da tarefa comportamental, o que pode ter contribuído para a abolição da persistência da memória encontrada no grupo D. Outro estudo demonstrou que a síntese de BDNF no hipocampo de ratos é necessária durante a janela de tempo em torno de 12h após o treinamento para que haja a persistência da memória (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2008). Pesquisas anteriores relataram uma diminuição dos níveis de BDNF e de mRNA no estriado e no córtex frontal de animais submetidos a uma dieta deficiente em  $\omega 3$  (Miyazawa et al., 2010; Rao et al., 2007). Bousquet e colaboradores (2009) mostraram que o aumento da expressão do mRNA da neurotrofina BDNF e do seu receptor TrkB também foram associados ao efeito neuroprotetor dos ácidos graxos  $\omega 3$ .

Dietas adequadas em ácidos graxos  $\omega 3$  promoveram a maturação de neurônios e neurogênese em ratos adultos e restauraram os níveis de BDNF no hipocampo de ratos em um modelo de trauma cerebral (Wu et al., 2008). A suplementação de ácidos graxos  $\omega 3$  forneceu

proteção contra plasticidade reduzida e capacidade de aprendizagem diminuída após dano oxidativo, normalizando os níveis de BDNF e modulando atividade do fator de transcrição CREB (Wu et al., 2004). Isto também pode ter relação com os resultados encontrados no presente estudo, já que os níveis de BDNF não tiveram relação direta com a tarefa comportamental, e sim com a dieta consumida.

#### **4. Conclusões**

Os resultados mostraram que a deficiência de ácidos graxos DHA  $\omega$ 3 causou alteração no perfil lipídico e diminuição do conteúdo de BDNF do hipocampo dos ratos, sendo que estas alterações podem estar relacionadas com déficits na persistência da memória. Devido ao complexo mecanismo envolvido no processo de formação da memória, mais investigações precisam ser realizadas para elucidar o papel dos ácidos graxos  $\omega$ 3 neste processo, bem como os mecanismos bioquímicos e neuroquímicos envolvidos nesta regulação.

#### **5. Procedimento Experimental**

##### **5.1 Animais**

Duas semanas antes do período de acasalamento, para controlar os níveis de PUFA  $\omega$ -3 tanto no leite materno quanto na dieta após o nascimento, ratas Wistar fêmeas fornecidas pelo biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram alojadas em ambiente com controle de temperatura (21-22°C), com ciclo dia / noite de 12h, e comida e água *ad libitum*. As fêmeas foram divididas em dois grupos: dieta  $\omega$ -3 ( $\omega$ 3) ou dieta deficiente em  $\omega$ 3 (D). As dietas foram preparadas em nosso laboratório e disponibilizadas aos animais diariamente.

Após o período de 2 semanas, ratos machos fornecidos pelo mesmo biotério foram colocados junto às fêmeas (duas fêmeas e um macho por caixa) para o acasalamento. Quando prenhas, as fêmeas eram colocadas em uma caixa isolada e diariamente verificava-se o

nascimento dos filhotes. Na primeira semana de vida após o nascimento, realizava-se a padronização das ninhadas (7 animais/ninhada), a fim de que se tivesse o mesmo número de filhotes. Este procedimento evita que se obtenha um desenvolvimento diferenciado de algumas ninhadas e/ou filhotes em relação a outras (os), bem como quantidades muito discrepantes na ingestão diária de leite materno e  $\omega$ -3.

Após 21 dias do nascimento, realizava-se o desmame, ou seja, a mãe era retirada da caixa juntamente com as fêmeas da ninhada. Permaneciam apenas os filhotes machos, que prosseguiram até a idade adulta com a mesma dieta materna. Quando necessário, os animais eram sacrificados por decapitação.

Utilizaram-se 20 animais por grupo para a tarefa de esquiva inibitória. Para a dosagem do perfil lipídico foram utilizados 7 animais para o grupo  $\omega$ -3 e 5 para o grupo D. Para a dosagem de BDNF foram utilizados 8 animais para o grupo  $\omega$ -3 e 7 para o grupo D.

O estudo foi realizado de acordo com a Lei N° 11.794, 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para uso de animais (BRASIL, 2008) e todos os experimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRGS sob o protocolo número: 20561.

## 5.2 Dietas

O modelo dietético utilizado foi previamente descrito em estudo feito anteriormente por Moreira e colaboradores (2010) (Tabela 2). Os animais foram divididos em dois grupos com dietas isocalóricas, contendo 8% de gordura no total, tendo como única diferença entre os dois grupos a composição de ácidos graxos  $\omega$ 3 (Tabela 3). Manteve-se a composição lipídica de acordo com os valores recomendados para ingestão diária de ácidos graxos  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 de 5:1 (Simopoulos et al., 2000). Para alcançar esta recomendação, a dieta  $\omega$ 3 continha, em sua composição, uma mistura de óleo de peixe juntamente com óleo de soja. Para a dieta deficiente em ômega-3, utilizou-se o óleo de amendoim, cujo conteúdo de ácidos graxos praticamente não inclui ômega-3, somente os da série ômega-6.

### **5.3 Dosagem do perfil lipídico hipocampal**

Para dosagem do perfil de ácidos graxos do hipocampo, a gordura total foi extraída utilizando-se clorofórmio e metanol (0,02% butil-hidroxi-tolueno), tal como descrito anteriormente (Bligh e Dyer, 1959). A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa. A gordura foi saponificada de uma solução metanólica de KOH e em seguida esterificada em solução metanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Hartman e Lago 1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados usando um cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies (HP 6890) equipado com uma coluna capilar DB-23 (50% cianopropil-metilpolissiloxano, 60 mx 0,25 mm x 0,25 m) e detecção de ionização por chama. Os ácidos graxos foram expressos como percentagem do teor de ácidos graxos totais.

### **5.4 Tarefa de Esquiva Inibitória**

A tarefa de esquiva inibitória é amplamente utilizada para avaliar memória após estímulo aversivo na região do hipocampo em roedores (Izquierdo e Medina, 1997; Bevilaqua et al., 2005; Bekinschtein et al., 2007; Rossato et al., 2009). Em ratos, a tarefa de esquiva inibitória desencadeia eventos bioquímicos no hipocampo, que são necessários para a retenção desta tarefa (Izquierdo e Medina, 1997).

Para a tarefa de esquiva inibitória, os ratos foram colocados sobre uma plataforma de 5,0 cm de altura, 8,0 cm de largura localizada à esquerda de um aparelho de formação 50 x 25 x 25 cm, cujo chão possui uma série de barras paralelas de bronze com espaçamento de 1,0 cm uma da outra. Foi medido o tempo de latência que o animal levou para descer da plataforma sobre as barras paralelas com as quatro patas. Na sessão de treino, imediatamente após pisar sobre as barras com as 4 patas, os animais receberam um choque com intensidade de 0,7 mA e duração de 1000ms com o objetivo de induzir a persistência da memória, que é dependente da síntese de BDNF (Bekinschtein et al. 2007). Nas sessões de testes, realizados 1,5 h (memória de curto prazo), 24h (memória de longo prazo) e 7 dias (persistência da memória) após o treino, os procedimentos foram semelhantes, exceto que o choque nas patas

foi omitido. Diferenças significativas no tempo de latência do treino comparadas com as sessões de teste foram tomadas como uma medida da memória.

### **5.5 Dosagens dos níveis de BDNF**

Para a análise bioquímica, os animais de ambas as dietas foram sacrificados e o hipocampo foi dissecado tal como anteriormente descrito (Isosaka et al. 2008). O conteúdo de BDNF do hipocampo foi medido 12h após os animais serem submetidos apenas ao contexto (serem colocados no aparelho de esquiva inibitória sem levar o choque) ou serem submetidos à sessão de treino com choque de intensidade 0,7 mA na tarefa de esquiva inibitória. Os hipocampos foram homogeneizados num tampão de lise [Tris 10 mM-HCl (pH 7,4), 1% de Triton-X-100, SDS a 0,1, NaCl a 150 mM, EDTA 1 mM, cocktail de inibidores de protease 1% (Sigma)] gx, e foram centrifugados a 10.000rpm/15 min. Os sobrenadantes foram utilizados para análise do conteúdo de BDNF.

Para a dosagem do BDNF por ensaio ELISA, utilizou-se o kit BDNF DuoSet (R&D System, Inc, EUA), e as absorbâncias foram lidas em um leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA).

### **5.6 Análise Estatística**

Para a análise do perfil lipídico do hipocampo, os resultados foram expressos como média e desvio padrão, e a análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. Para a análise do conteúdo de BDNF, foi utilizada ANOVA de uma Via e teste de Tukey como post-hoc. Para a tarefa de esquiva inibitória, os resultados foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil e foi utilizado o teste de Wilcoxon para a análise dentro dos grupos e o teste de Mann Whitney para análise entre os grupos. Para significância estatística, foi considerado o valor de  $P < 0,05$ . A análise estatística foi realizada no programa SPSS 15.0.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, FAPERGS, INCT para Excitotoxicidade e Neuroproteção (CNPq / INCT) e IBN.Net FINEP / FADESP.

## TABELAS

Tabela 1 – Perfil de Ácidos Graxos Hipocampal (#)

	Dieta $\omega$ 3 %	Dieta D %
Saturados		
C 14:0	0.45	0.39
C 16:0	27.29	26.39
C 18:0	19.46	18.02
C 24:0	0.34	0.68
Monoinsaturados		
C 15:1	2.64	2.52
C 16:1 $\omega$ 7	0.97	0.95
C 18:1 $\omega$ 7	2.89	2.80
C 18:1 $\omega$ 9	18.03	19.45
C 20:1 $\omega$ 9	0.91	1.25
Poliinsaturados		
C 22:6 $\omega$ 3	11.02	8.41*
C 18:2 $\omega$ 6	2.78	2.38
C 20:4 $\omega$ 6	9.39	9.15
C 22:4 $\omega$ 6	2.90	3.70
C 22:5 $\omega$ 6	0.16	1.70*
$\omega$ 6: $\omega$ 3	1.4	2.14

# Valor médio dos ácidos graxos com conteúdo de no mínimo 0,5%. \*  $p < 0,001$  comparando o grupo  $\omega$ 3 (n = 7) com o grupo D (n = 5).



Tabela 2 – Composição das dietas

	Dieta $\omega$ 3 (%)	Dieta D (%)
Caseína <sup>a</sup>	22	22
Amido de milho <sup>b</sup>	42	42
D-L-Metionina <sup>b</sup>	0,16	0,16
Sacarose	21	21
Fibras	2	2
Sais Minerais	4	4
Vitaminas	1	1
Óleo de amendoim	0	8
Óleo de milho	7	0
Óleo de peixe	1	0

A composição de sais e vitaminas foi feita de acordo com Horwitz, 1980.

<sup>a</sup> Caseína: 87% de pureza (Herzog, Porto Alegre, Brasil)

<sup>b</sup> D-L-Metionina (Merk, Rio de Janeiro, Brasil)

<sup>c</sup> Sais minerais: mg/100g de dieta (Roche, São Paulo, Brasil): NaCl, 557; KI, 3,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1556; MgSO<sub>4</sub>, 229; CaCO<sub>3</sub>, 1526; FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 108; MnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, 16; ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 2,2; CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O, 1,9; COCl-6H<sub>2</sub>O, 0,09.

<sup>d</sup> Vitaminas: mg/100g de dieta (Roche, São Paulo, Brasil): vitamina A (acetato de retinil), 4; vitamina D (coleciferol, 0,5; vitamina E (acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol), 10; menadiona, 0,5; piridoxina (hidrocloro de piridoxina) 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B<sub>12</sub>, 0,003.

Fonte: Moreira et al., 2009.

Tabela 3 - Composição de ácidos graxos dos lipídios das dietas<sup>a</sup>

	Dieta ω3 %	Dieta D %
Saturados		
C 16:0	10,9	11,1
C 18:0	2,0	2,4
C 20:0	0,5	1,3
C 22:0	0,1	2,9
C 24:0	0,0	1,5
Monoinsaturados		
C 16:1	0,2	0,2
C 18:1	25,4	46,7
C 20:1	0,0	1,6
Poliinsaturados		
C 18:2 ω6	56,6	32,0
C 18:3 ω3	1,2	0,0
C 20:5 ω3 <sup>b</sup>	2,2	0,0
C 22:6 ω3 <sup>b</sup>	3,5	0,0

<sup>a</sup> de acordo com O'Brien, 2004.

<sup>b</sup> de acordo com o fabricante (Naturalis, Brasil).

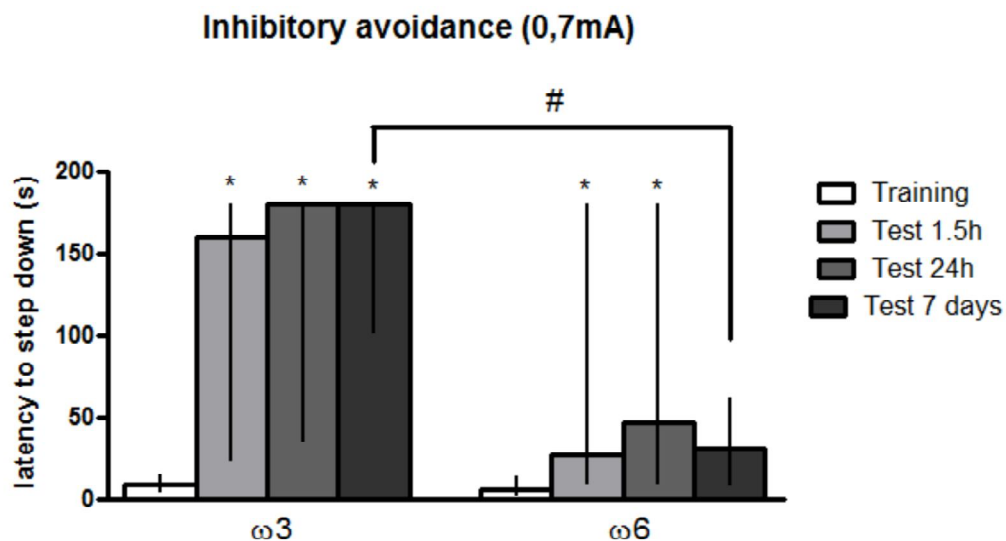


Figura 1. A tarefa de esquia inibitória foi utilizada para avaliar formação da memória de curta e longa duração. A memória foi avaliada 1,5 h, 24 h e 7 dias após a sessão de treino.  $\omega 3$  - dieta adequada em  $\omega 3$ ; D - dieta deficiente em  $\omega 3$ .  $\omega 3$ , n = 20; D, n = 20. Os resultados foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil, teste de Wilcoxon foi utilizado para análise dentro dos grupos e Mann Whitney foi usado para a análise entre os grupos (\* p < 0,05 em relação à respectiva sessão de treino; # p < 0,05 em relação ao respectivo grupo  $\omega 3$ ).

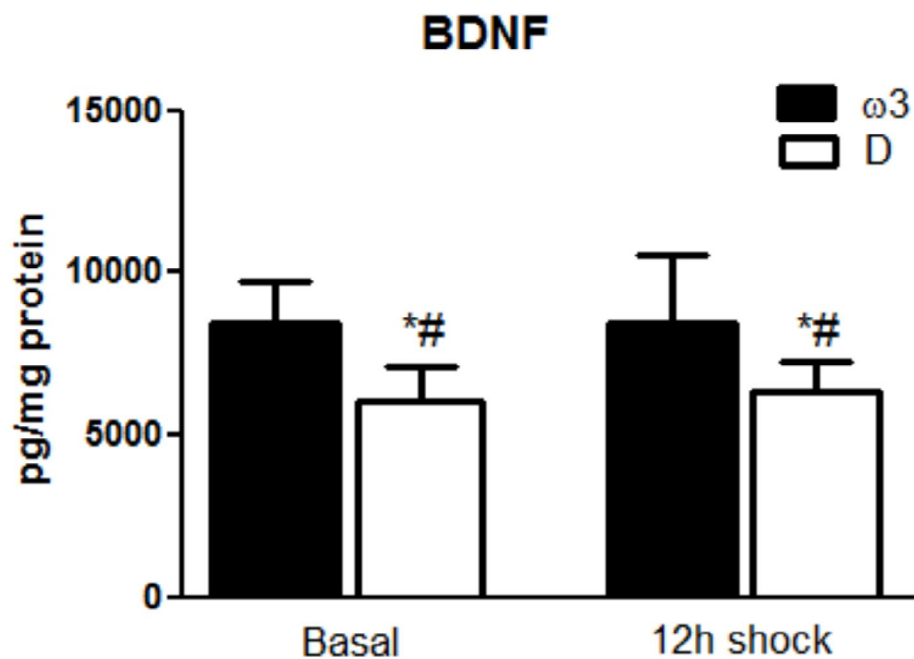


Figura 2. O conteúdo de BDNF hipocampal encontrado em animais submetidos ao contexto sem choque nas patas (basal) e 12 horas após a sessão de treino (12h de choque).  $\omega$ 3 - dieta adequada em  $\omega$ 3; D - dieta deficiente em  $\omega$ 3.  $\omega$ 3, n = 8; D, n = 7. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e os dados foram analisados por Two-way ANOVA e Bonferroni como *post-hoc* foram utilizados (\* p <0,05 em relação a ambos os grupos  $\omega$ 3).

## Referências

- Aid, S., Vancassel, S., Poumes-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P., Lavielle, M., 2003. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J. Lipid. Res.* 44, 1545-1551.
- Alonso, M., Vianna, M.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2002. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22(5-6), 663-74.
- André, A., Juanéda, P., Sébédio, J.L., Chardigny, J.M., 2005. Plasmalogen metabolism-enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. *Biochimie.* 88, 103-111.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 18; 53(2), 261-77.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2008. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* 14(2), 147-56.
- Bevilaqua, L.R., Da Silva, W.N., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2005. Extinction and reacquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 139-145.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F., Cicchetti, F., 2009. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 33, 1401-1408.
- Brasil, 2008. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Estabelece Procedimentos Para O Uso Científico de Animais Brasil, Publicada no D.O.U. DE 09/10/2008, p. 1.
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.S., Jun, S.B., Lovinger, D., Kim, H.Y., 2009. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem.* 111, 510-521.
- Chung, W.L., Chen, J.J., Su, H.M., 2008. Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J. Nutr.* 138, 1165-1171.
- Dyall, S.C., Michael, G.J., Whelpton, R., Scott, A.G., Michael-Titus, A.T., 2006. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age related decrease in GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol. Aging.* 28 (3), 424-439.

- Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., 2001. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J. Mol. Neurosci.*, Totowa NJ. 16, 263-272.
- Fedorova, I., Hussein, N., Baumann, M.H., Di Martino, C., Salem, N. JR., 2009. An n-3 fatty acid deficiency impairs rat spatial learning in the Barnes maze. *Behav. Neurosci.* 123, 196-205.
- Garcia, M.C., Ward, G., Ma, Y.C., Salem, N. Jr., Kim, H.Y., 1998. Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylethanolserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *J. Neurochem.* 70, 24-30.
- Garcia-Calatayud, S., Redondo, C., Martin, E., Ruiz, J.I., Garcia-Fuentes, M., Sanjurjo, P., 2005 Brain docosahexaenoic acid status and learning in young rats submitted to dietary long-chain polyunsaturated fatty acid deficiency and supplementation limited to lactation. *Pediatr. Res.* 57, 719-723.
- Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Lavielle, M., Vancassel, S., Breton, S., Denis, I., 2009. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. *J. Neurochem.* 54(8), 535-543.
- Hartman, L., Lago, R.C., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22, 475-476.
- Hibbeln, J. R., Davis, J.M., Steer, C., Emmett, P., Rogers, I., Williams, C., Golding, J., 2007. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet.* 369 (9561), 578-585.
- Isosaka, T., Hattori, K., Kida, S., Kohno, T., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Yagi, T., Yuasa, S., 2008. Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 28, 973-981.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68(3), 285-316.
- Kafitz, K.W., Rose, C.R., Thoenen, H., Konnerth, A., 1999. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature.* 401(6756), 918-21.
- Kojima, N., Ishibashi, H., Obata, K., Kandel, E.R., 1998. Higher seizure susceptibility and enhanced tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in fyn transgenic mice. *Learn. Mem.* 5(6), 429-45.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Michaelsen, K.S., 2001. The essentiality of long chain omega-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid. Res.* 40, 1-94.
- Lim, S.Y., Hoshiba, J., Salem, N., 2005<sup>a</sup>. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *J. Neurochem.* 95 (3), 848-857.

- Lim, S.Y., Doherty, J.D., McBride, K., Miller-Ihli, N.J., Carmona, G.N., Stark, K.D., Salem, N. Jr., 2005<sup>b</sup>. Lead exposure and (n-3) fatty acid deficiency during rat neonatal development affect subsequent spatial task performance and olfactory discrimination. *J. Nutr.* 135 (5), 1019-1026.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(3), 175-90.
- Marszalek, J.R., Lodish, H.F., 2005. Docosahexaenoic Acid, Fatty Acid-Interacting Proteins, and Neuronal Function: Breastmilk and Fish are Good for You. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 663-657.
- Martin, R.E., Bazan, N.G., 1992. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J. Neurochem.* 59, 318-325.
- Mathieu, G., Denis, S., Lavialle, M., Vancassel, S., 2008. Synergistic effects of stress and omega-3 fatty acid deprivation on emotional response and brain lipid composition in adult rats. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 78, 391-401.
- McGahon, B.M., Martin, D.S., Horrobin, D.F., Lynch, M.A., 1999. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Neurosci.* 94(1), 305-14.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory- a century of consolidation. *Science.* 287, 248-251.
- Moreira, J.D., Knorr, L., Ganzella, M., Thomazi, A.P., Souza, C.G., Souza, D.G., Pitta, C.F., Souza, T.M., Wofchuk, S., Elisabetsky, E., Vinadé, L., Perry, M.L.S., Souza, D.O., 2010. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: Relevance for behavior alternations. *Neurochem. Int.* 56(6-7), 753-9.
- Moriguchi, T., Greiner, R.S., Salem, N. Jr., 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* 75, 2563-2573.
- Miyazawa, D., Yasui, Y., Yamada, K., Ohara, N., Okuyama, H., 2010. Regional differences of the mouse brain in response to an alpha-linolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity. *Life. Sci.* 87, 490-494.
- Niu, S.L., Mitchell, D.C., Lim, S.Y., Wen, Z.M., Kim, H.Y., Salem, N., Litman, B.J., 2004. Reduced G-protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* 279 (30), 31098-31104.
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(1), 24-32.
- Rao, J.S., Ertley, R.N., Lee, H.J., Demar, J.C. Jr., Arnold, J.T., Rapoport, S.I., Bazinet, R.P., 2007. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry.* 12, 36-46.
- Rossato, J.I., Bevilaqua, R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., Cammarota, M., 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science.* 325, 1017-1020.

- Simopoulos, A. P., Leaf, A., Salem, N. Jr., 2000. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 63 (3), 119-121.
- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2009. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS. One*. 23; 4(6), e6007.
- Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Schuman, E.M., 2002. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 8; 99(1), 467-72.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2008. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*. 155, 751–759.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004. Dietary omega–3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma*. 21, 1457–1467.
- Yamada, K., Nabeshima T., 2003. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci*. 91(4), 267-70.
- Zimmer, L., Delion- Vancassel, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J.C., Chalon, S., 2000. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J.Lipid. Res*. 41 (1), 32-40.



## APÊNDICE A – NORMAS DA REVISTA BRAIN RESEARCH

### GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

*Brain Research* publishes papers reporting interdisciplinary investigations of nervous system structure and function that are of general interest to the international community of neuroscientists. As is evident from the journals name, its scope is broad, ranging from cellular and molecular studies through systems neuroscience, cognition and disease. Invited reviews are also published; suggestions for and inquiries about potential reviews are welcomed.

Note: With the appearance of the final issue of the 2011 subscription, Vol. 67/1-2 (24 June 2011), *Brain Research Reviews* has ceased publication as a distinct journal separate from *Brain Research*.

Review articles accepted for *Brain Research* are now published in that journal.

In the journals Table of Contents, published papers will be shown under one of the Section titles listed (in bold type) below. Authors will be given the opportunity to choose the most appropriate section upon manuscript submission.

#### SECTIONS

##### **Cell Biology, Signaling and Synaptic Transmission**

*Senior Editors:* Jonathan F. Ashmore (London, UK), Philip G. Haydon (Boston, MA, USA), Leonard K. Kaczmarek (New Haven, CT, USA), Diane Lipscombe (Providence, RI, USA)

Studies investigating the cellular, molecular and genetic bases of structure, function and signaling (both intracellular and intercellular) in nervous systems.

##### **Cognition and Computation**

*Senior Editors:* Francesco P. Battaglia (Amsterdam, Netherlands), Erich Schröger (Leipzig, Germany), Christina L. Williams (Durham, NC, USA)

Studies of the neural mechanisms of cognition and behavior in humans and animal models including basic behaviors and higher mental functions; as well as studies dealing with realistic simulation, analysis and prediction of the structure and functions of nervous systems and individual neuronal and glial elements within nervous systems.

##### **Development, Degeneration and Regeneration, and Aging**

*Senior Editors:* Fen-Biao Gao (Worcester, MA, USA), Michael E. Selzer (Philadelphia, PA, USA), Flora M. Vaccarino (New Haven, CT, USA)

Studies concerning neuronal and glial development and the formation of the nervous system, molecular and cellular aspects of degeneration and regeneration, and changes associated with the aging brain.

##### **Neurobiology of Disease**

*Senior Editors:* Lorraine Iacovitti (Philadelphia, PA, USA), Jae-Young Koh (Seoul, Korea), Brian A. MacVicar (Vancouver, Canada), Peter H. Reinhart (Boston, MA, USA), J. Paul Taylor (Memphis, TN, USA)

Studies whose primary focus is on clinically diseased nervous systems or disease models, including molecular, cellular, systems and behavioral approaches and analysis of therapeutic interventions.

##### **Reviews**

*Senior Editor:* Irwin B. Levitan (Philadelphia, PA, USA)

Invited reviews on all aspects of nervous system structure and function. The editors welcome suggestions for specific review topics. .

##### **Systems Neuroscience and Behavior**

*Senior Editors:* Gary Aston-Jones (Charleston, SC, USA), Leslie C. Griffith (Waltham, MA, USA), David J. Perkel (Seattle, WA, USA)

Studies concerning structure and organization of neural circuits, sensory and motor systems, internal regulatory systems and the control of behaviors.

#### TYPES OF PAPERS

1. **Research Reports** reporting results of original fundamental research in any branch of the brain sciences. Papers describing new methods or significant developments of recognised methods which provide significant insight into the structure or function of the nervous system, the pathophysiology of a disease, or its treatment may also be submitted. Articles should be written in sufficient detail to allow others to verify the above methods.

2. **Reviews:** Reviews are by invitation only. Inquiries and suggestions for reviews should be directed to the *Brain Research* Editorial Office (bres@elsevier.com).

*Brain Research* will also regularly publish **thematic special issues** highlighting important new developments in neuroscience research.

##### **The Neuroscience Peer Review Consortium**

*Brain Research* is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers

involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Brain Research* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of *Brain Research*. (N.B. Only manuscripts which were first submitted to another journal after 1st January 2008 are eligible for the NPRC scheme.)

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Brain Research*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Brain Research* without reference to the previous submission.

No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Brain Research* specification and submit the paper to *Brain Research* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that they are happy for referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. Authors will be asked upon submission to *Brain Research* the title of the first journal submitted to and the manuscript ID that was given by that journal. The editorial office of *Brain Research* will request the referees' reports from the first journal.

The Editors of *Brain Research* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

*Contact Details for submission*

Submission of manuscripts to *Brain Research* is entirely online at <http://ees.elsevier.com/bres>.

Queries about the submission or editorial processes may be directed to the *Brain Research* Editorial Office, Elsevier, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA; Fax: (1)-619-699.6850, Email: [bres@elsevier.com](mailto:bres@elsevier.com)

## **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### *Policy and ethics*

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

For other policy issues, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### *Contributors*

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### *Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts*

*Before the accepted manuscript is published in an online issue* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted

manuscript and must include: The reason the name should be added or removed or the author names rearranged. Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests. Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue*

Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>).

Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights> .

#### *Language and language services*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

#### *Submission*

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bres>

#### *Section, Senior Editor and Reviewers*

Authors will be asked during manuscript submission to select a section of the journal, and a senior editor from that section whom they consider most appropriate to edit their manuscript. While every effort will be made to honor authors' selections, the assignment to a handling editor will be made by the Editor-in-Chief. Please submit, with the manuscript, the names, addresses and email addresses of 3 potential reviewers. Note that the handling editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

#### *Referees*

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

#### *Additional information*

*Cover illustrations:* Authors are encouraged to submit visually and scientifically interesting figure(s) representative of their data, though not necessarily as they appear in the manuscript, for potential cover illustrations (see specific instructions for submission of cover art under *PREPARATION / Color Artwork below*). The use of illustrations for journal covers is at the discretion of the Editors; only those related to articles accepted for publication will be considered. At the end of each year, all published covers will automatically be considered in a competition for the year's best cover illustration, and will be judged on their aesthetic value and scientific interest. The author(s) of the winning image will receive US\$ 500 from Elsevier.

### **PREPARATION**

#### *Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

#### *Article structure*

##### *Subdivision*

Divide your article into clearly defined and numbered sections (e.g. Abstract, 1. Introduction, 2. Results, 3. Discussion, 4. Experimental Procedure, Acknowledgements, References). Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to " the text" .

Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### *Introduction*

State the objectives of the work and provide relevant background information. Published studies should be described concisely, and be cited appropriately.

##### *Results*

The results should be described clearly and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

#### *Discussion*

The results of the research should be discussed in the context of other relevant published work; Extensive citations and discussion of published literature should be avoided. The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

#### *Experimental Procedure*

This section should contain all the details necessary to reproduce the experiments. Avoid re-describing methods already published; only relevant modifications should be included in the text.

#### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### *Abstract*

The abstract should state briefly (in no more than 250 words) the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### *Graphical abstract*

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

#### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### *Keywords*

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

## Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

*Cover art:* Illustrations to be considered for the cover should be related to the authors' submitted article and be representative of their data, but need not necessarily be as they appear in the manuscript. Cover art should be formatted to occupy an area of 18X21 cm and should be submitted in digital format (TIFF, Photoshop, JPEG or Powerpoint) with a resolution of at least 300 dpi. Please also include a descriptive text with your cover art submission. The files should be uploaded to a specified FTP site - please contact the Editorial Office at [bres@elsevier.com](mailto:bres@elsevier.com) for instructions. For authors who wish to postal mail a CD with the cover art, please send it to:

Brain Research Editorial Office, Elsevier, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA.

Please ensure that the manuscript reference number is included on all materials. *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### References

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for



publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

#### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.