

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

FLÁVIA SPREAFICO FERNANDES

**A SEMENTE DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) COMO FONTE DE ÁCIDO
GRAXO OMEGA-3 DURANTE A GESTAÇÃO, LACTAÇÃO E CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO COGNITIVO DE RATOS**

NITERÓI

2007

FLÁVIA SPREAFICO FERNANDES

A SEMENTE DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) COMO FONTE DE ÁCIDO
GRAXO OMEGA-3 DURANTE A GESTAÇÃO, LACTAÇÃO E CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO COGNITIVO DE RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Atenção Integrada à Criança.

Orientadores: Prof. Dr. GILSON TELES BOAVENTURA
Profª Draª MARIA DAS GRAÇAS TAVARES DO CARMO

NITERÓI
2007

FLÁVIA SPREAFICO FERNANDES

A SEMENTE DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) COMO FONTE DE ÁCIDO
GRAXO OMEGA-3 DURANTE A GESTAÇÃO, LACTAÇÃO E CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO COGNITIVO DE RATOS.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Atenção Integrada à Criança.

Aprovada em _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. ADAUTO DUTRA MORAES BARBOSA
UFF

Profª Drª MÔNICA SANTOS ROCHA
UFRJ

Profª Drª FÁTIMA LÚCIA DE CARVALHO SARDINHA
UFRJ

NITERÓI
2007

Ao meu pai, que plantou em mim a inquietude do “querer saber”;

À minha mãe, que sempre me amparou;

Ao Marco Aurélio, à Marina e à Thaís que sempre torceram e acreditaram no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Professor Gilson Teles Boaventura pelo incentivo e por possibilitar a realização desse trabalho;

À Professora Maria das Graças Tavares do Carmo, pela paciência, compreensão, empenho e rapidez;

Ao Professor Elton Matsushima, por toda a ajuda e pelas orientações;

À Coordenação do Curso de Mestrado em Saúde da Criança e Adolescente pelo apoio;

À Adilza, pela disponibilidade e simpatia;

À Kátia Calvi Lenzi sempre do meu lado nos momentos difíceis;

À Juliana Azevedo, sempre a postos, para o que desse e viesse;

À Carine e ao André pela força nos cuidados com os animais;

À toda a equipe do LabNE, sempre apoiando e disposta a ajudar;

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

ESTA DISSERTAÇÃO GEROU OS SEGUINTE TRABALHOS PARCIAIS APRESENTADOS EM EVENTOS:

- LEITE, C.D.F.; FERNANDES, F.S., BOAVENTURA, G.T., DE MENEZES, J.A. DE AMEIDA, K.C.L., GUZMÁN-SILVA, M.A., **GLICEMIA E ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM RATOS FILHOTES PROVENIENTES DE MÃES ALIMENTADAS COM RAÇÃO DE LINHAÇA**. In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral e V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica – Florianópolis, novembro de 2007.
- LEITE, C.D.F.; FERNANDES, F.S., BOAVENTURA, G.T., DE MENEZES, J.A., DE AMEIDA, K.C.L., GUZMÁN-SILVA, M.A., **INFLUÊNCIA DA SEMENTE DE LINHAÇA NOS NÍVEIS SÉRICOS DE HEMATÓCRITO E HEMOGLOBINA EM RATOS WISTAR – Pôster em destaque** In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral e V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica – Florianópolis, novembro de 2007.
- DE AMEIDA, K.C.L., FERNANDES, F.S., DE MENEZES, J.A., LEITE, C.D.F., GUZMÁN-SILVA, M.A., BOAVENTURA, G.T., **QUALIDADE PROTÉICA DA LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*) E SEU EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO DE RATOS**. III Congresso Latino-americano de Higienistas de Alimentos, IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses, I Encontro Nacional do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Porto Seguro, maio de 2007.
- LEITE, C.D.F., DE MENEZES, J.A., DE AMEIDA, K.C.L., FERNANDES, F.S., BOAVENTURA, G.T., **EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA SOBRE O TEOR DE GORDURA EM LEITE DE RATOS WISTAR**. III Congresso Latino-americano de Higienistas de Alimentos, IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses, I Encontro Nacional do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Porto Seguro, maio de 2007.
- DE AMEIDA, K.C.L., FERNANDES, F.S., DE MENEZES, J.A., LEITE, C.D.F., GUZMÁN-SILVA, M.A., BOAVENTURA, G.T., **INFLUÊNCIA DA SEMENTE DE LINHAÇA NA FERTILIZAÇÃO DE RATAS WISTAR**. III Congresso Latino-americano de Higienistas de Alimentos, IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses, I Encontro Nacional do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Porto Seguro, maio de 2007.
- FERNANDES, F.S., DE AMEIDA, K.C.L., DUMAS, M., DE MENEZES, J.A., BOAVENTURA, G.T., **INFLUÊNCIA DA LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*) NO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL DE RATOS RECÉM NASCIDOS**. III Congresso Latino-americano de Higienistas de Alimentos, IX Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, II Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses– Porto Seguro, maio de 2007.
- DE AMEIDA, K.C.L., DALEPRANE, J.B., TROINA, A.A., FERNANDES, F.S., CYSNEIROS, N.C., MUNIZ, J.M., LEITE, C.D.F.C., MOTTA, E.F.R.O., BOAVENTURA, G.T. GUZMAN-SILVA, M.A., PACHECO, J.T., AZEREDO, V.B., **ESTUDO LONGITUDINAL DE RATAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO TENDO COMO FONTE PROTÉICA A LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*): DADOS DE CRESCIMENTO**. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. São Paulo, 2006.

- LEITE, C.D.F.C., DE ALMEIDA, K.C.L., CYSNEIROS, N.C., DALEPRANE, J.B., MUNIZ, J.M., FERNANDES, F.S., BRITO, C.M., PACHECO, J.T., AZEREDO, V.B., MOTTA, E.F.R.O., BOAVENTURA, G.T., **ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DA LINHAÇA COM A SOJA ORGÂNICA E TRANSGÊNICA COMO FONTES PROTÉICAS EXCLUSIVAS DURANTE O CRESCIMENTO DE RATOS**. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. São Paulo, 2006.
- LEITE, C.D.F.C., DALEPRANE, J.B., MUNIZ, J.M., MOTTA, E.F.R.O., CYSNEIROS, N.C., BRITO, C.M., FERNANDES, F.S., DE ALMEIDA, K.C.L., TROINA, A.A., BOAVENTURA, G.T., PACHECO, J.T., AZEREDO, V.B., **POTENCIAL PROTÉICO DA LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*): PARA RAÇÃO DE RATOS EM CRESCIMENTO**. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. São Paulo, 2006.
- DE ALMEIDA, K.C.L., FERNANDES, F.S., TROINA, A.A., CYSNEIROS, N.C., FIGUEIREDO, M.S., PACHECO, J.T., BRITO, C.M., MUNIZ, J.M., DALEPRANE, J.B., AZEREDO, V.B., BOAVENTURA, G.T., **ESTUDO LONGITUDINAL DE RATAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO TENDO COMO FONTE PROTÉICA A LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*): FIBRA ALIMENTAR**. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. São Paulo, 2006.
- MUNIZ, J.M., MOTTA, E.F.R.O., CYSNEIROS, N.C., LEITE, C.D.F.C., DALEPRANE, J.B., FERNANDES, F.S., TROINA, A.A., BOAVENTURA, G.T., DE ALMEIDA, K.C.L., SRUR, A.U.S., BRITO, C.M., PACHECO, J.T., AZEREDO, V.B., **LINHAÇA (*LINUM USITATISSIMUM*) COMO FONTE PROTÉICA EXCLUSIVA: UM ESTUDO EM RATOS**. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. São Paulo, 2006.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES		Página
Figura 1	Representação esquemática do desenvolvimento do sistema nervoso central durante o período intra uterino	18
Figura 2	Cronograma do desenvolvimento cerebral humano.	21
Figura 3	Esquema da dessaturação e alongação dos ácidos graxos linoléico (18:2n-6) e linolênico (18:3n-3).	25
Tabela 1	Algumas das recomendações mais aceitas para a relação entre os ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta	29
Figura 4	<ul style="list-style-type: none"> a. Esquema do cérebro humano detalhando o hipocampo e suas principais estruturas b. Esquema do cérebro do rato indicando suas principais estruturas 	40
Figura 5	Teste do Labirinto Aquático de Morris, versão Memória Operacional ou Memória espacial de Referência	42
Figura 6	Teste do Labirinto Aquático de Morris, versão Memória de Procedimento	44
Tabela 2	Composição das rações experimentais	50
 ARTIGO 1		
Tabela 1	Composição das rações experimentais (g/100g; AIN 93).	79
Tabela 2	Características gerais e nutricionais das ratas no momento pré-concepcional, gestacional, lactacional e de suas respectivas crias	80
Tabela 3	Massa cerebral e massa cerebral relativa neonatais	81
Gráfico 1	Crescimento dos filhotes durante os 21 dias de lactação.	
Gráfico 2	Teor Lipídico (%) do leite materno aos 21 dias de lactação	83

Tabela 4	Distribuição percentual dos ácidos graxos nas rações e no leite materno	84
----------	---	----

ARTIGO 2

Tabela 1	Composição e distribuição de macronutrientes das rações experimentais (g/100g; AIN 93).	109
Gráfico 1	Consumo alimentar relativo do desmame ao final do período de avaliação biológica (entre semanas 1 e 5)	110
Gráfico 2	Crescimento após o desmame	111
Tabela 2	Indicadores biológicos de qualidade nutricional	112
Tabela 3	Distribuição percentual dos ácidos graxos nas rações e no cérebro dos animais dos grupos experimentais.	113
Gráfico 3	Médias dos tempos de latência na versão Memória Operacional do Labirinto Aquático de Morris	114
Tabela 4	Médias dos tempos de latência no teste de Memória de Referência Espacial nos dias de treino e de teste	115
Gráfico 4	Médias dos tempos de latência na versão Memória de Procedimento do Labirinto Aquático de Morris	116
Tabela 5	Correlação entre os percentuais dos ácidos graxos AA e DHA nos lipídeos totais dos cérebros dos filhotes com o desempenho nas versões MO, MRE e MP do Labirinto Aquático de Morris.	117

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico (20:4n-6)
AG	Ácido graxo
AGE	Ácido graxo essencial
AGPI-CL	Ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AL	Ácido linolênico (18:2n-6)
ALA	Ácido alfa-linolênico (18:3n-3)
CA	<i>Cornu Anmonis</i>
CEA	Coefficiente de Eficácia Alimentar
cm	Centímetros
DDA	Distúrbio do Déficit de Atenção
DHA	Ácido docosahexaenóico (22:6n-3)
DPE	Ácido docosapentaenóico (22:5n-6)
EPA	Ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3)
EPM	Erro Padrão da Média
ERG	Eletrorretinografia
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FI	Fórmulas Infantis
g	Gramas
GC	Grupo Controle

GCM	Grupo Controle Modificado
GL	Grupo Linhaça
h	Horas
Kcal	Quilocalorias
m	Metros
mg	Miligramas
MO	Memória operacional
MRE	Memória de referência espacial
NCM	<i>Nordic Council of Ministers</i>
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NPR	<i>Net Protein Retention</i>
°C	Graus centígrados
PER	<i>Protein Efficiency Ratio</i>
s	Segundos
SCR	<i>Scientific Review Committee</i>
SDG	Secoisolaricresinol
SNC	Sistema Nervoso Central
VET	Valor energético total
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO:

A participação dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL), no desenvolvimento neurológico e na função visual é inquestionável e está bem documentada. Recentemente diversos estudos vêm sugerindo que as necessidades do ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) durante o período perinatal estão aumentadas em função do pico de desenvolvimento cerebral do concepto. Dessa forma as gestantes e lactantes têm sido orientadas a aumentar o consumo de alimentos fonte de ácido linoléico, precursor do DHA. Considerando a importância dos lipídios na estrutura e funcionalidade do cérebro, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação materna com semente de linhaça, oleaginosa considerada a maior fonte vegetal de AL, na composição relativa de ácidos graxos do leite materno e do cérebro da prole além de associar o perfil desses ácidos graxos com medidas cognitivas.

Foram utilizados ratos wistar de ambos os sexos divididos em três grupos conforme a dieta experimental: Grupo Controle (GC), com dieta à base de caseína, Grupo Controle Modificado (GCM) com dieta à base de caseína adicionada de óleo de soja e Grupo Linhaça (GL) com dieta à base de caseína suplementada com 25% de semente de linhaça. As rações experimentais foram consumidas pelas mães durante o período pré concepcional e durante a gestação e lactação, e pela prole após o desmame. O GCM foi alimentado em sistema de *pair feeding* com o GL. As fêmeas dessa geração acasalaram aos 90 dias e, após o parto, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes por fêmea sendo o excedente sacrificado para coleta de tecido cerebral para a dosagem dos ácidos graxos. Os animais foram monitorados em dias alternados obtendo-se a massa corporal e consumo alimentar durante todo o experimento. Aos 21 dias, quando se deu o desmame, as ratas lactantes foram anestesiadas e o leite foi extraído por expressão manual. O desempenho cognitivo dos filhotes machos foi avaliado a partir dos 30 dias de idade através de três versões do Labirinto Aquático de Morris. Os lipídios do leite, ração e tecido cerebral foram extraídos e os ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa após prévia extração e separação dos ésteres metílicos. Os ácidos graxos foram identificados por comparação do seu tempo de retenção com padrões conhecidos. Os dados foram tratados com o teste de Shapiro-Wilk e, uma vez constatada sua não normalidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e o coeficiente de correlação de Spearman. A ração de linhaça favoreceu a maior incorporação de ácido docosahexaenoico (n-3) e menor proporção de araquidônico n-6 no leite materno. O desequilíbrio entre AG n-6 e n-3 interferiu na fertilidade das fêmeas, na duração da gestação, e no crescimento dos filhotes. O GL apresentou crescimento inferior ao GC e equivalente ao GCM provavelmente em função da presença de fatores antinutricionais e do desequilíbrio entre Ômega 3 e Ômega 6 da semente que inibiu a síntese de ácido araquidônico. O perfil de AG cerebrais mostrou eficiência, em roedores, na bioconversão do ácido linoléico presente na ração. Os animais do GL tiveram melhor desempenho nas versões do labirinto aquático que dependem mais do córtex frontal e hipocampo sugerindo maior incorporação de DHA nessas estruturas. O desempenho na versão MP foi equivalente entre os três grupos. O conteúdo de DHA cerebral esteve correlacionado com melhor desempenho nos testes cognitivos enquanto o conteúdo de ácido araquidônico se correlacionou com maior tempo para resolução da tarefa.

ABSTRACT:

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) effects on neurological development and visual function are unquestionable and well documented. Many recent studies have suggested that DHA (22:6n-3) needs during perinatal period are increased because brain development is then at its peak. Pregnant and nursing mothers are therefore encouraged to increase their consumption of foods containing linoleic acid, the precursor of DHA. Considering lipids the importance to the brain structure and function, the objective of this study is to determine the effect of maternal dietary supplementation with linseed – Linoleic acid richest vegetable source – on the relative composition of fatty acids in maternal milk and the offspring's brain, and associate fatty acid profiles with behavioral measurements.

Wistar rats of both sexes were divided into three experimental groups: a Control Group (GC), to which a casein diet was administered, a Modified Control Group (GCM), to which a casein diet supplemented with soy oil was administered, and a Linseed Group (GL), which was fed a casein diet supplemented with 25% linseed. The experimental diets were consumed by the mothers during gestation and nursing periods and by their offsprings after weaning. The GCM was pair-fed to the GL. Animals mated at 90 days of, and after delivery each litter was adjusted to 6 pups. The surplus pups were sacrificed to collect brain tissue for dosing fatty acids. The animals were monitored for body weight and food consumption every other day. After 21 days, when the pups were weaned, nursing rats were anesthetized and manually milked. The cognitive performance of the males was evaluated at 30 days of age using three versions of the Morris Water Maze. The lipids in the milk, the diets and brain tissue were extracted and the fatty acids analyzed through gas chromatography after first extracting and separating the methyl esters. Data was processed with Shapiro-Wilk test and when non-normality was detected Kruskal Wallis test and Spearman correlation coefficient were applied. Linseed-supplemented diets resulted in greater incorporation of n-3 essential fatty acid and a smaller proportion of n-6 arachidonic acid (AA) in maternal milk. The unbalance between n-6 and n-3 FA affected the fertility of the females during gestation and pups growth. Growth rates in the GL were lower than in the GC and the same as in the GCM, probably due to the presence of anti-nutritional factors and the unbalance between omega 3 and omega 6, which inhibited arachidonic acid synthesis. FA brain profile showed efficiency (in rodents) in bioconversion of linolenic fatty acid present in diet. The GL animals showed better performance in water maze versions that are frontal cortex and hippocampus related, suggesting greater incorporation of DHA in these structures. Performance in MP version was the same for all three groups, what indicates that the worse growth founded in GL did not interfered on motor functions. Cerebral DHA content was correlated to better performance in cognitive tests while arachidonic acid content was correlated to greater time required to perform the task.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Nutrição e desenvolvimento cerebral	17
1.1.1 DESENVOLVIMENTO CEREBRAL PRÉ-NATAL	18
1.1.2 DESENVOLVIMENTO CEREBRAL PÓS-NATAL	19
1.2 Lipídeos - Conceito e classificação	22
1.3 Ácidos graxos e desenvolvimento cerebral	22
1.3.1 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS	24
1.3.2 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO CEREBRAL	26
1.3.3 AGPI-CL NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO	27
1.4 Recomendações dietéticas de n-3 e n-6	28
1.5 A linhaça como fonte de ácidos graxos	30
1.6 Aprendizado e memória	32
1.6.1 PLASTICIDADE SINÁPTICA	34
1.6.2 MECANISMOS DE MEMÓRIA	35
1.6.3 TIPOS DE MEMÓRIA	36
1.6.4 HIPOCAMPO E MEMÓRIA	37
1.6.5 ESTUDO DA MEMÓRIA	40

2 JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 ANIMAIS	47
4.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS	48
4.2.1 Confeção	48
4.2.2 Composição centesimal das rações experimentais	50
4.2.3 Distribuição percentual de ácidos graxos	50
4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	51
4.4 ANÁLISE DO LEITE MATERNO	51
4.4.1 Coleta do leite	51
4.4.2 Determinação do crematócrito	51
4.4.3 Distribuição percentual de ácidos graxos do leite materno	52
4.5 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ÁCIDOS GRAXOS CEREBRAIS	52
4.6 MODELOS COGNITIVOS	52
4.6.1 Teste do labirinto aquático de Morris	52
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	55

ARTIGO 1	56
RESUMO	57
Introdução	58
Material e métodos	60
Resultados	63
Discussão e conclusão	66
Referências Bibliográficas	72
ARTIGO 2	84
RESUMO	85
Introdução	87
Material e métodos	89
Resultados	94
Discussão e conclusão	97
Referências bibliográficas	102
6 CONCLUSÃO	118
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
7.1 OBRAS CITADAS	119
7.2 OBRAS CONSULTADAS	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 NUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

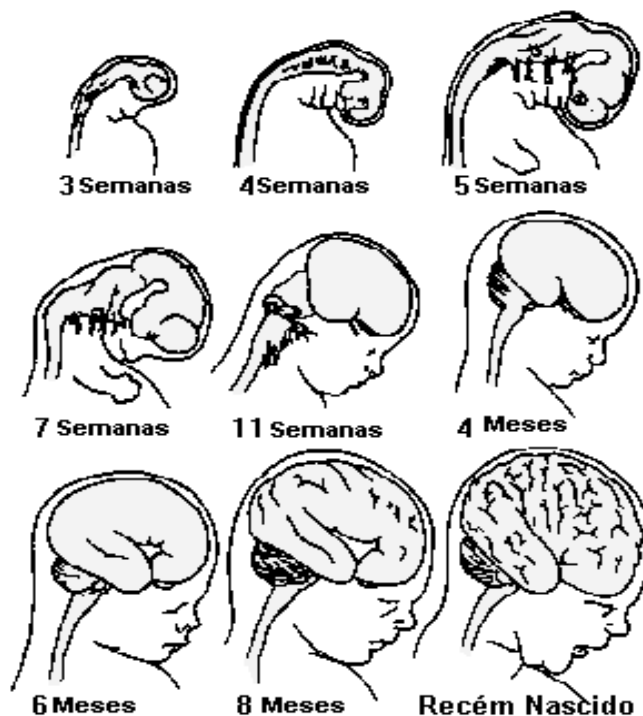
O desenvolvimento e a manutenção das funções psicomotoras e cognitivas, no decorrer da vida, sofrem influência decisiva da nutrição desde o período perinatal. Embora todos os nutrientes sejam importantes para o desenvolvimento estrutural do Sistema Nervoso Central (SNC), alguns lipídeos, como os Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Longa (AGPI-CL), podem influenciar decisivamente em determinadas fases do desenvolvimento mental (GEORGIEFF e RAO, 2001). De fato, a qualidade do suprimento de lipídeos, durante a gestação e a infância, vem sendo considerada como principal determinante do crescimento, do desenvolvimento visual e neurológico e da saúde. Desta forma, a seleção qualitativa dos lipídeos da dieta, no início da vida, é considerada de grande importância (INNIS, 2007). A deficiência de AGPI-CL durante a gestação e o início da vida pode acarretar danos permanentes ao desenvolvimento cerebral e neurológico do neonato. Alterações no desenvolvimento neurológico, principalmente função visual anormal e neuropatia periférica estão presentes na deficiência de AGPI-LC da série n-3 (UAUY e VALENZUELA, 2000).

O potencial genético do desenvolvimento cerebral é determinado durante a embriogênese e no início da vida pós-natal. Este período corresponde, em humanos, aos dois ou três primeiros anos de vida. Já em ratos, às três primeiras semanas de vida pós-natal (entre o 7º e o 21º dia), período no qual se dá o aleitamento. É neste período que ocorrem os processos de neurodesenvolvimento mais importantes - mielinização, organização de sistemas neurotransmissores, arborização dendrítica e gênese sináptica, os quais acontecem com maior intensidade no sistema visual e no

hipocampo (SALIBA e MARRET, 2001). Neste momento, o cérebro é especialmente vulnerável a quaisquer deficiências nutricionais, em função de ser o período em que os processos implicados no desenvolvimento cerebral ocorrem com maior rapidez (ALMEIDA et al., 2002; MORGANE et al., 2002).

O cérebro humano, entre os seis meses de gestação e um ano de idade, passa de relativamente primitivo e pouco elaborado para uma estrutura complexa e integrada (GEORGIEFF e INNIS, 2005). Esse período, em ratos se dá nos primeiros quinze dias de vida, período do aleitamento (UAUY et al., 1989).

Figura 1 - Representação esquemática do desenvolvimento do sistema nervoso central durante o período intra-uterino.



Fonte: Chudler, E.H., Neuroscience for kids, 2007.

1.1.1 Desenvolvimento cerebral pré-natal

A formação do tecido neural tem início entre a segunda e a terceira semana de gestação. Há um espessamento do tecido neural rudimentar para formar a placa neural, que vai se transformar gradualmente no tubo neural. O tubo neural dará origem aos neurônios e à glia. As células que permanecem no interior do tubo neural

vão dar origem ao SNC, enquanto aquelas que ficam entre o tubo neural e a parede ectodérmica constituirão o Sistema Nervoso Periférico (WEBB et al, 2001).

Por volta da sétima semana de gestação, a proliferação das células indiferenciadas dá origem aos neurônios pós-mitóticos, que irão migrar para áreas específicas do cérebro. A migração se dá das áreas mais profundas para as áreas mais superficiais, havendo também um deslocamento paralelo à superfície cerebral. Entre 11 e 16 semanas de gestação, dar-se-á a diferenciação das diferentes regiões cerebrais em córtex cerebral, gânglios da base, corpo caloso, tálamo e outras estruturas (WEBB et al., 2001).

1.1.2 Desenvolvimento cerebral pós-natal

Após a migração, uma vez definida a diferenciação celular, os axônios dos neurônios alongam-se e passam a formar dendritos que se arborizam. A partir daí, tem início a sinaptogênese, formação de conexões sinápticas, processo que persiste até o segundo ano de vida pós-natal, em algumas regiões do córtex cerebral. Surgem sulcos e giros na superfície do cérebro, que cresce para melhor acomodar o aumento da massa encefálica. Aos três anos de idade, o giro frontal vai atingir sua densidade máxima. A atividade dos neurônios, espontânea ou induzida por estímulos do meio ambiente, conduz à formação e estabilização das sinapses (BOURGEOIS, 2001). Há uma excessiva formação inicial de sinapses, provavelmente para permitir que o cérebro imaturo selecione as conexões sinápticas mais adequadas a estímulos específicos do meio ambiente (COTMAN, 1998). A formação de sinapses tem início em torno de 23 semanas de gestação, intensificando-se no primeiro ano de vida e se estendendo até a adolescência ou idade adulta. Níveis adultos de sinapses são atingidos entre os cinco e seis anos de idade, no córtex visual, e entre os 15 e 18 anos, no córtex frontal. À fase de superprodução de sinapses, segue-se um processo de "poda", influenciado por mudanças nos estímulos do meio, ação de neurotransmissores - como o Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) - e fatores neurotróficos. A mielinização, formação da bainha lipídica que isola e protege os axônios permitindo maior velocidade de condução dos impulsos elétricos, tem início em torno de dois meses antes do nascimento e se prolonga até os cinco a 10 anos de idade. A mielinização completa-

se em torno de dois anos e meio, no tronco cerebral e na medula espinhal, e entre 20 a 40 anos de idade, no córtex frontal (COTMAN, 1998; SAMPAIO e TRWIT, 2001).

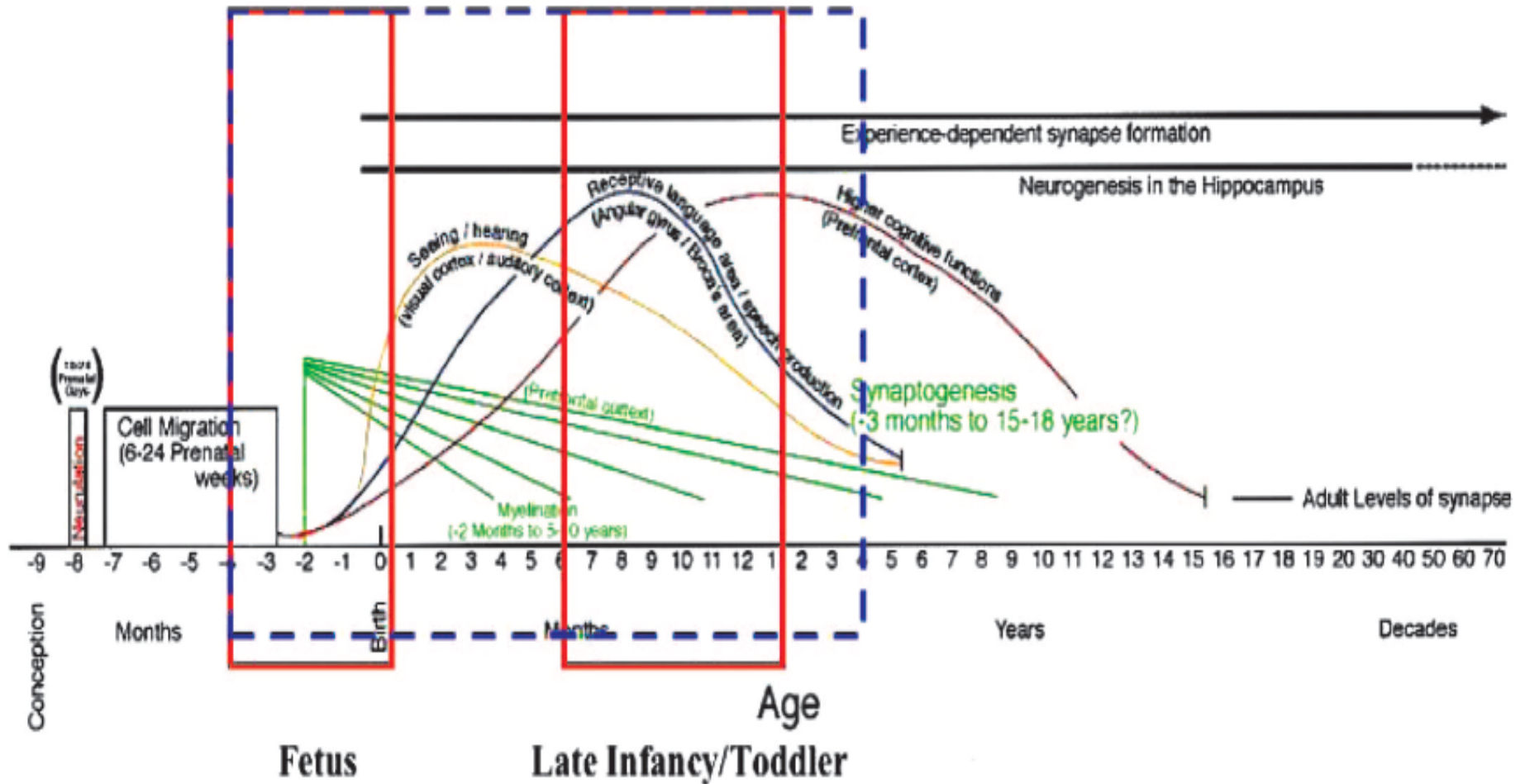
A capacidade dos circuitos neurais para se moldarem, em resposta aos estímulos ambientais que determinam mudanças na expressão genética, constitui o processo de plasticidade neural e atua durante toda a vida. Os mecanismos pelos quais a plasticidade neural se estabelece incluem fatores anatômicos como a modificação das sinapses existentes através da formação de novos neurônios ou aumento da superfície dendrítica, neuroquímicos, como a modificação da atividade das sinapses pelo aumento da síntese e liberação de neurotransmissores e metabólicos como flutuações na atividade metabólica, para utilização de oxigênio e glicose (HEIM e ROCHSTROH, 2001; REINIS e GOLDMAN, 1980; SERES, 2001).

A plasticidade serve de base para o aprendizado, uma vez que define a seleção de conexões sinápticas que irão moldar habilidades e comportamentos (visão, audição, linguagem, funções cognitivas superiores como uso de símbolos e capacidade de relacionar quantidades, controle emocional e interação social) (AU LOIS et al., 1997, Mc MAHON e BARRIONUEVO, 2002; HEIM e ROCHSTROH, 2001).

Outras funções cognitivas superiores que dependem do desenvolvimento do córtex pré-frontal - memória associativa, flexibilidade cognitiva, estratégia e planejamento - desenvolvem-se lentamente até o final da adolescência, quando as sinapses desta área atingem níveis adultos (BENES, 2001; KANDEL et al., 2003).

A base de toda formação e organização neurológicas para o adequado desenvolvimento cerebral no decorrer da vida acontece, portanto, no período compreendido entre o início da gestação e os cinco anos de idade. O desenvolvimento que ocorre após este período depende da estrutura formada nos primeiros anos de vida. A síntese de tecidos, enzimas e fatores de crescimento depende do aporte adequado de macro e micronutrientes. Um aporte insuficiente de proteínas, carboidratos e lipídeos pode comprometer o crescimento cerebral e corporal (KOLB e CIOE, 2000; ALMEIDA et al., 2002; GALLER, 1995; GEORGIEFF, 2006).

Figura 2 – Cronograma do desenvolvimento cerebral humano



Retirado de: GEORGIEFF e INNIS, 2005.

A caixa azul indica o período crítico para alterações no aporte de ácidos graxos essenciais. A caixa vermelha indica o período crítico para oferta de ferro.

1.2 LIPÍDEOS - CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

A palavra é derivada do grego *lipos*, que significa gordura (CURI et al., 2002). Do ponto de vista químico, a definição de lipídeos relaciona-se com substâncias solúveis em solventes orgânicos não-polares e insolúveis em água (CURI et al., 2002; WAITZBERG, 2000).

A estrutura fundamental dos lipídeos é composta por Ácidos Graxos (AG), que possuem uma cadeia hidrocarbonada (4 a 26 C) e um grupamento carboxila terminal (ácidos carboxílicos). Os AGs são capazes de gerar mediadores ativos e modular a resposta a hormônios, além de influenciarem as respostas imunológicas inflamatórias e a secreção hormonal (CALDER, 2002).

A presença ou não de duplas ligações nas cadeias hidrocarbonadas dos AGs vai classificá-los como saturados (sem duplas ligações) ou insaturados (com uma ou mais duplas ligações) (NELSON e COX, 2005). Os AGs com uma única dupla ligação recebem a denominação de monoinsaturados (AGMS); já aqueles com duas ou mais duplas ligações são chamados de poliinsaturados (AGPI). A localização da dupla ligação em relação ao carbono mais distante do grupamento carboxila vai classificar os AGs insaturados em n-3, n-6, n-9 ou n-7 (SIDDIQUI, et al., 2004). Também se usa o termo “ômega” em substituição à letra “n” ou mesmo à letra grega “ ω ” (NELSON e COX, 2005).

O organismo humano é capaz de sintetizar a maioria dos AGs dos quais necessita, com exceção dos ácidos Linoléico (AL, 18:2n-6) e α -Linolênico (ALA, 18:3n-3), que são considerados essenciais (AGE) por não serem sintetizados endogenamente. Devem, portanto, ser obtidos através da dieta (DAS e FAMS, 2003). Os AGs essenciais pertencem às classes n-3 e n-6, e são fundamentais para o desenvolvimento adequado do Sistema Nervoso Central e da retina.

1.3 ÁCIDOS GRAXOS E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

O interesse no estudo dos fatores que modificam o desenvolvimento dos recém-nascidos tem levado pesquisadores a darem maior atenção aos AGPI-CLs das séries n-3 e n-6. Esses AGs, além de fundamentais para o crescimento e o

desenvolvimento normal do SNC, são comprovadamente deficientes em prematuros (LAPILLONE e CARLSON, 2001; GEORGIEFF e INNIS, 2005).

Os AGPI-CLs de maior relevância para a nutrição neonatal são os ácidos Docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) e Araquidônico (AA, 20:4n-6), das famílias n-3 e n-6, respectivamente. Esses AGs são formados a partir dos AGEs Alfa-Linolênico (AL, n-3) e Linoléico (ALA, n-6), respectivamente, e são estes os AGPI-CLs mais presentes no plasma fetal e no leite materno (UAUY et al., 1990).

Os lipídeos proporcionam a maior parte da energia dietética e constituem os principais estoques energéticos em recém-nascidos e lactentes. Seu armazenamento e sua subsequente mobilização, a partir das reservas orgânicas, garantem um aporte adequado para o cérebro.

Tradicionalmente, a principal preocupação relacionada aos lipídeos da dieta era a sua digestibilidade. Atualmente, existe um interesse crescente na qualidade do suprimento de lipídeos durante a infância, fazendo com que sejam considerados determinantes, em longo prazo, no crescimento, no desenvolvimento visual e neurológico, e na saúde. Desta forma, a seleção do suprimento dos lipídeos da dieta, no início da vida, é considerada de grande importância (SIMOPOULOS, 2000).

Além de serem componentes estruturais de todos os tecidos, os lipídeos são indispensáveis para a síntese da membrana celular. O cérebro, a retina e outros tecidos neurais são particularmente ricos em AGPI-CL (MENSKIN e KATAN, 1992).

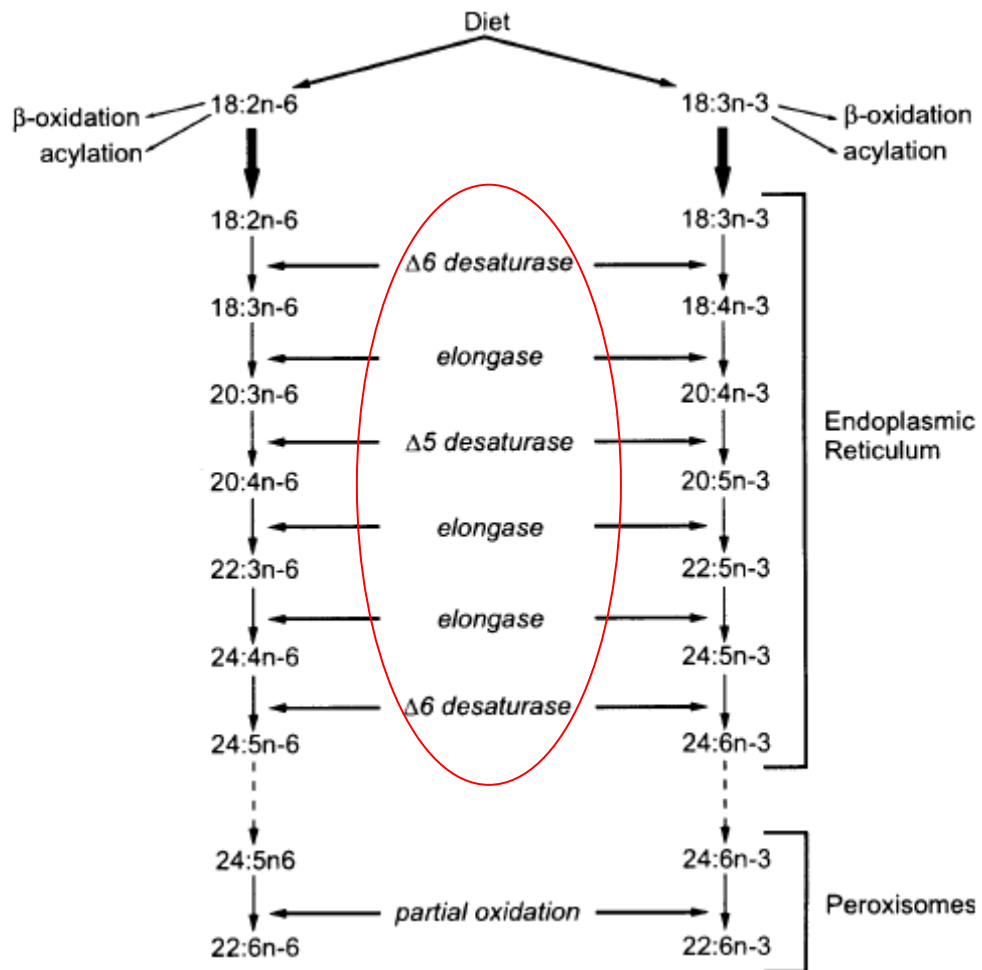
Essas classes de AGs servem também como precursores específicos na produção de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos). Os eicosanóides são potentes reguladores autócrinos e parácrinos de numerosas funções das células e tecidos, inclusive da agregação de trombócitos, reações inflamatórias e funções dos leucócitos, vasoconstrição e vasodilatação, pressão arterial, constrição bronquial e contração uterina (SIMOPOULOS, 1991). A ingestão de lipídeos também afeta o metabolismo do colesterol no início da vida e está associada à doença cardiovascular e à mortalidade no idoso (MENSKIN e KATAN, 1992).

1.3.1 Ácidos graxos essenciais

Em 1929, George e Mildred Burr introduziram o conceito de que componentes específicos da gordura podem ser necessários para o crescimento e o desenvolvimento adequado de animais e, possivelmente, de humanos. Propuseram que os seguintes AGs fossem considerados essenciais: Ácido Linoléico (AL, 18:2n-6), Ácido Araquidônico (ARA, 20:4n-6) e Ácido α -Linolênico (ALA, 18:3n-3) (RIVERS e FRANKEL, 1981).

A essencialidade dos AGs n-6 e n-3 para humanos é melhor explicada pela incapacidade dos tecidos animais de introduzir duplas ligações em posições anteriores ao carbono 9, contando-se a partir da terminação metil ou ômega (n). Se na dieta faltarem os AGEs n-3 e n-6, os tecidos irão acumular ácido eicosatrienóico (20:3 n-9). A proporção entre AGs contendo trienos ou tetraenos (20:3 n-9 a 20:4 n-6) pode ser usada inclusive como um indicador de deficiência de AGEs, mas não é válida como marcador de deficiência isolada de n-3 (RIVERS e FRANKEL, 1981). Tipicamente, em uma deficiência de AG n-3, o AGPI-CL n-6, Ácido Docosapentaenóico (DPA, 22:5n-6), tende a se acumular, enquanto o principal AGPI-CL, Ácido Docosahexaenóico (DHA: 22:6 n-3), diminui nos lipídeos do tecido. Evidências funcionais e bioquímicas indicam que no início da vida o ALA não é convertido de forma suficiente para DHA (UAUY et al., 1989). Desta forma, o LA, o ALA e também o DHA devem ser considerados nutrientes essenciais para o desenvolvimento normal do olho e do cérebro humano. O DHA tem uma cadeia de 22 carbonos com seis duplas ligações, tornando-se um dos mais altamente insaturados AGs no corpo humano. O metabolismo do ALA envolve uma série de dessaturases (inserir duplas ligações à molécula) e alongases (acrescentam unidades de dois carbonos à estrutura molecular). As etapas finais na biossíntese do DHA foram bem definidas por Voss e colaboradores (1991) como reações de dessaturação, alongamento e β -oxidação, para converter o derivado do carbono 22 (22: n-3) no produto final: o DHA. No entanto, essas reações são catalisadas por enzimas que usam como substrato tanto o ALA para conversão em DHA quanto o AL para a conversão em AA, de forma que existe uma competição entre esses dois AGs pelas enzimas. O excesso de um vai prejudicar a síntese do outro. (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da dessaturação e alongação dos ácidos graxos linolêico (18:2n-6) e linolênico (18:3n-3)



Fonte: INNIS, 2003.

Embora o DHA represente uma pequena porcentagem dos AGs na maior parte dos tecidos humanos, atinge concentrações de 30% a 40% do total de AGs nos segmentos externos dos fotorreceptores da retina. Esta alta concentração de um ácido altamente insaturado pode aumentar a fluidez da membrana e, por sua vez, modificar a mobilidade das proteínas e a atividade das enzimas cerebrais e retinianas, fundamentais para a transdução dos sinais nervosos (LAURITZEN et al, 2001).

Os AGEs foram considerados de importância nutricional secundária para humanos até a década de 60, quando então sinais de deficiência clínica se tornaram aparentes em crianças pequenas que recebiam fórmulas baseadas em leite

desnatado, bem como nas que recebiam nutrição parenteral sem lipídeos (UAUY et al., 1989). Elas apresentavam deficiência no crescimento e secura, descamação e espessamento da pele como freqüentes manifestações de deficiência de LA. A patologia epidérmica foi primariamente associada à deficiência de AG n-6, sendo que os sintomas clínicos mais sutis apareciam na deficiência de AG n-3. Estes últimos incluíam efeitos no desenvolvimento neurológico, função visual anormal e neuropatia periférica (UAUY e VALENZUELA, 2000).

1.3.2 Incorporação de ácidos graxos no tecido cerebral

Do nascimento até o início da primeira mamada (em ratos equivale a mais ou menos duas horas), as crias passam a receber da mãe uma dieta láctea pobre em glicídios e rica em lipídeos. Nesta fase, o metabolismo do recém-nascido está adaptado para utilizar lipídeos como principal substrato energético (UAUY et al., 1989).

Durante o pico de crescimento e o início da mielinização (em ratos ocorre entre o sétimo e o 14º dia pós-natal), há um rápido acúmulo de AGs saturados e insaturados de cadeia longa (EDMOND et al, 1998). O acréscimo de AG no cérebro em desenvolvimento tem como fonte, em parte, os AGs captados da circulação materna (MARBOIS et al, 1992).

O peso do cérebro também aumenta progressivamente durante o desenvolvimento, alcançando aquele dos animais adultos por volta do 30º dia de vida pós-natal. A deposição de lipídeos neste órgão, que até o 10º dia é muito inferior ao da proteína, começa a ser importante em função do processo de mielinização. O conteúdo de DNA do cérebro de ratos atinge valores máximos ao redor do 16º dia de vida pós-natal, indicando, portanto, que a proliferação celular já se encontra completa nesta idade. Tem início então a fase de hipertrofia (REINIS e GOLDMAN, 1980).

Considerando que a síntese de AGPI-CL é muito ativa durante o período pós-natal, os fosfolipídeos são necessários para a proliferação das membranas celulares e para a mielinização. Por outro lado, a importância das membranas fosfolipídicas está associada à fluidez, bem como à função e à atividade das enzimas ligadas a esta (LAURITZEN et al., 2001).

As propriedades físicas dos fosfolípidos são, em parte, determinadas pelo tamanho da cadeia carbônica e pelo grau de insaturação dos AGs que a compõem. Tais propriedades físicas, quando alteradas, afetam a habilidade dos fosfolípidos em manter sua função estrutural assim como a atividade normal das enzimas ligadas à membrana. A deficiência de AGPI nos fosfolípidos de membranas diminui a sua fluidez e, deste modo, pode alterar as funções das enzimas relacionadas às membranas e a transdução de sinais nervosos (INNIS, 2000).

Ao nascimento, muitos dos nervos dos bebês carecem de bainhas de mielina maduras, o que explica que os seus movimentos sejam inábeis e descoordenados (RUDICK et al., 1999).

Os processos descritos dependem da correta estruturação cerebral e neural em todas as fases do desenvolvimento. Desta forma, o aporte adequado de AGs que favoreçam esse desenvolvimento deve ser priorizado.

1.3.3 AGPI-CL no crescimento e desenvolvimento neurológico

Conforme relatado, o suprimento de lipídeos, especialmente de AGPI-CL, tem demonstrado contribuir com o desenvolvimento e a função estrutural neural e retiniana, além de constituírem fatores de proteção cardiovascular no adulto (GROENER, et al., 1991, CALDERON e KIM, 2004).

Recentemente, o consumo de AGPI-CL tem despertado grande interesse dos pesquisadores em função das associações encontradas entre o seu consumo e a prevenção de doenças neurodegenerativas em idosos, além da constatação de que portadores de enfermidades neurológicas como esquizofrenia, depressão, Síndrome do Déficit de Atenção e hiperatividade têm menores teores de n-3 nas membranas celulares (SUBLETTE et al., 2004, HASHIMOTO et al, 2002).

As pesquisas iniciais com foco no desenvolvimento cognitivo se deram a partir das comparações entre o aleitamento materno e a utilização de Fórmulas Infantis (FI). (CARLSON et al., 1996; UAUY e CASTILLO, 2003, BIRCH et al, 2002, EILANDER et al, 2007).

Dados acumulados nas últimas décadas, a partir de estudos em animais, dão forte apoio à necessidade de AGPI-CL no início da vida. A deficiência de AG n-3 resultou em respostas eletrorretinográficas anormais em ratos (VOSS et al, 1991) e

macacos (NEURINGER et al., 1988). As informações diretas em humanos são limitadas porque a investigação na área começou há apenas uma década. Os estudos do início da década de 90 forneceram evidências de que a deficiência dietética de AG n-3 afeta a função visual e cerebral em recém-nascidos prematuros, avaliada através de ERG, potenciais evocados visuais corticais e teste de acuidade visual. As alterações da estrutura química na membrana provavelmente são responsáveis pelos efeitos funcionais observados, havendo propostas de um modelo molecular para a função do DHA como modulador da atividade da rodopsina (UAUY et al., 1990).

1.4 RECOMENDAÇÕES DIETÉTICAS DE n-3 E n-6

Conforme visto anteriormente, os AGs das séries n-3 e n-6 participam fundamentalmente de uma grande variedade de funções biológicas, seja por fazer parte de estruturas orgânicas como as membranas celulares, seja como precursores ou ativadores de mediadores orgânicos. É importante ressaltar a necessidade de reduzir os AGPI-CL n-6, ainda que os n-3 sejam aumentados na dieta de adultos e de recém-nascidos, visando a reduzir os efeitos adversos do excesso de AA e a formação de eicosanóides. Tal fato ocorre diante do excesso de AL e AA de origem dietética sem as quantidades adequadas de n-3. As recomendações de proporção n-3/n-6 variam de 5:1 a 15:1; no entanto, há uma grande divergência entre os pesquisadores. Na gravidez e lactação, recomenda-se uma ingestão mínima de 300 mg diários de DHA (SIMOPOULOS et al, 1999). Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de estabelecer as quantidades ótimas de n-3, bem como a relação ideal n-6/n-3 para maximizar o potencial genético de desenvolvimento cerebral; no entanto, os resultados são controversos e não existe ainda um consenso quanto às recomendações (SIMOPOULOS et al, 1999; SIMOPOULOS, 2006 et al., INNIS, 2000, GENIUS e SCHWALFENBERG, 2006; KOLETZKO et al, 2007). Desta forma, há grande variabilidade entre as recomendações vigentes da relação n-6/n-3 (Tabela 1)

Tabela 1 - Algumas das recomendações mais aceitas para a relação entre os ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta.

País / Organização	n-6/n-3	Referência
Canadá	4:1 a 10:1	SCR, 1990
EUA	2:1 a 3:1	Simopoulos, 1999
EUA	4:1	Schaefer, 2002
França	5:1	Chardigny et al., 2001
Japão	2:1 a 4:1	Kris-Etherton et al., 2000
Suécia	5:1	NCM, 1996
Codex Alimentarius	5:1 a 15:1	FAO/WHO, 2007

FAO: Food and Agriculture Organization; SCR: Scientific Review Committee;
NCM: Nordic Council of Ministers; WHO: World Health Organization

A formação de sinapses e a mielinização são processos que se estendem até a adolescência. No entanto, o período crítico do desenvolvimento cerebral situa-se entre o período neonatal e os três anos de vida, momento em que a deficiência nutricional pode causar prejuízos na formação de axônios e dendritos e na mielinização, sendo normalmente o hipocampo a área mais afetada (FERNSTROM, 2000). Crianças com desnutrição protéica e calórica, no período perinatal, apresentam baixo desempenho em testes de inteligência e de processos cognitivos específicos - memória visual, habilidade verbal e aquisição de vocabulário (GEORGIEFF e RAO, 2001). Algumas funções cognitivas ligadas à linguagem e à socialização continuam a se desenvolver até os 20 anos ou mais, embora o potencial genético prejudicado durante o pico de desenvolvimento não se recupere com a adequação nutricional posterior (FERNSTROM, 2000).

A fase na qual ocorreu a deficiência nutricional também vai ser determinante nos seus efeitos sobre o encéfalo e o comportamento. Dobbing, em 1968, relatou que existem períodos especificamente críticos no início da vida, nos quais o organismo está particularmente vulnerável aos efeitos das deficiências nutricionais. Nesses períodos ocorre um aumento particularmente rápido do peso cerebral, acompanhado dos processos de desenvolvimento neuroquímico e neuroanatômico (*brain growth spurt*). Atualmente, se considera período crítico aquele no qual se dá o

pico da atividade de eventos específicos da neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular (SERES, 2001).

Essa fase de maior vulnerabilidade às carências nutricionais, em humanos, vai do terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida (DOBBING, 1968). Em outras espécies animais (roedores, por exemplo), este período ocorre nas três primeiras semanas após o nascimento (MORGANE et al, 1993). Sendo assim, as estruturas mais vulneráveis às deficiências nutricionais nestes animais são aquelas que se desenvolvem após o nascimento, como a formação hipocampal, o bulbo olfatório e o cerebelo.

Danos no desenvolvimento cerebral, nos estágios iniciais da vida, provocam alterações nos parâmetros neuroanatômicos, neuroquímicos, neurofisiológicos e/ou funcionais (WALKER, 2005), que mesmo com a reversão da deficiência nutricional parecem ter caráter permanente (GALLER et al, 1995; RIVERS e FRANKEL, 2001).

1.5 A LINHAÇA COMO FONTE DE ÁCIDOS GRAXOS

A linhaça é uma semente oleaginosa produzida pela planta do linho (*Linum usitatissimum*), cujas fibras são utilizadas pela indústria têxtil. Seu óleo tem propriedades secantes em função do seu alto conteúdo de ALA, além de ser rico em proteínas, lipídeos e fibras dietéticas. Sua composição centesimal mostrou cerca de 41% de lipídeos, 28% de fibras, 21% de proteínas, 4% de resíduos e 6% de hidratos de carbono distribuídos entre ácidos fenólicos, açúcares, lignana e hemicelulose. Cem gramas de linhaça contêm 450 Kcal, distribuídas em 109 Kcal de proteínas e 369 Kcal de lipídeos, o que corresponde a 41 g de lipídeos e 27 g de proteínas a cada 100 gramas (ZHENG et al., 2005).

A produção de linhaça no Brasil ainda é pequena, com cerca de 21 toneladas por ano. A produção mundial tem uma média de 2.400.000 toneladas por ano, sendo o Canadá o maior produtor e a Argentina o maior da América do Sul, produzindo cerca de 80 toneladas anuais. No entanto, com a grande difusão do consumo da semente e de suas inúmeras aplicações industriais em produtos forneados, cereais matinais, ração para animais e subprodutos enriquecidos com AG n-3, esses valores vêm apresentando um aumento significativo inclusive na América do Sul (TURATTI, 2000).

O óleo de linhaça prensado a frio já é oferecido no mercado de produtos naturais, na forma de encapsulados. A semente de linhaça também é usada em fitoterapia, no tratamento de distúrbios gástricos, dispepsias e úlceras, além de ter poder como laxativo (BENNETT, 1985)

O aminograma da linhaça é semelhante ao da soja, uma das maiores fontes protéicas de origem vegetal (AHMED, 1999; OOMAH e MAZZA, 1993).

Quanto à distribuição dos AGs, a semente possui 57% de n-3, 16% de n-6, 18% de AGs monoinsaturados e apenas 9% de AGs saturados (WIESENFELD et al., 2003).

As fibras dietéticas correspondem a cerca de 28% do peso seco da semente, nas proporções entre fibras solúveis e insolúveis que variam entre 20:80 e 40:60, dependendo do método utilizado na análise química. Parte importante da fração de fibra da linhaça é de amido resistente, como celulose e complexos polímeros com lignana. A fração solúvel de fibras é composta por resinas adesivas em valores que oscilam entre 7% e 10%, fato que contribui para seu efeito antiaterogênico. A linhaça é muito rica em potássio, com um teor aproximadamente sete vezes maior do que o da banana, e tem quantidades importantes de vitamina E, na forma de gama-tocoferol, conhecido pelas suas propriedades antioxidantes (CHOO et al, 2007, THOMPSON et al, 1996).

As propriedades antioxidantes da linhaça também merecem destaque. A partir de compostos fenólicos, derivados hidroxilados dos ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas, flavonóides e lignanos (OOMAH 2001; KÄHKONEN et al., 1999; SHUKLA et al., 1997), esses compostos são importantes no desenvolvimento e no crescimento normal e na defesa contra infecções e injúrias (KÄHKONEN et al, 1999). Também os extratos etanólicos (95%) da linhaça exibem propriedades antioxidantes quando avaliados no sistema α -caroteno-ácido linoléico (SHUKLA et al., 1997; MATTHAUS, 2004, AMAROWICZ et al, 2004).

Entre os lignanos tem sido identificado o diglucosídeo seicoisolariciresinol, que teria uma atividade antioxidante potente devido à sua semelhança na estrutura química com o Ácido Nordihidroguaiarético (NDGA), conhecido como um antioxidante eficaz (AMAROWICZ et al, 1993).

1.6 APRENDIZADO E MEMÓRIA

O hipocampo é uma estrutura de grande importância na aprendizagem e memória. Vários estudos indicam que os prejuízos de aprendizagem e memória espacial estão correlacionados com alterações fisiológicas e/ou neuroanatômicas desta estrutura, principalmente nos campos CA3 e CA4. As células granulares do giro denteado também estão envolvidas com o aprendizado e a memória (MORGANE et al, 1993).

Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do SNC, e a expressão de memórias previamente adquiridas é indispensável para a sobrevivência e evolução das espécies (MORGADO, 1999).

Aprendizado e memória são propriedades fundamentais do SNC e estão intimamente relacionados entre si. A capacidade de adaptação e modificação do comportamento dos indivíduos, quando expostos a novas experiências, bem como a de aprender e recordar eventos, depende de motivações induzidas no sistema nervoso pela percepção desses eventos (RAMON Y CAJAL, 1911).

Por ser um processo dinâmico, a memória pode ser dividida em quatro etapas (IZQUIERDO, 2002):

- **aquisição** - através da exposição a uma experiência, o processo de aquisição da informação se dá de forma relativamente automática e consta essencialmente da associação de estímulos e respostas entre si. O processo inicial é intenso e se manifesta no fato de ser a memória de uma experiência recém-vivida geralmente fiel e precisa ao estímulo que a gerou. No entanto, com o passar do tempo, essa intensidade e a clareza dos acontecimentos tendem a decrescer (CAMMAROTA, 1998). Esta etapa do processamento da memória envolve alterações em circuitos neurais existentes, conseqüentes ao contato com uma nova situação ou evento de aprendizagem. A capacidade de armazenamento da informação nesta etapa é bastante limitada e, sem reforço, persiste por um período de apenas minutos (KANDEL et al., 2003). Como os eventos são geralmente múltiplos e complexos, os sistemas de memória só permitem a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição (LENT, 2001);

- **consolidação** - é o processo de filtração e fixação progressiva da informação adquirida: a fase na qual a informação adquirida é processada. Nesta fase, a memória se mostra mais lábil e suscetível a modificações (McGAUGH, 2000). Após a aquisição, as informações selecionadas podem ser armazenadas por algum tempo. Este é o processo de retenção, durante o qual os eventos selecionados ficam disponíveis para serem lembrados. O tempo de retenção é limitado pelo esquecimento. Ambos são definidos, entre outros aspectos, pelo tipo de utilização que se faz de cada evento memorizado. A retenção pode ocorrer por tempos variáveis e nem sempre é permanente (um evento após ter sido retido, pode ser consolidado para posterior evocação, como também ser esquecido após algum tempo) (LENT, 2001);
- **armazenamento** - uma vez consolidadas, as memórias são armazenadas em algum lugar do cérebro, de forma a permanecerem de forma mais ou menos estável com o passar do tempo (IZQUIERDO, 1989; McGAUGH, 1996). O local específico de armazenamento das informações já consolidadas é um aspecto ainda muito pouco claro, mas é sabido que elas se mantêm devido a novas interações neuronais que determinam mudanças na dinâmica comunicacional entre distintas estruturas cerebrais, além de mudanças plásticas nas conexões sinápticas responsáveis pelo armazenamento, que levam à síntese de proteínas (IZQUIERDO, 2002; SOUZA, 2001). O esquecimento provavelmente desempenha um papel muito importante na prevenção de sobrecarga nos sistemas cerebrais dedicados à memorização, e tem ainda a virtude de permitir a filtragem dos aspectos mais relevantes ou importantes de cada evento (LENT, 2001);
- **evocação** - é o processo que torna a informação disponível. A evocação corresponde ao ato de lembrar ou acessar memórias quando necessário (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002; KANDEL et al, 2003).

A única forma de estudar e avaliar o processamento da memória é através da observação de mudanças do comportamento individual após a exposição a novas experiências (QUILLFELDT, 1994).

A consequência dos três primeiros processos envolvidos na memória seria uma aprendizagem que se manifesta por um novo comportamento ou modificação

de um preexistente. No entanto, a maioria dos estudiosos restringe o processo de aprendizagem somente à aquisição de novos conhecimentos, uma vez que a memória seria a retenção dos mesmos (IZQUIERDO et al, 1992; KANDEL e SQUIRE, 2000; MORGADO, 1999). Por definição, não há aprendizagem sem memória e nem memória sem aprendizagem, pois os dois processos encontram-se intimamente ligados e estão presentes em diversos mecanismos do funcionamento cerebral - por exemplo, o reconhecimento da percepção sensorial.

Aprendizagem é o processo de aquisição de novas informações específicas e de conhecimentos gerais sobre o mundo, que serão retidos na memória (LENT, 2001). Experimentalmente, o aprendizado é quantificado como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após a sua repetição (AGRANOFF, 1998).

Em função da dificuldade e das opiniões controversas de diversos autores com relação à definição do que é o processo de aprendizagem, tem-se optado por um termo mais geral que é a plasticidade.

1.6.1 Plasticidade sináptica

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido à plasticidade neural, um fenômeno característico do SNC (RAMÓN Y CAJAL, 1911). O conceito de plasticidade é bastante amplo e inclui todas as formas de reorganização que ocorrem no cérebro. Esta reorganização se dá em aspectos fisiológicos, a partir de propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios, tais como aumento no tamanho e ativação da função dos dendritos, formação ou eliminação de sinapses e aumento da atividade metabólica; e morfológicas, através de alterações na morfologia e ultra-estrutura neuronal e glial; e bioquímicas, que envolvem atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica. A plasticidade resulta de processos adaptativos do funcionamento cerebral que acarretam alterações estruturais e funcionais nas sinapses. A modulação do comportamento é decorrente desse processo adaptativo, uma vez que gera alterações na eficiência sináptica, com aumento ou diminuição de impulsos nervosos (AU LOIS et al., 1997; McMAHON e BARRIONUEVO, 2002).

O cérebro desenvolve respostas plásticas durante longos períodos que acabam por provocar mudanças estruturais de longa duração (AU LOIS et al., 1997). O SNC pode apresentar uma plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma atividade, como o aprendizado de uma nova tarefa ou o estímulo a uma nova percepção sensorial (COTMAN, 1998).

1.6.2 Mecanismos de memória

A memória é composta por múltiplos sistemas independentes que trabalham de forma cooperativa. Diferentes etapas são necessárias para a fixação da memória, e durante certo tempo, após o aprendizado, a memória permanece vulnerável a interferências. A maior parte do processo de consolidação se completa nas primeiras horas após o aprendizado. No entanto, o processo de estabilização da informação armazenada se estende por um prazo mais longo e envolve alterações contínuas na própria organização da memória (TOMAZ, 1999).

“Podemos afirmar que somos aquilo que recordamos, literalmente” (IZQUIERDO, 2002). O acervo de memórias e lembranças de cada um vai determinar aquilo que se denomina personalidade. “Nós somos quem somos, em grande parte, devido ao que aprendemos e ao que lembramos” (KANDEL et al., 2003). Nossas memórias são feitas e armazenadas em redes neurais. Existem diferentes redes neurais para diferentes tipos de memória, redes estas localizadas em estruturas neurais distintas e com neurônios que utilizam mecanismos celulares distintos. O funcionamento destas redes é modulado pelas emoções, pelo nível de consciência e pelo estado de ânimo (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002; KANDEL et al., 2003).

Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos. Considera-se que as informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais, de acordo com a sua função: memórias motoras próximas do córtex motor, memórias visuais próximas do córtex visual, e assim por diante. Além disso, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, especialmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdaloide do lobo temporal (LENT, 2001). Existem evidências de

que o SNC exerça também um efeito modulatório sobre memórias procedurais, sinalizando principalmente a contingência de reforço.

Estudos distintos têm demonstrado, ao longo do tempo, que existem vários processos de memória, e que estes envolvem diferentes sistemas neurais e regiões cerebrais. Há muitas classificações de memórias, de acordo com a sua função e natureza, o tempo que duram e o seu conteúdo. Tais classificações, às vezes, sobrepõem-se de acordo com o critério utilizado pelo autor (KANDEL et al, 2003; IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001).

1.6.3 Tipos de memória

Um tipo de memória muito breve e fugaz é a chamada memória de trabalho ou memória operacional, que serve para “gerenciar a realidade”. É comparável à memória RAM dos computadores. A memória de trabalho serve para manter viva na mente, durante alguns segundos, a informação que está sendo processada, e sua atividade está relacionada ao funcionamento do lobo frontal (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002). Após a entrada das informações, ocorre a primeira seleção do que poderá ser armazenado durante um tempo um pouco maior, suficiente para orientar o pensamento e o comportamento (LENT, 2001). A memória de trabalho irá então determinar o contexto em que os diversos fatos, acontecimentos ou outros tipos de informação ocorrem, e se vale a pena ou não fazer uma nova memória disso, ou se esse tipo de informação já consta nos arquivos armazenados (IZQUIERDO, 2002).

A memória de trabalho é processada principalmente pelo córtex pré-frontal. Em todas as espécies, o córtex pré-frontal atua em conjunto com o córtex entorrinal, parietal superior e cíngulo anterior, e com o hipocampo e os núcleos da base (FAW, 2003). Este trabalho conjunto é realizado através de suas diversas conexões. Mas a formação da memória de trabalho é acompanhada de poucas alterações bioquímicas. Seu processamento parece depender fundamentalmente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal que, no entanto, liberam neurotransmissores nos neurônios pós-sinápticos, comunicando traduções bioquímicas da informação processada (IZQUIERDO, 2002).

Independente de quais são seus caminhos, a memória de trabalho fornece ao indivíduo o mínimo necessário para a realização das operações do dia-a-dia: compreensão dos fatos, raciocínio, resolução de problemas e gerenciamento do comportamento. Pode-se dizer que é o sistema que gerencia quais informações serão armazenadas por curtos ou longos prazos, quando o sujeito está vivenciando uma experiência (IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001).

O córtex pré-frontal e a memória de trabalho também estão envolvidos com os processos de aquisição e evocação da memória de longa duração.

Mover uma informação disponível na memória de trabalho para o seu local de armazenamento faz parte do processo de aquisição de uma memória de longa duração. Trazer uma informação de volta para a “consciência” é evocação. Dentre os tipos importantes da memória de longa duração, uma distinção pode ser feita entre memórias declarativas e não-declarativas (KANDEL et al, 2003; IZQUIERDO, 2002). A memória declarativa refere-se à memória que o sujeito pode relatar verbalmente. Uma outra classificação próxima a esta divide as memórias de longa duração em memórias implícitas e explícitas.

As memórias explícitas são aquelas que podem ser evocadas conscientemente; as implícitas são as que influenciam o comportamento do indivíduo sem que ele se dê conta de que aprendeu algo que agora o orienta naquela situação. Algumas memórias implícitas e não-declarativas são demonstradas através de um procedimento motor (andar de bicicleta, nadar etc). Estas memórias são chamadas de memórias de procedimento. O armazenamento de memórias declarativas requer a ativação do hipocampo e das áreas adjacentes do lobo temporal (KANDEL et al, 2003; IZQUIERDO, 2002; LENT, 2001). Por outro lado, acredita-se que a formação de memórias procedurais depende da integridade do estriado (KANDEL et al, 2003;).

1.6.4 Hipocampo e memória

A formação hipocampal é constituída por três partes: o giro denteado, o hipocampo propriamente dito e o subículo. Em humanos, o hipocampo e o giro denteado situam-se profundamente no lobo temporal, paralelos ao giro para-

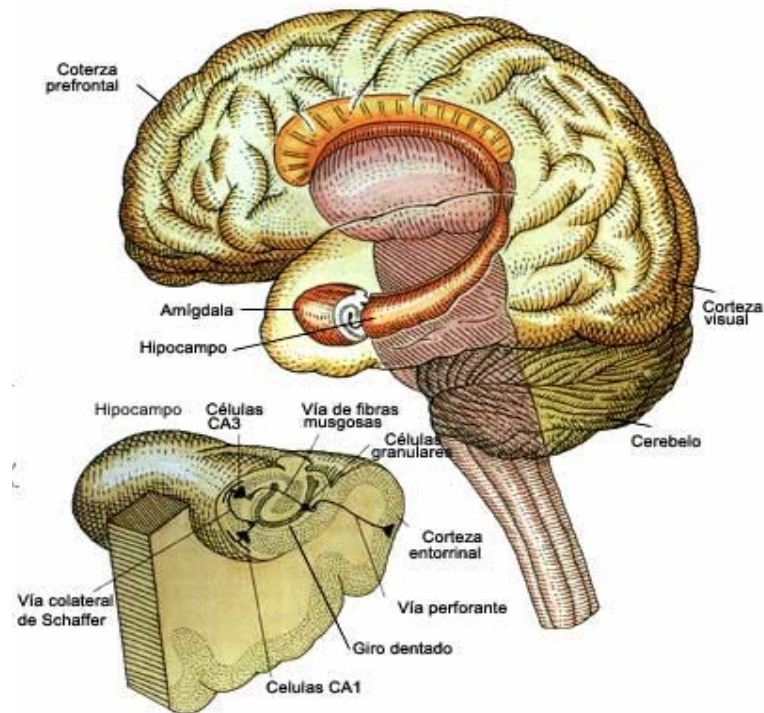
hipocampal. O subículo é uma zona de transição entre o hipocampo e a área entorrinal, parte do giro para-hipocampal (YOUNG, 1998).

O giro denteado é formado por três camadas distintas: a molecular (externa), a granular (média) e a polimórfica (profunda). O tipo de neurônio mais característico e abundante é a célula granular, cujos corpos celulares empilham-se densamente na camada granular. Sua árvore dendrítica irradia-se para a camada molecular e seus axônios saem do giro denteado, atingindo a camada molecular do hipocampo como fibras musgosas (BURT, 2001).

O hipocampo é paralelo ao giro denteado, tanto em localização quanto em desenvolvimento. Também é formado por três camadas: a polimórfica (externa), a de células piramidais (média) e a molecular (profunda). No hipocampo, o tipo celular mais característico é a célula piramidal da camada de células piramidais, cujas árvores dendríticas se estendem até a camada molecular. Seus dendritos e axônios descem até a camada polimórfica (BURT, 2001).

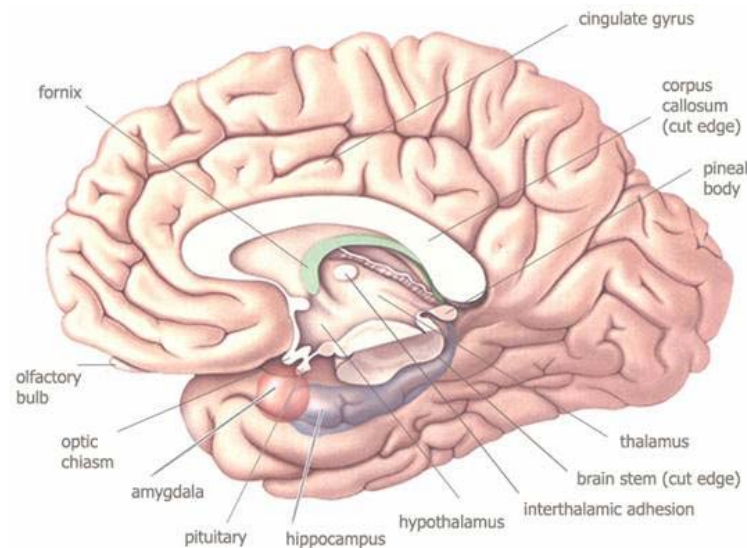
O hipocampo é uma estrutura relativamente uniforme quanto à sua composição celular. No entanto, existem pequenas diferenças entre regiões e áreas, tanto em padrões citoarquitetônicos quanto neuroquímicos. Por este motivo, o hipocampo é subdividido em regiões e campos. A região superior, formada por uma camada compacta de células piramidais, estende-se aproximadamente até a metade da distância entre o subículo e o giro denteado. O restante do hipocampo recebe a designação de região inferior. Também há uma divisão por campo, determinada por pequenas variações na composição celular. São quatro os campos que compõem o hipocampo, designados pelas letras CA (de *cornu ammonis*) e um número (de um a quatro). O CA1 ocupa a maior parte da região superior e o CA3 a maior parte da inferior. O CA2 tem pequena extensão e é uma zona de transição entre o CA1 e o CA3. Já o CA4 fica na zona de transição entre o hipocampo e o giro denteado (BURT, 2001). Figura 4:

Figura 4a - Esquema do cérebro humano detalhando o hipocampo e suas principais estruturas



Fonte: Squire e Kandel (2000)

Figura 4b. Esquema do cérebro do rato identificando suas principais estruturas



Fonte: Fuster, JM., 1995

O hipocampo atua na aprendizagem e no armazenamento da representação do ambiente espacial, através da sua codificação em mapas cognitivos. O conceito de mapa cognitivo refere-se ao estabelecimento de representações de pistas associadas a um local e das posições relativas a estes locais, capacitando o

organismo a utilizar tais representações. Os mapas são construídos ao longo das interações do organismo, com objetos e estímulos presentes no ambiente. A partir desta teoria, estabelece-se que os animais podem formar relações espaciais entre os objetos e o ambiente, relacionando os eventos com o contexto espacial no qual eles ocorrem. Além desse sistema de mapas cognitivos, existe ainda um outro sistema de localização espacial que não depende da formação hipocampal, denominado de “sistema de táxon” (O’KEEFEE E NADEL, 1978).

Como a memória não pode ser definida simplesmente como a recordação ou lembrança de eventos passados, e também envolve processos complexos ligados a fatores neuroanatômicos, neurofisiológicos, neuroquímicos, comportamentais e ambientais, podemos defini-la, de um modo geral, como um processo que envolve a capacidade de aquisição, armazenamento e evocação das informações (KESSELS e HAAN, 2001). Outros autores definem a memória como a capacidade de alterar o comportamento em função de experiências anteriores. Esta definição também pode ser atribuída à aprendizagem (CATÂNIA, 1998).

Estudos com modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do SNC, entre as quais tem destaque o hipocampo. Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos e de cascatas bioquímicas dos neurônios. Além dos mecanismos envolvidos diretamente na formação da memória, esta ainda pode ser modulada pela ação de vários neurotransmissores, neuromoduladores e hormônios (McGAUGH, 1996).

1.6.5 Estudo da memória

Múltiplos sistemas independentes trabalham de forma cooperativa na formação da memória (TOMAZ, 1999). Na memória de curto prazo, ocorre o armazenamento de pequenas quantidades de informações por um período de tempo limitado, enquanto na memória de longo prazo são armazenadas grandes quantidades de informações por um período de tempo ainda não determinado (BADDELEY E HITCH, 1974). Os conceitos de memória de longo e de curto prazo foram ampliados para memória de referência e memória operacional, respectivamente. De acordo com Baddeley e Hitch (1974), a memória operacional é

composta por uma central executiva, com auxílio de dois subsistemas de suporte responsáveis pelo arquivamento temporário e pela manipulação de informações - sistemas visuo-espacial e fonológico. A central executiva é um sistema com capacidade limitada, responsável pela conexão entre os sistemas de suporte e pela memória de longa duração. E também pela seleção de estratégias e planos. O sistema fonológico (alça fonológica) é responsável pelo processamento do material verbal, enquanto o visuo-espacial pelo processamento do material visual e espacial. Posteriormente, um quarto componente foi inserido no modelo - *buffer* episódico, uma fração da central executiva na qual a informação evocada da memória de longa duração se tornaria consciente (BADDELEY, 2000).

Segundo Olton e Becker (1979), com base em seus estudos sobre aprendizagem e memória espacial, o tempo cronológico não seria o fator determinante sobre a manutenção ou não de uma informação, mas o processamento inicial que a originou. Desta forma, as informações apresentadas em contextos temporais específicos seriam organizadas por um sistema de memória denominado de memória operacional, a ser mantida por curtos períodos de tempo. Já as informações utilizadas em diferentes situações, independentes de contexto específico, seriam arquivadas sob a forma de memória de referência, podendo ser armazenadas por tempo indeterminado.

No labirinto aquático é possível criar diferentes procedimentos comportamentais que permitem estudar os sistemas de memória e aprendizado.

O desempenho de ratos em tarefas que procuram avaliar os comportamentos de aprendizagem e memória foi estudado utilizando-se uma grande variedade de modelos de lesão cerebral e de testes comportamentais.

Morris (1981) descreveu uma metodologia que permite utilizar duas formas de navegação espacial e diversas formas de retenção de informação. O animal é colocado numa piscina circular com água, para que possa nadar em direção a uma plataforma. Na versão chamada de memória de procedimento, a plataforma é visível a partir de uma pista visual afixada em sua superfície, permitindo que o animal identifique com rapidez a sua localização (Figura 5). Nesta versão, o animal se orienta pela pista visual, utilizando o “sistema de táxon”, independente da função hipocampal, já que não há necessidade de formar um mapa cognitivo de orientação espacial através das relações entre os objetos colocados próximos ao labirinto. Na outra versão, a plataforma está submersa e, portanto, invisível para o animal.

Com a plataforma invisível, podem ser avaliadas a memória operacional (MO) e a memória de referência espacial (MRE), que aferem a retenção da informação em diferentes espaços de tempo. (Figura 6)

Nas duas versões, a plataforma submersa é mantida em posição fixa relativa às pistas visuais que ficam fora do labirinto. O animal, para aprender a localização da plataforma, tem que utilizar as pistas ambientais e navegar até a plataforma. As versões dependentes de pista visual forçam o uso de estratégias de mapeamento espacial. O que diferencia as duas versões é o tempo que decorre entre o treinamento e o teste, caracterizando a duração de retenção da informação. Na versão da memória operacional, a plataforma submersa é mudada de posição a cada dia de treino - e os treinos são feitos em dias consecutivos. Desta forma, as informações retidas em um dia não são úteis para o dia seguinte, podendo ser descartadas; já na versão da memória espacial de referência, a plataforma é mantida na mesma posição e há um intervalo de dois dias entre os treinos, de modo que seja necessária a retenção da informação por um período maior.

Figura 5 – Teste do Labirinto Aquático de Morris, versão Memória Operacional ou Memória de Referência Espacial (plataforma invisível para o animal).

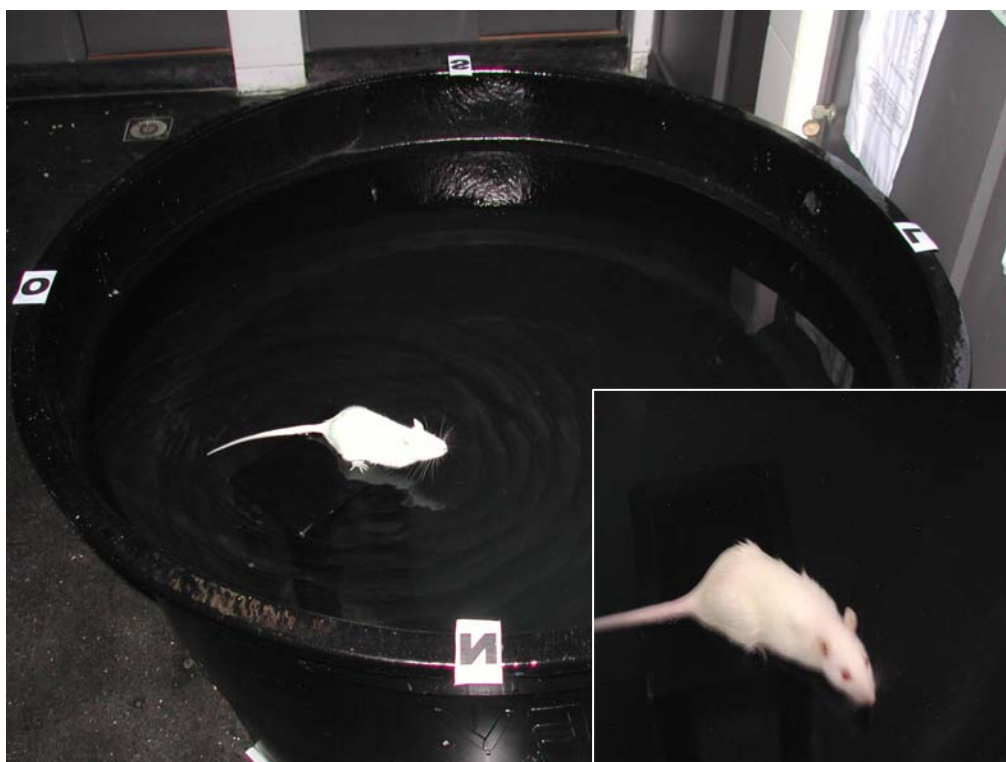


Imagem produzida no Laboratório de Nutrição Experimental (UFF) durante uma das sessões de teste deste trabalho.

Figura 6 – Teste do Labirinto Aquático de Morris, versão Memória de Procedimento (com pista visual).

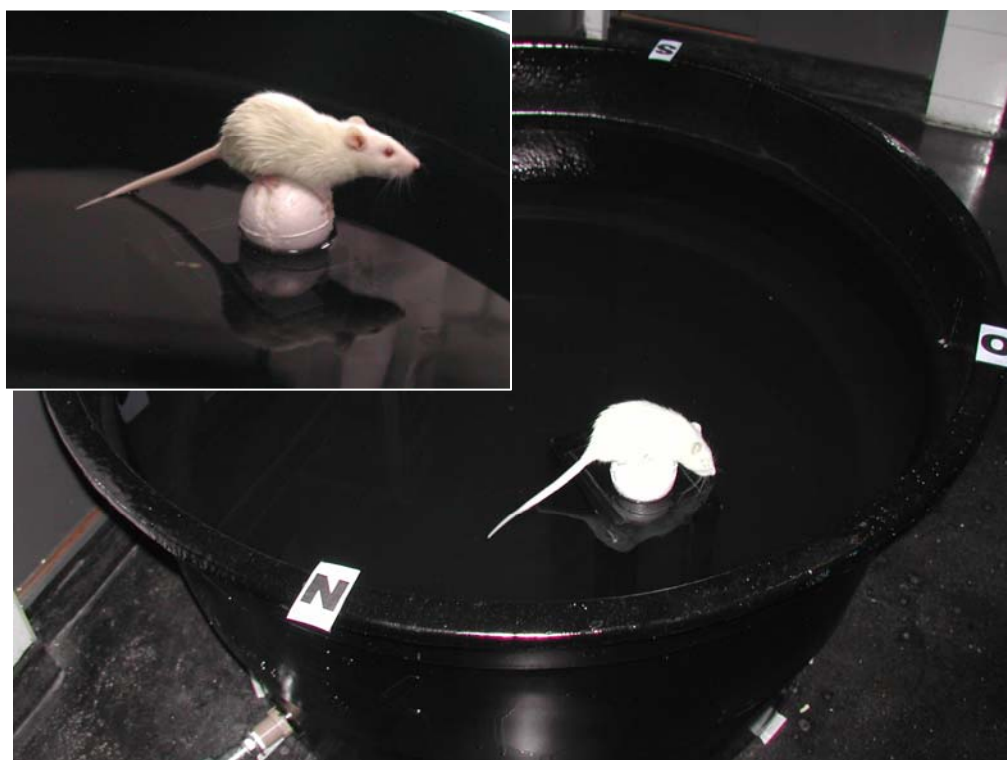


Imagem produzida no Laboratório de Nutrição Experimental (UFF) durante uma das sessões de teste deste trabalho.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a efetiva participação dos AG n-3 no desenvolvimento e maturação do SNC; as evidências de ser o DHA o ácido graxo mais presente no tecido cerebral, responsável pela fluidez das membranas celulares e eficiência das conexões sinápticas, além de participar na síntese de neurotransmissores; e as associações crescentes entre o teor de n-3 nos tecidos cerebrais e o melhor desenvolvimento cognitivo, este estudo pretende avaliar a eficiência da semente de linhaça como fonte de AG n-3, enquanto alimento funcional de baixo custo, e a sua efetividade no desenvolvimento neurológico e cognitivo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da semente de linhaça durante o período pré concepcional, gestacional e lactacional em ratas bem como o crescimento e o desenvolvimento cognitivo de suas crias, associados à composição relativa de ácidos graxos tanto do leite materno quanto do cérebro dos filhotes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Determinar o peso corporal e consumo alimentar das fêmeas no período pré concepcional, gestacional e durante a lactação;
- 3.2.2 Verificar o potencial reprodutivo das fêmeas dos grupos alimentares através da quantificação dos filhotes de cada ninhada e do percentual de fêmeas fertilizadas em cada grupo;
- 3.2.3 Verificar a mortalidade neonatal de cada grupo experimental;
- 3.2.4 Determinar o peso corporal e cerebral dos filhotes dos diferentes grupos experimentais no pós-natal imediato.
- 3.2.5 Quantificar os teores relativos de ácidos graxos dos lipídeos totais do cérebro dos grupos de filhotes no pós-natal imediato.
- 3.2.6 Determinar o crescimento dos filhotes durante o período de aleitamento;
- 3.2.7 Quantificar o consumo alimentar e a evolução ponderal dos filhotes dos diferentes grupos experimentais do desmame aos 49 dias de vida;

- 3.2.8 Determinar os indicadores biológicos de crescimento dos diferentes grupos experimentais.
- 3.2.9 Caracterizar o perfil de ácidos graxos nos lipídeos totais, nas dietas experimentais.
- 3.2.10 Caracterizar o percentual lipídico e o perfil de ácidos graxos nos lipídeos totais do leite materno, durante a lactação exclusiva.
- 3.2.11 Verificar possíveis diferenças no aprendizado e aquisição de memória, através de três versões do Labirinto Aquático de Morris, nos diferentes grupos de animais a partir dos 30 dias de idade.
- 3.2.12 Estabelecer uma correlação entre os parâmetros nutricionais encontrados com o consumo de AG n- 3 fibras e antioxidantes da semente de linhaça.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (fêmeas) oriundos do biotério de criação do Laboratório de Nutrição Experimental (LabNE) do Instituto de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (UFF), obtidos imediatamente após o desmame (21 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais (42 x 34 x 17 cm), em condições controladas de umidade e temperatura (23 + 1°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h), divididos em três grupos conforme a ração experimental: Grupo Controle (GC), recebendo ração à base de caseína, segundo formulação AIN-93 (REEVES, 1993); Grupo Linhaça (GL), recebendo ração à base de caseína suplementada com semente de linhaça como fonte de fibras e óleo; e Grupo Caseína Modificada (GCM), recebendo ração à base de caseína suplementada de óleo de soja, no intuito de igualar o teor lipídico com o do GL. A ração foi consumida *ad libitum* pelos GCs e GLs, e no sistema de *pair feeding* com o GL pelo GCM. A água foi consumida *ad libitum* por todos os grupos experimentais.

Em experimentos anteriores, foi verificado que os animais do GL tinham um consumo alimentar espontaneamente menor do que os do GC, provavelmente pelo alto teor de fibras e lipídeos da dieta. Isto fez com que os animais tivessem um crescimento inferior aos controles. Por este motivo, foi instituído o GCM, que recebeu ração à base de caseína com teores de lipídeos e fibras equivalentes aos da ração de linhaça e em quantidades iguais às aquelas consumidas pelo GL.

Após a maturação sexual (90 dias), as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para cada três fêmeas. Após o parto, as ninhadas foram ajustadas com seis filhotes para cada mãe, no intuito de estabelecer condições

ideais para o desempenho lactotrófico. O desmame ocorreu no 21º dia de vida, quando os animais de cada grupo (n=6) foram separados da mãe acondicionados em gaiolas individuais, passando a receber a mesma dieta materna. Aos 30 dias de vida pós-natal, os animais foram submetidos aos testes cognitivos e comportamentais, com o sacrifício realizando-se aos 52 dias de vida, ao final dos testes.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), e devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, sob o número 188/06.

4.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS

As rações foram produzidas no LabNE e tiveram como componentes básicos caseína, mistura de vitaminas e minerais, bitartarato de colina e L-cistina (Comercial Rhostr Indústria e Comércio Ltda), amido de milho (Maizena®), açúcar refinado (União®), celulose microcristalina (Blanver®) e óleo de soja (Lisa®), para as rações dos GCs e GCMs, e semente de linhaça (ArmaZen®) para a ração do GL. Todas as rações experimentais foram isocalóricas, isoprotéicas e normolipídicas, seguindo as recomendações do American Institute of Nutrition-93 (58) (Tabela 1). Nas rações GL, considerou-se o teor de lipídeos equivalente a 25 g de linhaça igual a 10 g de lipídeos totais.

4.2.1 Confeção

Para a confeção da ração, a semente de linhaça foi moída em moinho Fritsch Pulverisette® 14, sendo a farinha resultante acondicionada em sacos plásticos herméticos, lacrada e armazenada em refrigerador. As quantidades de farinha de linhaça armazenadas não ultrapassaram a quantidade de 3 kg, no intuito de evitar o armazenamento prolongado e conseqüentes alterações nas propriedades originais da semente. O processamento térmico das sementes de linhaça, objetivando inativar fatores antinutricionais e favorecer a digestibilidade, não foi possível devido à grande quantidade de mucilagem presente nas sementes que,

quando submetidas a temperaturas mais elevadas, produzem uma goma densa que torna inviável a sua manipulação.

Os ingredientes de cada ração foram homogeneizados em batedeira industrial (Semco Hobart®) e acrescidos de água fervente para a formação de uma massa consistente. Em seguida, a massa foi processada em prensa para a formação de *pellets* e levada à estufa (Fabbe Primar® nº 171), a 60°C, por 24 horas. A ração pronta, depois de resfriada, foi acondicionada em sacos plásticos herméticos e armazenada em refrigerador por um período não maior do que cinco dias.

Tabela 2 - Composição das rações experimentais (g/100g; AIN 93).

Ingredientes (g/100g)	GC		GCM		GL	
Linhaça moída	-		-		25,00	25,00
Caseína	10,87	(18,48)	10,87	(18,48)	5,43	(13,04)
Amido	62,08	(54,47)	59,08	(51,47)	54,52	(46,91)
Açúcar	10,00		10,00		10,00	
Mistura de minerais ^a	3,50		3,50		3,50	
Mistura de vitaminas ^b	1,00		1,00		1,00	
Óleo	7,00		10,00		-	
Celulose	5,00		5,00		0,00	
Bitartarato de colina	0,25		0,25		0,25	
L-Cistina	0,30		0,30		0,30	

() Período de gestação e lactação.

^a Mistura de minerais (g/kg de dieta) inclui: carbonato de cálcio 357,0; fosfato de potássio monobásico 250,0; citrato de potássio H₂O 28,0; cloreto de sódio 74,0; sulfato de potássio 46,6; óxido de magnésio 24,0; sulfato ferroso 7H₂O 5,21; carbonato de zinco 1,65; carbonato de manganês 0,63; carbonato cúprico 0,3; iodato de potássio 0,01; selenato de sódio 0,01025; amônio paramolibdato 4H₂O-0,007; sódio metasilicado 9H₂O-1,45; sulfato de cromo-potássio 12H₂O- 0,27; cloreto de lítio 0,01; ácido bórico 0,08; carbonato de níquel 0,03; vanádio amônio 0,007 (AIN-93M-MINERAL MIX DYETS #210052, DYETS INC., BETHLEHEM, PA, USA).

^b Mistura de vitaminas (g/kg de dieta) inclui: tiamina HCl, 0,60; riboflavina 0,60; piridoxina HCl 0,70; niacina 3,0; pantotenato de cálcio 1,60; ácido fólico 0,20; biotina 0,02; vitamina B12 2,50; vitamina A-palmitato (500,0 UI/g) 0,80; vitamina E-acetato (500 IU/g) 2,5; vitamina D3 (400,000IU/g) 0,25; vitamina K1 0,75 (AIN-93M-VITAMIN MIX DYETS #310025, DYETS INC., BETHLEHEM, PA, USA).

4.2.2 Composição centesimal das rações experimentais

Todas as rações experimentais passaram por análises químicas regulares no intuito de manter constante a oferta de nutrientes. Para tanto foram determinadas suas composições centesimais de acordo com as seguintes metodologias:

- **umidade** - foi determinada por gravimetria, em estufa (Quimis®) a 105°C, até atingir peso constante (AOAC, 1984).
- **cinzas** - o resíduo mineral fixo foi determinado por gravimetria, utilizando-se mufla (Quimis) a 550°C (AOAC, 1984).
- **extrato etéreo** - foi determinado por extrator de Soxhlet, utilizando como solvente o éter etílico (AOAC, 1984).
- **proteína** - o teor de proteína foi determinado pelo método micro-Kjeldahl para nitrogênio total, onde o fator 6,25 foi utilizado para a conversão em proteína (AOAC, 1984).
- **fração fibra** - foi determinada utilizando-se o método Fibra em Detergente Ácido (ADF, Robertson e Van Soest, 1981), modificado por Mendez et al. (1985).
- **fração nifext** - corresponde aos carboidratos e foi determinada pela diferença após a determinação das frações anteriores.

4.2.3 Distribuição percentual de ácidos graxos das rações

A distribuição percentual dos ácidos graxos foi realizado nas rações experimentais prontas, após sete dias de armazenamento: Para determinação do perfil de ácidos graxos das rações foi inicialmente realizada a extração, saponificação e metilação dos ácidos graxos das amostras de acordo com o método de Lepage e Roy (1986). Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gasosa e os ácidos graxos separados com coluna de capilar SP-2560 (Supelco Inc. Bellefonte, PA), como descrito em estudo anterior (ASUMPCÃO et al, 2004). Os ésteres foram identificados por comparação com seu tempo de retenção, com padrões conhecidos (Sigma, Supelco e Nuchek).

4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

O consumo de ração e a evolução ponderal dos animais foram monitorados durante todo o período experimental, de dois em dois dias, em balança digital (Gehara®) com precisão de 0,05 g.

Foram utilizados os seguintes indicadores biológicos:

- 4.3.1 Protein Efficiency Ratio (CAMPBELL, 1963): calculado através da relação entre o ganho ponderal e o consumo protéico dos animais, durante o período de 28 dias após o desmame. Indica a capacidade de crescimento deles;
- 4.3.2 Coeficiente de Eficácia Alimentar (CAMPBELL, 1963) - determinado pela relação entre a variação ponderal dos animais e a quantidade de ração consumida. Indica quanto um grama de ração ingerido promove em aumento de peso corporal do animal;
- 4.3.3 Net Protein Retention (CAMPBELL, 1963) - calculado a partir do peso corporal de um grupo de animais recebendo dieta isenta de proteínas. O ganho ponderal dos animais do grupo em teste é somado à perda ponderal dos animais do grupo aprotéico.

4.4 ANÁLISE DO LEITE MATERNO

4.4.1 Coleta do leite

Foi seguido o protocolo descrito por KEEN et al (1981). Quatro horas após a separação das ninhadas de suas mães, no 21º dia de vida, momento do desmame, as fêmeas receberam 5 ml de oxitocina e foram anestesiadas com Xilazina 2% (Calmium®), na proporção de 20 mg/kg do peso corporal. As drogas foram injetadas via intraperitoneal. O leite para análise foi retirado através de expressão manual.

4.4.2 Determinação do crematócrito

Foi realizada segundo metodologia da Rede Nacional de Bancos de Leite Humanos / IFF / Fiocruz. (LUCAS et al, 1978) As amostras foram homogeneizadas em agitador vortex (Certomat MV, B. Braun) e aquecidas em banho-maria, a 40°C

(Nova Técnica®), durante 10 minutos. Foram coletadas alíquotas de 75 microlitros em tubo microcapilar em triplicata. Uma das extremidades do microcapilar foi vedada por calor em Bico de Bunsen e, em seguida, os capilares foram centrifugados por 15 minutos, a 15.000 rpm (Sigma 4X-15). A leitura foi feita em régua milimetrada e foram calculados o percentual de gordura e o valor calórico do leite, expressos em Kcal/litro.

4.4.3 Distribuição percentual de ácidos graxos do leite materno

A determinação dos ácidos graxos do leite materno foi feita seguindo a mesma metodologia descrita para a dosagem de AG das rações.

4.5 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS CEREBRAIS

Imediatamente após o sacrifício, no período pós-natal, os cérebros foram retirados com auxílio de tesoura e pinça, seguindo uma padronização com relação à porção de corte do tronco encefálico e bulbo olfatório, visando à uniformidade entre as amostras. A seguir, foram pesados em balança analítica, com precisão de 0,001 g (Bosh S-2000), congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e acondicionados em *freezer* para posterior dosagem de ácidos graxos que foi feita seguindo a metodologia descrita para as dosagens de ácidos graxos citadas anteriormente.

4.6 MODELOS COGNITIVOS

4.6.1 Teste do labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (1,20 m de diâmetro e 80 cm de altura), baseado no modelo proposto por MORRIS e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo esta mantida à temperatura constante ($26 \pm 1^\circ \text{C}$). Foram estabelecidas quatro posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do

labirinto em quatro quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma utilizada para os testes com a plataforma submersa (testes de memória operacional e memória espacial de referência) era de cor preta (10 cm x 10 cm) e foi submersa a 1,5 cm da superfície da água. Para o teste com pista visual (teste da memória de procedimento), uma bola de cor branca (7 cm de diâmetro) foi fixada sobre a superfície superior da plataforma submersa, de modo a permanecer visível sobre a superfície da água.

Durante os experimentos, um sistema de câmera digital acoplada a um computador capturou as imagens do labirinto aquático, para posterior análise das imagens.

4.6.1.1 Versão Memória Operacional:

Os animais foram submetidos a quatro treinos por dia, durante cinco dias. A cada dia, os animais eram liberados de quatro pontos de partida diferentes, de forma pseudo-aleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição durante todas as sessões do dia, mas entre um dia e outro foi trocada de posição. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso não encontrasse a plataforma neste tempo, era levado manualmente até a plataforma e lá deixado por 30s. Os tempos de latência para o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 30 s, o animal foi colocado no ponto de partida seguinte.

4.6.1.2 Versão Memória de Referência Espacial

Os animais foram submetidos a seis treinos no labirinto aquático (durante um único dia). Em cada treino, os animais foram liberados de pontos de partida diferentes, de forma pseudo-aleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição (Sudeste) durante todo o treinamento. No dia do teste (48 h após o treinamento), repetiu-se o procedimento do dia de treinamento com exceção do número de sessões terem sido reduzidas para três. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso não encontrasse a plataforma neste tempo, era levado manualmente até a plataforma, onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, ele foi retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s. Em seguida, era colocado no próximo ponto de partida.

4.6.1.3 Versão Memória de Procedimento.

Os animais foram submetidos a quatro treinos por dia, durante quatro dias, no labirinto aquático. A cada treino, foram liberados de quatro pontos de partida diferentes (Norte, Sul, Leste e Oeste) e a plataforma visível foi sendo trocada de posição, a cada treino, entre os quatro diferentes quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso não encontrasse a plataforma neste tempo, era levado manualmente até a plataforma, onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, ele foi retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s. Neste intervalo, foi efetuada a troca de posição da plataforma para o treino seguinte. A posição de partida e a posição da plataforma foram arranjadas de modo que as distâncias (proximal e distal) fossem contrabalançadas entre os treinos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos em médias (\pm Erro Padrão da Média - EPM). Uma vez constatada a não normalidade de suas distribuições, através do teste de Shapiro-Wilk, os dados foram tratados com estatística não-paramétrica, de acordo com o teste de Kruskal Wallis para variáveis independentes, com nível de significância $p < 0,05$ e as correlações foram feitas através do coeficiente de correlação de Spearman sendo considerado significativo $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS-10.

6 RESULTADOS

Os dados obtidos no presente estudo foram organizados de forma a constituir duas possíveis publicações. Na primeira, reunimos os dados da massa corporal materna, ingestão alimentar, composição do leite materno e dados de crescimento das crias após o nascimento e lactação.

Os resultados dos filhotes após o desmame, como massa corporal e composição dos ácidos graxos cerebrais associados com o comportamento cognitivo, estão constituindo um segundo artigo.

Desta forma, apresentaremos os resultados respeitando este formato:

1. A ingestão de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) por ratas durante a pré-concepção, gestação e lactação altera fertilidade, massa corporal materna composição do leite e o crescimento dos filhotes, a ser submetido à ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY.
2. Distribuição percentual dos ácidos graxos cerebrais e comportamento cognitivo em ratos jovens (42 dias de vida) alimentados com dieta à base de semente de linhaça desde a fase intrauterina, a ser submetido à NUTRITIONAL NEUROSCIENCE

ARTIGO 1

Título:

A ingestão de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) por ratas durante a pré-concepção, gestação e lactação altera fertilidade, massa corporal materna, composição do leite e crescimento dos filhotes

Autores:

Flávia Spreafico FERNANDES ¹, Kátia Calvi Lenzi DE ALMEIDA ², Maria Angélica GUZMÁN-SILVA ², Maria das Graças TAVARES DO CARMO ³, Gilson Teles BOAVENTURA².

Instituições

1. Laboratório de Nutrição Experimental - Departamento de Nutrição e Dietética - Universidade Federal Fluminense; 2. Departamento de Patologia, Universidade Federal Fluminense; 3. Laboratório de Bioquímica Nutricional - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Título curto: suplementação da semente de linhaça durante o período perinatal.

Enviar correspondência para:

Flávia Spreafico Fernandes
Universidade Federal Fluminense
Rua Cosme Velho, 625/801
22.241-090 – Rio de Janeiro - Brasil
Tel: +55 21 8163 2343
e-mail: flaviasfer@gmail.com

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Artigo 1: RESUMO

Objetivo: Examinar se a ingestão de semente de linhaça como fonte parcial de proteína e exclusiva de lipídeos e de fibra na dieta ofertada à mãe desde o período de pré-concepção, gestação e lactação altera a fertilidade, o estado nutricional materno, o perfil de ácidos graxos no leite materno bem como o crescimento e o desenvolvimento do recém-nascido.

Métodos: Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas, obtidas após o desmame (21 dias) que foram divididos em três grupos conforme a ração experimental: Grupo Controle (GC) e Grupo Linhaça (GL), recebendo ração *ad libitum* e Grupo Caseína Modificada (GCM) recebendo ração no sistema de *Pair feeding* com o GL. As fêmeas acasalaram aos 90 dias e após o parto, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes sendo o excedente sacrificado para análises. Foi avaliado o consumo alimentar das fêmeas e todos os animais tiveram a massa corporal monitorada durante todo o período experimental. Foram determinados o percentual de fêmeas que não engravidou, o ganho ponderal na gestação e a mortalidade neonatal dos grupos estudados além do teor lipídico do leite e a composição dos ácidos graxos tanto do leite materno quanto das rações experimentais.

Resultados e discussão: A ração de linhaça favoreceu a maior incorporação de ácido graxo essencial linolênico n-3 e menor proporção de araquidônico (AA) n-6 no leite materno. O desequilíbrio entre AG n-6 e n-3 interferiu na fertilidade das fêmeas, na duração da gestação, e no crescimento dos filhotes.

Conclusão: A semente de linhaça pode ser uma boa fonte suplementar de AG n-3, no entanto recomenda-se que a sua suplementação seja feita em conjunto com AG n-6.

Introdução

Inúmeros estudos realizados nos últimos 10 anos vêm alertando para o fato de que o consumo de uma dieta com alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da série n-3 está associada à redução na incidência de doenças cardiovasculares (Abayasekara and Wathes, 1999; Marchioli, 2003; Mori, 2006). Além disso, estudos experimentais evidenciaram que os Ácidos Graxos (AG) da série n-3 são fundamentais como elementos estruturais no desenvolvimento do sistema nervoso do feto e do recém nato, fato que está diretamente ligado à ingestão materna desses AGs (Anderson, 1994; Innis, 2007). Antes do nascimento, todos os ácidos graxos das séries n-6 e n-3 acumulados pelo feto provêm da circulação materna através da transferência placentária e depois do nascimento originam-se do leite (Innis, 2003). A importância da amamentação já foi largamente comprovada, e muitos autores associam essa importância ao fornecimento dos AGPI, em especial os da série n-3 (Innis, 2003; Helland et al., 2006).

Embora todos os nutrientes sejam importantes para o desenvolvimento estrutural do Sistema Nervoso Central (SNC), alguns tipos de lipídeos, como os Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Longa (AGPI-CL), podem influenciar decisivamente em determinadas fases do desenvolvimento mental (Georgieff, 2006; Innis, 2007).

Os AGPI-CL podem ser originados a partir da metabolização dos ácidos graxos essenciais: ácido linoléico (AL, 18:2n-6) e ácido α -linolênico (ALA, 18:3n-3). Os AGPI-CL das séries n-6 e n-3, mais importantes para o desenvolvimento durante o período perinatal são o ácido araquidônico (AA 20:4n-6) derivado do ácido linoléico (18:2n-6) a partir de uma série de reações de alongação e dessaturação, que por sua vez é precursor dos eicosanóides e essencial para o crescimento fetal (Uauy, Birch and Birch, 1990) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3 da série n-3) derivado do ácido α -linolênico (18:3n-3), que é essencial para desenvolvimento do cérebro e função visual (Georgieff and Innis, 2005). A deficiência de AG da série n-3 pode provocar o desenvolvimento anormal da função visual além de neuropatia periférica (Uauy and Valenzuela, 2000).

Com base nessas evidências, a população mundial vem sendo orientada a alterar sua dieta de forma que os alimentos ricos em AG n-3 passem a ter maior participação na composição básica da alimentação. No entanto, é importante que

essas recomendações não venham a comprometer a fertilidade ou mesmo crescimento e desenvolvimento do neonato. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de estabelecer as quantidades ótimas de n-3, bem como a relação ideal n-6/n-3 para maximizar o potencial genético de crescimento e desenvolvimento. No entanto os resultados são controversos e não existe ainda um consenso quanto às recomendações para a população em geral. Em novembro de 2007 Koletzko et al., publicaram o primeiro consenso com recomendações de ingestão lipídica para gestantes e lactantes, resultantes de ampla revisão sistemática realizada com a participação de diversas entidades internacionais de pesquisa científica na área. O referido consenso estabelece um consumo de AGPI n-3 suficiente para fornecer, no mínimo, 200 mg diários de DHA além de mencionar que estudos randomizados controlados suplementaram gestantes e lactantes com até 1g /dia de DHA ou 2,7 g /dia de AGPI n-3 sem efeitos adversos.

O ALA está presente em todas as folhas de vegetais verdes como componente lipídico dos cloroplastos, no entanto suas concentrações são muito pequenas (Sargent, 1977). O óleo de peixe é rico em ALA e fornece DHA, e EPA pré formados, acelerando sua incorporação em até 20 vezes em comparação ao ALA (Neuringer et al., 1990). Por esse motivo a grande maioria de estudos realizados utilizando a suplementação de AGPI n-3, utiliza como fonte de AG o óleo de peixe, sendo poucos os estudos com outros alimentos fonte de AGPI. A principal fonte vegetal de ALA é a semente de linhaça, uma oleaginosa rica em proteínas, lipídeos fitoestrógenos e fibras dietéticas. Sua composição centesimal mostrou cerca de 41% de lipídeos, 28% de fibras, 21% de proteína, 4% de resíduos e 6% de hidratos de carbono distribuídos entre ácidos fenólicos, açúcares, lignana e hemicelulose. Cem gramas de linhaça contêm cerca de 450 Kcal, sendo 109 Kcal de proteínas, e 369 Kcal de lipídeos, (Zheng, 2005; Payne, 2000; Oomah, 2001; Rafter, 2002). O aminograma da linhaça é comparável ao da soja, com altas taxas de ácido aspártico, glutamina, leucina e arginina (Oomah e Mazza, 1993) caracterizando a semente como uma proteína completa (Ahmed, 1999). Do teor lipídico total, 57% é de n-3, 16% de n-6, 18% de ácidos graxos monoinsaturados e apenas 9% são saturados, o que faz da semente a maior fonte vegetal de n-3 (Wiesenfeld, 2003). A linhaça é também a maior fonte de lignanas, fitoestrógenos que se assemelham ao estrogênio e que têm propriedades anticarcinogênicas, estrogênicas, antiestrogênicas e antioxidantes (Nesbitt 1997; Meagher, 1999). A presença de glicosídeos

cianogênicos (linustatina, neolinustatina e linimarina) na semente não constitui um problema quanto à sua utilização, uma vez que suas dosagens são baixas (Oomah, 1992), além de serem eliminadas com tratamento térmico (Cunnane, 1993; Lampe, 1994). Também não podem deixar de ser consideradas as propriedades antioxidantes das lignanas da linhaça que, apesar de leves (Thompson, 1993), contribuiriam para reduzir os efeitos da maior geração de radicais livres em função da maior vulnerabilidade dos AGPI à peroxidação lipídica (Kitts, 1999).

Considerando as evidências da necessidade de aporte adequado de AGPI-CL para o normal crescimento e desenvolvimento durante o período perinatal e levando em conta a particular composição da semente de linhaça como fonte de ácidos graxos n-3 de baixo custo, este estudo avaliou se a ingestão de semente de linhaça como fonte exclusiva de lipídeos e de fibra na dieta, durante a pré-concepção, gestação e lactação, altera a fertilidade, o estado nutricional materno, o perfil de ácidos graxos no leite materno bem como o crescimento do recém-nascido.

Material e métodos

Animais e procedimentos gerais

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas, oriundas do biotério de criação do Laboratório de Nutrição Experimental (LabNE) do Instituto de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (UFF), obtidas imediatamente após o desmame (21 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais (42 x 34 x 17 cm) em condições controladas de umidade e temperatura (23 + 1°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h) e foram divididos em três grupos conforme a ração experimental: Grupo Controle (GC), com ração à base de caseína; Grupo Linhaça (GL), com ração à base de caseína suplementada com semente de linhaça como fonte de fibras e óleo e Grupo Caseína Modificada (GCM), com ração à base de caseína, suplementada com óleo de soja no intuito de igualar a quantidade de óleo ao do GL. A ração foi consumida ad libitum pelos GC e GL e no sistema de *Pair feeding* com o GL pelo GCM. A água foi consumida ad libitum por todos os grupos experimentais. O GCM foi instituído em função de ter sido constatado, em experimentos anteriores, um consumo alimentar espontaneamente menor no GL. Por isso o GCM (*pair feeding*) recebeu ração à base de caseína com

teores de lipídeos e fibras equivalentes ao da ração do GL, em quantidades iguais às consumidas pelo GL.

Após a maturação sexual (90 dias) as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para cada três fêmeas. Constatando-se a gravidez, através da presença de espermatozóides no muco vaginal, as mães continuaram recebendo suas respectivas dietas até o final da lactação. Após o parto, as ninhadas foram ajustadas para seis filhotes por mãe para se estabelecerem condições ideais de desempenho lactotrófico. Os filhotes excedentes foram pesados e sacrificados por decapitação para a retirada e aferição da massa cerebral. O desmame ocorreu no 21º dia de vida, quando seis machos de cada grupo (n=6), foram transferidos para gaiolas individuais e passaram a receber a mesma dieta materna (Grupo Controle (GC); Grupo Controle Modificado (GCM), Grupo Linhaça (GL)). Durante todo o período de acasalamento, gestação e lactação as fêmeas e, após o parto, suas ninhadas foram monitoradas através do controle ponderal e do consumo alimentar, em dias alternados, em balança digital (GEHARA) com precisão de 0,01g.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas previstas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense sob o número 188/06.

As rações foram produzidas no LabNE e tiveram como componentes básicos caseína, mistura de vitaminas, mistura de minerais, bitartarato de colina, L-cistina, amido de milho, açúcar refinado, celulose microcristalina e óleo de soja para as rações dos GC e GCM e semente de linhaça para a ração do GL. Todas as rações experimentais foram isocalóricas, isoproteicas e normolipídicas, seguindo as recomendações da *American Institute of Nutrition* (Reeves, 93) (Tabela 1). Nas rações do GL considerou-se o teor lipídico de 10%, o equivalente a 25g da semente de linhaça.

INSERIR TABELA 1

A coleta do leite materno foi feita no 21º dia de lactação, dia do desmame, pelo protocolo descrito por Keen et al. (1981): As mães foram separadas de suas crias 4 horas antes da coleta, para enchimento das mamas. Quinze minutos antes da ordenha foram ministrados 5UI de oxitocina (Naox ®) e 20mg/kg de xilazina

(Calmium ®) via intraperitoneal. A ordenha foi feita manualmente e o leite congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20°C até o momento das análises.

As determinações de lipídeos totais do leite foram feitas segundo metodologia desenvolvida por Lucas (1978) e utilizada pela Rede Nacional de Bancos de Leite Humanos, IFF – Fiocruz.

Análise de ácidos graxos na ração e leite materno

Para determinação do perfil de ácidos graxos do leite materno e da ração foi inicialmente realizada a extração, saponificação e metilação dos ácidos graxos das amostras de acordo com o método de Lepage e Roy (1986). Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gasosa e os ácidos graxos separados com coluna de capilar SP-2560 (Supelco Inc. Bellefonte, PA), como descrito em estudo anterior (Assumpção et al., 2004). Os ésteres foram identificados por comparação com seu tempo de retenção, com padrões conhecidos (Sigma, Supelco e Nuchek).

Análise Estatística

Os resultados encontrados foram expressos em médias \pm erro padrão da media (EPM). Os dados foram tratados com estatística não paramétrica, através do teste de Kruskal Wallis para variáveis independentes com significância a nível de $p < 0,05$, uma vez constatada a não normalidade de suas distribuições através do teste de Shapiro-Wilk. As correlações foram feitas através do coeficiente de correlação de Spearman sendo significativo $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS-10.

Resultados

Massa corporal das ratas no período pré-concepção, gestação e lactação, ingestão alimentar durante gestação e lactação e indicadores de fertilidade e mortalidade neonatal.

A tabela 2 mostra a evolução ponderal dos grupos experimentais do período pré-concepcional ao final da lactação. O GC apresentou massa corporal pré-concepcional (aos 60 dias de idade) equivalente ao GCM. A massa corporal do GL foi entre 10-15% reduzido em comparação ao do GC, no entanto também não houve diferença estatística entre o GL e o GCM. Já no início da gestação, o GCM e o GL apresentaram massas corporais similares, porém 9% e 12%, respectivamente reduzidas em comparação ao GC. Ao final da gestação, O GL apresentou uma redução de 10% na massa corporal em relação ao GC. Este, por sua vez, apesar de ter apresentado maiores valores, foi semelhante ao GCM estatisticamente, que, por sua vez, foi semelhante ao GL. O aumento ponderal durante a gestação foi equivalente entre os três grupos. O GCM gerou maior número de filhotes por ninhada ($p < 0,05$), enquanto o GL teve ninhadas com menor quantidade de filhotes ($p < 0,05$). Já o GC o número de filhotes mostrou valores intermediários, no entanto com significância estatística ($p < 0,05$) tanto com o GCM quanto com o GL. No início da lactação os GC e GCM apresentaram massas corporais equivalentes enquanto o GL mostrou os menores valores ($p < 0,05$). A mortalidade neonatal foi significativamente maior ($p < 0,05$) no GC. Os GL e GCM tiveram uma mortalidade neonatal semelhante entre si. A perda ponderal durante a lactação foi equivalente entre os três grupos, sendo inclusive menor no grupo GL, e no final do período de lactação o GL apresentou 8% de redução na massa corporal em relação ao GC, com semelhança estatística com o GCM e este por sua vez se assemelhou ao GC. Ainda na tabela 2, observa-se que apesar de menor massa corporal em todos os momentos aferidos o GL foi o que teve um maior consumo relativo de ração, tanto o período gestacional quanto no de lactação ($p < 0,05$).

É interessante observar que a taxa de fecundidade do GCM foi superior ($p < 0,05$) aos demais grupos, uma vez que apenas 5,56% das fêmeas não engravidaram. Em contrapartida, o GL apresentou baixa taxa de fecundidade, com 44,44% das fêmeas sem engravidar. (Tabela 2)

INSERIR TABELA 2

A tabela 3 mostra a massa cerebral e a massa cerebral relativa neonatais. O GL apresentou massa cerebral maior ($p < 0,05$) quando comparado aos GC e GCM. Como o GL apresentou uma menor massa corporal, a massa corporal relativa nesse grupo também foi significativamente maior ($p < 0,05$)

INSERIR TABELA 3

Taxa de crescimento dos filhotes dos diferentes grupos durante o período de aleitamento: entre os dias 01 e 21 da lactação.

O gráfico 1 apresenta a evolução ponderal dos filhotes dos grupos experimentais do 1º ao 21º dia de vida, momento do desmame. No 1º e 3º dias embora o GCM tenha apresentado massa corporal numericamente menor ($6,45 \pm 0,48$ e $7,87 \pm 0,77$ g respectivamente) não houve significância estatística com os GC e GL (1º dia: $7,42 \pm 0,90$ e $7,18 \pm 0,62$ g; 3º dia: $9,04 \pm 1,13$ e $9,01 \pm 1,64$ g respectivamente). Nas aferições realizadas entre o 5º e o 15º dias, o GCM apresentou menores valores de massa corporal (5º dia: $9,18 \pm 1,04$ g, 7º dia: $10,70 \pm 0,93$ g, 9º dia: $13,42 \pm 1,04$ g, 12º dia: $16,12 \pm 1,78$ g e 15º dia $18,82 \pm 1,68$ g; $p < 0,05$). Os GC e GL mantiveram semelhança entre si (5º dia: $11,18 \pm 0,95$ e $12,27 \pm 2,07$ g; 7º dia $14,23 \pm 2,13$ e $15,27 \pm 1,90$ g; 9º dia: $19,07 \pm 3,07$ e $18,10 \pm 3,10$ g; 12º dia: $22,88 \pm 2,86$ e $20,56 \pm 3,78$ g e 15º dia: $28,38 \pm 4,23$ e $23,07 \pm 4,38$ g). Já no 18º dia o GL sofreu um desaceleramento no crescimento apresentando massa corporal semelhante ao do GCM ($26,68 \pm 4,52$ e $23,11 \pm 2,51$ g respectivamente), enquanto o GC apresentou maiores valores ($35,75 \pm 6,04$; $p < 0,05$). Por fim, no 21º dia de vida, o GCM apresentou recuperação ponderal equivalendo-se estatisticamente ao tanto ao GL ($39,67 \pm 3,79$ e $38,25 \pm 5,71$ g respectivamente) quanto ao GC ($46,92 \pm 6,73$ g).

INSERIR GRAFICO 1

Conteúdo total dos lipídeos (%) no leite materno

Os resultados do percentual total de lipídios no leite materno pela técnica do crematócrito estão expressos no gráfico 2. Observam-se diferenças estatísticas entre os três grupos experimentais ($p < 0,05$). O GL, embora tenha recebido uma ração com a mesma distribuição de macronutrientes do que a ração do GCM, este apresentou menor concentração de lipídeos ($p < 0,05$) no leite materno, comparado ao GCM e significativamente maior comparado ao GC. De todos os grupos, o GCM foi o que apresentou o maior percentual de lipídios ($p < 0,05$) no leite.

INSERIR GRÁFICO 2

Perfil dos ácidos graxos na dieta e no leite materno dos diferentes grupos estudados

A tabela 4 apresenta a composição percentual dos ácidos graxos nas rações e no leite materno dos diferentes grupos experimentais. Ao analisar a tabela podemos observar que, quanto maior a concentração de AGPI n-3 na dieta materna, maior o percentual desses ácidos graxos no leite do grupo GL. Interessante observar que quantitativamente, o maior percentual de n-3 no leite não é proveniente do maior percentual dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3, como EPA e DHA e sim da maior concentração do precursor, ou seja, do ácido graxo essencial linolênico, ainda que os percentuais tanto de EPA quanto de DHA tenham sido significativamente maiores no grupo GL em comparação aos outros grupos. Podemos também observar que tanto na dieta como no leite do GL a concentração de linoléico foi significativamente menor em relação aos outros grupos. Já o ácido araquidônico (AA) (20:4n-6) foi praticamente não detectado na dieta em todos os grupos e significativamente menor no leite do GL em comparação aos outros grupos.

INSERIR TABELA 4

Discussão e conclusão

Com a finalidade de avaliar experimentalmente os efeitos da ingestão dietética da semente de linhaça durante o período pré-concepcional e perinatal nas respectivas proles sobre aspectos ponderais (corporal e tecidual), fertilidade, bem como sobre o conteúdo de ácidos graxos do leite produzido, administramos durante a pré-concepção, gestação e lactação uma dieta à base de linhaça, dieta essa não somente rica em fibras, antioxidantes como também em ácidos graxos da série n-3.

Nesse estudo, ratas submetidas a uma dieta à base de semente de linhaça desde o desmame até o final da lactação, apresentaram redução significativa da massa corporal total em cerca de 10%, atingindo um terço da massa corporal final do grupo controle. O comprometimento do crescimento somático ocorreu mesmo com o aumento da ingestão energética em proporção à massa corporal. Estudos adicionais seriam necessários para a elucidação dos mecanismos exatos pelos quais essas alterações se estabeleceram no grupo GL, no entanto poderíamos sugerir algumas hipóteses 1) o aumento da expressão de neuropeptídeo Y no núcleo arqueado, um potente estimulador da ingestão alimentar (Jacobson 2000); 2) a baixa eficiência energética da dieta, que promove aumento da ingestão alimentar na tentativa de preservar tecido magro e o desempenho adequado durante a gestação e lactação, associada a hipoleptinemia e insulinemia fisiológica na lactação (Webster, 1993), 3) a presença das fibras dietéticas, que promovem redução da massa corporal por diminuir a digestibilidade (Zhao et al., 1995) e conseqüentemente a absorção de nutrientes (Burton-Freeman, 2000). A magnitude desses resultados depende do tipo de fibra, porém independente das suas propriedades o seu efeito sobre a massa corporal resulta das reduções da ingestão energética e da disponibilidade de energia metabolizável. Todas estas situações podem ter ocorrido no presente estudo, sendo importante em estudos posteriores avaliar a composição de proteína e gordura na carcaça desses animais.

Estudos anteriores mostraram que animais alimentados com altas doses de n-3 apresentaram aumento na duração e no número de ovulações, além de aumento na duração da gestação, redução no número de óvulos liberados a cada ciclo e folículos ovarianos em menor tamanho e número quando comparados a animais alimentados com maiores proporções de n-6 (Trujillo e Broughton, 1995). Além da

interferência no ciclo ovulatório das fêmeas, a suplementação de machos com n-3 provocou redução no tamanho testicular e queda na fertilidade em machos (Leat et al., 1983).

No presente estudo o grupo GL, apresentava na ração o mesmo percentual de lipídeos que o GCM, no entanto a taxa de fecundidade do GCM foi de 94,44%, o que indica que o teor lipídico aumentado para esse grupo com a relação n-6/n-3 em torno de 9:1 foi eficiente para o desempenho reprodutivo desses animais. No entanto, além de conter uma proporção maior de n-3 com relação ao n-6, a linhaça é a maior fonte vegetal do diglicosídeo Secroisolariciresinol (SDG), precursor de lignanas em mamíferos. As propriedades agonistas e antagonistas de estrogênio das lignanas têm sido associadas à redução de tumores mamários e ovarianos em ratos suplementados com 10% de semente de linhaça (Thompson et al., 1996 a e 1996b). No entanto, a quantidade de SDG presente na ração com 10% de linhaça mostrou efeitos estrogênicos que se refletiram em menor peso ao nascer, puberdade precoce, alongamento do ciclo estral e estro persistente nas fêmeas da prole dos animais tratados com a ração experimental. Os machos apresentaram aumento precoce das glândulas sexuais e da próstata, que também sugerem efeito estrogênico. O mesmo estudo, ao utilizar suplementação com 5% da semente observou efeitos antiestrogênicos, levando a um atraso de aproximadamente cinco dias na maturação sexual e aumento na duração do diestro (Tou, 1998). Essas observações justificam tanto a menor taxa de fertilidade quanto a maior duração da gestação no GL apesar de não ser possível definir qual fator teve maior influência nas alterações hormonais principalmente pelo fato da ação das lignanas parecerem produzir um efeito dose-dependente.

A massa corporal dos filhotes sacrificados no pós-natal imediato reflete a condição da nutrição intra-uterina. O consumo da ração à base de semente de linhaça em uma proporção de 25% na dieta AIN-93 preconizada pelo American Institute of Nutrition (1993) pelas ratas no período pré-concepcional e perinatal provocou menor crescimento intra-uterino da prole dos animais do GL. A menor proporção de n-6 com relação ao n-3 da semente de linhaça (tabela 3) provavelmente foi responsável pelo menor crescimento intrauterino dos animais do GL em função da inibição da conversão do AL para AA ou mesmo que o ácido eicosapentaenóico (EPA: 20:5 n-3), também presente em grande quantidade, tenha competido com o AA na biotransformação enzimática. O AA é fundamental para o

crescimento normal e é de grande importância por participar da sinalização e divisão celular (Elias and Innis, 2001).

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura. Koletzko e Braun (1991) encontraram correlações significativas entre a massa corporal tanto com o teor de AA quanto do total de n-6. Carlson et al. (1992), ao suplementar prematuros com óleo de peixe, observou efeito benéfico na função visual e adverso no crescimento com redução na concentração de AA no sangue do neonato. Os estudos citados corroboram com os resultados do presente estudo no que diz respeito à relação entre o teor de AA e o crescimento. Em contrapartida Koletzko et al., (2007) no primeiro consenso para o consumo de lipídeos por gestantes e lactantes estabelece que as quantidades de n-6 presentes nas recomendações dietéticas da população em geral contemplam as gestantes e lactantes mesmo que suplementadas com até 1200 mg de DHA diários. A revisão do CODEX ALIMENTARIUS realizada em 2007 inclui, pela primeira vez, recomendações de suplementação de ALA na proporção de 50mg/100 Kcal e mantém as recomendações de, no mínimo, 300 mg/ 100 Kcal de AL em fórmulas infantis, estabelecendo a recomendação da relação n-6/n-3 entre o mínimo de 5:1 e o máximo 15:1.

O presente estudo forneceu, através da ração, 1193,11; 1522,49 e 397,08 mg /100 Kcal de AL e 119,78; 155,95 e 1271,69 mg /100 Kcal de ALA para os GC, GCM e GL respectivamente. A redução dos percentuais tanto de AL quanto de ALA quando comparados entre a ração e o leite materno, é esperada em função da bioconversão de AL em AA, que não apresentou quantidades detectáveis em nenhuma das rações experimentais, mas foi secretado no leite nas proporções de 23,13; 30,38 e apenas 5,63 mg/100 Kcal nos GC, GCM e GL, respectivamente. O valor de DHA presente no leite do GC foi 19,81 vezes maior do que aquele contido na ração do GC. O DHA do GCM e do GL foi 11,78 e 16,33 vezes respectivamente. Isso indica uma tentativa do organismo de maximizar a conversão em DHA a partir, inclusive, das reservas maternas, priorizando o desenvolvimento do SNC, uma vez que o GC, que teve a menor oferta de ALA, apresentou uma taxa de conversão superior aos GC e GCM. Alguns autores afirmam que a conversão do ALA para EPA e DHA não é eficiente em mamíferos a ponto de suprir as necessidades do organismo, sendo necessária a oferta desses dois AG pré-formados (O'Connor et

al., 2001) No entanto, no presente estudo o GL apresentou, no leite materno, valores 12 vezes maiores de EPA do que os GC e GCM.

A oferta de AGPI-CL para as mães através da ração foi superior ao preconizado por Simopoulos (2000), para gestantes e lactantes e que varia entre 6 e 8% do Valor Energético Total (VET) para AL e 1% do VET para o ALA. No entanto, a relação n-6/n-3 que, segundo o autor, deve manter-se entre 5 a 10:1 foi mantida em 9,96:1 no GC e 9,76:1 no GCM sendo invertida para 3,10 n-3 : 1n-6. Essa inversão se refletiu não apenas no crescimento dos filhotes, mas também na fecundidade das ratas, uma vez que além do número de fêmeas do GL que não engravidaram ter sido superior ao dos demais grupos, aquelas que engravidaram geraram um número significativamente menor de filhotes (tabela 4), comprovando a interferência da relação C18:2/C18:3 na utilização de AL na síntese de AA. A redução nos níveis de AA está associada ao comprometimento da função reprodutiva (German et al., 1996) Existem evidências de que alterações no perfil de AGPI-CL dietéticos influenciam tanto a síntese quanto o metabolismo de prostaglandinas em mamíferos afetando, conseqüentemente, as diversas funções que elas modulam, com ênfase na secreção hormonal (Abayasekara e Wathes, 1999).

O desenvolvimento e o crescimento dos filhotes estão diretamente relacionados com a qualidade e a quantidade do leite (Worthington-Roberts e Williams, 1998). Devido à importância dos lipídeos no crescimento e no desenvolvimento infantil, vários trabalhos focalizam a distribuição e a concentração dos ácidos graxos no leite como parâmetro de desenvolvimento e crescimento.

De fato, os ácidos graxos que compõem o leite materno podem ser provenientes da dieta, da biossíntese da glândula mamária, e da mobilização de outros tecidos maternos, como o tecido adiposo e o fígado (Barber et al., 1997). O presente estudo mostrou que a ingestão materna de semente de linhaça, rica em AG n-3 durante o período pré-concepcional e perinatal altera a composição dos ácidos graxos do leite materno. Desta maneira, o perfil dos ácidos graxos na gordura do leite foi bastante similar ao da linhaça usada como fonte lipídica na dieta experimental, indicando que, quanto maior a quantidade de ácidos graxos de uma determinada série na dieta materna, maior a quantidade desses ácidos graxos no leite.

Analisando a distribuição percentual dos AG da série n-6 tanto na ração quanto no leite materno se percebe grande diferença no conteúdo de AG n-6 no GL.

O suprimento de AG n-3 nas quantidades presentes na ração de linhaça atuaram, provavelmente, como inibidores da síntese dos AG n-6 em função da competição pelas enzimas envolvidas no metabolismo dos AGPI-CL, provocando, dessa forma, uma deficiência de AA o que justifica o menor crescimento do GL. De fato, houve uma correlação negativa entre o AA e o EPA tanto no GC ($r_s = -0,832$; $p < 0,040$) quanto no GCM ($r_s = -0,841$; $p < 0,036$) corroborando com a redução dos AG n-6 na presença dos n-3. No entanto, a maior oferta de lipídeos do GCM levou a uma correlação positiva entre o AA e o DHA no leite ($r_s = 0,986$; $p < 0,001$), fato que não ocorreu no GL, que apresentou significância somente quando correlacionados a massa cerebral relativa com o teor de n-6 do leite, provavelmente em função da baixa relação n-6/n-3. De fato, tanto a massa corporal quanto a massa cerebral intra-uterinas do GCM tiveram correlações positivas com o conteúdo de n-6, de AGEs e de AGPI no leite. (resultados não demonstrados)

No que concerne à composição do leite materno se observa que a concentração de AL manteve-se dentro do preconizado pelo Codex Alimentarius para adição em FIs (300 mg/ 100 Kcal) tanto no GC quanto no GCM, mas foi inferior no GL. Em contrapartida, tanto o GC quanto o GCM tiveram ofertas de ALA inferiores ao preconizado pelo Codex, que é de 50 mg /100 Kcal. A oferta de ALA pelo leite materno do GL foi oito vezes maior do que aquela preconizada no codex, o que indica uma boa bioconversão do ALA presente na linhaça contrariando os resultados de alguns estudos com cobaias, porcos, ratos e macacos que sugerem ser a bioconversão do ALA dietético pouco efetiva para o fornecimento adequado de DHA para o desenvolvimento cerebral e mielinização das terminações nervosas e da retina (Bourre, et al., 1993; Greiner, et al., 1997; Su, et al., 1999) No entanto, a diferença significativa da massa cerebral do GL (tabela 3) sugere eficiência da ração de linhaça no favorecimento do crescimento desse órgão, apesar da baixa relação entre n-6 e n-3 ter interferido no crescimento corporal desses animais. Considerando o peso cerebral como indicativo do desenvolvimento do SNC (Xiang, 2000) os resultados indicam que houve uma priorização da nutrição cerebral em detrimento do crescimento corporal no GL uma vez que esses animais apresentaram peso cerebral significativamente maior e, conseqüentemente, um peso cerebral relativo também maior.

Esse padrão de crescimento se manteve durante o período de aleitamento já que a massa corporal no momento do desmame também foi inferior no GL,

sugerindo que a proporção da distribuição de AG pela circulação materno-fetal foi equivalente àquela fornecida pelo leite, também influenciada pela quantidade de ALA, repercutindo no metabolismo dos AG de maneira geral.

Com relação à composição dos lipídeos totais no leite materno, percebemos que, mesmo recebendo uma dieta com teor de lipídeos equivalente ao GCM, o GL produziu um leite com menor concentração de gorduras do que o GCM. No entanto, o GC, que apresentou menor concentração de gordura no leite, foi o que teve melhor crescimento, o que mais uma vez chama a atenção para a importância da distribuição de ácidos graxos na dieta, em particular da relação n-3/n 6.

Analisado de forma global os resultados encontrados, podemos concluir que a ingestão de semente de linhaça se mostrou eficiente como suplemento de baixo custo de ALA apresentando boa biodisponibilidade em roedores e grande incorporação desse ácido graxo no leite materno. No entanto a suplementação deve ser feita em conjunto com o AL para controlar os efeitos adversos da competição entre os dois AGPI-CL com conseqüente desequilíbrio entre AA e DHA e suas repercussões clínicas.

Considerando que o início do desenvolvimento pós-natal é a fase onde o crescimento celular encontra-se mais ativo, assim como a expansão das membranas, o metabolismo e o processo de desenvolvimento na sua totalidade, maior atenção deve ser dada ao consumo de uma relação n-6/n-3 durante o período perinatal.

Este trabalho mostra a importância de se alertarem mulheres em idade reprodutiva a respeito do consumo elevado de um tipo de ácido graxo de uma série na dieta. No presente estudo, houve alteração dos parâmetros de massa cerebral dos lactentes. No entanto, a ingestão materna de linhaça ocasionou importantes alterações não apenas no crescimento da prole e na composição dos ácidos graxos do leite materno, mas também na taxa de fertilidade e no número de filhotes por ninhada. Esses resultados sugerem que o desequilíbrio na proporção dos AG dietéticos, principalmente aqueles que compõem as biomembranas celulares pode interferir em uma série de outras funções celulares como a fertilidade.

Referências Bibliográficas

- Abayasekara, D.R.E., Wathes, D.C., 1999, Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 61, 275–287.
- Ahmed, Z.S. 1999. Physico-chemical, structural and sensory quality of cornbased flax-snack. *Nahrung-Food* 43, 253–258.
- American Institute of Nutrition (AIN), 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123: 1939 -1951.
- Anderson, G.J., 1994, Developmental sensitivity of the brain to dietary n-3 fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 35,105–11.
- Assumpção, R.P., Santos, F.D., Barreto, G.F., Andrade, P.M.M., Tavares do Carmo, M.G., 2004. Effect of variation of trans fatty acid in lactating rat's diet on the lipoprotein lipase activity in mammary gland, liver, and adipose tissue. *Nutrition. USA*, v.20, p.806 – 811.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T.,Vernon R.G., 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland, *Biochim. Biophys. Acta* 1347, 101–126.
- Bourre, J.M., Dumont, O. Pascal, G., Durand, G. 1993, Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/Kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in the brain, heart and liver in adult rats. *Journal of Nutrition*, 123 (7), 1313-1319.
- Burton-Freeman, B., 2000. Dietary fiber and energy regulation. *Journal of Nutrition* 130, 272S–275S.
- Carlson, S.E., Cooke, R.S., Werkman, S.H., Tolley, E.A., 1992. First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids* 27 (11) 827-834.

- Connor W.E., Neuringer E., Lin D.S., 1990 Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J Lipid Res* 31:237– 247.
- Cunnane, S.C., Ganguli, S, Menard, C., Liede, A.C., Hamadeh, N.J., Chen, Z.Y., Wolever T.M., Jenkins, D.J., 1993, High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): Some nutritional properties in humans. *British Journal of Nutrition*, 69(2), 443-453.
- Elias S.L., Innis S.M., 2001. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *American Journal of Clinical Nutrition* 73:807-14.
- Georgieff, M.K., INNIS, S.M., 2005. Controversial nutrients that potentially affect preterm neurodevelopment: Essential fatty acids and Iron. *Pediatric Research*, 57(5):99-103.
- Georgieff, M.K., 2006. Early Brain Growth: Macronutrients for the Developing Brain. *NeoReviews* 7(7), 323-334.
- German, J.B., Dillard, C.J., Whelan, J., 1996. Biological Effects of Dietary Arachidonic Acid. *The Journal of Nutrition* 126, 1076S - 1080S.
- Greiner, R.C.S, Winter, J., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., 1997. Brain docosahexanoate accretion in fetal baboons: bioequivalence of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids. *Pediatric Research*, 42 (6), 86 -134.
- Helland, I.B., Saugstad, O.D., Saarem, K. Van Houwelingen, A.C., Nylander, G., Drevon, C.A., 2006, Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 19, 397-406.
- Innis, S.M., 2007, Fatty acids and early human development. *Early Human Development.* 83, 761–766.

- Innis S.M., 2003. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Pediatrics*,; 143:S1-S8.
- Jacobson, L., 2000. CRH and NPY are not decreased in hypophagic, protein deprived rats. *Peptides* 21 1487–1493.
- Keen, C. L., Lonnerdal, B., Clegg, M., Hurley, L.S., 1981. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *Journal of Nutrition*, 11:226-230.
- Kitts, D.D., Yuan, Y.U., Wijewickreme, A.N., Thompson, L.U., 1999, Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignans metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 202 (1-2), 91-100.
- Koletzko, B. and Braun, M., 1991. Arachidonic acid and early human growth: is there a relation? *Ann. Nutr. and Metab.* 35: 128-131.
- Koletzko, B., Cetin, I., Brenna, J.T., 2007. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Consensus Statement, British Journal of Nutrition* 98, 873-877.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, A., Demmelmair, H., Fildler, N., Jensen, R., Sauerwald, T., 2001. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development* 65, S3-S18.
- Lampe, J.W., Martini, M.C., Kurzer, M.S., Adlercreutz, H., Slavin, J.L., 1994. Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *American Journal of Clinical Nutrition* 60, 122-128.
- Leat, W.M.F., Northrop, C.A., Harrison, F.A., Cox, R.W., 1983. Effect of dietary linoleic and alpha linoleic acids on testicular development in the rat. *QJ Experimental Physiology*, 68, 221-231.
- Lepage, G., Roy, C. C., 1987. Direct transesterification of classes of lipid in one-step reaction. *Journal Lipid Research*, 27:114-20.

- Lucas, A., Gibbs, J.A.H., Lyster, R.L.J., Baum, J.D. 1978. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British Medical Journal* 1: 1018-20.
- Marchioli, R., 2003, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Minerva Cardioangiol.* 51, 561-576.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W., 1999. Isolation and characterization of the lignans, secoisolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 3173-3180.
- Mori, T.A., 2006, Omega-3 fatty acids and hypertension in humans. *Clin.Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 842-846.
- Nesbitt, P.D., Lam, Y. Thompson, L.U., 1997. Lignans in homemade and commercial products containing flaxseed. *Nutrition and Cancer* 29, 222-227.
- Neuringer M., Anderson G. J., Connor W. V., 1988, The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Ann Rev Nutr*; 8: 517-544.
- O'Connor, D.L., Hall, R., Adamkins, D., Auestad, N., Castillo, M., Connor, W.E., Connor, S.L., Fitzgerald, K., Groh-Wargo, S., Hartmann, E.E., Jacobs, J., Janowsky, J., Lucas, A., Margeson, D., Mena. P., Neuringer, M., Nesin, M., Siger, L., Stephenson, T., Szabo, J., Zemon, V., 2001. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics*, 108 (2), 359-371.
- Oomah, B.D., Mazza, G., Kenaschuk, E.O., 1992. Cyanogenic compounds in flaxseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 1346-1348.
- Oomah, B.D., Mazza, G., 1993. Flaxseed proteins. A review. *Food Chemistry* 48, 109-114.
- Oomah, B.D., 2001. Flaxseed as a functional food source. *Journal of Science, Food and Agriculture* 81, 889-894.

- Payne, T.J., 2000. Promoting Better health with flaxseed in bread. *Cerealfoods world* 45(3), 102-104.
- Rafter J.J., 2002. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: câncer *British Journal of Nutrition* 88, Supplement 2, 219-224.
- Sargent, J.R., 1977. Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition*, 78 (suppl 1), S5-S13.
- Simopoulos, A.P., 2000. Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science* 79, 961-970.
- SU, H.-M., Bernardo, L., Mirmiran, M., Ma, X.-H., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., 1999. Dietary 18:3n-3 and 22:6n-3 as sources of 22:6n-3 accretion in neonatal baboon brain and associated organs. *Lipids* 34 (suppl.) S347-S350.
- Thompson, L.U., Rickard, S. E., Orcheson, L. J. and Seidl, M. M., 1996a. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 17: 1373–1776.
- Thompson, L.U., 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International* 26, 131-149.
- Thompson, L. U., Seidl, M. M., Rickard S. E., Orcheson, L. J. and Fong, H.H.S., 1996b. Antitumorigenic effect of mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr. Cancer* 26: 159–165.
- Tou, J.C.L., Chen, J. Thompson, L.U., 1998. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol dyglucoside, affect pregnancy outcome and reproductive developmment in rats. *Journal of Nutrition* 128 (11), 1861-1868.
- Trujillo, E.P., Broughton, K.S., 1995. Ingestion of n-3 polyunsaturated fatty acids and ovulation in rats. *Journal of Reproductive Fertility* 105. 197-203.

- Uauy, R., Valenzuela, A., 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, 16(7/8):680-684.
- Uauy, R; Birch D.G., Birch, E.E., 1990. Effects of dietary ω -3 fatty acid on retinal function of very low birth weight neonates. *Pediatric Research*, 28:485:92.
- Webster, A.J.F., 1993. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proceedings of the Nutrition Society* 52 (1), 69-76(8).
- Wiesenfeld, P.W., Babu, U.S., Collins, T.F.X., Sprando, R., O'Donnell, M.W., Flynn, T.J., Black, T., Olejnik, N., 2003. Flaxseed increased alfa linolenic and eicosapentanoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dam and offspring. *Food and Chemical Toxicology* 41, 841-855.
- Worthington-Roberts e Willians, 1998 Worthington-Roberts, B. and Williams, S. R. (1993) *Nutrition in Pregnancy and Lactation*, 5th edn. Mosby-Year Book, St Louis, MO.
- Xiang, M., Alfvén, G., Blennow, M., Trygg, M. Zetterström R.,2000.Long-chain polyunsaturated fatty acids in human milk and brain growth during early infancy *Acta Paediatrica* 89 (2), 142–147.
- Zhao, X, Jorgensen, H., Eggum, B.O., 1995. The influence of dietary fibre on body composition, visceral organ weight, digestibility and energy balance in rats housed in different thermal environments. *British Journal of Nutrition* 73(5): 687-699.
- Zheng, Y., Weisenborn, D.P., Tostenson, K., Kangas, N., 2005. Energy analysis in the screw pressing of whole and dehulled flaxseed. *Journal of Food Engineering*. 66:193-202,

TABELAS E GRÁFICOS

Artigo 1 - Tabela 1 - Composição das rações experimentais (g/100g; AIN 93).

Ingredientes (g/100g)	GC	GCM	GL
Linhaça moída	-	-	25,00 25,00
Caseína	10,87 (18,48)	10,87 (18,48)	5,43 (13,04)
Amido	62,08 (54,47)	59,08 (51,47)	54,52 (46,91)
Açúcar	10,00	10,00	10,00
Mistura de Minerais	3,50	3,50	3,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00	1,00
Óleo de soja	7,00	10,00	-
Celulose	5,00	5,00	0,00
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
L-Cistina	0,30	0,30	0,30

() Período de gestação e lactação; GC: Grupo Controle, GCM, Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.

Artigo 1 - Tabela 2 - Características gerais e nutricionais das ratas no momento pré-concepcional, gestacional e lactacional e das respectivas crias.

GRUPO	GC		GCM		GL	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
Massa Corporal Pré-concepcional (60 dias) (g)	256,45 a	±17,74	239,10 ab	±34,54	224,20 b	±34,33
Massa Corporal no início da gestação (90 dias) (g)	271,20 a	±23,60	246,30 b	±21,42	238,78 b	±16,14
Massa Corporal no final da gestação (g)	339,65 a	±33,11	323,20 ab	±14,56	304,15 b	±33,41
Ganho ponderal na gestação (g)	68,45 a	±39,94	76,90 a	±17,14	65,37 a	±28,54
Duração da gestação (dias)	21,80 a	±0,79	21,70 a	±0,82	24,70 b	±1,34
Consumo de ração durante a gestação (g/100g de massa corporal)	146,61 a	±15,85	148,33 a	±10,07	163,95 b	±21,55
Numero de filhotes por nascimento	7,40 a	±3,37	10,10 b	±1,20	6,80 c	±1,69
Numero de filhotes falecidos	1,0 a	±1,05	0,20 b	±0,63	0,20 b	±0,63
Massa Corporal no início da lactação (g)	270,53 a	±18,36	260,55 a	±15,80	241,75 b	±13,83
Massa Corporal no final da Lactação (g)	229,15 a	±15,70	222,80 ab	±23,52	209,35 b	±20,77
Perda ponderal na lactação (g)	41,38 a	±17,54	37,75 a	±15,76	32,40 a	±14,20
Consumo de ração durante a lactação (g/100g massa corporal)	150,33 ab	±17,89	136,88 a	±17,29	163,19 b	±16,74
Percentual de fêmeas que não engravidaram	27,78%		5,56%		44,44%	

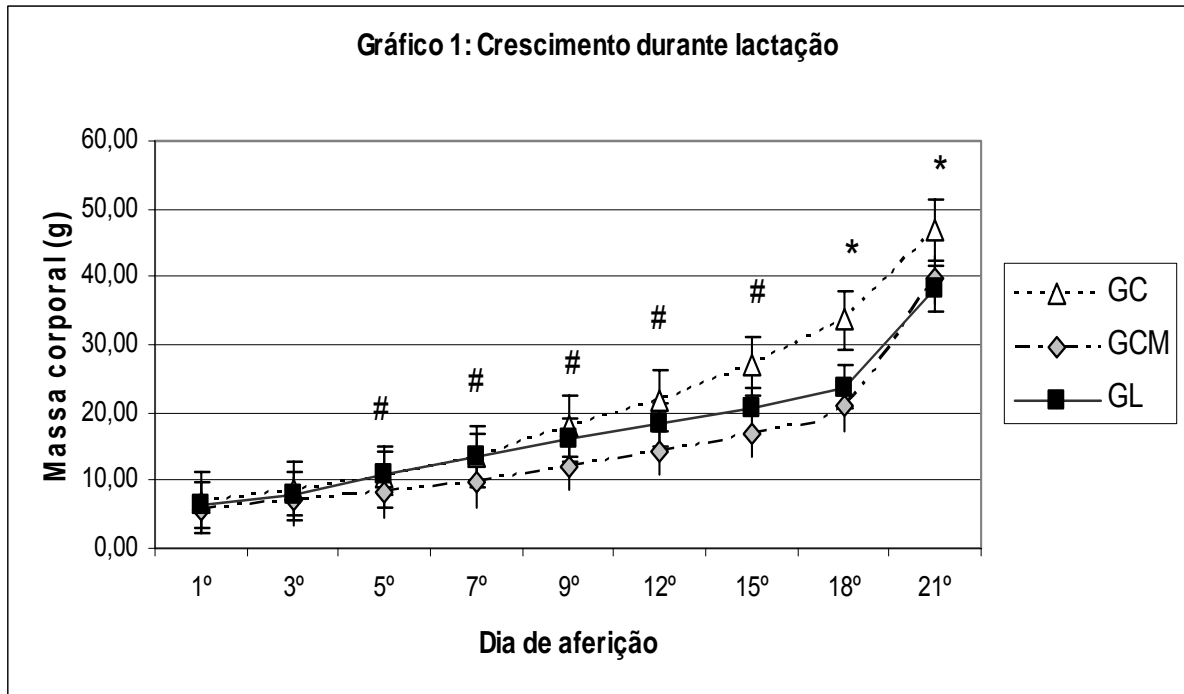
Os dados são média ± Erro Padrão da Média (EPM) de 6-10 animais. GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$
 Massa cerebral e corporal das crias ao nascer

Artigo 1 - Tabela 3: Massa cerebral e massa cerebral relativa neonatais.

GRUPOS	GC	EPM	GCM	EPM	GL	EPM
Peso ao nascer (g)	5,45 a	±0,12	5,45 a	±0,33	5,00 b	±0,33
Cérebro (g)	0,18 a	±0,01	0,19 a	±0,01	0,26 b	±0,02
Peso cerebral relativo	3,38 a	±0,11	3,57 a	±0,07	5,14 b	±0,34

Os dados são média ± Erro Padrão da Média (EPM) de 6-10 animais GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça; EPM: Erro Padrão da Média. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

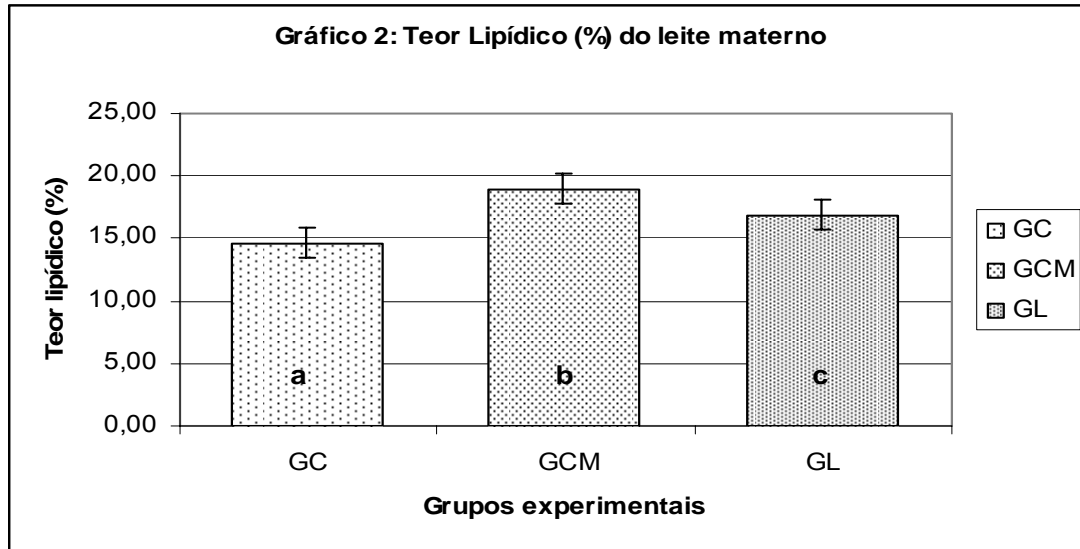
Artigo 1 - Gráfico 1: Crescimento dos filhotes durante os 21 dias de lactação.



GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça

* significa diferença estatística significativa com $p < 0,05$ entre o GC e o GL

significa diferença estatística significativa com $p < 0,05$ entre o GCM e o GL

Artigo 1 - Gráfico 2 - Teor Lipídico (%) do leite materno aos 21 dias de lactação

GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça;
Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$

Artigo 1 - Tabela 4: Composição percentual dos ácidos graxos nas rações e no leite materno dos grupos experimentais.

Ácidos Graxos	RAÇÃO						LEITE					
	GC		GCM		GL		GC		GCM		GL	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EMP	MÉDIA	EMP	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EMP
C 14:0	0,40	a ± 0,36	0,21	a ± 0,04	1,41	b ± 0,84	4,28	a ± 2,26	5,69	a ± 4,88	4,99	a ± 2,02
C 15:0	0,15	a ± 0,16	0,65	b ± 0,42	0,31	b ± 0,11	0,13	a ± 0,02	0,10	a ± 0,05	0,20	b ± 0,10
C 16:0	12,63	a ± 0,12	12,92	b ± 0,20	8,09	c ± 0,23	18,00	a ± 1,91	20,63	b ± 1,87	13,73	c ± 2,79
C 18:0	3,44	a ± 0,01	3,49	a ± 0,04	5,24	b ± 0,10	3,52	a ± 0,45	3,53	a ± 0,74	4,54	b ± 0,73
C 18:1 n-9 cis	22,34	a ± 0,26	22,13	a ± 0,10	22,98	b ± 0,26	23,38	a ± 5,04	21,32	a ± 6,76	20,90	a ± 5,99
C 18:2 n-6 cis (AL)	53,69	a ± 0,015	53,11	b ± 0,14	14,41	c ± 0,09	24,68	a ± 3,14	26,23	a ± 4,20	9,60	B ± 1,95
C 18:3 n-6	0,21	a ± 0,01	0,19	b ± 0,01	0,14	c ± 0,05	0,09	a ± 0,02	0,11	ab ± 0,06	0,05	b ± 0,02
C18:3 n-3 (ALA)	5,39	a ± 0,19	5,44	a ± 0,03	46,15	b ± 0,64	1,71	a ± 0,62	1,58	a ± 0,52	21,15	b ± 4,35
C 20:4 n-6 (ARA)	ND	±	ND	±	ND	± 0,00	1,42	a ± 0,21	1,44	a ± 0,68	0,30	b ± 0,11
C 20:5 n-3 (EPA)	0,08	a ± 0,06	0,03	ab ± 0,01	0,05	b ± 0,01	0,08	a ± 0,01	0,08	a ± 0,02	0,99	b ± 0,29
C 22:4 n-6	0,04	a ± 0,04	0,02	a ± 0,01	0,01	a ± 0,00	0,33	a ± 0,07	0,41	a ± 0,39	0,12	b ± 0,13
C 22:6 n-3 (DHA)	0,01	a ± 0,00	0,02	b ± 0,02	0,02	ab ± 0,01	0,27	a ± 0,03	0,32	a ± 0,15	0,48	b ± 0,10
Total AGPI n-6	53,72	a ± 0,11	53,12	b ± 0,15	14,42	c ± 0,10	26,43	a ± 3,42	28,07	a ± 4,95	10,01	b ± 2,03
Total AGPI n-3	5,83	a ± 0,19	5,84	a ± 0,04	46,33	b ± 0,68	2,15	a ± 0,62	2,12	ab ± 0,34	23,01	b ± 4,33
Relação n6/n3	9,10	a ± 0,03	9,23	a ± 0,26	0,31	b ± 0,00	13,11	a ± 4,07	13,43	a ± 2,80	0,45	b ± 0,17
Total AGE	59,08	a ± 0,25	58,55	b ± 0,16	60,56	c ± 0,72	26,39	a ± 3,37	27,80	a ± 4,19	30,75	a ± 4,03
Total AGPI-CL	0,55	a ± 0,07	0,44	b ± 0,04	0,24	c ± 0,06	2,26	a ± 0,33	2,46	ab ± 1,30	3,26	b ± 0,77
Total AGS	16,70	a ± 0,22	17,35	b ± 0,22	15,11	c ± 0,89	32,31	a ± 3,52	35,66	a ± 7,65	30,59	a ± 2,64
Total AGMS	22,90	a ± 0,22	22,76	a ± 0,09	23,43	b ± 0,23	26,34	a ± 5,50	24,01	a ± 7,97	22,26	a ± 6,55
Total AGPI	59,29	a ± 0,25	58,75	b ± 0,16	60,70	c ± 0,75	26,48	a ± 3,36	27,89	a ± 4,19	30,79	a ± 4,01

Valores expressos em médias ± erro padrão da média. GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.. ARA: Ácido Graxo Araquidônico; EPA: Ácido Graxo Eicosapentaenóico; DHA: Ácido Graxo Docosahexaenóico, AGPI: Ácidos Graxos Poliinsaturados; AGPI-CL: Ácido Graxo Poliinsaturado de Cadeia Longa; AGS: Ácido Graxo Saturado; AGMS: Ácido Graxo Monoinsaturado. ND - Não Detectado
Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com p<0,05.

ARTIGO 2

Título:

Distribuição percentual dos ácidos graxos cerebrais e comportamento cognitivo em ratos jovens alimentados com dieta à base de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) desde a fase intrauterina

Autores:

Flávia Spreafico FERNANDES¹, Maria das Graças TAVARES DO CARMO³; Gilson Teles BOAVENTURA²

Instituições

1. Laboratório de Nutrição Experimental - Departamento de Nutrição e Dietética - Universidade Federal Fluminense; 3. Laboratório de Bioquímica Nutricional - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Título curto: suplementação da semente de linhaça durante o período perinatal.

Enviar correspondência para:

Flávia Spreafico Fernandes
Universidade Federal Fluminense
Rua Cosme Velho, 625/801
22.241-090 – Rio de Janeiro - Brasil
Tel: +55 21 8163 2343
e-mail: flaviasfer@gmail.com

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Artigo 2: RESUMO

Objetivo: Investigar, em ratos jovens, se a ingestão de semente de linhaça como fonte parcial de proteína e exclusiva de lipídeos e de fibra na dieta ofertada a mãe desde o período pré-concepção, gestação e lactação, e em seguida as crias até a idade jovem (56 dias) altera o desenvolvimento do sistema nervoso central, relacionando a composição relativa de ácidos graxos cerebrais com avaliações comportamentais.

Métodos: Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas, obtidas após o desmame (21 dias) que foram divididas em três grupos conforme a ração experimental: Grupo Controle (GC) e Grupo Linhaça (GL), recebendo ração *ad libitum* e Grupo Caseína Modificada (GCM) recebendo ração no sistema de *Pair feeding* com o GL. As fêmeas acasalaram com machos que receberam os mesmos tratamentos dietéticos. Imediatamente após o parto, as ninhadas foram reduzidas para seis filhotes por mãe. Os filhotes excedentes foram sacrificados para realização do perfil de ácidos graxos cerebrais. Foram dosados também os ácidos graxos das rações experimentais. O desmame se deu aos 21 dias quando os filhotes passaram a receber a mesma dieta das mães. Foram determinados os indicadores biológicos PER, NPR e CEA a partir do registro da evolução ponderal e consumo de ração durante o período experimental. Aos 30 dias de vida seis machos de cada grupo escolhidos aleatoriamente foram testados no labirinto aquático de Morris nas versões Memória Operacional (MO), Memória de Referência Espacial (MRE) e Memória de Procedimento (MP).

Resultados e discussão: O GL apresentou crescimento inferior ao GC e equivalente ao GCM provavelmente em função da presença de fatores antinutricionais e do desequilíbrio entre omega 3 e omega 6 da semente que inibiu a síntese de ácido araquidônico. O perfil de AG cerebrais mostrou eficiência na bioconversão do ácido linoléico presente na ração em roedores. Os animais do GL tiveram melhor desempenho nas versões MO e MRE do labirinto aquático sugerindo maior incorporação de DHA no córtex frontal e hipocampo. O desempenho na versão MP foi equivalente entre os três grupos. O conteúdo de DHA cerebral esteve correlacionado com melhor desempenho nos testes cognitivos enquanto o conteúdo de ácido araquidônico se correlacionou com maior tempo para resolução da tarefa.

Conclusão: A adição de semente de linhaça na dieta materna ocasionou maior incorporação de AG n-3 e menor de AA no cérebro dos filhotes e conseqüente melhora na cognição em roedores, no entanto promoveu déficit do crescimento devendo a suplementação de n-3 ser feita sempre com cautela no período perinatal e observando-se a oferta adequada também de n-6.

Introdução

O desenvolvimento e a manutenção das funções psicomotoras e cognitivas no decorrer da vida sofrem influência decisiva da nutrição adequada desde o período perinatal. Embora todos os nutrientes sejam importantes para o desenvolvimento estrutural do Sistema Nervoso Central (SNC), alguns tipos de lipídeos, como os Ácidos Graxos Poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL), podem influenciar decisivamente em determinadas fases do desenvolvimento mental (Georgieff, e Innis, 2005). De fato, a qualidade do suprimento de lipídios durante a gestação e a infância, vem sendo considerada como principal determinante do crescimento, do desenvolvimento visual e neurológico e da saúde em longo prazo. Dessa forma, a seleção qualitativa dos lipídios da dieta no início da vida é considerada de grande importância (Simopoulos, 1999).

O potencial genético do desenvolvimento cerebral é determinado durante a embriogênese e no início da vida pós-natal. Esse período corresponde, em humanos, aos dois a três primeiros anos de vida, e em ratos às três primeiras semanas de vida pós-natal (entre o 7º e o 14º dia), período no qual se dá o aleitamento exclusivo. É nesse período que ocorrem os processos de neurodesenvolvimento mais importantes: mielinização, organização de sistemas neurotransmissores, arborização dendrítica e gênese sináptica, que ocorrem com maior intensidade no sistema visual e no hipocampo (Saliba and Marret, 2001). Nesse momento o cérebro é especialmente vulnerável a quaisquer deficiências nutricionais em função de ser o período em que os processos implicados no desenvolvimento cerebral ocorrem com maior rapidez. (Almeida et al., 2002 , Morgane et al., 2002). Danos no desenvolvimento cerebral nesses estágios iniciais da vida provocam alterações nos parâmetros neuroanatômicos, neuroquímicos, neurofisiológicos e/ou funcionais e mesmo com a reversão da deficiência nutricional os danos parecem ter caráter permanente (Meiners et al., 1995; Levitsky e Strupp., 1995; Georgieff, 2007).

Recentemente as pesquisas com AGPI-CL têm dado maior atenção à associação do consumo de n-3 com o melhor desenvolvimento cognitivo na infância e a regressão da queda na cognição de idosos. Estudo recente realizado com camundongos em idade adulta e na velhice, suplementados com AG n-3, mostrou percentuais mais elevados de DHA nos fosfolipídeos cerebrais associados ao

melhor desempenho em testes de aprendizagem desenvolvidos em labirintos (Shirai, 2004). Um outro estudo realizado com ratos mostrou associação entre conteúdo de DHA dietético e maior habilidade em testes de esQUIVA inibitória (Hashimoto, 2005). Morigushi (2000) alimentou ratos com uma dieta deficiente em n-3 e submeteu suas gerações F2 e F3 ao teste do labirinto aquático de Morris, encontrando pior desempenho nas gerações oriundas dos animais com deficiência de n-3 do que nos controles. O desempenho nos testes cognitivos apresentou associação com os níveis de DHA cerebrais.

Assisi et al. (2006), em metanálise com estudos experimentais e clínicos focando o consumo de AG durante a gestação e a infância e doenças neurológicas como o Distúrbio do Déficit de Atenção (DDA), hiperatividade, depressão e esQUIZOFRENIA encontraram baixas concentrações de n-3 nas membranas celulares de pacientes com desordens do SNC. No entanto os dados sobre as relações adequadas n-6/n-3 foram inconclusivos.

Willatts (2002) detectou melhor desempenho na função visual e no desenvolvimento cognitivo em crianças alimentadas com leite materno quando comparadas a crianças que receberam fórmula infantil sem AGPI-CL, atribuindo o melhor desempenho ao conteúdo lipídico do leite, ou seja de AGPI-CL (Lucas 1997, Angelsen 2002).

Esses estudos, no entanto, tem sido inconclusivos, uma vez que, enquanto alguns autores encontraram resultados positivos com prematuros nenhum resultado foi encontrado em recém natos a termo (Horby, 1998; Makrides, 2000).

A fonte de AG utilizada para a suplementação também sofre grande variação. A maioria utiliza óleos vegetais em função do custo. No entanto os estudos feitos com suplementação de AGPI-CL normalmente fazem uso do óleo de peixe ou AA, DHA e EPA pré-formados.

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma semente oleaginosa que vem ganhando espaço no mercado de alimentos funcionais por sua particular composição que inclui um teor de ALA superior a 50% do total de AG presente na semente. Inicialmente, o óleo purificado da semente de linhaça foi utilizado em estudos com humanos no tratamento de sintomas de deficiência de AG n-3, como distúrbios neurológicos e visuais, dermatite hemorrágica, foliculite e retardo de crescimento (Holman et al., 1982; Bjerve e Thoreson.,1988). Atualmente a semente

de linhaça vem sendo muito utilizada, adicionada a outros alimentos nas refeições humanas.

Além de grande fonte de AGPI, a semente de linhaça também tem alto teor de fibras, tanto solúveis quanto insolúveis, que correspondem a cerca de 30% de seu peso seco (Carter, 1993), além de propriedades antioxidantes atribuídas a seu conteúdo em compostos fenólicos, derivados dos ácidos benzóico, cinâmico, cumarinas, flavonóides e lignanos (Oomah et al., 1995).

O presente estudo avaliou, portanto, a influência da semente de linhaça como fonte parcial de proteína e exclusiva de lipídeos e de fibra na dieta, ofertada à mãe durante o período pré-concepcional, gestação e lactação, e em seguida às crias até a idade jovem no desenvolvimento do sistema nervoso central, relacionando a composição relativa de ácidos graxos cerebrais com avaliações comportamentais de ratos através de três versões do Labirinto Aquático de Morris.

Material e métodos

Animais e procedimentos gerais

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas, oriundas do biotério de criação do Laboratório de Nutrição Experimental (LabNE) do Instituto de Nutrição da Universidade Federal Fluminense (UFF), obtidas imediatamente após o desmame (21 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais (42 x 34 x 17 cm) em condições controladas de umidade e temperatura (23 + 1°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 h) e foram divididos em três grupos conforme a ração experimental: Grupo Controle (GC), com ração à base de caseína; Grupo Linhaça (GL), com ração à base de caseína suplementada com semente de linhaça como fonte de fibras e óleo e Grupo Caseína Modificada (GCM), com ração à base de caseína, suplementada óleo de soja no intuito de igualar a quantidade de fibras e óleo aos do GL. Nesse estudo, a semente de linhaça foi adicionada na dieta porque esta é normalmente ingerida dessa forma na alimentação humana..A ração foi consumida ad libitum pelos GC e GL e no sistema de *Pair feeding* com o GL pelo GCM. A água foi consumida ad libitum por todos os grupos experimentais. O GCM foi instituído em função de ter sido constatado, em experimentos anteriores, um consumo alimentar espontaneamente menor no GL. Por isso o GCM recebeu ração

à base de caseína com teores de lipídeos e fibras equivalentes ao da ração do GL, em quantidades iguais às consumidas pelo GL (*pair feeding*).

Após a maturação sexual (90 dias) as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para cada três fêmeas. Constatando-se a gravidez através da presença de espermatozóides no muco vaginal, as mães continuaram recebendo suas respectivas dietas até o final da lactação. Após o parto, as ninhadas foram ajustadas para seis filhotes por mãe para se estabelecerem condições ideais de desempenho lactotrófico. Os filhotes excedentes foram pesados e sacrificados por decapitação para a retirada e pesagem dos cérebros. Os cérebros foram pesados em balança analítica GEHARA com precisão de 0,0001g, e foram congelados em nitrogênio líquido para posterior dosagem de ácidos graxos. O desmame ocorreu no 21º dia de vida, quando os animais machos de cada grupo (n=6), foram escolhidos aleatoriamente e transferidos para gaiolas individuais passando a receber a mesma dieta materna (Grupo Controle (GC); Grupo Controle Modificado (GCM), Grupo Linhaça (GL)).

O consumo de ração e a evolução ponderal dos animais foram monitorados durante todo o período experimental, em dias alternados, em balança digital (GEHARA) com precisão de 0,01g.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas previstas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense sob o número 188/06.

As rações foram produzidas no LabNE e tiveram como componentes básicos caseína, mistura de vitaminas, mistura de minerais, bitartarato de colina, L-cistina, amido de milho, açúcar refinado. As rações do GC e do GCM receberam também celulose microcristalina e óleo de soja e a ração do GL recebeu semente de linhaça moída. Todas as rações experimentais foram isocalóricas, isoproteicas e normolipídicas, seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition-93* (Reeves 1997) (Tabela 1). Nas rações do GL considerou-se o teor lipídico de 10%, o equivalente a 25g da semente de linhaça.

INSERIR TABELA 1

Avaliação Biológica

Para a análise do crescimento e eficiência das rações foram utilizados os seguintes indicadores biológicos (Campbell, 1963):

Protein Efficiency Ratio (PER) – Calculado através da relação entre o ganho ponderal e o consumo protéico dos animais em 28 dias após o desmame, indica a capacidade de crescimento dos animais;

Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) – Determinado pela relação entre a variação ponderal dos animais (VP) e a quantidade de ração consumida, indica quanto em grama de ração ingerida promove em aumento de peso corporal do animal.

Net Protein Retention (NPR) – Calculado a partir do peso corporal de um grupo de animais recebendo dieta isenta de proteínas. O ganho ponderal dos animais do grupo em teste é somado à perda ponderal dos animais do grupo aprotéico determinando quanto do aumento ponderal foi devido à proteína.

Análise de ácidos no cérebro dos filhotes no pós natal imediato

Para determinação do perfil de ácidos graxos do cérebro foi inicialmente realizada a extração, saponificação e metilação dos ácidos graxos das amostras de acordo com o método de Lepage e Roy (1986). Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gasosa e os ácidos graxos separados com coluna de capilar SP-2560 (Supelco Inc. Bellefonte, PA), como descrito em estudo anterior (Assumpção et al., 2004). Os ésteres foram identificados por comparação com seu tempo de retenção, com padrões conhecidos (Sigma, Supelco e Nuchek).

Testes cognitivos aos 30 dias de vida pós-natal nos filhotes

Aos 30 dias de vida pós-natal os animais foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris que consiste em um tanque circular de cor preta (1,20 m de diâmetro e 80 cm de altura), baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, e mantida à temperatura constante ($26 \pm 1^\circ \text{C}$). Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste).

Duas versões do teste (testes de memória operacional e memória de referência espacial) utilizaram uma plataforma de cor preta, com 10 x 10 cm submersa 1,5 cm da superfície da água e uma terceira versão (memória de procedimento) utilizou uma bola de cor branca (7 cm de diâmetro) como pista visual fixada sobre a superfície superior da plataforma submersa, permitindo que a bola permanecesse visível sobre a superfície da água.

Durante os experimentos, um sistema de câmera digital acoplada a um computador capturou as imagens do labirinto aquático, para posterior análise das imagens.

Versão Memória Operacional (MO): Foram realizadas 4 tentativas por dia, durante 5 dias de treino. Os pontos de partida foram alterados a cada tentativa. A plataforma submersa permaneceu na mesma posição durante todas as sessões do dia sendo trocada de posição no dia seguinte. O animal teve um tempo de observação de 30s sobre a plataforma antes de ser colocado no ponto de partida seguinte.

Versão Memória de Referência Espacial (MRE): Foi feito um treino com 6 tentativas em um único dia. Os animais foram liberados de pontos de partida diferentes a cada tentativa. A plataforma permaneceu na mesma posição durante todo o treino. O tempo de observação sobre a plataforma foi de 10s e foi dado um intervalo de 20s entre cada tentativa. O teste foi realizado 48 horas após o treino repetindo-se o procedimento à exceção do número de tentativas que foi reduzido para 3.

Versão Memória de Procedimento (MP): realizadas 4 tentativas por dia, durante 4 dias de treino. Em cada tentativa os animais foram liberados de pontos de partida diferentes e a plataforma visível foi trocada de posição a cada tentativa. O tempo de observação na plataforma foi de 10s com um intervalo de 20s entre cada tentativa. Nesse intervalo era efetuada a troca de posição da plataforma para a tentativa seguinte.

Os testes foram realizados sempre no mesmo horário. Os pontos de partida e a localização da plataforma variaram em uma seqüência aleatória de forma que o mesmo animal não largasse do mesmo ponto de partida no mesmo dia e não houvesse repetição da ordem dos pontos de partida nos dias subseqüentes. O animal em teste era colocado na piscina com o focinho voltado para a borda e permitido a nadar livremente para procurar a plataforma durante 60 segundos. Caso não encontrasse a plataforma, era guiado manualmente até a mesma, onde permanecia durante o tempo estabelecido para observação. Entre todas as

tentativas, os animais foram secos com papel absorvente e colocados em sua gaiola para aguardar a próxima tentativa.

Análise Estatística

Os resultados encontrados foram expressos em médias \pm erro padrão da media (EPM). Os dados foram tratados com estatística não paramétrica, através do teste de Kruskal Wallis para variáveis independentes com significância a nível de $p < 0,05$, uma vez constatada a não normalidade de suas distribuições através do teste de Shapiro-Wilk. As correlações foram feitas através do coeficiente de correlação de Spearman sendo significativo $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS-10.

Resultados

Ingestão alimentar e massa corporal dos filhotes após o desmame.

O gráfico 1 mostra o consumo alimentar relativo, em gramas por 100 gramas de massa corporal, dos grupos experimentais desde o desmame (semana 1) até o final da avaliação biológica (semana 5).

Observa-se que nas duas primeiras semanas não houve diferença significativa no consumo relativo entre os grupos. Na segunda semana, embora sem significância estatística, o GL já apresenta ingestão alimentar maior do que os outros grupos (7% em relação ao GCM e 8% em relação ao GC). Já na terceira semana o GL apresentou consumo relativo significativamente maior do que os GC (15%) e GCM (14%) que foram semelhantes entre si. A partir da 4ª semana até o final do estudo o grupo GL apresentou consumo alimentar relativo superior tanto em relação ao grupo GC como o GCM, não sendo observado diferença significativa no consumo relativo entre os grupos GC e GCM.

INSERIR GRÁFICO 1

No Gráfico 2 está representada a curva ponderal dos diferentes grupos com avaliações semanais desde o desmame (semana 1) até o final da avaliação biológica de crescimento (semana 5). Observa-se que a massa corporal do GC ($46,92 \pm 6,73\text{g}$) foi superior ($P < 0,05$) à dos GCM e GL desde o desmame ($39,67 \pm 3,69$ e $38,25 \pm 5,71\text{g}$ respectivamente), que foram semelhantes entre si. Nas 2,3,4 semanas ocorreu diferença estatística ($P < 0,05$) entre os três grupos estudados, sendo o GC o que apresentou maior massa corporal e o GL menor. No final do período estudado o GC continuou com a maior massa corporal ($P < 0,05$; $172,08 \pm 14,62\text{g}$) enquanto o GL atingiu valores de massa corporal equivalentes ao GCM ($127,58 \pm 4,35$ e $127,67 \pm 6,33\text{g}$ respectivamente).

INSERIR GRÁFICO 2

Indicadores Biológicos de crescimento e de eficiência alimentar e protéica

A tabela 2 mostra, através do PER, que o GC apresentou, para esse indicador, os maiores valores ($p < 0,05$), enquanto o GL apresentou os menores valores ($p < 0,05$), permanecendo o GCM com valores intermediários. O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) se comportou de forma semelhante, enquanto o NPR mostrou menores valores no GL ($p < 0,05$) e valores equivalentes entre o GC e GCM.

INSERIR TABELA 2

A tabela 3 mostra a composição percentual dos ácidos graxos nas rações experimentais e no cérebro dos filhotes ao nascimento nos diferentes grupos. Ao analisar a tabela podemos observar diferenças importantes na incorporação de alguns ácidos graxos no cérebro das crias. Teores de AA e DHA foram praticamente não detectados na dieta, no entanto a incorporação desses AGs foi expressiva no cérebro de todos os grupos. Além disso, a concentração do ácido araquidônico (AA) ($20:4n-6$) do GL foi significativamente menor do que os demais grupos ($p < 0,05$), enquanto o percentual de DHA foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação aos outros grupos. Interessante que o maior percentual do ácido graxo linolênico na dieta do grupo GL não refletiu na maior incorporação desse ácido graxo no cérebro dos filhotes do grupo GL e sim nos seus derivados de cadeia longa como DPA e DHA. De maneira similar o AG de maior predominância na dieta tanto no GC quanto no GCM foi o AL (53%), o qual por sua vez apresentou-se em proporções reduzidas no cérebro dos filhotes dos grupos GC e GCM ($< 1\%$), no entanto foram observados teores de AA de 12% nesses grupos. O perfil dos AGs dos cérebros dos filhotes mostra concentração de quase 50% de AGS, ainda que as proporções desses AGs nas rações foram relativamente pequenas (15-17%).

INSERIR TABELA 3

Testes Cognitivos

A versão Memória Operacional do Teste do Labirinto Aquático de Morris foi analisada através das médias de tempo de latência gastos pelos animais para encontrar a plataforma submersa em quatro tentativas realizadas a cada dia. Como a cada dia a plataforma teve sua posição alterada, a latência da primeira tentativa foi descartada, pois uma vez que o animal não sabia onde estava a plataforma o tempo gasto à sua procura não refletiria o comportamento de memória e sim o acaso.

No primeiro dia de treino o GL apresentou latências inferiores ao GC ($p < 0,05$) e similares ao GCM, que também foi similar ao GC (GL=35,14 \pm 8,81s; GC=44,90 \pm 12,50s e GCM=45,69 \pm 8,81s). O mesmo padrão de desempenho se repetiu no segundo e no terceiro dias (GL=22,38 \pm 5,36 e 17,01 \pm 4,91s; GC=29,65 \pm 5,28 e 22,95 \pm 5,68 e GCM= 29,55 \pm 13,06 e 23,11 \pm 17,36), No quarto dia de treino, no entanto, não houve significância estatística entre as latências dos três grupos e no quinto dia o GL voltou a encontrar a plataforma em menor tempo ($p < 0,05$; 8,70 \pm 5,50 s) do que o GC (12,69 \pm 5,65s). O GCM mais uma vez manteve semelhança estatística tanto com o GL quanto com o GC, uma vez que apresentou 14,62 \pm 5,76 segundos para encontrar a plataforma. (Gráfico 3)

INSERIR GRÁFICO 3

Também na versão Memória Espacial de Referência do Labirinto Aquático de Morris o GL apresentou menores latências do que os GC e GCM, tanto no treino quanto no teste. As latências do treino foram semelhantes entre os GC e GCM, no entanto o GCM foi, o que necessitou de maior tempo para encontrar a plataforma no teste. (Tabela 4)

INSERIR TABELA 4

Já na versão Memória de Procedimento, teste que utiliza pista visual, não houve diferença estatística no desempenho dos grupos experimentais nos quatro dias de treino. (Gráfico 4)

INSERIR GRÁFICO 4

A tabela 5 mostra a correlação entre os percentuais dos ácidos graxos AA e DHA nos lipídeos totais dos cérebros dos filhotes e a latência média encontrada nas três versões do labirinto aquático estudadas com cada grupo experimental. Vale ressaltar que as menores latências, ou seja, as correlações inversas traduzem em melhor desempenho cognitivo, uma vez que indica maior rapidez do animal na realização da tarefa.

Os teores de AA estiveram diretamente correlacionados com a versão MO tanto no GC quanto no GCM ($p < 0,01$) e o GL apresentou uma correlação inversa com o DHA, atribuindo a esse AG o melhor desempenho nessa versão do labirinto aquático. Na versão MRE, o GCM e o GL apresentaram correlação inversa com conteúdo de DHA. Já na versão MP, o DHA dos três grupos esteve inversamente correlacionado com a média das latências, associando a presença desse AG à redução no tempo para encontrar a plataforma.

INSERIR TABELA 5

Discussão e conclusão

No presente estudo, a ingestão materna de semente de linhaça como fonte parcial de proteínas e exclusiva de lipídeos e fibra na dieta durante os períodos pré-concepcional, gestação e lactação e, por parte dos filhotes machos do desmame até a idade jovem (42º dia de vida), ocasionou redução significativa da massa corporal total em cerca de 22% com relação à massa corporal final do grupo controle. Na realidade, o crescimento das crias do GL mostrou-se inferior ao do GC desde a lactação, fato que refletiu na massa corporal ao desmame.

O consumo alimentar do GL indica uma tentativa de recuperação no crescimento, já que seu consumo relativo foi superior aos demais grupos desde a segunda semana (gráfico 1). No entanto, o maior consumo relativo não foi suficiente para recuperação no crescimento, uma vez que o GL só atingiu a mesma taxa de crescimento do GCM na 5ª semana (gráfico 2). Vale ressaltar que o GCM, em função da sua característica de ser *pair fed* do grupo GL, consumiu as mesmas quantidades de ração que o GL e, ainda assim apresentou crescimento mais eficiente. Nas semanas 2, 3 e 4, apesar dos GL e GCM terem recebido rações com

a mesma distribuição de macronutrientes, a qualidade da fonte lipídica foi diferente, apresentando o GL maior conteúdo do AG linolênico (n-3) e o GCM do AG linoléico (n-6). Além disso, a fonte protéica do GL também diferiu do GCM, sendo esta última como fonte principal a caseína e, similar ao do Grupo Controle.

De fato, ao analisar os indicadores biológicos (tabela 2) se percebe, através do PER, que a proteína da ração de linhaça não resultou na mesma eficiência do que as demais rações, promovendo, de fato, menor crescimento e o CEA indica que, em termos globais de macronutrientes, a ração de linhaça não obteve a mesma eficiência biológica na promoção do crescimento do que a do GC. Já o NPR indica uma menor eficiência protéica da ração de linhaça, uma vez que o GC e o GCM tiveram resultados semelhantes mesmo com o mesmo conteúdo de fibras. Deste modo, o teor quantitativo de fibra da dieta não justifica a menor taxa de crescimento do GL, embora não possamos descartar a hipótese que a presença de fatores antinutricionais como o fitato, linatina, e compostos cianogênicos possam também ter contribuído para um menor crescimento nesses animais decorrente da menor absorção protéica (Thompson, 1993).

Todos esses dados, em conjunto, nos levam a sugerir que provavelmente a menor taxa de crescimento nos animais GL em relação aos GCM, pelo menos até a 5^o semana, seja decorrente tanto da fonte protéica como da fonte lipídica da dieta administrada.

A literatura mostra que o déficit de massa corporal induzido pela restrição protéica em fases de crescimento rápido não consegue ser completamente restabelecido por uma dieta normal (Ventrucci et al, 2004). Em nosso caso, podemos pensar que essa mesma situação ocorreu com o grupo GCM, já que por conta da sua situação de ser *pair-feed* do GL este vem ingerindo menos proteína que o grupo controle desde a fase intrauterina.

Com relação à fonte lipídica da dieta, a tabela 3 mostra a distribuição percentual dos ácidos graxos de cada uma das dietas do estudo. Como esperado na dieta com 25% de semente de linhaça, rica em ácidos graxos da família n-3, os ácidos graxos mais abundantes são os ácidos graxos poliinsaturados n-3, sendo o ácido graxo linolênico ALA (C18:3 n-3) o que apresenta-se em maior proporção, seguido do ácido graxo oléico (C18:1 n-9) e linoléico (C18:2 n-6). De maneira similar, nas dietas com óleo de soja, os ácidos graxos poliinsaturados n-6 estão em maior proporção e o principal representante é o linoléico (C18:2 n-6), seguido do

ácido graxo oléico (C18:1 n-9) e linolênico ALA (C18:3 n-3). Cabe destacar a ausência do ácido araquidônico (C20:4 n-6) e do docosahexaenóico (C22:6 n-3) em todas as dietas.

Ao avaliarmos a distribuição percentual dos ácidos graxos da dieta e a sua incorporação nos lipídeos totais do cérebro, podemos observar que a proporção de ácidos graxos nos lipídeos cerebrais difere substancialmente daqueles da dieta consumida pelos animais. De modo que todos os grupos estudados apresentaram, no cérebro, grande proporção dos ácidos graxos saturados. É provável que isto seja decorrente da aumentada lipogênese cerebral que sabidamente ocorre no período perinatal (Girard, et al., 1992).

Outra importante diferença foi que os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AA, EPA e DHA), ainda que ausentes ou em pouca concentração nas dietas encontram-se de maneira apreciável no cérebro. O ácido araquidônico (AA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são sintetizados a partir do ácido linoléico e linolênico respectivamente, através de uma série de reações de dessaturação e alongação desses ácidos graxos essenciais (Pereira et al., 2003).

Os animais alimentados com semente de linhaça apresentaram no cérebro valores mais baixos de AA, porém, teores mais elevados dos ácidos graxos linoléico e DHA quando comparados aos valores dos outros grupos. Tem sido vista uma competição entre ALA e AL pelas enzimas dessaturases, sendo o ALA substrato preferencial dessas enzimas quando este está em maior concentração (Behrouzian et al., 2003). Assim, a maior proporção de ALA na dieta de linhaça no presente estudo provavelmente favoreceu a conversão do ALA em DHA em detrimento da bioconversão do LA em AA, fato que se refletiu em concentrações mais baixas de AA nos cérebros do GL. Uma das conseqüências da deficiência de AA é o déficit de crescimento em função de sua participação na síntese hormonal e duplicação de DNA (Makrides, 1995; Lauritzen, 2001, Marszalik e Lodish, 2005).

São muitos os estudos que correlacionam suplementação de DHA sem AA com maior eficiência na maturação retiniana (Uauy, 1990), melhora na função visual (Birch, 1993) e na cognição e no neurodesenvolvimento (Carlson et al, 1996a), no entanto todos esses estudos mostraram também déficit de crescimento importante (Carlson et al., 1996b; Ryan et al., 1999) O' Connor e colaboradores (2001) chegam a questionar o quanto se deve buscar a melhora no neurodesenvolvimento em detrimento do crescimento.

Assim, considerando que o cérebro é fundamental na cognição e comportamento do animal, julgamos importante analisar se esse perfil de ácidos graxos nos cérebros dos filhotes que foram alimentados com semente de linhaça do presente estudo poderia influenciar no desempenho cognitivo desses animais, de modo a ocasionar alguma modificação funcional.

De fato, os animais do GL apresentaram melhor desempenho na versão MO do Labirinto Aquático de Morris do que os animais do GC. Considerando que a memória operacional e o aprendizado envolvem o córtex frontal (Felt et al., 2006) e o hipocampo dorsal (Pothuizen et al, 2004), os resultados sugerem uma provável incorporação de DHA nessas estruturas interferindo na fluidez da membrana neuronal, o que facilitaria a transmissão de impulsos sinápticos e favorecendo, como conseqüência, o desempenho do GL no teste de MO.

Também na versão MRE o GL apresentou melhor desempenho. O aprendizado espacial e a memória de maior duração envolvem hipocampo e cerebelo (Lukoyanov e Andrade, 2000; Colombel et al., 2004). Pothuizen et al (2004) investigaram o envolvimento de diferentes áreas da formação hipocampal em função do tipo de memória utilizada (operacional ou de referência). Para tanto, provocaram, no hipocampo, lesões completas ou limitadas à sua região ventral ou dorsal, encontrando prejuízos na memória operacional e na memória de referência apenas nos animais com lesão no hipocampo ventral. Da mesma forma, podemos associar o melhor desempenho nos testes de MO e MRE do GL ao acúmulo de DHA nessas regiões.

Prejuízos na memória espacial e no aprendizado de animais desnutridos foram correlacionados com alterações fisiológicas e neuroanatômicas na formação hipocampal, principalmente nas regiões CA3 e CA4 (Jordam, 1982, Morgane et al., 2002). Esses dados sugerem que o DHA formado a partir do ALA dietético do GL interferiu positivamente nessas estruturas. Na versão Memória de Procedimento todos os grupos tiveram desempenho semelhante, o que indica que a deficiência de crescimento dos animais do GL não provocou prejuízos motores uma vez que a habilidade natatória foi semelhante ao do GC.

Na versão MO do labirinto aquático de Morris o DHA mostrou correlação com as menores latências, ou seja, melhor desempenho no GL, ao passo que a concentração de AA se correlacionou com maior tempo de latência no GC e no GCM. Essa associação entre maior latência e pior desempenho nos testes poderia

ser atribuída à velocidade de natação, uma vez que quanto mais pesado o animal, menor a velocidade de natação (Wainwright et al., 1997) o que poderia ser um fator de confundimento no presente estudo. No entanto aplicando testes estatísticos para este variável de confundimento não encontramos correlação entre os testes comportamentais e o peso do animal. Além disso, a partir da 5ª semana o GCM manteve a massa corporal semelhante à do GL e também apresentou pior desempenho associado às maiores concentrações de AA. Na versão MRE, a concentração de DHA esteve correlacionada também às menores latências tanto no GCM quanto no GL. Essa correlação também existiu no GC, no entanto sem significância estatística.

Um fator limitante a ser considerado no presente estudo é que o desequilíbrio observado entre n-6 e n-3 não podem ser extrapolados para humanos, uma vez que a linhaça foi a única fonte lipídica da dieta, fato que não ocorre na alimentação humana que tem maior diversidade de fontes lipídicas. No entanto, a relação n-6/n-3 deve ser observada respeitando as necessidades do organismo principalmente em períodos vulneráveis como gestação e lactação.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem fortemente que o maior aporte de n-3 na dieta reflete em maior incorporação de AG da família n-3 nas estruturas cerebrais, que por outro lado, exerce influência positiva no desempenho dos animais nos testes cognitivos. No entanto a suplementação com AG n-3 visando a melhoria no desempenho neurológico deve ser feita com cautela e observando-se a oferta adequada também de n-6 uma vez que o desequilíbrio entre esses dois AGEs trazem como consequência não apenas o déficit de crescimento, mas também diversas alterações metabólicas que envolvem a síntese de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos interferindo, dessa maneira, na produção hormonal, fertilidade, imunidade e resposta inflamatória.

Referências bibliográficas

- Almeida, S.S.; Dantas, L.H.; Dye, L.; Nunes, M.L.; Prasad, C.; Rocha, J.B.; Wainwright, P.; Zaia, C.T.; Guedes, R.C., 2002. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutritional. Neurosciences* 5(5), 311-20.
- Angelsen N.K., Vik, T., Jacobsen, G., Bakketeig, L.S., 2001. Breast feeding and cognitive development at age 1 and 5 years. *Arch Dis Child.* 85, 183-188.
- Assisi, A., Banzi, R., Buoncuore, C., Capasso, F., Di Muzio, V., Michelacci, F., Renzo, D., Tafuri, G., Trotta, F., Vitocolonna, M., Garattini, S., 2006. Fish oil and mental health: the role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in cognitive development and neurological disorders. *International Clinical Psychopharmacology* 21(6), 319-336.
- Assumpção, R.P., Santos, F.D., Barreto, G.F., Andrade, P.M.M., Tavares do Carmo, M.G., 2004. Effect of variation of trans fatty acid in lactating rat's diet on the lipoprotein lipase activity in mammary gland, liver, and adipose tissue. *Nutrition* 20, 806 - 811.
- Behrouzian B., Buist P.H., 2003. Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. *Prost Leukot Essent Fatty Ac* 682, 107-12.
- Birch E.E., Birch D.G., Hoffman D., Hale L., Everett M., Uauy R., 1993 Breast-feeding and optimal visual development. *Journal of Pediatric Ophthalmology Strabismus* 30:33–38.
- Bjerve K.S., Thoreson, O., 1988. Linseed oil and cod liver oil induce rapid growth in a seven-year-old girl with a n-3 fatty acid deficient. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 12(5), 521-5.
- Campbell, J.A., 1963. Method for determination of PER & NPR.- Evaluation of protein quality. *Food and Nutrition Board*, 31-33.

- Carlson S.E., Werkman S.H., Tolley E.A., 1996a. The effect of long-chain n-3 fatty acid supplement on visual acuity and growth of preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *Am J Clin Nutr.* 63, 687–697.
- Carlson S.E., Werkman S.H., 1996b. A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until 2 months. *Lipids.* 31:85-90.
- Carter J., 1993. Flax seed as a source of alpha linolenic acid. *Journal of American College Nutrition* 12:551.
- Colombel, C., Lalonde, R. and Caston, J. 2004. The effects of unilateral removal of the cerebellar hemispheres on spatial learning and memory in rats. *Brain Research*, 1004, 108-115.
- Felt, B. T., Beard, J. L., Schallert, T., Shao, J., Aldridge, J. W., Connor, J. R., Georgieff M. K. e Lozoff, B. 2006. Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats *Behavioural Brain Research* 10, 171(2):261-270.
- Meiners, S., Powel, E.M., Geller, H.M., 1999. Neurite outgrowth promotion by the alternatively spliced region of tenascin-C is influenced by cell-type specific binding. *Matrix Biology* 18, 75-87
- Georgieff, M.K.; Innis, S.M., 2005. Controversial Nutrients That Potentially Affect Preterm Neurodevelopment: Essential Fatty Acids and Iron *Pediatric Research* 57, 5, Pt 2, 99R-102R.
- Georgieff, M.K., 2007. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 85 (2), 614S-620S.
- Girard, J. Ferre, P., Pegorier J.P., Duee P.H., 1992. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition *Physiol Rev*, 72(2), 507-562.
- Guise, E., del Pesce, M., Foschi, N., Quattrini, A., Papo I., Lassonde, M., 1999. Callosal and cortical contribution to procedural learning. *Brain* 122, (6), 1049-1062.

- Hashimoto, M., Tanabe, Y., Fujii, Y., Kikuta T., Shibata, H., Shido O., 2005. Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid b-infused rats, *J. Nutr.* 135, 549–555.
- Holman R.T., Johnson S.B., Hatch T.F., 1982. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr.* 35(3), 617–623.
- Horby, M.J., Olle, H., Hughes, E.L., Michaelsen, K.F., 2001. Is There a Relation between Docosahexaenoic Acid Concentration in Mothers' Milk and Visual Development in Term Infants? *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.* 32(3):293-296.
- Jordan TC, Cane SE, Howells KF. Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev Psychobiol* 1981;14:317-25.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., Michaelsen, K. F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid. Res.* 40, 1-94,
- Lepage, G., Roy, C. C., 1987. Direct transesterification of classes of lipid in one-step reaction. *Journal Lipid Research*, 27:114-20.
- Lucas A., Fewtrell M.S., Davies P.S.W., Bishop N.J., Clough H., Cole T.J., 1997. Breastfeeding and catch-up growth in infants born small for gestational age. *Acta Paediatr* 86:564-569.
- Lukoyanov, N.V., Andrade, J.P., 2000. Behavioral Effects of Protein Deprivation and rehabilitation in Adult Rats: Relevance to Morphological Alterations in the Hippocampal Formation. *Behavioral Brain Research*, 112, 85 97.
- Makrides, M., Neumann, M., Simmer, K., Gibson, R., Parter, J., 1995. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? *The Lancet*, v. 345, 1463-1468.
- Makrides, M., Gibson, R.A., 2000. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1), 307S-311S.

- Marszalek, J.R., Harvey F.L. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid–interacting proteins, and neural function: Breastmilk and Fish Are Good for You. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 633-657.
- Morgane et al., P.J.; Mokler, D.J.; Galler, J.R., 2002. Effects of Prenatal Protein Malnutrition on the Hippocampal Formation. *Neur Biobeh Rew*, v.26, p.471-483.
- Morgane et al., P.J.; Mokler, D.J.; Galler, J.R., 2002. Effects of Prenatal Protein Malnutrition on the Hippocampal Formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.26, p.471-483,
- Moriguchi, T., Greiner, R.S., Salem Jr. N., 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration, *J. Neurochem* 75, 2563–2573.
- Morris, R.G., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11 (1), 47-60,
- O'Connor,D.L., Hall, R., Adamkins, D., Auestad, N., Castillo, M., Connor, W.E., Connor, S.L., Fitzgerald, K.,Groh-Wargo, S., Hartmann, E.E., Jacobs, J., Janowsky, J., Lucas, A., Margeson, D., Mena. P., Neuringer, M., Nesin, M., Siger, L.,Stephenson, T., Szabo, J., Zemon, V., 2001. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics*, 108 (2), 359-371.
- Oomah, B.D., Mazza, G., Kenaschuk, E.O., 1992. Cyanogenic compounds in flaxseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 1346-1348.
- Pereira S.L., Leonard A.E., Mukerji P. 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prost Leukot EssentFatty Ac.* 682, 97-106.
- Pothuizen, H.H.J., Zhang, W.N., Jongen, A.L.R., Joram F., Yee, B.K., 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory *European Journal of Neuroscience* 19 (3), 705–712.

- Reeves, P.G., 1997. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *The Journal of Nutrition* 127(5), 838S-841S
- Ryan A.S., Montalto M.B., Groh-Wargo S., et al., 1999. Effect of DHA-containing formula on growth of preterm infants to 59 wks postmenstrual age. *Am J Hum Biol.* 11, 457–467
- Saliba, E., Marret, S., 2001. Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors *Seminars in Neonatology* 6(2), 121-133
- Shirai, N., Suzuki , H., 2004. Effect of Dietary Docosahexaenoic Acid and Catechins on Maze Behavior in Mice *Annals of Nutrition & Metabolism* 48:51-58
- Simopoulos, A.P., Leaf, A., Salem, J.N., 1999. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of Nutrition and Metabolism* 43, 127-130.
- Levitsky D. A., Strupp, B.J., 1995. Malnutrition and the Brain: Changing Concepts, Changing Concerns. *Journal of Nutrition* 125, 8 Suppl, 2212-2220.
- Thompson, L.U., 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International* 26, 131-149.
- Uauy, R; Birch D.G., Birch, E.E., 1990. Effects of dietary ω -3 fatty acid on retinal function of very low birth weight neonates. *Pediatric Research*, 28:485:92.
- Ventrucci, G. Ramos, L.G.S., Roston, M.A.M., Gomes, M.C.M., 2004. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. *Nutrition* 20(2), 213-217.
- Wainwright, P.E., Xing, H.C., Mutsaers, L., McCutcheon, D., Kyle D., 1997. Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behavior of a diet with a low (n-6):(n-3) ration and very high levels of docosahexaenoic acid, *J. Nutr.* 127, 184-190.
- Willatts, P., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acids improve cognitive development. *Journal of Family Health Care* 12 (suppl.6):5

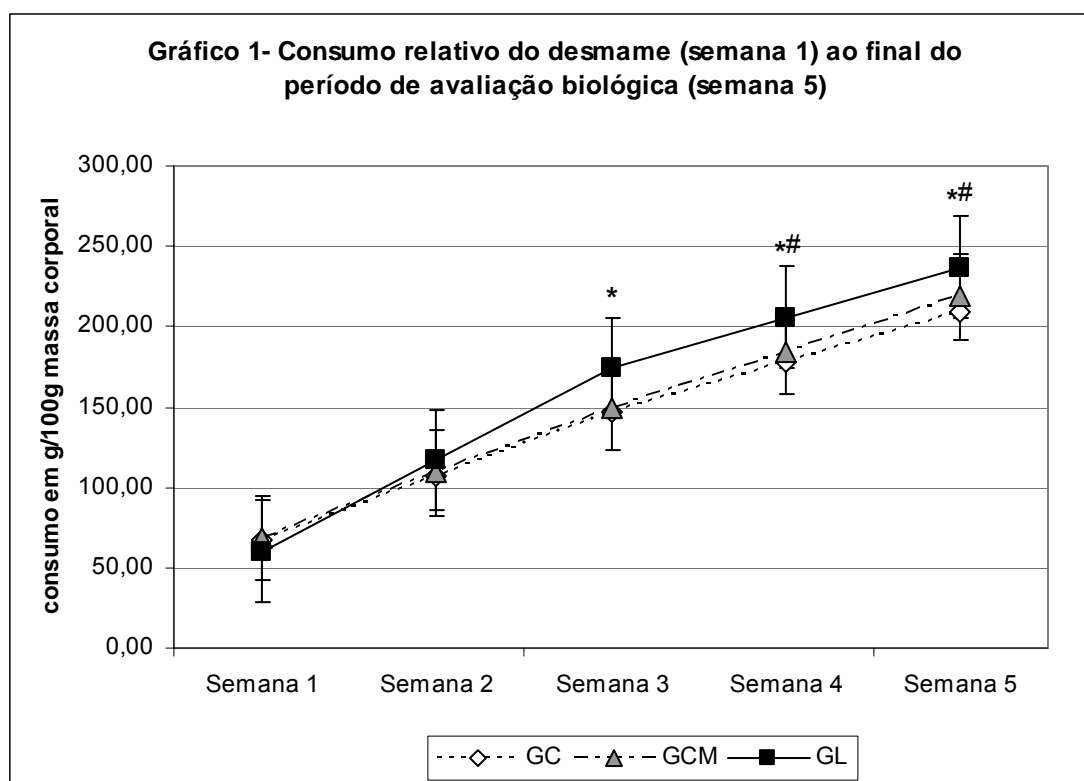
TABELAS E GRÁFICOS - ARTIGO 2

Artigo 2 - Tabela 1 - Composição e distribuição de macronutrientes das rações experimentais (g/100g; AIN 93).

		Grupo Controle		Grupo Controle Modificado		Grupo Linhaça	
Ingredientes (g)							
Proteína							
	Caseína	10,87	(18,48)	10,87	(18,48)	5,43	(13,04)
	Linhaça	0,00		0,00		5,00	
Carboidratos							
	Amido de milho	62,08	(54,47)	59,08	(51,47)	52,02	(44,41)
	Açúcar	10,00		10,00		10,00	
	Linhaça	0,00		0,00		7,50	
Lipídeos							
	Oleo de soja	7,00		10,00		0,00	
	Linhaça	0,00		0,00		10,00	
Fibras							
	Celulose	5,00		5,00		0,00	
	Linhaça	0,00		0,00		5,00	
	Mistura de Vitaminas	3,50		3,50		3,50	
	Mistura de Minerais	1,00		1,00		1,00	
	L-cistina	0,30		0,30		0,30	
	Bitartarato de Colina	0,25		0,25		0,25	
	Total (g)	100,00		100,00		100,00	
Distribuição energética							
	Valor energético Kcal/100g	358,07	(360,70)	375,07	(377,71)	388,68	(392,51)
	% proteínas	11,58	(19,25)	11,05	(18,38)	10,35	(17,35)
	% Carboidratos	68,80	(61,52)	63,11	(56,20)	64,86	(56,91)
	% Lipídeos	19,62	(19,23)	25,84	(25,42)	24,80	(10,61)

() Período de gestação e lactação; GC: Grupo Controle, GCM, Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.

Artigo 2 - Gráfico 1 – Consumo relativo semanal do desmame ao final do período de avaliação biológica (entre semanas 1 e 5)

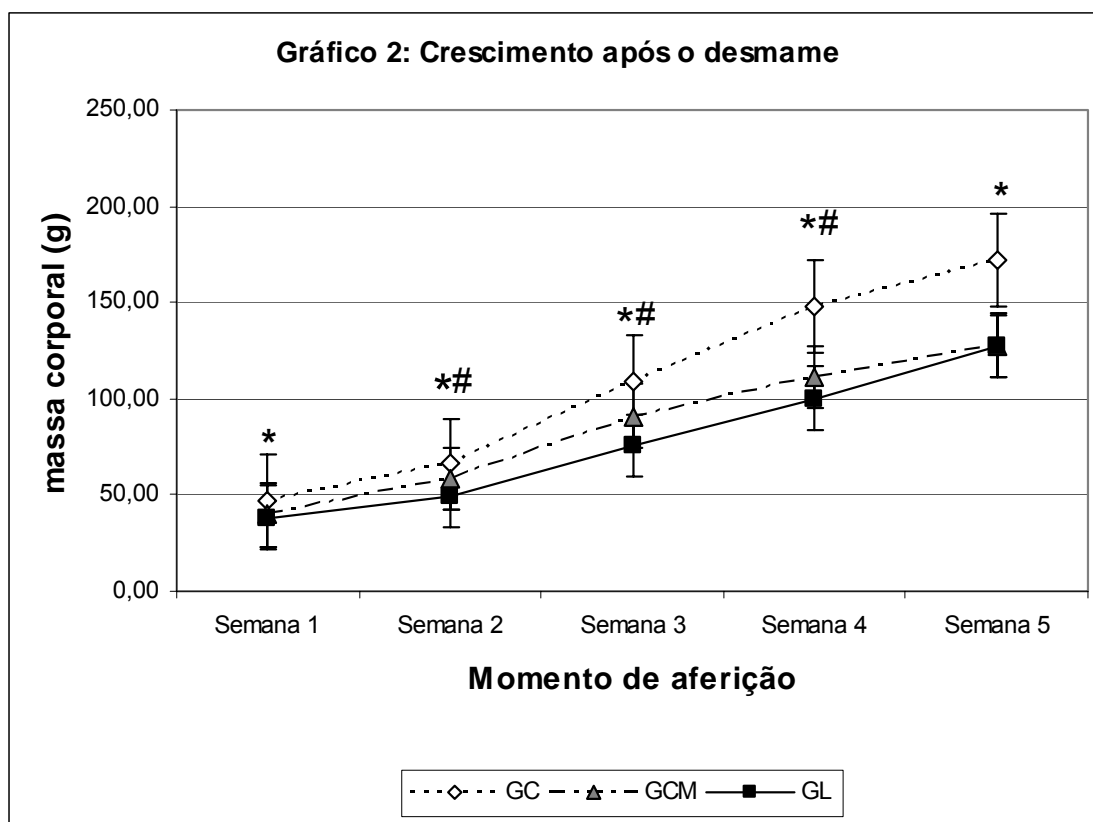


GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça; Desmame: Semana 1.

* significa diferença com $p < 0,05$ entre GC e GL

significa diferença com $p < 0,05$ entre GCM e GL

Artigo 2 - Gráfico 2: Crescimento após o desmame



GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça; Desmame: Semana 1.

* significa diferença com $p < 0,05$ entre GC e GL

significa diferença com $p < 0,05$ entre GCM e GL

Artigo 2 - Tabela 2: Indicadores Biológicos de qualidade nutricional

GRUPO	GC		GCM		GL	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
PER	3,37	a ±0,10	3,06	b ±0,18	2,87	c ±0,15
CEA	0,35	a ±0,01	0,31	b ±0,02	0,30	c ±0,02
NPR	4,29	a ±0,34	4,29	a ±0,39	3,39	b ±0,25

GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça; PER: *Protein Efficiency Ratio*; CEA: Coeficiente de Eficácia Alimentar; NPR: *Net Protein Retention*.
 Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$

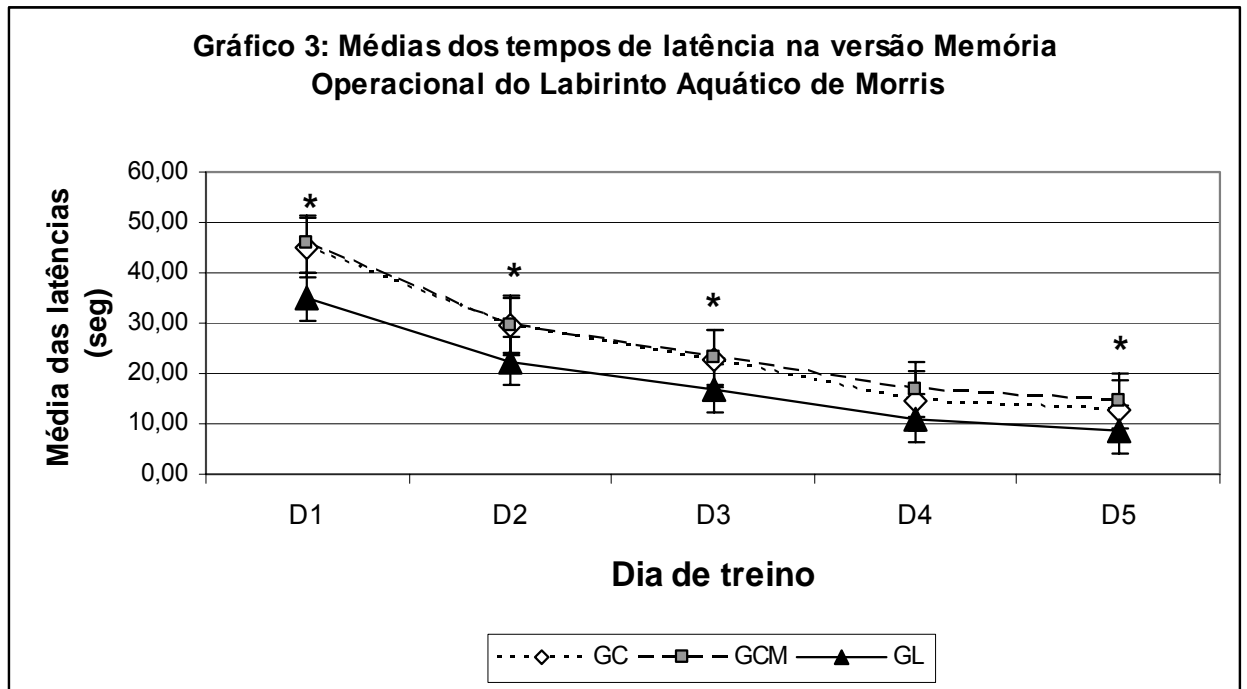
Artigo 2 - Tabela 3: Composição percentual dos ácidos graxos nas rações e no cérebro dos animais dos grupos experimentais.

ÁCIDO GRAXO	RAÇÃO						CÉREBRO					
	GC		GCM		GL		GC		GCM		GL	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EMP	MÉDIA	EMP	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
C 14:0	0,40	a ± 0,36	0,21	A ± 0,04	1,41	b ± 0,84	1,64	a ± 0,02	1,57	b ± 0,01	1,60	ab ± 0,09
C 15:0	0,15	a ± 0,16	0,65	b ± 0,42	0,31	b ± 0,11	2,00	a ± 0,14	1,70	a ± 0,49	2,24	b ± 0,18
C 16:0	12,63	a ± 0,12	12,92	b ± 0,20	8,09	c ± 0,23	29,78	a ± 0,01	29,33	b ± 0,05	30,00	ab ± 1,27
C 18:0	3,44	a ± 0,01	3,49	a ± 0,04	5,24	b ± 0,10	16,35	a ± 0,38	16,82	a ± 0,40	15,54	b ± 0,24
C 18:1 n-9 cis	22,34	a ± 0,26	22,13	a ± 0,10	22,98	b ± 0,26	10,69	a ± 0,33	10,32	b ± 0,14	11,98	c ± 0,17
C 18:2 n-6 (AL)	53,69	a ± 0,15	53,11	b ± 0,14	14,41	c ± 0,09	0,77	a ± 0,00	0,81	b ± 0,02	1,11	c ± 0,12
C 18:3 n-6	0,21	a ± 0,01	0,19	b ± 0,01	0,14	c ± 0,05	0,05	a ± 0,21	0,07	b ± 0,01	0,08	b ± 0,02
C18:3 n-3 (ALA)	5,39	a ± 0,19	5,44	a ± 0,03	46,15	b ± 0,64	0,11	ab ± 0,06	0,15	a ± 0,01	0,08	b ± 0,02
C 20:4 n-6 (AA)	ND		ND		ND		12,57	a ± 0,25	12,87	b ± 0,11	7,91	c ± 0,29
C 20:5 n-3 (EPA)	0,08	a ± 0,06	0,03	ab ± 0,01	0,05	b ± 0,01	0,15	a ± 0,01	0,13	b ± 0,02	0,05	c ± 0,00
C 22:5 n-3 (DPA)	0,01	a ± 0,01	0,02	a ± 0,01	0,04	± 0,04	0,15	a ± 0,01	0,10	b ± 0,06	2,41	c ± 0,22
C 22:6 n-3 (DHA)	0,01	a ± 0,00	0,02	b ± 0,02	0,02	ab ± 0,01	10,41	a ± 0,06	10,85	b ± 0,53	14,33	c ± 0,25
Total PUFAs n-6	53,72	a ± 0,11	53,12	b ± 0,15	14,42	c ± 0,10	16,75	a ± 0,14	16,99	a ± 0,25	9,96	b ± 0,44
Total PUFAs n-3	5,83	a ± 0,19	5,84	a ± 0,04	46,33	b ± 0,68	10,67	a ± 0,01	11,40	b ± 0,61	17,32	c ± 0,03
Relação n-6/n-3	9,10	a ± 0,03	9,23	a ± 0,26	0,31	b ± 0,00	1,57	a ± 0,01	1,49	a ± 0,08	0,58	b ± 0,02
Total EFA	59,08	a ± 0,25	58,55	b ± 0,16	60,56	c ± 0,72	0,88	a ± 0,08	0,96	b ± 0,04	1,18	c ± 0,14
Total LC-PUFAs	0,55	a ± 0,07	0,44	b ± 0,04	0,24	c ± 0,06	26,69	a ± 0,22	27,56	b ± 0,41	26,15	c ± 0,33
Total SFA	16,70	a ± 0,22	17,35	b ± 0,22	15,11	c ± 0,89	49,82	a ± 0,26	49,50	b ± 0,02	49,39	ab ± 0,96
Total MUFAS	22,90	a ± 0,22	22,76	a ± 0,09	23,43	b ± 0,23	20,58	a ± 0,50	19,71	b ± 0,52	19,48	c ± 0,27
Total PUFAS	59,29	a ± 0,25	58,75	b ± 0,16	60,70	c ± 0,75	0,93	a ± 0,09	1,03	b ± 0,05	1,25	c ± 0,15

Valores expressos em médias ± erro padrão da média. GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.. AA: Ácido Graxo Araquidônico; EPA: Ácido Graxo Eicosapentaenóico; DHA: Ácido Graxo Docosahexaenóico, PUFA: Ácidos Graxos Poliinsaturados; LC-PUFAS: Ácido Graxo Poliinsaturado de Cadeia Longa; SFA: Ácido Graxo Saturado; MUFA: Ácido Graxo Monoinsaturado. ND: Não determinado.

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

Artigo 2 - Gráfico 3



GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.

* Significa diferença estatística com $p < 0,05$ entre GC e GL

Artigo 2 - Tabela 4 - Médias do tempo de latência no teste de Memória de Referência Espacial nos dias de treino e de teste

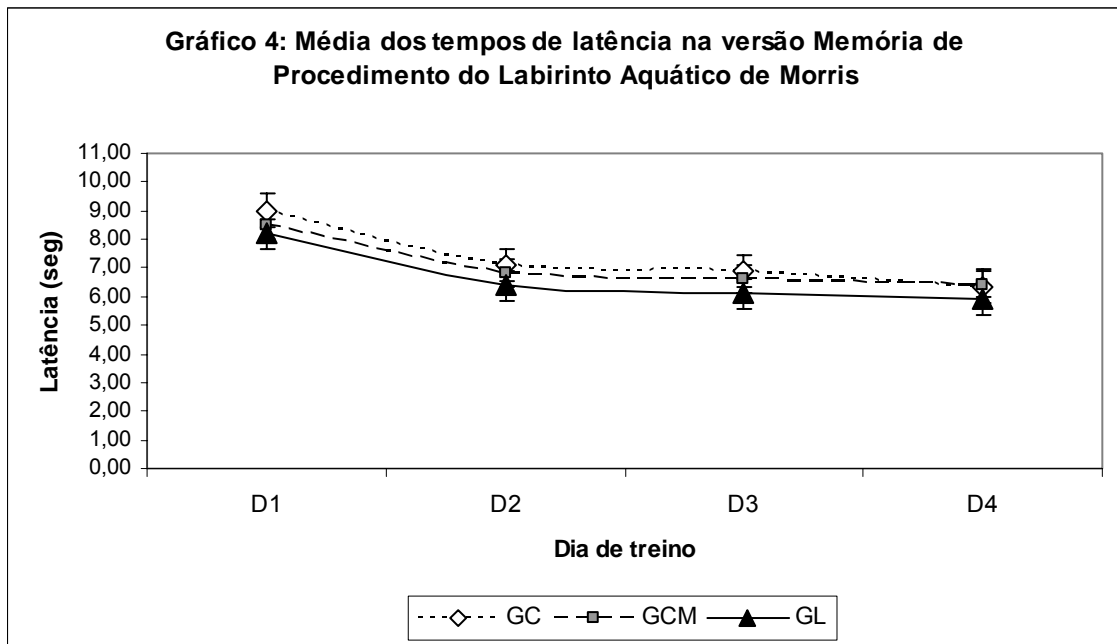
	GC		GCM		GL	
	MÉDIA (seg)	EPM	MÉDIA (seg)	EPM	MÉDIA (seg)	EPM
Treino	21,29 a	1,70	25,24 a	7,97	16,46 b	3,57
Teste	12,93 a	2,00	20,25 b	4,20	9,46 c	1,22

GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.

D: Dia de treino; EPM: Erro Padrão da Média

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa com $p < 0,05$

Artigo 2 - Gráfico 4



GC: Grupo Controle; GCM: Grupo Controle Modificado; GL: Grupo Linhaça.
D: Dia de treino; EPM: Erro Padrão da Média
Não houve diferença estatística entre os grupos

Artigo 2 - Tabela 5: Correlação entre os percentuais dos ácidos graxos AA e DHA nos lipídeos totais dos cérebros dos filhotes com o desempenho nas versões MO, MRE e MP do Labirinto Aquático de Morris.

CORRELAÇÃO	GC		GCM		GL	
	r_s	<i>P</i>	r_s	<i>p</i>	r_s	<i>P</i>
AA X MO	0,878 *	0,021	0,886 *	0,019	0,429	0,397
DHA X MO	0,600	0,208	-0,518	0,292	-0,943 **	0,005
AA X MRE	-0,405	0,426	-0,543	0,266	0,600	0,208
DHA X MRE	-0,783	0,015	-0,899 *	0,015	-0,941 **	0,005
AA X MP	0,657	0,156	0,543	0,266	0,771	0,072
DHA X MP	-0,880 *	0,021	-0,899 *	0,015	-0,986 **	0,001

MO: Versão Memória Operacional; MRE: Versão Memória de Referência Espacial; MP: Versão Memória de Procedimento

r_s : Coeficiente de correlação de Spearman rho.

* significância com $p < 0,05$

** significância com $p < 0,01$

7. CONCLUSÃO

O ácido α -linolênico (ALA, 18:3n-3) presente na linhaça tem uma bioconversão eficiente para DHA (22:6n-3) em roedores, sendo secretado de forma substancial pelo leite materno. Desta maneira, a semente de linhaça pode constituir uma boa fonte suplementar de AG n-3 de baixo custo. No entanto é necessária a observação da relação n-6/n-3 no intuito de evitar a concorrência enzimática entre o ácido linoléico (LA, 18:2n-6) e ácido α -linolênico (ALA, 18:3n-3) com conseqüente comprometimento na síntese de ácido araquidônico (AA 20:4n-6) e suas implicações clínicas como a redução da fertilidade e interferência no tempo gestacional como encontrados no presente estudo.

O consumo de linhaça pelas fêmeas proporcionou maior incorporação de DHA, (22:6n-3) e menor de AA (20:4n-6) no cérebro dos filhotes. Essa incorporação se refletiu em melhor desempenho cognitivo nos testes do Labirinto Aquático, no entanto interferiu na síntese de AA provocando déficit de crescimento nas crias do GL., de forma que a suplementação deve ser feita com cautela no período perinatal observando-se também as fontes de ácido linoléico (LA, 18:2n-6).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.1 OBRAS CITADAS

AGRANOFF, B.W., Learning and memory. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. 6. ed. Lippincott-Raven Publishers, p. 1027-52, 1998.

AHMED, Z.S., Physico-chemical, structural and sensory quality of cornbased flax-snack. *Nahrung-Food*, 43, 253–258. 1999.

ALMEIDA, S.S., DANTAS, L.H., DYE, L., NUNES, M.L., PRASAD, C., ROCHA, J.B., WAINWRIGHT, P., ZAIA, C.T., GUEDES, R.C., Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutritional. Neurosciences*, 5(5), 311-20, 2002.

AMAROWICZ, R., WANASUNDARA, U., WANASUNDARA, J., SHAHIDI, F., Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a carotenelinoleate model system. *J. Food Lipids* 1, 111-117, 1993.

AMAROWICZ, R., PEGGB R.B., RAHIMI-MOGHADDAM C.P., BARLD B., WEILC J.A., Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14. ed. Arlington, 1141 p. 1984.

ASSUMPÇÃO, R.P., SANTOS, F.D., BARRETO, G.F., ANDRADE, P.M.M., TAVARES DO CARMO, M.G., Effect of variation of trans fatty acid in lactating rat's diet on the lipoprotein lipase activity in mammary gland, liver, and adipose tissue. *Nutrition*, 20, 806 -811, 2004.

AU LOIS, N.C., NIQUET, J., BEM-ARI, Y., REPRESA, A., A cellular plasticity. In: *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 387-96, 1997.

BADDELEY, A.D., HITCH, G.J., Working memory. In: *The psychology of learning and motivation*, Edit by Bower, G. Academic Press, New York, 47-90, 1974.

BADDELEY, A.D., The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in Cognitive Science*, 4, 417-423, 2000.

BENES, F.M., The development of prefrontal cortex: the maturation of neurotransmitter systems and their interactions. In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, Edited by Nelson, C.A., MIT Press, London, p 79-92, 2001.

BENNETT, M., The flaxseed revolution: nature's source of omega-3, lignins and fiber. Califórnia, Optimal Healthspan Publications, 1998.

BIRCH, E.E., HOFFMAN, D.R., CASTAÑEDA, Y.S., FAWCETT, S.L., BIRCH, G.D., UAUY, R.D., A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 570-80, 2002.

BOURGEOIS, J.P., Synaptogenesis in the neocortex of the newborn: the ultimate frontier for individuation? In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, Edited by Nelson, C.A., MIT Press, London, p. 23-34, 2001.

BURT, A.M., O sistema límbico. In: ____ *Neuroanatomia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap 22, p 384-399. 2001.

CALDER, P.C., Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.*, 61 (3), 345-358, 2002.

CALDERON, F., KIM, H.Y., Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons, *J. Neurochem*, 90, 979-988, 2004.

CALLEGARO, D., GOLDBAUM, M., MORAIS, L., TILBERY, C.P., MOREIRA, M.A., GABBAI, A.A., SCAFF, M., The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Neurologica Scandinavica* 104(4), 208-13, 2001.

CAMMAROTA, M., Um estudio neuroquimico sobre la consolidacion de memórias. Buenos Aires, 1998. Trabajo de Tesis para optar al Titulo de Doctor - Universidad de Buenos Aires - 104p. 1998.

CAMPBELL, J. A., Method for determination of PER & NPR. In: *ESTADOS UNIDOS. National Academy of sciences. National Research Council. Food and Nutrition Board* – Evaluation of protein quality. Whashington, p. 31-32, 1963.

CARLSON S.E., FORD A.J., WERKMAN S.H., PEEPLES J.M., KOO W.W., Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Pediatr Res.*, 39, 882-888, 1996.

CATÂNIA, A.C., Aprendizagem e comportamento. In: _____ *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição*. Artes Médicas, 4. ed., São Paulo, 21-31, 1998.

CHARDIGNY, J.M., BRETILLON, L., SEBEDIO, J.L., New insights in health effects of trans alpha linolenic acid isomers in humans. *Eur J Lipid Sci Technol*, 103(7), 478-82, 2001.

CHOO, W.S., BIRCH, J., DUFOUR, J.D., Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 202-211, 2007.

COTMAN, C.W. Axonal sprouting. In: *Basic neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects*. 6. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 589-612, 1998.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J., *Entendendo a Gordura. Os Ácidos Graxos*. São Paulo, Manole, 1 ed., 2002.

DAS, U.N., FAMS, M.D., Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Growth and Development of the Brain and Memory, *Nutrition*, 19, 62-65, 2003.

DOBBING, J., Vulnerable periods in developing brain. In: *Applied Neurochemistry*. Edited by In: Davidson, N.A., Dobbing, J., London, Oxford Blackwell Scientific Publications, 287-316, 1968.

EDMOND, J.; HIGA, T.A.; KORSACK, R. A., BERGNER, E.A., LEE, W.N., Fatty acid transport and utilization for the developing brain. *J. Neurochem.* 70, 1227-1234, 1998.

EILANDER, A., HUNDSCHIED, D.C., OSENDARP, S.J., TRANSLER, C., ZOCK, P.L., Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: A review of human studies. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76, 189–203, 2007.

FAW, B., Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. *Consciousness and Cognition*, 12, 83-139, 2003.

FERNSTROM, J.D., Can nutrient supplements modify brain function? *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (suppl.), 1669S-75S. 2000.

GALLER, J.R., SHUMSKY, J.S., MORGANE, P.J., Malnutrition and brain development. *Nutrition in Pediatrics*, 2. ed., cap. 14, p.1-55, 1995.

GENIUS, S.J., SCHWALFENBERG, G.K., Time for an oil check: the role of essential omega-3 fatty acids in maternal and pediatric health. *J Perinatol.*, 26, 359-365, 2006.

GEORGIEFF, MK; INNIS, S.M. Controversial nutrients that potentially affect preterm neurodevelopment: Essential fatty acids and Iron. *Pediatric Research*, 57(5):99-103, 2005.

GEORGIEFF, M.K., Early Brain Growth: Macronutrients for the Developing Brain. *NeoReviews*, 7(7), 323-334, 2006.

GEORGIEFF, M.K., RAO, R., The Role of Nutrition in Cognitive Development. In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*. Edited by Nelson, C.A. ed. MIT Press, London, 2001.

GROENER J.E., VAN RAMSHORST E.M. ,KATAN M.B., MENSINK R.P., VAN TOL A., Diet-induced alteration in the activity of plasma lipid transfer protein in normolipidemic human subjects, *Atherosclerosis*. 87(2-3), 221-6, 1991.

HASHIMOTO, M., HOSSAIN, S., SHIMADA, T., Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats, *J Neurochem*, 81, 1084-1091, 2002.

HEIM, T.E., ROCHSTROH, B., Neural plasticity and development. In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, Edited by Nelson, C.A., MIT Press, London, p 191-202, 2001.

INNIS, S.M., The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developin brain. *Developmental Neuroscience*, 22, 474-480, 2000.

INNIS, S.M., Human milk: maternal dietary lipids and infant development, *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 397-404, 2007.

IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B., MEDINA, J.H., Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats, *Behavioral and Neural Biology*, 58,16-26. 1992.

IZQUIERDO, I., Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology* ,51, 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I., *Memória*. Porto Alegre, Artmed, 2002.

KÄHKONEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., HEINONEN, M., Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, *J. Agric. Food Chem*, 47, 3954-3962, 1999.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. Princípios da neurociência. São Paulo, Manole, p. 5 - 18 ; 1227-1279, 2003.

KANDEL, E.R., SQUIRE, L.S., Neuroscience: Breaking down barriers in the study of brain and mind. *Science*, 290, 1113-20. 2000.

KEEN, C. L., LONNERDAL, B., CLEGG, M., HURLEY, L.S., Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *Journal of Nutrition*, 11, 226-230, 1981.

KESSELS, R.P.C., HAAN, F.S., Implicit Learning in Memory Rehabilitation: A Meta-Analysis on Errorless Learning and Vanishing Cues Methods. 25(6), 805 - 814,2003.

KOLB B., CIOE J., Recovery from early cortical damage in rats, VIII. Earlier may be worse: behavioural dysfunction and abnormal cerebral morphogenesis following perinatal frontal cortical lesions in the rat. *Neuropharmacology*, 39(5), 756-64, 2000.

KOLETZKO, B., CETIN, I., BRENNAN, J.T., Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. Consensus Statement, *British Journal of Nutrition*, 98, 873-877, 2007.

KRIS-ETHERTON, P.M., TAYLOR, D.S., YU-POTH, S., HUTH, P. MORIARTY, K.FICHELL, V., Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr*. 71 (1 suppl), 179S-88S, 2000.

LAPILLONNE, A., CARLSON, S.E., Polyunsaturated fatty acids and infant growth. *Lipids* , 36(9), 901-911, 2001.

LAURITZEN, L., HANSEN, H.S., JØRGENSEN, M.H., MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progr. Lipid Res.*, 40, 1-94, 2001.

LENT, R., *Cem Bilhões de Neurônios*. São Paulo, Atheneu. p 587-617, 2001.

LEPAGE, G., ROY, C.C., Direct transesterification of classes of lipid in one-step reaction. *Journal Lipid Research*, 27, 114-20, 1987.

LUCAS, A., GIBBS, J.A.H., LYSTER, R.L.J., BAUM, J.D., Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British Medical Journal*.1, 1018-20, 1978.

MARBOIS, B.N., AJIE, H.O., KORSAK, R.A., SENSHARMA, D. K., EDMOND, J.L., The origin of palmitic acid in brain of the developing rat. *Lipids*, 27, 587-592, 1992.

MATTHAUS, B., Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444-3452, 2002.

MCGAUGH, J.L., Memory: a century of consolidation. *Science*, 287, 248-51. 2000.

MCGAUGH, J.L., Time-dependent process in memory storage. *Science* 153, 1351-58. 1996.

MCMAHON, D.B., BARRIONUEVO, G., Short and long-term plasticity of the perforant path synapse in hippocampal area CA3. *Journal Neurophysiology*, 88(1) 528-33, 2002.

MENDEZ, M.H.M.; DERIVI, S.C.N.; RODRIGUES, M.C.R.; FERNANDES, M.L.; MACHADO, R.L.D. Método de fibras detergente neutro, modificado para amostras ricas em amido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 5(2),123-131,1985.

MENSKIN RP, KATAN MB: Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women, *Atherosclerosis*, 96, 109-118, 1992.

MORGADO, I., Aprendizaje y Memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. In: *Neuroanatomía y fisiología de las funciones cerebrales*. Madrid, Madrilena, cap. 32, p. 827-73, 1999.

MORGANE, P.J., AUSTIN-LAFRANCE, R., BRONZINO, J., TONKISS, J., DÍAZCINTRA, S., CINTRA, L., KEMPER, T., GALLER, J. R., Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17, 91-128, 1993.

MORGANE, P.J., MOKLER, D.J., GALLER, J.R., Effects of Prenatal Protein Malnutrition on the Hippocampal Formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 471-483, 2002.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD P.; RAWLINS, J.N.P., O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683. 1982.

MORRIS, R.G.M., Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learning and motivation*, 12, 239-260, 1981.

NELSON, D.L., COX, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4.ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2005.

NEURINGER M., ANDERSON G. J., CONNOR W. V., The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Ann Rev Nutr*, 8, 517-544. 1988.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS, Nordic Nutrition recommendations. *Scand J Nutr.*, 40(4), 161-165, 1996.

O'KEEFE, J., NADEL, L., *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press, 1978.

OLTON, D. S., BECKER, J. T., HANDELMANN, G. E., Hippocampus, Space and Memory. *Behav. Brain Sci.*, 2, 313-322, 1979.

OOMAH, B.D., MAZZA, G., Flaxseed proteins. A review. *Food Chemistry*, 48,109-114, 1993.

OOMAH, B.D., Flaxseed as a functional food source. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 81, 889-894, 2001.

QUILLFELDT, J.A., O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Rio Grande do Sul, 1994. Tese de Doutorado - Departamento de Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. 1994.

RAMÓN Y CAJAL, S., Histologie du systeme nerveux de l'homme et dès vertebrés, Paris, Maloine, 1911.

REEVES P.G., NIELSEN FH, FAHEY G.C., American Institute of Nutrition (AIN). Purified Rodent Diets. *Jour Nutr.*, 123, 1939-51, 1993.

REINIS, J., GOLDMAN. M., The Prenatal and early postnatal development of brain function. In: *The Development of the Brain: Biological and Functional Functional Perspectives*. Edited by Thomas, C.C., Springfield, IL, 1980.

RIVERS, J.P.W., FRANKEL, T.L., Essential Fatty acid deficiency, *British Medical Bulletin*, 37(1), 59-64, 2001.

RIVERS, J.P.W., FRANKEL, T.L., The production of 5,8,11 eicosatrienoic acid (20:3n-9) in the essential fatty acid deficient cat. *Proc. Nutr. Soc.* 40: 117 (abs.). 1981.

RUDICK, R.A., GOODMAN, A., HERNDON, R.M., PANITCH, H.S., Selecting relapsing remitting multiple sclerosis patients for treatment: the case for early treatment. *Journal of Neuroimmunology*, 98(1), 22-8, 1999.

SALIBA, E., MARRET, S., Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors. *Seminars in Neonatology*, 6(2), 121-133, 2001.

SAMPAIO, R.C., TRUWIT, C.I., Myelination in the developing human brain. In: *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, Edited by: Nelson, C.A., MIT Press. London, p 35-44, 2001.

SCIENTIFIC REVIEW COMMITTEE. Nutrition recommendations. Ottawa: Canadian Government Publishing Center, Supply and Services. Canadá, 1990.

SERES, L. Morphological changes of the human hippocampal formation from midgestation to early childhood. In: Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience, Edited by Nelson, C.A., MIT Press, London, p 45-58, 2001.

SHUKLA, V.K.S., WANASUNDARA, P.K.J.P.D., SHAHIDI, F., Natural antioxidants from oilseeds. In: *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. Edited by Shadhi, F., Champaign, AOCS Press, p.97-132, 1997.

SCHAEFER, E.J., Lipoproteins, nutrition and heart disease. *Am J Clin Nutr*, 75(2):191-212., 2002

SIDDIQUI, R.A., SHAIKH, S.R., SECH, L.A., YOUNT, H.R., STILLWELL, W., ZALOGA, G.P., Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem.*, 4 (8), 859-71, 2004.

SIMOPOULOS, A.P., Symposium: role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA: human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult. Sci.*, 79, 961-970, 2000.

SIMOPOULOS, A.P., Omega 3 fatty acids in health and disease and its growth and development. *Am J Clin Nutr*, 54, 438-63, 1991.

SIMOPOULOS, A.P., LEAF, A., SALEM, J.N., Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann. Nutr. Metab.*, 43(3),127-130, 1999.

SIMOPOULOS, A.P., LEAF A., SALEM, J.N., Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 3, 119-121. 2006.

SOUZA, M.M., Memórias de curta e longa duração: mecanismos independentes. Rio Grande do Sul, 2001. Tese de Doutorado - Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

SQUIRE L.S., KANDEL E.R., *Memory: From mind to molecules*. New York, Henry Holt & Co, New York, 2000.

SUBLETTE, M., RUSS, M., SMITH, G., Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. *Bipolar Disord*, 6, 95-105, 2004.

THOMPSON, L.U., SEIDL, M.M., RICKARD S.E., ORCHESON, L.J., FONG, H.H.S., Antitumorigenic effect of mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr. Câncer*, 26: 159–165. 1996.

TOMAZ, C., Amnésia. In: *Neurobiologia das doenças mentais*. Editado por Graeff, B.G. 5. ed., Lemos, São Paulo, 1999.

TURATTI, J.M., Lino, uma oleaginosa con historia. *Aceites & Grasas*, 38,59-72, 2000.

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

UAUY, R; BIRCH D.G., BIRCH, E.E., Effects of dietary ω -3 fatty acid on retinal function of very low birth weight neonates. *Pediatric Research*, 28:485:92, 1990.

UAUY, R., CASTILLO, C., Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *J Nutr*. 133, 2962-72, 2003.

UAUY, R., TREEN, M., HOFFMAN, D.R., Essential fatty acid metabolism and requirements during development. *Semin. Perinatol*. 13(2), 118-30. 1989.

VOSS, A., REINHART, M., SANKARAPPA, S. SPRECHER, H., The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4- desaturase. *J. Biol. Chem*, 266(30), 19995-20000, 1991.

WAITZBERG, D.L., Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

WALKER C.D., Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29(8), 1249-63, 2005.

WEBB, S.J., MONK, C.S., NELSON, C.A., Mechanisms of postnatal neurobiological development: implications for human development. *Dev. Neuropsychol*, 19,147-71, 2001.

WIESENFELD P.W., BABU, U.S., COLLINS T. F.X., SPRANDO, R., O'DONNELL, M.W., FLYNN T.J., BLACK, T., OLEJNIK, N., Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 841-855. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Codex Standard for Infant Formula nº 72, 1981 revisão 2007.

YOUNG, P.A., YOUNG, P.H., O sistema límbico: amnésia anterógrada e comportamento inadequado. In: ___Bases da Neuroanatomia Clínica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1998.

ZHENG, Y., WEISENBORN, D.P., TOSTENSON, K., KANGAS, N., Energy analysis in the screw pressing of whole and dehulled flaxseed. *Journal of Food Engineering*, 66,193-202, 2005.

7.2 OBRAS CONSULTADAS:

ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, *Guide for authors*, disponível em http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503299/authorinstructions, acessado em 20/10/07

BAYLEY, N., Bayley Scales of Infant Development. San Antonio, Psychological Corp. 1993.

BEARD, J. L., Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*, 131:568S-80S, 2001.

BIRCH E.E., BIRCH D.G., HOFFMAN D.R., UAUY R., Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 33, 3242–3253, 1992.

Sezione 1.01

BIRCH E.E., GARFIELD S., HOFFMAN D.R., UAUY R., BIRCH D.G., A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Child Neurol*, 42, 174–181, 2000.

BRAZIELAS, M.L.M., *Normas para apresentação de trabalhos de conclusão de curso, monografia, dissertação e tese na Universidade*. Rio de Janeiro, Ed. Gama Filho, 2005.

CARLSON, N.R. *Physiology of Behavior*. Boston: Allyn & Bacon. 2000.

CARLSON S.E., WERKMAN S.H., RHODES P.G., TOLLEY E.A., Visual-acuity development in healthy, preterm infants: effect of marine-oil supplementation. *Am J Clin Nutr.*, 58, 35-42, 1993.

CARLSON S.E., WERKMAN S.H., PEEPLES J.M., Arachidonic acid status correlates with first year growth of preterm infants. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 1073–1077, 1993.

CHUDLER, E.H., Neurosciences for Kids. Disponível em <http://faculty.washington.edu/chudler/neurok.html>, acessado em 20/11/2007.

FALDELLA G., BOVONI M., ALESSANDRONI R., Visual evoked potentials and dietary long chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants. *Arch Dis Child.*, 75, 108-112, 1996.

GREINER, R.S., MORIGUCHI, T., SLOTNICK, B.M., HUTTON, A., SALEM Jr. N., Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats, *Physiol. Behav.*, 72, 379–385, 2001.

HOLMAN, R.T., **The** Slow Discovery of the Importance of ω 3 Essential Fatty Acids in Human Health. *The Journal of Nutrition*, 128 (2), 427S-433S, **1998**.

JOHNSTON, M.V. Clinical disorders of brain plasticity. *Brain & Develop*, 28, 142-51, 2003.

KANDEL, E.R., SHWARTZ J. H., JESSEL T.M. Aprendizado e Memória. *In: Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda., p. 519 -39, 2003.

MILANI-COMPARETTI, A. Pattern Analysis of Normal and Abnormal Development: The Fetus, The Newborn, The Child. *In: Slaton DS Chapel Hill, NC: University of North Carolina: ed. Development of Movement in Infancy.*: 1-37, 1981.

MAIER, N.R.F., SCHINEIRLA, T.C., Principles of Animal Psychology. New York, Dover Publications, 1964.

Sezione 1.02

MORLEY, R., LUCAS, A., Influence of early diet on outcome in preterm infants. *Acta Paediatr*, Suppl 405, 123–126, 1994.

NELSON, C.A., Neural plasticity and human development. *Curr Dir Psychol Sci*, 8, 42-5, 1999.

NUTRITIONAL NEUROSCIENCES, *Instruction for authors*, disponível em http://www.informaworld.com/smpp/title~db=all~content=t713645878~tab=submit~mode=paper_submission_instructions, acessado em 07/11/07

ROCANGLILOLO, M., GARRIDO M., WALTER, T., PEIRANO, P., LOZOFF, B., Evidence of altered central nervous system development in young iron-deficient infants: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am J Clin Nutr*, 68, 683-90, 1998.

SASTE, M.D., CARVER, J.D., STOCKARD, J.E., BENFORD, V.J., CHEN, L.T., PHELPS, C.P., Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups, *J. Nutr.* ,128, 740–743. 1998.

SQUIRE L. S., KANDEL, E. R., *Memory: From mind to molecules*. Scientific American Library, New York, 2000.

TURATTI, J.M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. *Óleos e Grãos* 56, 20-27, 2000.

UAUY, R., HOFFMAN, D.R., BIRCH, E.E., BIRCH, D.G., JAMESON, D.M., TYSON, J.. Safety and efficacy of omega-3 fatty acids in the nutrition of very low birth weight infants: soy oil and marine oil supplementation of formula. *J Pediatr.*, 124, 612–620, 1994.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, *Apresentação de trabalhos monográficos de conclusão de curso*. Editado por: Abreu, E.S.; Teixeira, J.C.A., Niterói. EDUFF, 2005.

WAINWRIGHT, P.E., XING, H., CGIRARD, T., PARKER, L., WARD, G.R., Effects of dietary n-3 fatty acid deficiency on Morris water-maze performance and amphetamine induced conditioned place preference in rats, *Nutr. Neurosci.* 1, 281–293, 1998.

WAINWRIGHT, P.E., Do essential fatty acids play a role in brain and behavioral development?, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 193–205, 1992

WAINWRIGHT, P.E., Nutrition and behavior: the role of n-3 fatty acids in cognitive function, *Br. J. Nutr.*, 83, 337–339, 2000.

WAINWRIGHT, P.E., Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms, *Proc. Nutr. Soc.*, 61, 61–69, 2002.

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