

KÁTIA MARIA MARQUES GOUVEIA

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA CRÔNICA EM  
ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS SOBRE A  
EXPRESSÃO DO RITMO CIRCADIANO DA  
ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Psicobiologia da Universidade Federal  
do Rio Grande do Norte como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Doutor em Psicobiologia

NATAL  
2012

KÁTIA MARIA MARQUES GOUVEIA

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA CRÔNICA EM ÁCIDOS  
GRAXOS ESSENCIAIS SOBRE A EXPRESSÃO DO RITMO  
CIRCADIANO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Psicobiologia da Universidade Federal  
do Rio Grande do Norte como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Psicobiologia -  
área Psicologia Fisiológica

Orientadora: Miriam Stela M O Costa

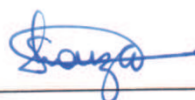
NATAL  
2012

Título: Efeitos da deficiência crônica em ácidos graxos essenciais sobre a expressão do ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos

Autor: Kátia Maria Marques Gouveia

Data da defesa: 30 de março de 2012

Banca Examinadora:



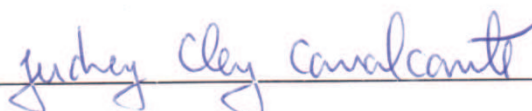
---

Profª. Dra. Sandra Lopes de Souza  
Universidade Federal de Pernambuco



---

Prof. Dr. John Fontenele Araujo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



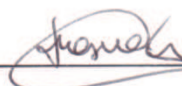
---

Prof. Dr. Judney Cley Cavalcante  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



---

Prof. Dr. Jeferson de Souza Cavalcante  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



---

Profª. Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**Para Filipe,  
Filho querido  
Portador de afeto familiar  
Sua existência é eterno estímulo**

**Para Augusto,  
Marido e companheiro  
Dedicação à família  
Apoio fundamental**

## AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, agradeço a Deus por Vossa eterna bondade que nos permite seguir em frente, mesmo com todos os obstáculos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, aos Departamentos de Fisiologia e Morfologia da UFRN e ao Departamento de Fisiologia da UFPE.

Ao meu filho Filipe por me motivar sempre, independente do resultado alcançado.

À minha mãe e ao meu pai, pelo apoio incondicional que sempre me forneceram.

Ao meu marido Augusto pelo companheirismo.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Miriam Stela, pelo suporte científico e orientação ao longo deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Belmira Lara pelo conhecimento científico e pela oportunidade de trabalharmos juntas mais uma vez.

Aos professores John Fontenele Araujo e Carolina Virgínia Macêdo de Azevedo pela contribuição científica.

A todos os professores da PPG em Psicobiologia que me acompanharam ao longo das disciplinas.

A Ana Cláudia, pelo apoio na organização das atividades acadêmicas.

Ao Prof<sup>o</sup>. Ruthnaldo Lima pela colaboração na análise dos resultados.

Aos professores Jeferson de Souza Cavalcante, Judney Cavalcante e Expedito Silva pelo convívio e pela experiência compartilhada no Labneuro e no curso.

Aos colegas Francisco Gilberto, Fausto Pierdoná Guzen, Joacil Germano Soares, Sebastião Franco, Breno Tércio e Leandro Freitas, pela experiência profissional.

A Miriam Regina pela excelente colaboração técnica.

A José Flávio Coutinho, pela assistência veterinária.

A Ana Tertuliano, Ana Carla, Adriana, Alane, André Pontes, José Rodolfo, Janaína  
Siqueira, Rayane, Renata, Rovená, Twyla.

A todos os alunos da iniciação científica do Labneuro.

Aos colegas do Laboratório de Neurofisiologia da UFPE, especialmente ao  
professor Valdir Luna pela colaboração neste trabalho.

Ao prof. Rubem Guedes pela contribuição à pesquisa.

A Priscila Passos pela colaboração e convívio profissional.

A Zenira Costa Xavier pelo apoio técnico no laboratório de Neurofisiologia  
da UFPE, nos cuidados com os animais e no preparo da ração.

Pelo incentivo dos colegas da UFAL, especialmente da Prof<sup>a</sup>. Theresinha Calado.

Pelo apoio financeiro da FAPEAL, CAPES, CNPq e FAPERN.

## SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nutrição, dieta e sistema nervoso	1
1.2. Importância dos ácidos graxos essenciais no desenvolvimento do organismo e do sistema nervoso	3
1.3. Influência da carência em ácidos graxos essenciais sobre a neurotransmissão	10
1.4. Repercussões da carência em ácidos graxos essenciais em patologias neurodegenerativas e distúrbios psiquiátricos	12
1.5. O sistema de temporização circadiana em mamíferos	14
1.6. Ácidos graxos essenciais e os ritmos circadianos	19
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES DO ESTUDO	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA	24
4.1. Animais	24
4.2. Formação dos grupos	24
4.3. Composição das dietas	25
4.4. Análise bioquímica das dietas	27
4.5. Registro das respostas circadianas motoras	28
4.6. Análise dos pesos encefálico e corpóreo	30
4.7. Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Artigo: <i>Dietary essential fatty acid restriction associated to high levels of saturated fatty acids affects circadian parameters of the motor activity in rats</i>	32
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	83

## RESUMO

Considerando a importância dos ritmos circadianos para a sobrevivência dos organismos e a vulnerabilidade do sistema nervoso a mudanças ambientais e nutricionais, desenvolvemos esse trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos de uma dieta deficiente em ácidos graxos essenciais, ômega-3 e ômega-6, em ratos expostos a diferentes regimes de iluminação sobre a ritmicidade circadiana. Ratos Wistar com idades pós-natais P21 a P125 foram alimentados em regime *ad libitum* com dietas controle e deficiente em AGEs, sendo mantidos em ambiente com temperatura média de  $21 \pm 2$  °C e iluminação (com iluminância de 150 lux durante a fase de claro e 1 lux durante a fase de escuro), em esquemas de ciclo claro-escuro de 24 horas (CE 12:12), sendo posteriormente submetidos a atraso de fase e ao escuro constante, com a atividade motora registrada continuamente, monitorada por sensor infravermelho sensível ao movimento do animal. A análise das características do ritmo e plotagem dos gráficos (actogramas e periodogramas) foi realizada através do programa “El Temps®”. Os animais jovens tratados com a dieta experimental (dieta à base de óleo de coco) exibiram atividade motora reduzida durante a fase de claro ( $p < 0,01$ ) e utilizaram um tempo maior para os ratos resincronizarem após o atraso de fase de 6 h no ciclo claro-escuro ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos controles alimentados com dieta à base de soja. Já os animais adultos tratados com a dieta experimental, a partir do P84, mostraram-se incapazes de resincronizar a atividade motora para o ciclo CE, apresentando um aumento no período ( $1478 \pm 9.67$  min,  $p < 0,01$ ) em relação aos controle ( $1442 \pm 1.3$  min). A partir do P105, em condições de livre-curso, o período é predominantemente maior no grupo experimental ( $p < 0,05$ ). Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que a organização funcional do sistema circadiano pode ser modificada pela composição



lipídica da dieta, incluindo ácidos graxos saturados, e salienta um papel modulador dos ácidos graxos poliinsaturados na sincronização induzida pela luz no sistema circadiano.

***Palavras-chave:*** Ácidos graxos essenciais, núcleo supraquiasmático, ritmos circadianos, sincronização.

## ABSTRACT

Considering the importance of circadian rhythms to the survival of organisms and the vulnerability of the nervous system to environmental and nutrition changes, this study was developed aiming to evaluate the effects of a diet deficient in essential fatty acids, omega-3 and omega-6, in rats exposed to different lighting regimes on the circadian rhythmicity. Wistar rats from postnatal ages P21 to P125 were fed control or deficient in EFAs diets in *ad libitum* settings, being kept at controlled temperature (average  $21 \pm 2$  ° C) and lighting (with luminance of 150 lux during the and 1 lux of light during the dark) in a light-dark cycle of 24 hours (LD 12:12) and subsequently subjected to phase delay and constant darkness, where their motor activity was recorded continuously monitored by infrared sensors sensitive to movement. The analysis of the pace and plotting of graphs (actograms and periodograms) was performed using the program "El Temps®". One of the observations found in the treatment with the experimental diet was the capability to reduce the motor activity during the light phase ( $p < 0.01$ ) and the longer time required by the animal to resynchronize after the 6 h phase delay of the light-dark cycle 6 h dark ( $p < 0.05$ ) in young rats. Adult animals treated with the experimental diet were, after P84, unable to resynchronize the motor activity for the light-dark cycle, therefore presenting an increase in the period ( $1478 \pm 9.67$  min,  $p < 0.01$ ) when compared to control ( $1442 \pm 1.3$  min). In free running conditions, after P105, there is variation in the period, with predominance towards the experimental group ( $p < 0,05$ ). These results are consistent with the idea that the functional organization of the circadian system can be modified by the lipid composition of the diet, including saturated fatty acids, and outlines a modulating role of polyunsaturated fatty acids in synchronization induced by light in the circadian system.

**Keywords:** Circadian rhythms, essential fatty acids, synchronization, suprachiasmatic nucleus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3V	Terceiro ventrículo
5-HT <sub>2</sub>	Receptor de serotonina
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AA	Ácido araquidônico
AGE	Ácido graxo essencial
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPI-CL	Ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa
ALA	Ácido alfa-linolênico
AVP	Arginina vasopressina
Calb	Calbindina
CALR	Calretinina
CE	Claro/escuro
CT	Circadian Time
cyto c	Citocromo c
DA	Dopamina
DHA	Ácido docosaexaenóico
DM	Dorsomedial
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DPA	Ácid Docosapentaenóico
EE	Escuro constante
ENK	Encefalina
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAS	Fatty acid synthase
FIG	Folheto intergeniculado
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da célula glial
GHT	Geniculo-hypothalamic tract
GRP	Gastrin-releasing peptide
HA	Ácido heptadecanóico
IGL	Intergeniculate leaflet
LA	Ácid linoléico
mENK	Methionine-enkephalin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NPHI	Neurofisina
NPY	Neuropeptídeo Y
NSQ	Núcleo supraquiasmático

OC	Optic chiasm
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PC	Phosphatidylcholine
PHI	Peptídeo histidina-isoleucina
POA	Preoptic area
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
PVT	Núcleo paraventricular talâmico
RHT	Retinohypothalamic tract
RMDR	Remainder
SAMP8	Camundongo mutante com senescência acelerada
SCG	Gânglio cervical superior
SCN	Suprachiasmatic nucleus
SON	Supraoptic nucleus
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
STC	Sistema de temporização circadiana
TAG	Triacylglycerol
TH	Tirosina hidroxilase
TGH	Trato genículo-hipotalâmico
TRH	Trato retino-hipotalâmico
VA	Ácido Vacênico
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VL	Ventrolateral

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática das principais vias do metabolismo dos ácidos graxos. Modificado de de Groot (2003)	4
Figura 2. Dinâmica dos ácidos graxos na membrana celular. Modificado de Hagen et al. (2010)	5
Figura 3. Proporção de ácidos graxos no cérebro humano (Modificado de McNamara e Carlson (2006))	8
Figura 4. Modelo de sistema de temporização circadiana, de acordo com Reuss (2003)	15
Figura 5. Neurotransmissores e outras substâncias neuroativas no NSQ. Modificado de Golombek e Rosenstein (2010)	17
Figura 6. Condições de iluminação ao longo dos 105 dias de registro da atividade motora dos ratos. Dias pós-natais P21 a P125	29

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição das dietas	26
Tabela 2. Análise bioquímica das dietas em percentual do total de ácidos graxos	28
Tabela 3. Valores dos pesos corpóreo e encefálico e relação peso encefálico / corpóreo	30

## LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Documento do Comitê de ética em pesquisa da UFRN	84
Anexo 2. Regulamento do periódico <i>Journal of Biological Rhythms</i>	86
Anexo 3. Documentos da submissão de publicação de manuscrito em colaboração com a UFPE sobre DAGES e sistema dopaminérgico: <i>Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations</i>	88
Anexo 4. Relatório da atividade motora nas condições de claro/escuro, escuro constante e atraso de fase de 6 horas – controle e experimental	94
Anexo 5. Actogramas da atividade motora nas condições de claro/escuro, escuro constante e atraso de fase de 6 horas – controle e experimental	96
Anexo 6. Periodogramas da atividade motora nas condições de claro/escuro, escuro constante e atraso de fase de 6 horas – controle e experimental	102

## **INTRODUÇÃO**

### **1.1. Nutrição, dieta e sistema nervoso**

O desenvolvimento e a organização funcional dos seres vivos dependem, dentre outros fatores, de uma nutrição adequada. A relação entre fatores físicos, biológicos e sociais envolvidos com o estado nutricional traduz o nível de equilíbrio ou desajuste entre esses fatores, refletindo-se em problemas ocasionados por excessos ou carências nutricionais. Diante da importância destas condições, estudos abordando os efeitos de diversos tipos de carência nutricional sobre o sistema nervoso, enfatizando fases precoces do seu desenvolvimento, demonstram alterações morfológicas, neuroquímicas, endócrinas, funcionais e comportamentais, no sentido de entender as consequências, assim como a possibilidade de adaptação do ser vivo a diferentes formas de injúrias (Morgane et al., 1978; Stillwell et al., 2005; Antalis et al., 2006; Chalon, 2006).

A desnutrição, mesmo sendo leve, representa uma agressão ambiental multifatorial, uma vez que é capaz de induzir privação social e intelectual (Morley e Lucas, 1994), estresse emocional, prejuízos para interação mãe-filho (Colombo, 2001a; Otto et al., 2003), e até inibição do crescimento cerebral (Almeida et al., 2002). Entretanto, devem ser considerados os diferentes cronogramas de desenvolvimento e requerimentos metabólicos das diversas regiões cerebrais (Morgane et al., 1978; Almeida et al., 2002), uma vez que efeitos neurais induzidos por má nutrição podem se perpetuar e ser cumulativos sobre várias gerações (Decsi et al., 1996; Chalon, 2006; Levant et al., 2007).



O desenvolvimento do sistema nervoso e a adequada expressão do comportamento dependem de três fatores críticos: 1) hereditariedade; 2) nutrição adequada e 3) complexidade e grau de estimulação ambiental. Interferências nestes fatores podem desencadear uma cadeia de reações capazes de induzir e/ou amplificar erros funcionais (Morgane et al., 1978).

A vulnerabilidade do sistema nervoso a mudanças ambientais ocorre especialmente durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro. Este período em humanos começa no último trimestre de vida fetal e continua até o 3º e 4º anos de vida pós-natal. Em ratos se inicia na gestação e se estende no pós-natal, principalmente ao período de lactação. Durante esse período, processos como neurogênese, gliogênese e mielinização se realizam com intensidade máxima, de forma que sequelas promovidas pela má nutrição nesta fase da vida poderão ou não ser revertidas (Morgane et al., 1978; Guedes et al., 1996; Almeida et al., 2002; Hartvigsen et al., 2004). No entanto, a capacidade potencial do sistema nervoso para se reorganizar mediante insultos, ou seja, a sua plasticidade, deve ser também considerada (Heinemann et al., 2005). O estabelecimento de uma dieta apropriada após um período de má nutrição poderá restaurar injúrias ocorridas, principalmente quando estas não forem tão severas a ponto de induzir efeitos permanentes sobre os processos de desenvolvimento do sistema nervoso (Morgane et al., 1978). Além disso, tem sido demonstrado, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, que o enriquecimento ambiental com estímulos sensoriais e psicomotores durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro pode minimizar muitos dos efeitos induzidos pela má nutrição (Colombo et al., 2001b).

## **1.2. Importância dos ácidos graxos essenciais no desenvolvimento do organismo e do sistema nervoso**

Os lipídios são componentes fundamentais de uma dieta equilibrada, sendo necessários para o desenvolvimento do organismo. O ácido graxo que é obtido obrigatoriamente a partir das fontes alimentares, em vista da incapacidade dos mamíferos de sintetizá-lo, é denominado ácido graxo essencial (AGE). São assim considerados os ácidos graxos poliinsaturados das séries n-3 e n-6, os ácidos alfa-linolênico (18:3, n-3) e o linoléico (18:2, n-6) que produzem as famílias ômega-3 e ômega-6 respectivamente. Para cada família o ácido graxo essencial (AGE) é convertido em ácido graxo poliinsaturado (AGPI) da mesma série através de sucessivas reações realizadas pelas enzimas alongases e dessaturases, cujas atividades levam respectivamente à adição de novos carbonos e de insaturações às cadeias originais (ver Figura 1, de Groot, 2003). Esses AGEs são os precursores dos AGPIs de cadeia longa (AGPI-CL) como os ácidos araquidônico (20:4 n-6; AA), docosahexaenóico (22:6 n-3; DHA) e eicosapentaenóico (20:5 n-3; EPA), os quais entram na composição das membranas celulares e unem-se às moléculas de fósforo, formando os fosfolipídios, os quais desempenham papel fundamental para a manutenção da fluidez e estrutura da membrana.

A quantidade e a qualidade dos AGPIs incorporados à membrana influenciam suas propriedades físicas e funcionais (Bourre et al., 1989; 2006; Birch et al., 1998; Armstrong et al., 2003; Eldho et al., 2003; Innis, 2004; Wollin et al., 2004; Li et al., 2006; Puskas & Kitajak, 2006).

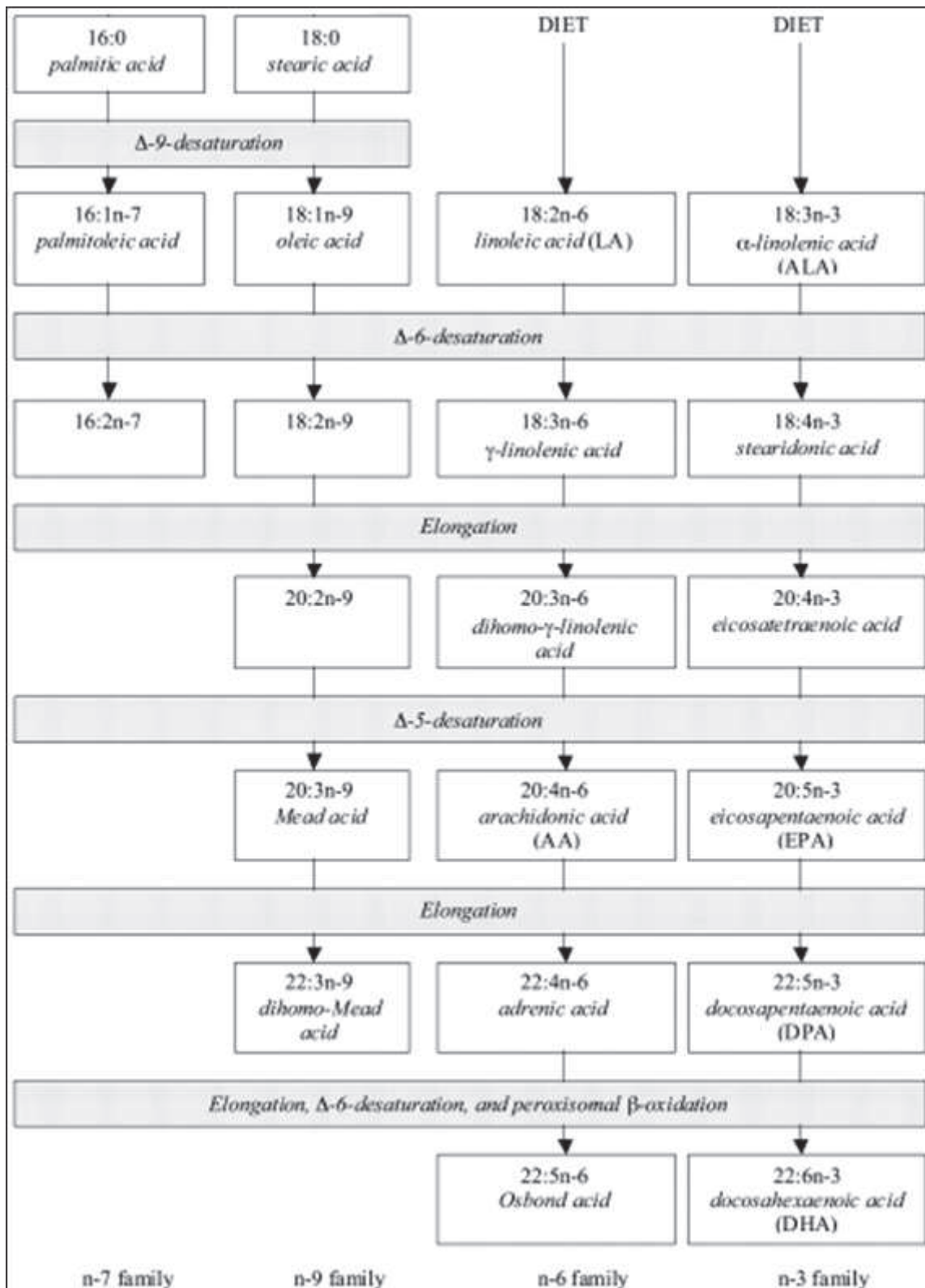


Figura 1. Representação esquemática das principais vias do metabolismo dos ácidos graxos. Modificado de de Groot, 2003.

O suprimento adequado desses ácidos graxos para o feto, a partir da circulação materna e durante o aleitamento, é essencial para o crescimento e desenvolvimento ótimos. Seus precursores, pelo fígado fetal e neonatal, são discutíveis (Innis, 1991; Greiner et al., 2003; Dijck-Brouwer et al., 2005b). Os lipídios encontrados na membrana de neurônios de mamíferos têm perfil de AGPI-CL (Innis, 2000), os quais desempenham um importante papel tanto na estrutura quanto nas funções das células neuronais (Wainwright et al., 1994; Zimmer et al., 2000). Por serem capazes de alterar as características físico-químicas da membrana dos neurônios, os AGPI-CL participam ativamente de processos de sinalização celular (Innis, 2000). Ver na figura 2 as alterações decorrentes da dinâmica de saturações e insaturações na membrana celular (Hagen et al., 2010).

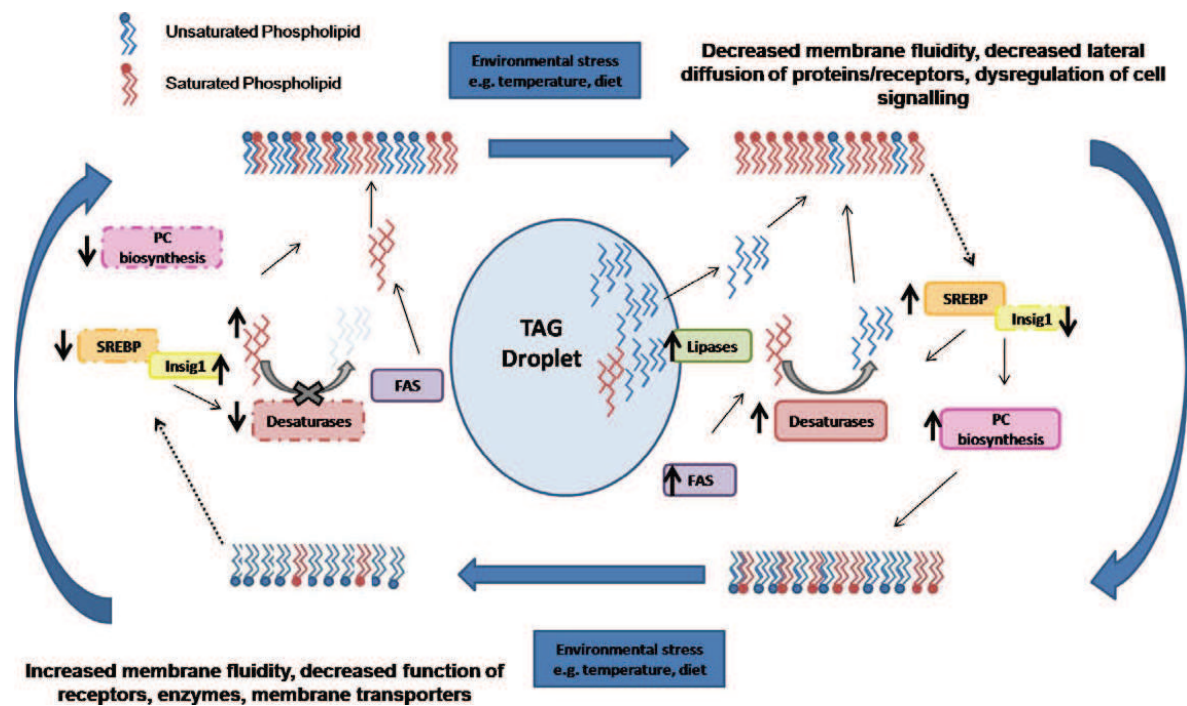


Figura 2. Dinâmica dos ácidos graxos na membrana celular. Modificado de Hagen et al. (2010).

O fato de serem constituintes das membranas celulares torna os AGEs necessários para a função normal de todos os tecidos. Assim é que uma dieta deficiente em AGEs causa alterações na composição das membranas celulares levando ao aparecimento de diversos distúrbios como retardo do crescimento, lesões epiteliais, diminuição da pigmentação da pele, diminuição na taxa metabólica, prejuízo no equilíbrio hídrico, aumento da fragilidade e da permeabilidade da membrana celular, além do aumento da susceptibilidade a infecções (Hansen e Jensen, 1985; Eldho et al., 2003; Greiner et al., 2003). Também por essa razão, os AGEs são objeto de estudo nas mais variadas abordagens, como por exemplo, estudos relacionados a suas propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes (Yavin, 2006; Innis, 2007; Kim et al., 2010). Nesse aspecto, uma revisão de estudos sobre as propriedades anti-inflamatórias dos AGPI-CL ômega 3, especialmente EPA e DHA dá conta de que a dieta rica nestes compostos está associada com uma redução da resposta proliferativa das células T e aumento da resposta apoptótica e que estes efeitos podem ser mediados por alterações nos microdomínios lipídicos da membrana (Switzer et al., 2004). O processo apoptótico é causado por uma cascata de eventos na qual a família de cisteína proteases conhecida como caspases leva a quebra de múltiplos substratos, com especificidade para o ácido aspártico (Lev et al., 2003; Eberhardt e Schulz, 2003). A morte apoptótica é caracterizada pela expressão de genes (a maior parte oncogenes), que aumentam o processo apoptótico (bax, bcl-x) e outros que inibem a morte celular, tais como bcl-2 e bcl-xL (Lev et al., 2003). Existem duas vias que relacionam a contribuição mitocondrial com a morte celular. A primeira via envolve a permeabilização da membrana externa mitocondrial e consequente liberação do citocromo c (cyto c); isso ocorre quando são ativadas as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax e/ou Bak) (Green, 2005; Sas et al., 2007). A segunda via de morte celular é iniciada por condições que levam a permeabilidade mitocondrial transicional, definido como um aumento não

específico da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Halestrap et al., 2002; Sas et al., 2007), levando ao edema e ruptura da membrana externa (Green, 2005).

Há evidências de que a dieta rica em ômega-3 leva à supressão da proliferação das células T devido a aumento na expressão da proteína ligante AcylCoA e massa fosfolipídica (Collison et al., 2005). Estudos “*in vitro*” em camundongos dão conta de que a adição de ômega-3 suprime a atividade das células T (Fan et al., 2003) e promove aumento de fator de necrose tumoral e interleucina-6 (Barber et al., 2005). Em ratos foi visto que uma dieta rica em ômega 3 reduz a agregação plaquetária e os níveis de prostaglandinas séricas, além de aumentar a atividade de enzimas anti-oxidantes hepáticas, tais como catalase e glutathione transferase (Ramaprasad et al., 2005).

Dentre as várias contribuições dos ácidos graxos ao organismo destaca-se a atuação deles na manutenção da estrutura e das funções dos neurônios. O sistema nervoso é predominantemente composto de lipídios contendo ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. O equilíbrio dos níveis dietéticos desses ácidos graxos é necessário para manter a integridade estrutural, metabólica e o desenvolvimento do cérebro (Uauy e Dangour, 2006). Proporcionalmente, 60% da massa seca do cérebro é formada de gordura, da qual até 25% corresponde ao ácido docosahexaenoico (DHA) e pelo ácido araquidônico (AA), que são ácidos graxos poliinsaturados das séries n-3 e n-6, respectivamente (Ver figura 3). No tecido nervoso, os ácidos graxos poliinsaturados DHA e AA são os mais abundantes nos mamíferos (Green e Yavin, 1996). O funcionamento cerebral adequado depende do acúmulo de AGEs, particularmente do DHA, que ocorre principalmente durante o período de maior crescimento cerebral (Burdge et al., 2002). Além disso, vários estudos sobre estes AGEs permitiram chegar à conclusão de que cada um deles possuem papel único, essencial e insubstituível no funcionamento do cérebro e do sistema nervoso. Tem sido evidenciado que os AGEs podem agir como neuroprotetores no

cérebro. Uma das evidências disso é que o DHA está envolvido na redução da apoptose e necrose em diferentes classes neuronais (Lang-Lazdunski et al., 2003; Kim et al., 2010), enquanto que AA pode atuar como um fator neurotrófico sobre neurônios sensoriais (Robson et al., 2010). O ácido graxo saturado esteárico (18:0) é capaz de proteger neurônios corticais contra os efeitos do estresse oxidativo (Wang et al., 2007), enquanto que o ácido graxo monoinsaturado oléico (18:1 n-9) pode se comportar como um fator neurotrófico em culturas de células (Medina e Taberner, 2002) ou promover axonogênese no estriado durante o desenvolvimento cerebral (Polo-Hernández et al., 2010).

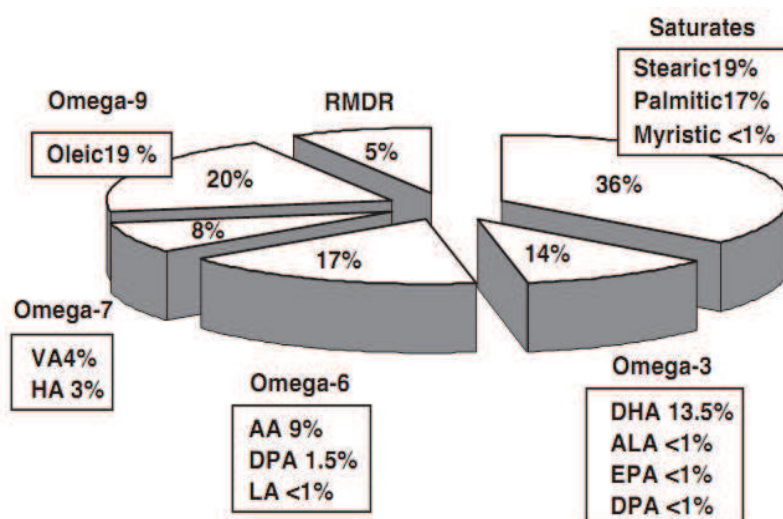


Figura 3. Proporção de ácidos graxos no cérebro humano (Modificado de McNamara e Carlson, 2006).

Em estudo com ratos, foram investigados os efeitos da composição fosfolipídica alterada de regiões cerebrais causados pela depleção de DHA, seja em consequência de atividade reprodutiva sucessiva ou por administração de dieta deficiente em ômega-3. Os resultados mostraram perdas celulares importantes nos córtices dos lobos frontal e temporal e no caudado-putamen e perdas menores no estriado ventral, hipotálamo, hipocampo e cerebelo, sugerindo que sistemas neuronais específicos podem ser afetados

diferencialmente pela depleção de DHA cerebral no organismo pós-parto (Levant et al., 2007).

Vários trabalhos têm demonstrado uma clara associação entre níveis inadequados de DHA nos fosfolípidios do cérebro e desenvolvimento neurológico deficitário (Neuringer et al., 1988; Carlson et al., 1996; 1997; Dijck-Brouwer et al., 2005a). Ratos alimentados com dietas deficientes em ácido linolênico apresentaram redução na capacidade de aprendizagem, indicando a necessidade de níveis adequados desse AGE no cérebro para o desempenho de funções cognitivas (Saste et al., 1998). A deficiência de DHA também está relacionada com um menor crescimento de neuritos em neurônios hipocampais (Calderon e Kim, 2004) e com um decréscimo no tamanho dos corpos celulares de neurônios no hipocampo, hipotálamo, córtex piriforme e parietal (Ahmad et al., 2002). Além de alterações no sistema visual, a deficiência de DHA induz também uma redução na capacidade de discriminação olfativa (Greiner et al., 2001). Também se observou que dietas deficientes em AGEs induzem mudanças na atividade elétrica cortical (Borba et al., 2010), na acuidade visual (Wainwright et al., 1991), na velocidade de condução do impulso nervoso em nervos periféricos (Silva et al., 1987), na arborização dendrítica e na formação da mielina (Calon et al., 2004; Hartvigsen et al., 2004). Oh-I et al. (2005) sugeriram um mecanismo molecular associado à leptina cerebral e ômega-3, promovendo um aumento de junções oclusivas no hipotálamo. Na mesma linha, Yamagata et al. (2003) sugeriram que os AGEs podem induzir a formação de junções oclusivas em células endoteliais de capilares cerebrais. Estudo recente demonstrou aumento no influxo de cálcio por canais voltagem-dependentes em membranas celulares e do retículo endoplasmático de culturas de células do gânglio ciliar de embriões de pinto, facilitado pelo DHA (Erriquez et al., 2005).



### **1.3. Influência da carência em ácidos graxos essenciais sobre a neurotransmissão**

AGPI-CL são envolvidos funcionalmente com diversos sistemas de neurotransmissão, incluindo o glutamatérgico (Nishikawa et al., 1994; Moreira et al., 2010), colinérgico (Aid et al., 2003) e monoaminérgico (Chalon, 2006). Dentre estes, o sistema dopaminérgico é especialmente vulnerável à carência específica em AGEs.

A dopamina (DA) exerce uma influência modulatória sobre várias funções cognitivas, sensoriais e motoras do córtex cerebral. A análise topográfica da distribuição de terminais imunorreativos a TH, enzima limitante na síntese da DA, bem como dos transportadores de membrana para a DA sugere que a inervação dopaminérgica exerce uma forte influência sobre a atividade neuronal no córtex parietal. Além disso, em regiões subcorticais a distribuição de terminais dopaminérgicos no córtex pode permitir uma maior difusão da DA como neuromodulador (Lewis e Levitt, 2002). Este sistema atua como um dos moduladores da atividade neuronal tanto ao nível do sistema meso-córtico-límbico como ao nível diencefálico, onde participa da regulação neuro-hormonal e neurovegetativa.

Deficiência em AGEs durante o período de aleitamento é capaz de reduzir os níveis de DA no córtex frontal (de la Presa e Innis, 1999), estriado e colículos superior e inferior em animais adultos (de la Presa e Innis, 2000). Zimmer et al. (1998) observaram que a deficiência crônica de DHA reduz a liberação vesicular de DA induzida pela tiramina no córtex frontal, sugerindo que a deficiência desse ácido graxo pode alterar o mecanismo de internalização da referida amina. Além disso, foi constatado que a diminuição da disponibilidade de DHA durante o desenvolvimento cerebral induz alterações neuroquímicas no sistema dopaminérgico envolvido com as funções mesolímbica e mesocortical (Yavin, 2006; Chalon, 2006; Kuperstein et al., 2008), seguidas por modificações comportamentais na idade adulta (Fedorova et al., 2009).

Em trabalhos envolvendo a dieta restrita em AGPIs, um modelo descrito de paridade sucessiva associado a dieta materna com níveis deficientes de ácido linolênico, foi observada redução no número de neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH) na substância negra pars compacta na prole em animais nos dias P70 (Ahmad et al., 2008). Estes dados sugerem que níveis adequados de AGEs n-3 na dieta são necessários para a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos.

Uma vulnerabilidade diferenciada diante de uma menor biodisponibilidade de AGEs da dieta foi também evidenciada entre neurônios dopaminérgicos do córtex frontal, hipocampo e estriado (Acar et al., 2003). Neste último estudo, uma dieta contendo a forma trans do ácido alfa linolênico (ou seja, isomerização de uma parte da dieta) provocou diminuição dos níveis de DA endógena, principalmente no hipocampo. Também foi visto que o número de neurônios dopaminérgicos está diminuído na substância negra pars compacta e área tegmental ventral de ratos alimentados com dieta deficiente em ômega-3 (Ahmad et al., 2008). Trabalhos em andamento (Passos et al., 2012, dados não publicados) apontam indícios de que a dieta deficiente em AGEs pode promover alterações sobre a neurogênese e diferenciação dos neurônios dopaminérgicos no sistema meso-córtico-límbico.

Além da DA, a serotonina (5-HT) contribui para fenômenos de plasticidade sináptica, sendo a participação relativa de cada uma delas diferente em relação aos córtices pré-frontal e parietal. Enquanto a DA exerce maior influência sobre a densidade sináptica no córtex pré-frontal, a 5-HT atua mais no córtex parietal (Sugahara & Shiraishi, 1998). Evidências obtidas em ratos também indicam que receptores dopaminérgicos do tipo D3 são expressos no córtex parietal de forma seletiva e transitória durante as duas primeiras semanas pós-natais, de forma coincidente com o desenvolvimento da organização somatotópica das vibrissas (Gurevich e Joyce, 2000).

No córtex frontal também foi observado que a deficiência crônica em ômega-3 promove aumento na densidade de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2</sub> e redução na densidade dos receptores dopaminérgicos durante o envelhecimento (Delion et al., 1996). Além das evidências de que a carência dos AGEs provoca alterações sobre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, até agora temos pouco conhecimento de alterações efetivas sobre outros neurotransmissores ou seus receptores, como por exemplo, o GABA, a glicina ou o glutamato, nem envolvendo a GAD (glutamato descarboxilase), enzima-chave de conversão entre os sistemas GABA-glutamatérgico. Um estudo recente apresentou resultados em que a suplementação dietética de ômega-3 pode reverter às mudanças relacionadas à perda e mau funcionamento de receptores glutamatérgicos no córtex frontal, hipocampo e estriado de pessoas em idade avançada (Dyall et al., 2007).

#### **1.4. Repercussões da carência em ácidos graxos essenciais em patologias neurodegenerativas e em distúrbios psiquiátricos**

Estudos relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos indicam que reduções nos níveis de AGEs, especialmente o ácido araquidônico, nos fosfolipídios de membranas neuronais, podem estar envolvidas na etiologia da esquizofrenia (Skosnik e Yao, 2003; Reddy et al., 2004). Considerando a importância dos AGPIs como agentes capazes de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e de promover neuroproteção, além de serem essenciais para o desenvolvimento e crescimento cerebral, foi também proposto que uma suplementação perinatal de quantidades adequadas destes ácidos graxos poderia ser uma estratégia adequada para a prevenção da esquizofrenia na vida adulta (Das, 2004). Horrobin (1992) já havia proposto uma relação entre esquizofrenia e o metabolismo de eicosanóides e AGEs. Evidências obtidas em camundongos transgênicos indicam que

AGEs podem ter também um potente efeito terapêutico na doença de Huntington, uma vez que o tratamento crônico com AGPI, a partir do nascimento, previne deficiências motoras em animais (Clifford et al., 2002).

Distúrbios relacionados à perda progressiva da memória foram investigados sob o ponto de vista neurofuncional e neuroquímico. Em estudos realizados em camundongos transgênicos, servindo como modelo experimental para a doença de Alzheimer, foi sugerido que uma dieta rica em ômega-3 pode aumentar a quantidade de receptores NMDA hipocampais (Calon et al, 2005). Na mesma linha de investigação, Lim G. P. et al. (2005) observaram uma redução de 40 a 50% de tecido hipocampal e do córtex parietal em ratos transgênicos. Alterações neuroquímicas foram sugeridas por Haag (2003), ao verificar que o ômega-3 aumenta a eficiência da 5-HT e das catecolaminas. Além disso, sugeriu também que evita a dessaturação da membrana neuronal e manutenção de sua fluidez, mecanismos neuroquímicos capazes de prevenir a doença de Alzheimer. A redução na incidência da doença de Alzheimer decorrente do consumo rico em ômega-3 também foi sugerida por Morris et al. (2003).

Transtornos como o déficit de atenção e hiperatividade também são citados como consequência da carência de AGEs (Haag, 2003; Young et al., 2004), entretanto, o mecanismo desencadeante ainda não foi elucidado. Por outro lado, Vancassel et al. (2005), em estudos testando a assimetria cerebral, encontraram dados relacionados a alterações de lateralidade em ratos carentes de AGEs, associados a uma redução da quantidade de neurônios colinérgicos estriatais. Estudos realizados com ratos para testar memória espacial em labirinto têm apontado uma melhora na habilidade locomotora associada a uma dieta rica em ômega-3 (Hartvigsen et al., 2004; Lim G. P. et al., 2005; Lim S. Y. et al., 2005).

Essas observações em animais experimentais em conjunto com estudos epidemiológicos e clínicos (Bourre, 2005; Dijck-Brouwer et al., 2005a; Das, 2006; McNamara e Carlson, 2006) sugerem que baixos níveis de DHA podem contribuir para a etiologia dos transtornos neuropsiquiátricos e de doenças neurodegenerativas. Assim, o uso terapêutico de AGPI-CL, especialmente os da série n-3, foi indicado em uma variedade dessas doenças (Heinrichs, 2010). Em modelos experimentais da doença de Parkinson, por exemplo, foi demonstrado que a suplementação dietética de DHA ou óleo de peixe pode restaurar parcialmente a neurotransmissão dopaminérgica após lesões estriatais induzidas por 6-hidroxidopamina (6OHDA) ou 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Bousquet et al., 2008; Cansev et al., 2008).

### **1.5. O sistema de temporização circadiana em mamíferos**

Os ritmos circadianos são oscilações em comportamentos e funções expressados por toda matéria viva com periodicidade de aproximadamente 24 horas. Eles representam um importante componente comportamental, uma vez que permite a um organismo antecipar-se e preparar-se para as alterações que ocorrem no ambiente natural, do nascer ao pôr do sol, podendo assim otimizar os seus comportamentos de acordo com os padrões rítmicos ambientais (Moore-Ede, 1986).

Duas propriedades básicas destes ritmos, a geração endógena, ou seja, a sua expressão mesmo na ausência de pistas ambientais, e a sincronização aos ciclos ambientais, particularmente o ciclo claro-escuro, permitiram inferir a existência de um sistema organizador. Este foi denominado sistema de temporização circadiana (STC) e compreende um conjunto de estruturas neurais diferenciadas, que incluem vias retinianas acopladas a um marca-passo no cérebro, o próprio marca-passo, bem como as estruturas

que representam entradas e saídas do marca-passo. Em mamíferos é constituído de estruturas neurais e endócrinas, onde se inclui classicamente o núcleo supraquiasmático (NSQ) como o marca-passo principal, além do folheto intergeniculado (FIG) e da glândula pineal (Figura. 4). (Ver Moore, 1999; Van Esseveldt et al., 2000; Marques e Menna-Barreto, 2003; Reuss, 2003; Morin e Allen, 2005; Golombek e Rosenstein, 2010).

O STC é organizado de maneira a receber informações dos ambientes externo, principalmente referentes ao ciclo claro-escuro ambiental, e interno das reações fisiológicas que ocorrem no organismo. Sua função é a organização temporal de processos fisiológicos e comportamentais num padrão circadiano de modo a permitir a expressão de um comportamento adaptativo (Moore, 1999; Van Esseveldt et al., 2000; Marques e Menna-Barreto, 2003; Reuss, 2003; Morin e Allen, 2005; Golombek e Rosenstein, 2010).

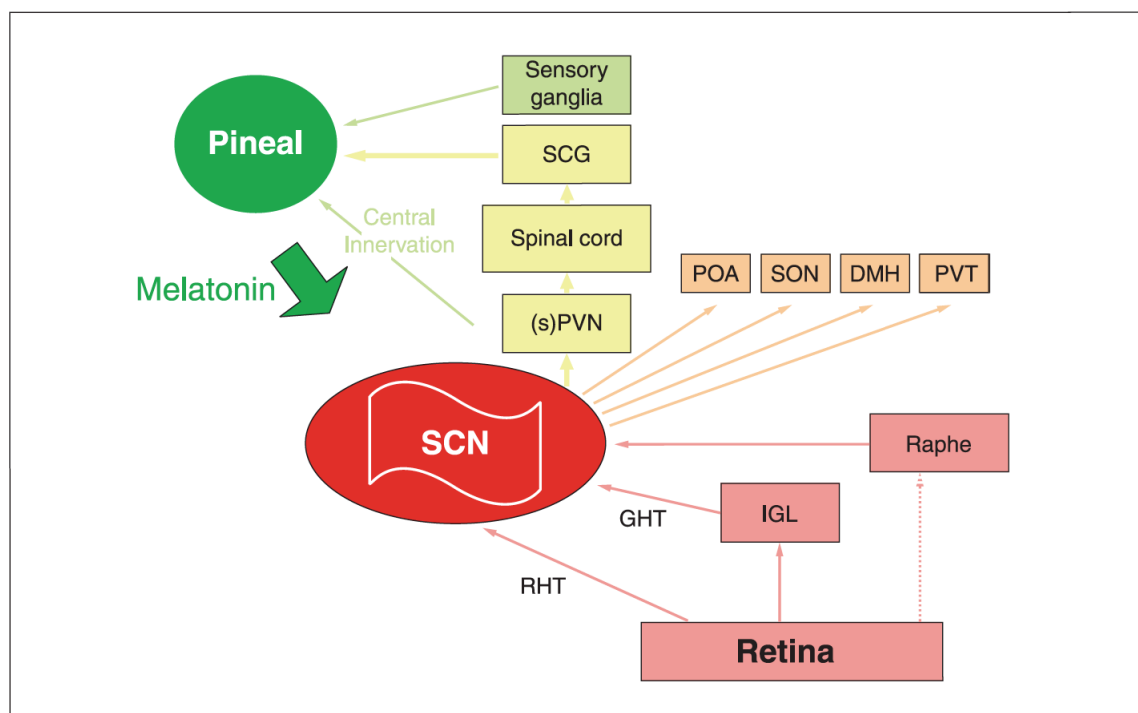


Figura 4. Modelo de sistema de temporização circadiana, de acordo com Reuss (2003).

O NSQ foi identificado como marca-passo, envolvido na geração e sincronização dos ritmos circadianos, a partir da descrição do trato retino-hipotalâmico (TRH) (Moore e

Lenn, 1972; Hendrickson et al., 1972) e estudos de lesão que resultaram na perda de ritmos para comportamentos de comer e beber (Stephan e Zucker, 1972) e do ritmo de secreção de cortisol (Moore e Eichler, 1972). Outros estudos detectaram ritmo circadiano na captação de 2-desoxi-glicose (Schwartz e Gainer, 1977; Shibata e Moore, 1988) e na atividade elétrica (Shibata e Moore, 1988), mantido mesmo quando isolado do resto do cérebro (Inouye e Kawamura, 1979). Por fim, foi mostrado que transplantes de NSQ fetal permitem recuperar a ritmicidade circadiana de animais tornados arrítmicos em consequência de lesão bilateral do NSQ (Drucker-Colin et al., 1984; Lehman et al., 1987) e que o ritmo recuperado assume as características do doador (Ralph et al., 1990).

O NSQ é uma estrutura par cuja disposição anatômica é similar entre os mamíferos; toda sua extensão antero-posterior está localizada no hipotálamo anterior, acima do quiasma óptico e lateralmente ao terceiro ventrículo. Embora sejam relatadas diferenças significativas entre as espécies em relação a forma, volume, densidade e tamanho celular, a localização do NSQ é uma constante no cérebro dos mamíferos, sugerindo tratar-se de uma estrutura filogeneticamente antiga e estável (Van den Pol, 1980; 1991; Lydic et al., 1982; Cassone et al., 1988; Costa et al., 1998; Smale e Boverhof, 1999; Nascimento Jr et al., 2010).

Do ponto de vista neuroquímico, o NSQ apresenta duas subpopulações neuronais distintas, caracterizadas pela presença de diferentes substâncias neuroativas encontradas em pericários ou em terminais provenientes das suas fontes de aferências. Com base principalmente em estudos em ratos (Van den Pol, 1980; Van den Pol e Tsujimoto, 1985; Golombek e Rosenstein, 2010), são descritas duas principais subpopulações de neurônios no NSQ. Na porção ventrolateral do núcleo, que recebe as aferências do trato retino-hipotalâmico (TRH), trato genículo-hipotalâmico (TGH) e da rafe, predomina uma população de neurônios produtores de polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), os quais

contêm também o peptídeo histidina-isoleucina (PHI). A porção dorsomedial, que recebe escassas fibras visuais, é caracterizada por uma população predominante de neurônios produtores de vasopressina (VP), expressando também sua proteína transportadora, neurofisina (NPFI), com a qual forma um complexo. Além disso, existem outras substâncias neuroativas, incluindo-se neurotransmissores, neuromoduladores, proteínas ligantes de cálcio, formando subpopulações no NSQ, detectando-se grande variabilidade no padrão de distribuição entre as espécies. No NSQ também está presente o óxido nítrico, uma substância gasosa envolvida em mecanismos celulares no núcleo (ver revisão em Cavalcante et al., 2006). A distribuição dos perfis neuronais do NSQ está representada na figura 5.

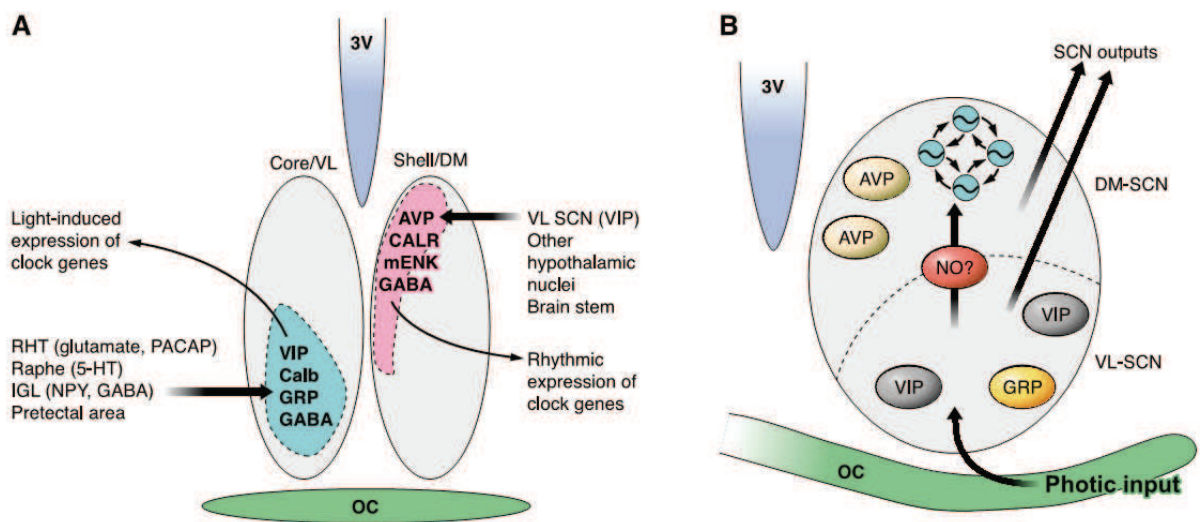


Figura 5. Neurotransmissores e outras substâncias neuroativas no NSQ. Modificado de Golombek e Rosenstein (2010).



O FIG é um conjunto de células presente em toda extensão do complexo geniculado lateral do tálamo, disposto como uma fina lâmina intercalada entre as duas outras porções desse complexo, o núcleo geniculado lateral dorsal e o núcleo geniculado lateral ventral, e que recebe fibras da retina bilateralmente e de forma quase simétrica (Hickey e Spear, 1976). É caracterizado pela presença de neurônios produtores de neuropeptídeo Y (NPY), que se projetam para o NSQ (Harrington et al., 1985; 1987). Contém uma população distinta de neurônios de tamanho pequeno a médio, alguns multipolares, embora com dendritos confinados aos seus limites. É proposta uma classificação fenotípica e hodológica para os neurônios do FIG, com neurônios gabaérgicos e NPY-érgicos que se projetam para o NSQ e neurônios gabaérgicos e encefalinérgicos (ENK) que se projetam para o FIG contralateral, e um pequeno grupo de neurônios, ainda não caracterizados quanto ao seu conteúdo neuroquímico, que se projetam para o NSQ (Moore e Card, 1994). A participação do FIG na regulação dos ritmos circadianos foi sugerida considerando-se a evidência de que é um núcleo retino-recipiente, com projeções para o NSQ. Isso levou à idéia de que se tratava de um relé para via alternativa de sincronização fótica. Entretanto, foi visto que o TRH é suficiente para manter a sincronização (Klein e Moore, 1979), e que a lesão bilateral do FIG não altera a sincronização do ritmo de atividade a um ciclo claro-escuro controlado em laboratório (Johnson et al., 1989), nem modifica a fase do ritmo de N-acetil-serotonina da pineal (Cipolla-Neto et al., 1995). Estes dados indicam que o FIG não está relacionado primariamente com a sincronização dos ritmos endógenos ao ciclo claro-escuro, embora posteriormente se tenha demonstrado que a lesão do FIG causa perturbação da sincronização a um fotoperíodo esqueleto em ratos (Edelstein e Amir, 1999). Uma série de outros estudos implica a participação do FIG em mecanismos de sincronização fótica e não fótica (ver Cavalcante et al., 2006).

## 1.6. Ácidos graxos essenciais e os ritmos circadianos

A deficiência crônica alimentar em ácidos graxos essenciais induz modificações neuroquímicas no cérebro a nível celular e em vários aspectos comportamentais (Yavin, 2006; Fedorova e Salem, 2006). Sabemos que os AGPI-CL, tais como o AA e o DHA são componentes importantes dos fosfolípidios de membrana das células neuronais e sua disponibilidade durante os períodos iniciais do desenvolvimento do cérebro parece ser fundamental para a neurogênese, migração de neuroblastos, diferenciação e sinaptogênese (Green e Yavin, 1996; Green et al., 1999). Eles possuem efeitos estruturais importantes no desenvolvimento dos órgãos, notadamente da retina e do cérebro (Holman et al., 1982; Heinemann et al., 2005; Salem et al., 2005). Tem sido observado que a redução na disponibilidade de DHA está associada com diminuição da acuidade visual, alterações cognitivas, de atenção e da coordenação motora (McNamara e Carlson, 2006). Em estudos na retina foi demonstrado que a modificação fosfolipídica na membrana da retina está associada com sua atividade funcional, correlacionando o *turnover* dos fosfolípidios e seu envolvimento com a atividade funcional dos bastonetes (Ikemoto et al., 2000b) e que ratos deficientes em ácido alfa-linolênico apresentam redução na atividade enzimática retiniana diurna (Ikemoto et al., 2000a). Além disso, a discriminação do brilho e a atividade eletrofisiológica da retina podem ser afetadas pela deficiência em AGPI n-3 em várias espécies, incluindo seres humanos (Neuringer et al., 1988; Okuyama et al, 2001; Diao et al, 2003; Jeffrey et al, 2002; SanGiovanni e Chew, 2005). Apesar de sua importância no sistema fotossensível da retina, poucos estudos investigaram o papel dos AGEs no sistema de temporização circadiana.

Alguns aspectos relacionados aos efeitos da composição lipídica da dieta sobre os ritmos biológicos têm sido atualmente investigados por alguns autores (Mendoza, 2007; Mendoza et al., 2008). Doenças metabólicas relacionadas à alimentação têm sido

associadas a modificações em muitos destes ritmos, especialmente os que envolvem o metabolismo lipídico (Bray e Young, 2006; Hastings et al., 2007; Cano et al., 2008), da glicose (Van Cauter et al., 1997; Winzell e Ahrén, 2004; Turek et al., 2005; Sinitskaya et al., 2007; Carneiro et al., 2010), além dos ritmos da temperatura corpórea e da atividade locomotora (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008), relacionados a dietas hipercalóricas, contendo altos níveis de gordura saturada. Restrição calórica também é capaz de modificar a sincronização interna do sistema circadiano, induzindo avanço de fase em diversos ritmos (Challet et al., 1997) ou modificando a organização temporal do NSQ e suas respostas circadianas à luz (Mendoza et al., 2005; Mendoza, 2007).

Camundongos mutantes com senescência acelerada (SAMP8) submetidos a uma dieta deficiente em ácido alfa linolênico (ALA) por sete meses apresentaram um aumento da atividade motora espontânea em ambas as fases, clara e escura (Umezawa et al., 1995). Também foi demonstrado que os ácidos graxos n-3 podem desempenhar um papel crítico na regulação da glândula pineal. Por exemplo, estudos *in vitro* relataram que a dieta deficiente em n-3 reduz a liberação de melatonina em cultura de células da glândula pineal (Gazzah et al., 1993). Além disso, estudos *in vivo* utilizando a mesma deficiência dietética mostraram aumento do nível de melatonina endógena durante o dia na glândula pineal (Zhang et al., 1998) e redução da excreção urinária de melatonina durante a noite em ratos (Zaouali-Ajina et al., 1999). Evidências em hamsters sírios também demonstraram que uma dieta deficiente em n-3 AGPIs diminui o ritmo da melatonina e induz a hiperatividade locomotora associada a alterações na neurotransmissão dopaminérgica no estriado (Lavialle et al., 2008). Adicionalmente, mudanças na expressão dos transportadores de glicose nas células endoteliais e neurônios do NSQ têm sido discutidas como um efeito potencial da deficiência em n-3 AGPIs no metabolismo energético deste núcleo (Ximenes da Silva et al., 2002).

Evidências recentes indicam que a suplementação com óleo de coco em ratos com dieta equilibrada pode aumentar a atividade locomotora espontânea no dia pós-natal 13, sugerindo que o perfil de ácidos graxos desse óleo, por si só, pode modificar sua atividade locomotora no início do desenvolvimento pós-natal (Borsonelo et al., 2011). Em trabalho recente foi evidenciado que o tratamento dietético contendo óleo de coco como a única fonte lipídica por um curto período, desde o desmame (P21) até P51, induz alterações metabólicas relacionadas a modificações no perfil de ácidos graxos dos tecidos muscular, adiposo e hepático, que são osciladores periféricos; de acordo com o estudo, tais alterações estão relacionadas com mudanças na lipogênese de AGPI-CL, que é sensível à presença da gordura saturada do óleo de coco (Ling et al., 2010). Esses autores relataram também aumento nos níveis de triglicerídeos tanto no fígado quanto no soro, indicando modificações no metabolismo energético (Ling et al., 2010). Esses efeitos metabólicos podem influenciar ritmos biológicos, como pode ser visto em trabalho em que a homeostase de lipídios e triglicerídeos mostra um padrão cíclico, permitindo aos animais se adaptar a ciclos rítmicos de alimentação e de atividade previsíveis (Yang et al., 2009). Além disso, o mecanismo molecular que gera oscilações circadianas amadurece em taxas diferentes em alguns relógios periféricos com funcionamento maleável, podendo se alterar durante o desenvolvimento dos órgãos (Yamazaki et al., 2009). Em conjunto, os resultados destes trabalhos sugerem que a organização funcional do sistema de temporização circadiana pode ser modificada pela composição lipídica da dieta, e enfatiza um papel modulador dos ácidos graxos de cadeia longa da série n-3 nesse contexto.

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES DO ESTUDO**

Embora se tenha ampliado a abrangência dos estudos sobre os efeitos da deficiência em AGEs na dieta, o conhecimento existente na literatura ainda é insuficiente para uma profunda compreensão dos efeitos dessa deficiência sobre a expressão e controle neural dos ritmos circadianos. Assim, o presente estudo foi conduzido com a finalidade de testar a hipótese de que uma dieta crônica deficiente em AGEs contendo óleo de coco como única fonte lipídica, utilizada como modelo experimental de deficiência em AGEs devido ao baixo teor de ambos os ácidos linoléico e alfa-linolênico e aos níveis elevados de ácidos graxos saturados, pode modificar a ritmicidade circadiana e sua eficiência na manutenção da sincronização às mudanças de fase e à sua expressão endógena em animais jovens e adultos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo geral verificar os efeitos da dieta deficiente em ácidos graxos essenciais sobre a expressão do ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos Wistar.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Investigar os efeitos de uma dieta deficiente em AGEs, administrada durante os períodos gestacional e de aleitamento até a idade adulta, sobre as respostas circadianas, incluindo:

1. Sincronização ao ciclo claro-escuro;
2. Ressincronização ao ciclo claro-escuro após atrasos de fase;
3. Expressão do ritmo em livre-curso.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos albinos adultos da linhagem Wistar provenientes da colônia do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. A partir daí foram realizados acasalamentos e obtidos os animais desse estudo no Laboratório de Neurobiologia e Ritmos Biológicos no Departamento de Fisiologia da UFRN, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura (média  $21 \pm 2$  °C) e iluminação (CE 12:12h) até o vigésimo dia pós-natal. Realizamos o trabalho com o mínimo de espécimes possível para obter resultados válidos, considerando-se a variabilidade esperada em testes comportamentais com mamíferos, os testes estatísticos a serem utilizados e o nível de significância estabelecido. Além disso, todos os cuidados foram tomados no sentido de evitar dor e sofrimento aos animais durante os procedimentos experimentais, seguindo estritamente as normas estabelecidas pelo National Research Council of the National Academy, publicadas no livro “Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research”. Uma versão em formato pdf está disponível gratuitamente no site da Sociedade de Neurociências e Comportamento (SBNeC) – <http://www.sbne.gov.br/links>. O projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, protocolo no. A-006/07, parecer no. 299/2007.

### **4.2. Formação dos grupos**

A partir do acasalamento, durante todo o período de gravidez e lactação, fêmeas adultas de 90 dias, pesando entre 200 e 250g, foram submetidas a uma dieta controle, balanceada, ou experimental, usada para induzir deficiência em AGEs, contendo em torno de 400 Kcal/100g, de acordo com a análise cromatográfica do Departamento de Química

Fundamental - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, e diferindo entre si apenas na fonte lipídica. Os animais originados a partir da paridade dessas fêmeas foram divididos em dois grupos, segundo a dieta a que foram submetidos a partir da gestação: 1) o grupo controle (grupo soja) recebeu uma dieta equilibrada em todos os nutrientes, tendo o óleo de soja como fonte lipídica; 2) o grupo experimental (grupo coco), deficiente em ácidos graxos essenciais, recebeu uma dieta semelhante em todos os constituintes, exceto pela fonte lipídica que foi substituída pelo óleo de coco, o qual é deficiente em AGEs. A ração para ambos os grupos foi fornecida pelo Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Após o desmame, realizado ao dia pós-natal (P) 21, todos os filhotes permaneceram recebendo as dietas de suas respectivas mães e foram utilizados para estudos imediatamente. Ao final dos experimentos foram utilizados no total 22 animais, sendo 10 do grupo controle e 12 do grupo experimental, os quais foram arrolados na análise do comportamento motor.

#### **4.3. Composição das dietas**

As dietas foram preparadas à base de coco e de soja e tiveram sua porção lipídica analisada por cromatografia gasosa no Departamento de Química Fundamental - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, para determinar a constituição das rações oferecidas aos animais dos grupos controle e experimental. As composições centesimais das dietas para formação das rações estão apresentadas na tabela 1. As rações eram preparadas pelo menos duas vezes por mês e armazenadas em uma geladeira a  $4 \pm 2$  ° C, dependendo do consumo de cada grupo.



**Tabela 1 – Composição das dietas**

Ingrediente	Quantidade (g/100g da dieta)	
	Controle	Experimental
Caseína	20,7 g	20,7 g
Óleo de soja	5 g	-----
Óleo de coco	-----	5 g
Açúcar	21 g	21 g
Celulose	1,8 g	1,8 g
Amido de milho	46,8 g	46,8 g
*Complemento mineral	3,7 g	3,7 g
Complemento vitamínico	0,9 g	0,9 g
DL-metionina ou L-cistina	0,1 g	0,1 g
Butil hidroxitolueno “BHT”	0,001 g	0,001 g
Kcal/100g	399,1	400,5

\*De acordo com os padrões da AIN

#### **4.4. Análise bioquímica das dietas**

As dietas de fontes lipídicas diferenciadas foram preparadas de acordo com Soares et al. (1995), submetidas a transesterificação de acordo com Hartman e Lago (1973) e analisadas por cromatografia gasosa no Departamento de Química Fundamental - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, para determinar a constituição lipídica das rações oferecidas aos animais dos grupos controle e experimental, de acordo com a tabela 2.

De acordo com a análise, a dieta controle continha 5% de óleo de soja com quantidades adequadas de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, linolênico e linoléico. Em comparação à dieta controle, a dieta experimental apresentou 5% de óleo de coco, contendo baixos níveis tanto de ácido linoléico (redução de aproximadamente 7 vezes), o que corresponde a 30% do mínimo recomendado para roedores (Bourre et al., 1990), quanto de alfa-linolênico (redução de aproximadamente 12 vezes), caracterizando a dieta de coco como deficiente em n-3 e n-6. Também foram observados na dieta experimental altos níveis de ácidos graxos saturados (duas vezes maior) e monoinsaturados (2,5 vezes maior), em comparação ao grupo controle. As dietas diferiram também em relação à razão n-6/n-3, apresentando valor aproximadamente 1,8 vezes maior no grupo experimental em comparação ao controle.

**Tabela 2 – Análise bioquímica das dietas em percentual do total de ácidos graxos**

Ácidos graxos	Dieta controle (soja)	Dieta experimental (coco)
Saturados	26	67,29
16:1	2,72	0,06
18:1n-9	9,360	23,506
20:1	0,24	0,16
Total monoinsaturados	2,96	0,219
<b>18:2n-6</b>	<b>55,363</b>	<b>8,097</b>
<b>18:3n-3</b>	<b>6,036</b>	<b>0,494</b>
20:2	0,042	0,064
20:5n-3	0,028	<b>nd</b>
22:2n	0,054	0,044
22:6n-3	0,133	0,065
Total poliinsaturados	61,65	8,75
<b>18:2n-6/18:3n-3</b>	<b>9,172</b>	<b>16,390</b>

**nd = não detectado**

#### **4.5. Registro das respostas circadianas motoras**

Após o desmame aos 21 dias de vida, animais dos dois grupos, totalizando 22 indivíduos, foram transferidos para a sala de registro do Laboratório de Neurobiologia e Ritmos Biológicos no Departamento de Fisiologia da UFRN. Os animais foram colocados em gaiolas individuais de polipropileno, com as seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 32 cm de largura e 17 cm de altura, em um ambiente confinado e isolado em

caixas de madeira, com o objetivo de atenuar ruídos e outras interferências externas, e temperatura controlada (média  $21 \pm 2$  °C), com as dietas próprias do grupo experimental ou controle e água *ad libitum*.

Os animais foram inicialmente expostos a um ciclo claro-escuro de 24 horas (CE 12:12), com as luzes acendendo-se às 17:00 h, com iluminância de 150 lux durante a fase de claro e 1 lux durante a fase de escuro. Após duas semanas em CE, o horário de apagar as luzes foi atrasado em seis horas, ficando assim por mais três semanas. Após esse período, os animais foram expostos em escuro constante (EE) por quatro semanas, seguido de um novo regime de CE 12:12 por mais três semanas e em seguida nova exposição a EE por três semanas, totalizando 105 dias de registro. As condições experimentais de iluminação utilizadas estão esquematizadas na figura 6.

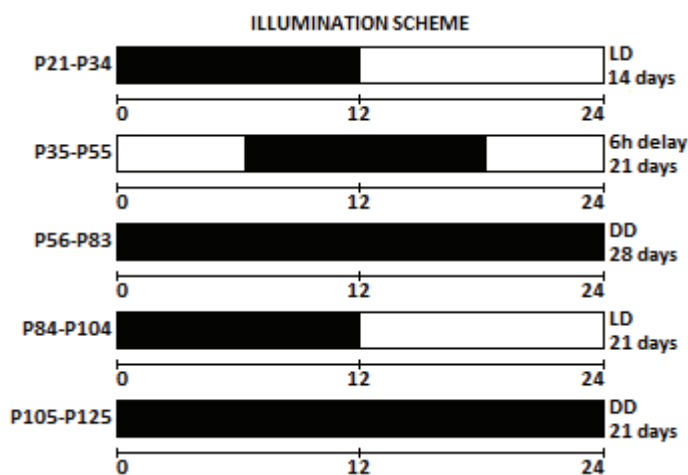


Figura 6. Condições de iluminação ao longo dos 105 dias de registro da atividade motora dos ratos. Dias pós-natais P21 a P125.

Os parâmetros avaliados foram as respostas circadianas como (1) a capacidade de sincronização ao ciclo claro-escuro, (2) a expressão do ritmo em livre curso e (3) capacidade de ressincronização após atrasos de fase e retorno a condições anteriores. Para isso, monitoramos em intervalos de 5 minutos a atividade motora de cada animal através

de um sensor infravermelho sensível ao deslocamento, colocado 15 cm acima de cada gaiola, durante todo o experimento. A saída de cada sensor foi integrada a um computador através de uma placa para aquisição de dados do software *Aschoff* (Laboratório de Neurobiologia e Ritmos Biológicos do Departamento de Fisiologia da UFRN). A análise das características do ritmo e plotagem dos gráficos (actogramas e periodogramas) foi realizada usando-se o programa “El Temps” (Díez-Noguera®, 1999). O período em livre-curso do ritmo de atividade motora em EE foi determinado pelo periodograma. Em escuro constante, o início da atividade, designado como hora circadiana (*Circadian Time*) 12 foi usado como referência para o início da noite subjetiva.

Para análise da atividade motora foram considerados os valores arbitrários obtidos pelo software *Aschoff* referentes aos registros dos actogramas da atividade no claro, no escuro e da atividade total. Os periodogramas foram utilizados como base para analisar os resultados do claro-escuro e do escuro constante; tais padrões serviram de referência para verificar a sincronização dos animais e as variações no ritmo da atividade motora.

#### 4.6. Análise dos pesos encefálico e corpóreo

A análise do peso corpóreo dos animais usados neste estudo foi realizada no dia de desmame (P21) e após o término do registro da atividade motora no dia P125, de acordo com a tabela 3.

**Tabela 3 – Valores dos pesos corpóreo e encefálico e relação peso encefálico/corpóreo.**

Grupos	Peso corpóreo inicial	Peso corpóreo final	Peso encefálico	Peso encefálico/peso corpóreo
Controle	57,7 ± 3,86	465,4 ± 39,68	1,92 ± 0,627	0,004168 ± 0,000447
Experimental	47,5** ± 0,9	421,91* ± 36,26	1,9 ± 0,054	0,004555 ± 0,000447

Peso corpóreo inicial avaliado no dia P21 pesos corpóreo final e encefálico avaliados no dia P125 Grupo controle n=10, grupo experimental n=12. \* (p < 0,012), \*\* (p < 0,003), segundo o teste ANOVA, Friedman. Valores expressos em média ± desvio-padrão.

Ao final dos procedimentos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados por via intramuscular com uma mistura de cloridrato de ketamina (100mg/Kg) e xilazina (~10 mg/Kg). Comprovada a anestesia pela ausência do reflexo corneano, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à perfusão transcardíaca, tendo os membros imobilizados. Para este procedimento, inicialmente foi realizada uma incisão a partir do processo xifóide contornando o gradil costal, depois ampliando-se de cada lado para cima, na direção da cabeça do úmero. Em seguida, desinsere-se o diafragma, de modo a expor completamente o coração na cavidade torácica. Insere-se uma agulha ligada através de um cateter a uma bomba peristáltica (Cole-Parmer) no ápice do ventrículo esquerdo, em direção à artéria aorta ascendente. Em seguida, faz-se uma pequena incisão no átrio direito e liga-se a bomba. Primeiro foram impulsionados 300 ml de cloreto de sódio a 0,9%, seguido por 700 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4, durando todo o procedimento em torno de 30 minutos. Depois da perfusão, os cérebros foram removidos da cavidade craniana. Após esse procedimento foram pós-fixados por duas horas no mesmo fixador e lavados em tampão fosfato antes de serem pesados em balança de precisão. Os valores dos pesos encefálicos e sua relação com os pesos corpóreos podem ser encontrados na tabela 3.

#### **4.7. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey para a atividade motora, tendo como parâmetros as fases dos ciclos claro e escuro. Devido às diferenças de sensibilidade entre os sensores, cada animal foi analisado individualmente. Para comparar os pesos corporal e encefálico foi usado o teste ANOVA seguido pelo teste de Friedman. O nível de significância estatística e o intervalo de confiança foram aceitos a partir de  $p = 0,05$  e 95% para comparação entre os grupos.

## **5. RESULTADOS**

5.1. Submissão de artigo ao *Journal of Biological Rhythms* (Classificação A2 no *QUALIS* em 2012):

**Dietary essential fatty acid restriction associated to high levels of saturated fatty acids affects circadian parameters of the motor activity in rats**

**Dietary essential fatty acid restriction associated to high levels of saturated fatty acids affects circadian parameters of the motor activity in rats**

Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Lima, R. R. M.<sup>2</sup>, Freitas, L. M.<sup>2</sup>, Carneiro, B. T. S.<sup>3</sup>, Araújo, J. F.<sup>3</sup>, Navarro, D. M.A. F.<sup>4</sup>, Santos, G. K. N.<sup>4</sup>, Silva, V. L.<sup>5</sup> Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>

- 1) Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió (AL), Brazil.
- 2) Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brazil.
- 3) Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brazil.
- 4) Departamento de Química Fundamental- Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brazil.
- 5) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brazil.



## RESUMO

A dieta contendo óleo de coco como a única fonte de lipídios tem sido usada como um modelo experimental de deficiência em ácidos graxo essenciais devido à redução dos níveis tanto dos ácidos linoléico e alfa-linolênico e aos elevados níveis de ácidos graxos saturados. Foi mostrado que esse tipo de tratamento dietético induz mudanças metabólicas e modificações no conteúdo de ácidos graxos dos tecidos muscular, adiposo e do fígado, que são relógios periféricos. O presente estudo foi conduzido de modo a testar a hipótese de que essa condição nutricional desde os estágios iniciais de desenvolvimento até a idade adulta pode modificar a expressão endógena da ritmicidade circadiana, sincronização à luz e resposta à mudança de fase da atividade motora geral do rato. Ratos Wistar fêmeas foram alimentadas com dietas contendo 5% de gordura oriunda ou do óleo de soja (controle) ou do óleo de coco (experimental) desde o acasalamento até o período de lactação. Os filhotes machos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente nas ninhadas e alojados em gaiolas individuais desde o desmame até o estágio adulto, recebendo as respectivas dietas das progenitoras. A atividade motora circadiana geral dos animais foi analisada por 15 semanas numa sala com ruído atenuado, temperatura controlada e água e comida num regime *ad libitum* por 24 horas. Os resultados mostraram que o tratamento com a dieta experimental foi capaz de reduzir a atividade motora durante a fase de claro ( $p < 0,01$ ) e aumentar o tempo para a ressincronização a um atraso de fase de 6 horas no ciclo claro-escuro ( $p < 0,05$ ) nos animais jovens. No estágio adulto, a partir dos 84 dias de idade, animais tratados com a dieta experimental não sincronizaram a atividade motora ao ciclo claro-escuro ( $p < 0,01$ ) e, após os 105 dias, mostraram um período maior em condições de livre-curso ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao controle. Tais resultados estão de acordo com a idéia de que a organização funcional do sistema de temporização circadiana pode ser modificada pela composição lipídica da dieta e enfatizam um papel modulador tanto dos

ácidos graxos essenciais poliinsaturados quanto dos saturados na sincronização circadiana induzida pela luz.

*Palavras-chave:* desenvolvimento cerebral, ritmo circadiano, ácido docosaexaenóico, atividade motora, nutrição, ácidos graxos poliinsaturados.

**Dietary essential fatty acid restriction associated to high levels of saturated fatty acids affects circadian parameters of the motor activity in rats**

Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Lima, R. R. M.<sup>2</sup>, Freitas, L. M.<sup>2</sup>, Carneiro, B. T. S.<sup>3</sup>, Araújo, J. F.<sup>3</sup>, Navarro, D. M.A. F.<sup>4</sup>, Santos, G. K. N.<sup>4</sup>, Silva, V. L.<sup>5</sup> Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>

- 1) Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió (AL), Brazil.
- 2) Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brazil.
- 3) Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brazil.
- 4) Departamento de Química Fundamental- Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brazil.
- 5) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brazil.

Running title: Circadian motor activity in essential fatty acid deficient rats

Text pages: 19

Tables: 3

Figures: 8

Corresponding author:

Dr. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa

Depto. de Morfologia

Centro de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Cidade Universitária, Natal, RN, Brazil.

Phone: 55-84-32153431

FAX: 55-84-32119207

E-mail: [mstela@cb.ufrn.br](mailto:mstela@cb.ufrn.br)

## ABSTRACT

A diet containing coconut oil as the only source of lipids has been used as an experimental model of essential fatty acid deficiency due to reduced contents in both linoleic and alpha-linolenic acids and high levels of saturated fatty acids. It has been shown that this type of dietary treatment induces metabolic changes and modifications in the fatty acid profile of muscle, adipose tissue and liver which are peripheral clocks. The present study was conducted in order to test the hypothesis that this nutritional condition from early developmental stages until adult age may modify the endogenous expression of circadian rhythmicity, photoentrainment and response to phase shift of the rat general motor activity. Wistar rat dams fed diets containing 5% fat either from soybean oil (control) or coconut oil (experimental) from mating until lactation period. Male pups of each group were randomly sampled from different litters, housed in individual cages from weaning until the adult stage, receiving their respective dams' diets. General circadian motor activity of the animals was analyzed for 15 weeks in a room with attenuated noise, controlled temperature, water and food *ad libitum* for 24 hours. The results showed that the treatment with the experimental diet was able to reduce the motor activity during the light phase ( $p < 0.01$ ) and increase time for re-entrainment to a 6 h phase delay in the light-dark cycle ( $p < 0.05$ ) in the young animals. At adult stage, from 84 days of age, animals treated with the experimental diet did not synchronize the motor activity to the LD cycle ( $p < 0.01$ ) and, after 105 days of age, showed an increased period in free running conditions ( $p < 0.05$ ), when compared to control. Such results are in agreement with the assumption that functional organization of the circadian timing system can be modified by the dietary lipid composition and emphasize a modulator role of essential polyunsaturated as well as saturated fatty acids on light induced circadian synchronization.

**Key words:** brain development, circadian rhythm, docosahexaenoic acid, motor activity, nutrition, polyunsaturated fatty acids.

## INTRODUCTION

Some aspects concerning effects of dietary lipid composition on biological rhythms have been currently investigated by several authors (Mendoza, 2006; Kohsaka et al., 2007; Lavalie et al., 2008; Mendoza et al., 2008). Metabolic diseases related to hypercaloric feeding have been associated with modifications on many of these rhythms, especially those involving glucose metabolism (Bray and Young, 2006; Hastings et al., 2007; Cano et al., 2008) and with diet containing high levels of saturated fat, for promoting modifications in the body temperature and locomotor activity rhythms (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008). Caloric restriction is also able to modify the internal synchronization of the circadian system, inducing phase advance in several rhythms (Challet et al., 1997) or modifying the temporal organization of suprachiasmatic nucleus and its circadian responses to light (Mendoza et al., 2005).

Balanced levels of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are fundamental for the brain and body functions, considering the structural and metabolic role of these fatty acids in several organs and systems (Uauy and Dangour, 2006). Dietary availability of essential fatty acids (EFA) from n-3 and n-6 families such as  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) and linoleic acid (LA, 18:2n-6) during the prenatal/neonatal period is necessary for optimal development of the central nervous system, especially because they are precursors of the long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA), present in high concentrations in the brain membrane phospholipids (Bourre, 2006; Koletzko et al., 2008). A chronic dietary deficiency in EFA induces neurochemical modifications in the brain at the cellular level or in several aspects of behavior (Yavin, 2006; Fedorova and Salem, 2006). Low DHA levels have been associated with decreased visual acuity and suboptimal cognitive and motor skills (for review, see

Bourre, 2006; McNamara and Carlson, 2006). Furthermore, retinal phospholipid turnover involved with the functional activity of rods (Ikemoto et al., 2000b), the brightness discrimination and retinal electrophysiological activity can be affected by n-3 PUFA deficiency in several species, including humans (Neuringer et al., 1988; Okuyama et al., 2001; Diau et al., 2003; Jeffrey et al., 2002; SanGiovanni and Chew, 2005).

Despite the admitted importance to the photosensitive system of the retina, few studies have investigated the role of EFA on the circadian timing system. Senescence-accelerated mice (SAMP8) submitted to a dietary ALA-deficiency for 7 months showed increased spontaneous motor activity in both diurnal and nocturnal phases (Umezawa et al., 1995). It has been also shown that n-3 fatty acids may play a critical role in regulating the pineal gland. For example, *in vitro* studies reported that the dietary ALA-deficiency reduces the melatonin release in cultured pineal gland (Gazzah et al., 1993). Moreover, *in vivo* studies using the same dietary deficiency showed increased endogenous daytime melatonin level in the pineal gland (Zhang et al., 1998) and reduced the urinary melatonin excretion during the nighttime in rats (Zaouali-Ajina et al., 1999). Recent evidence in Syrian hamsters also demonstrated that a dietary n-3 PUFA deficiency lessens the melatonin rhythm and induces locomotor hyperactivity associated to modifications on the dopaminergic neurotransmission in the striatum (Lavialle et al., 2008). Furthermore, changes in the expression of glucose transporters were observed in endothelial cells and neurons of suprachiasmatic nucleus, which has been discussed as a potential effect of n-3 PUFA deficiency on energy metabolism of this nucleus (Ximenes da Silva et al., 2002).

Taken together, these findings suggest that the functional organization of the circadian timing system can be modified by the dietary lipid composition, and emphasizes a modulator role of n-3 LC-PUFA. Nevertheless, recent evidence has indicated that the supplementation of a balanced diet with coconut oil can increase the spontaneous locomotor activity of rats at

postnatal day 13, suggesting that the fatty acid profile of this oil, *per se*, can modify this type of activity in early postnatal development (Borsonelo et al., 2011). The present study was conducted in order to test the hypothesis that a diet containing coconut oil as the only source of lipids may modify the endogenous expression of circadian rhythmicity, photoentraining and response to phase shift of the rat general motor activity at young and adult stages. Such diet has been used as an experimental model of EFA deficiency due the low contents in both linoleic and alpha-linolenic acids and high levels of saturated fatty acids (Hargrave et al., 2005; Ling et al., 2010).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and diets**

Adult female Wistar rats weighing 200-250 g were maintained from mating and throughout pregnancy and lactation on a control diet or an experimental diet which is commonly used to induce EFA-deficiency (Hargrave et al., 2005; Ling et al., 2010), which differed only by the lipid composition. The control diet contained 5% of soybean oil, with adequate amounts of both  $\alpha$ -linolenic and linoleic acids and balanced levels of saturated and monounsaturated fatty acids. The experimental diet contained 5% of coconut oil with higher levels of saturated and monounsaturated fatty acids and reduced levels of  $\alpha$ -linolenic (~12 times reduction) and linoleic (~7 times reduction) acids as compared to the control one. The composition and the fatty acid profile of these diets are shown in Tables 1 and 2 respectively. After weaning on postnatal day (P) 21, male pups were fed *ad libitum* the same diet as the mothers and divided into two main groups according to the nutritional condition: control rats (C) and EFA deficient rats (EFAD).

Please insert tables 1 and 2 around here

### **Behavioral recording of circadian motor activity**

Animals of each group were sampled randomly from different litters, housed in individual cages from P21 to P125, totaling 105 days (as illustrated in Figure 1) in a room with attenuated noise, controlled temperature at  $21 \pm 2$  °C and water and food available for 24 hours. Motor activity of the animals was analyzed for 15 weeks according to the following



protocol: first, animals were exposed for two weeks to an light/dark (LD) cycle of 24 hours (12:12, lights on at 17:00 h) and the luminance level was 150 lux during the light phase and 1 lux during the dark phase; after that, the animals were submitted to phase-delayed LD cycle when lights-on was delayed by 6 hours (12:12; lights on at 23:00 h). Three weeks later, the animals were placed in constant dark conditions (DD) for four weeks; returned to LD 12:12 (lights on at 17:00 h) for more three weeks and then again to constant dark conditions (DD) for three weeks.

Please insert figure 1 around here

General circadian motor activity of the rats was assessed using an infrared motion sensor which was placed above each cage to continuously record the animal's movement in 5 min intervals and stored in a computer by means of the Aschoff system (Laboratório de Neurobiologia e Ritmos Biológicos no Departamento de Fisiologia, UFRN). Analysis of rhythm characteristics and plotting of actograms and periodograms at modulo 24 h were undertaken using the El Temps computer software (Diez Noguera®). The period of the motor activity rhythm under LD or DD conditions was computed by the chi-square periodogram procedure (Sokolove and Bushell, 1978). Under DD, the onset of activity, designated as circadian time (CT) 12, was used as the phase reference point for the onset of the subjective night. The maintenance and use of experimental animals complied with the principles regarding the care and use of animals of the ethical requirements approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Prot. n. ° A-006/07- 299/2007).

## **Analysis of body and brain weights**

The analysis of body weight of all the animals used in this study was done in the weaning day (at P21) and after the recording of circadian motor activity at P125. After these experiments, the rats were deeply anesthetized with a mix of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (~10 mg/Kg) and perfused transcardially, first with 0.9% NaCl followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). After perfusion, the brains were dissected and then postfixed for 2 h in the same fixative, rinsed in PB and weighed in precision balance (wet weight).

## **Statistics**

Statistical analysis was carried out using ANOVA followed by the post-hoc Tukey test to compare motor activity with cycle phase and levels as factors. Due to differences of sensitivity between sensors, each animal was analyzed individually. Analysis of the body and brain weights was done with ANOVA followed by the Friedman test. Statistical significance was accepted at the 95% confidence level ( $p = 0.05$ ) for comparison between the groups.

## RESULTS

### Body and Brain Weights

Data on body and brain weights are presented in Table 3. As can be seen in this table, there is significant reduction on the body weight of the EFAD animals at P21 ( $p < 0.003$ ) and also at P125 ( $p < 0.012$ ); on the other hand, no significant difference was detected in the brain weight or in the brain/body weight ratio between the groups.

Please insert table 3 around here

### General Circadian Motor Activity

#### *During first LD cycle*

The general motor activity registered in the control group during the dark (scoto) phase increased from P28 to P33 when compared to early stages (P24-P27); such tendency was not observed in the EFAD (coconut) group. Figure 2A compares data of both groups. Although a slight increase in daily amount of motor activity was observed in the EFAD group at P24, P25 and P26, no significant difference was detected between the groups in these stages. However, a significant increase in the motor activity of EFAD group was observed at P27 ( $p < 0.01$ ) and P28 ( $p < 0.05$ ), compared to the control (soya). From P29 to P33, a slight decrease in the motor activity was observed in the EFAD group, but no significant difference was detected between the groups.

During the photophase, the motor activity of the EFAD group decreased in comparison to the control group, being significantly lower ( $p < 0.05$ ) from P28 to P33; no significant difference was detected in the previous postnatal days (Fig. 2B).

Please insert figure 2 around here

Figure 3 shows the total daily amount of motor activity from P24 to P33 in the scotophase, photophase and combined data of both phases. During the scotophase, despite the significant increase in the motor activity observed in the EFAD group at P27 and P28 (as seen at figure 2A), no significant difference between the groups was observed in the total motor activity of this period. On the other hand, a significant reduction in the motor activity was observed in the total photophase of EFAD group ( $p < 0.05$ ) which reflects modifications in this circadian rhythm since P28 until P33. The sum of total motor activity in photo plus scoto phases was similar between the groups.

Please insert figure 3 around here

#### ***During phase – delayed LD cycle***

Figure 4 depicts representative actograms of motor activity of both groups and shows that the resynchronization of motor activity rhythm to a 6-h phase delay of light onset in the 12:12 LD cycle from P35-P55 occurred more slowly in EFAD animals ( $5.75 \pm 0.25$  days) than in controls ( $3.75 \pm 0.25$  days;  $p = 0.016$ ). This difference was also found in the phase angle which was ( $1.5 \pm 0.08$  and  $2.0 \pm 0.11$ ,  $p < 0.05$ ) in the control and EFAD groups respectively.

Please insert figure 4 around here

During the synchronization to this new cycle, the daily total motor activity in the EFAD group from P45 to P55 in the photophase was ~60% lower than in the control group ( $p < 0.01$ ), but no difference between the groups was detected in the scotophase (Fig. 5).

Please insert figure 5 around here

### ***During Free-running rhythm***

After the resynchronization during the phase – delayed LD cycle, rats fed the control or EFAD diets showed similar free-running activity rhythms with respective periods of  $24.31 \pm 0.06$  h and  $24.33 \pm 0.00$  h during 28 days (from P56-P83), as shown in the figure 6.

Please insert figure 6 around here

### ***During second LD cycle followed by free-running rhythm***

The synchronization to a second LD cycle from P84 until P104 was modified by the nutritional condition. While in the control group the overall motor activity was concentrated in the scotophase and the activity period was  $1442 \pm 1.3$  min, in the EFAD group the animals did not resynchronize to this new cycle, with the motor activity occurring in both in the photophase and the scotophase. Daily activity rhythms plotted in double-actograms (Fig. 7) show that the re-entrainment was impaired in EFAD animals, which showed a significant

increase in the period length ( $1478 \pm 9.67$  min;  $p = 0.014$ ) and, after P97, a typical free-running activity.

Please insert figure 7 around here

From P105 both groups were submitted to a new free-running rhythm for 21 days. As shown in the figure 8, a significant increase in the free-running period was observed in the EFAD group ( $24.21 \pm 0.05$  h) when compared to the control group ( $23.97 \pm 0.04$  h;  $p < 0.05$ ).

Please insert figure 8 around here

## DISCUSSION

The present study investigated the effects of an experimental dietary model of EFA deficiency and high levels of saturated fatty acids on the expression of circadian rhythmicity, photoentraining and response to phase shift of the rat general motor activity. The results demonstrated that this dietary treatment during brain development until adult stage induced remarkable modifications in the total motor activity and altered the entrainment of the circadian clock to a LD cycle both in young or adult rats.

In the young rats from P24 to P33, the experimental diet modified the ontogenetic development of the motor activity, increasing daily amount of this activity during the dark phase at P27-P28 and reducing this activity from P28 to P33 during the light phase. These findings indicate that during this stage of development (P24 to P33), the motor circadian rhythm is intensified especially due to a lower level of activity in the light period, suggesting a higher sensitivity of malnourished animals to light. Such results seem to be in agreement with a previous study demonstrating a reduced basal locomotor activity during the light phase in young rats (P28) fed a n-3 PUFA deficient diet (Levant et al., 2006). The experimental dietary treatment adopted in the present study also affected the rate of re-entrainment of motor activity to a 6-h phase delay in the LD cycle, inducing a delay of 2 days for resynchronization. These findings contrast with data previously described for wheel-running activity of n-3 fatty acid-deficient adult hamsters which presented a faster resynchronization of locomotor activity to a similar phase delay (Lavialle et al., 2008). On the other hand, it has been demonstrated that a hypercaloric high-fat diet poor in n-3 PUFA but enriched in saturated fatty acids did not modify the rate of re-entrainment of adult mouse locomotor activity to a light-induced phase delay (Mendoza et al., 2008). Thus, it is possible that the later re-entrainment to shifted LD

cycle detected in the EFAD group could be influenced by the higher levels of saturated and monounsaturated fatty acids in our isocaloric experimental diet.

After re-entrainment to a 6h-phase delay in the LD cycle, the total motor activity in the EFAD group daily photophase was ~60% lower than in the control group, but it was not modified in the scotophase, intensifying the diurnal rhythm of this activity. These results indicate that the effects induced by the experimental diet on the light phase were not transitory or restricted to early stages of development, but increased with the age from P45 until P55. Recent evidence has indicated that treatment with a diet containing coconut oil as the only source of lipids for a short term (from rat weaning at P21 until P51) induces metabolic changes related to modifications in the fatty acid profile of muscle, adipose tissue and liver (Ling et al., 2010), which are peripheral clocks. Such changes are related to lipogenesis and LC-PUFAs interconversions, which are sensitive to the presence of coconut oil saturated fat (Ling et al., 2010). These authors also reported increased triglyceride levels both in the liver and in the serum, indicating modifications in the energy metabolism (Ling et al., 2010). The lipid homeostasis and triglyceride levels show a cyclic pattern allowing animals to adapt their feeding, activity and metabolism to predictable rhythmic cycles (Yang et al., 2009). Moreover, the molecular machinery that generates circadian oscillations matures at different rates in different tissues and the phase of some peripheral clocks is malleable and may shift as the organ function changes during development (Yamazaki et al., 2009). Thus, one could speculate that the repercussions on behavioral activity herein described in young animals between P33 and P55 could be related to potential modifications on the lipid homeostasis of peripheral clocks in the EFAD group. From P56 to P83, the dietary treatment was not able to modify the free-running period of EFAD animals, which expressed the endogenous rhythm of locomotor activity during constant darkness similarly to the control group.



The synchronization to a second LD cycle from P84 until P104 was modified by the nutritional condition in a distinct way to that observed in the young animals. While in the control group the overall motor activity was concentrated in the scotophase, in the EFAD group the motor activity did not synchronize to this new LD cycle and showed an increased period. These findings indicate an increasing and deleterious effect of the dietary treatment on the light-induced circadian synchronization in adult animals, suggesting entrainment disruptions which modify the diurnal rhythm of activity. Such results reinforce the hypothesis that the functional organization of the circadian timing system can be modified by essential fatty acid dietary restriction and also suggest a modulator action of saturated fatty acids in the function of the mammalian circadian clock. A high fat diet containing low levels of n-3 PUFA and enriched with saturated fatty acids is able to modify molecular and neurochemical parameters involved in the temporal synchronization and lipid metabolism as well as can induce adverse effects such as an increase in daily locomotor activity during photophase in adult mice (Kohsaka et al., 2007). Moreover, the same authors also reported that the dietary treatment was able to lengthen the free-running period in a way not related to modifications on body weight induced by the hypercaloric diet. In the present study, even using an isocaloric diet enriched with a distinct saturated fatty acid composition (from vegetal source), our EFAD group had a significant decrease in the body weight, which might be due to application of the coconut oil as the only source of dietary lipids, in agreement with previous studies (Deuel et al., 1954, Soares et al., 1995). About such effect, it is speculated that it might be due to the high fatty acid turnover rates of the saturated medium chain fatty acids, which have a faster oxidation than the long chain fatty acids (Hargrave et al., 2005), and it has also been associated with dysfunction of growth hormone regulation (Soares et al., 1995). In our study we have also observed an increase in the free-running period length associated to the lack of resynchronization to the light-dark cycle in adult animals. Although future studies

will determine the mechanism underlying such effects in adult animals of EFAD group, at least three aspects are of interest concerning the discussion of these data, considering mechanisms involved in the entrainment to LD cycle; coupling among oscillators and transmission of rhythmicity to the effectors (for revision, see Golombek and Rosenstein, 2010).

With respect to the changes in the entrainment to LD cycle, it has been shown that n-3 PUFA dietary restriction can affect several aspects of retinal function related to light sensitivity, including the rod activity (Ikemoto et al., 2000b) and diurnal enzymatic activity in the retina (Ikemoto et al., 2000a), the brightness discrimination and electrophysiological responses in several species (Neuringer et al., 1988; Okuyama et al., 2001; Diao et al., 2003; Jeffrey et al., 2002; San Giovanni and Chew, 2005). Entrainment to LD cycle could also be affected by modifications on the oxidative metabolism of suprachiasmatic nucleus, considering that glucose transport and utilization as well as the cytochrome oxidase activity can be reduced in rats fed n-3 PUFAs deficient diets (Ximenes da Silva et al., 2002). In line with this hypothesis, recent evidence has indicated that the diurnal oscillations in the SCN metabolic activity might be involved in the generation of circadian rhythm (Isobe et al., 2011). Reduction on SCN glial metabolism or in their communication by gap junctions can also disrupt the circadian locomotor rhythm (Prosser et al., 1994). Adequate levels of DHA are necessary to increase gap junction coupling in astrocytes (Champeil-Potokar et al, 2006), and the lipid composition of coconut oil can impair the astrocyte maturation (Joardar et al., 2006). Recent experiments of our lab have indicated that the dietary treatment used in the present work is able to modify the astrocyte differentiation in some nuclei from circadian temporization system (unpublished results).

The coupling among SCN and other oscillators as well as transmission of rhythmicity to the effectors could also be affected in the EFAD group. It is well established that the

intense output of SCN to other regions are necessary for organizing several circadian rhythms, including locomotor activity (Saper et al., 2005). Likewise, outputs from SCN to pineal gland via autonomic pathways are important to synchronize some behavioral and metabolic rhythms to the LD cycle (Warren and Cassone, 1995).

Thus, a potential factor to be taken into account for the disturbances induced by the experimental diet is the activity of the pineal gland. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that the ALA-dietary restriction reduces the urinary melatonin excretion during the nighttime in rats (Zaouali-Ajina et al., 1999) and the pineal gland melatonin release (Gazzah et al., 1993; Zhang et al., 1998). Recent evidence in adult hamsters also demonstrated that reduced dietary levels of ALA lessen the melatonin daily rhythm and increase locomotor activity in both the photophase and scotophase (Lavialle et al. 2008).

Serotonergic outputs from raphe nuclei to SCN can also interact with light-dependent mechanisms and modulate the photic synchronization (for revision, see Golombek and Rosenstein, 2010). Recent studies have shown that during the perinatal period, reduced levels of DHA can impair the normal development and function of the rat serotonin pathways (McNamara et al., 2009). Thus, we cannot discard the possibility that the dietary treatment adopted in the present study affected this neurotransmission system in the SCN. Nevertheless, future studies are necessary to address this issue.

There also is the possibility that changes in the DHA levels on the hypothalamus or other brain regions might interfere in the synchronization to the LD cycle, since a reduction of these levels was described in studies of locomotor behavior with adult and young rats and sex-specific (Levant et al., 2004; Levant et al., 2006) and other behaviors involved with the deficiency of n-3 LC-PUFAs (for revision, see McNamara e Carlson, 2006). However, additional studies are needed for a better understanding about this question.

## **CONCLUSION**

The results of the present study corroborates the assumption that functional organization of the circadian timing system can be modified by the dietary lipid composition and emphasizes a modulator role of n-3 and n-6 LC-PUFA, as well as contribution of saturated fatty acids in induced modifications in the light-induced temporal synchronization.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Miriam Regina Celi de Oliveira Costa, Zenira Cosme Xavier, for technical assistance, and José Flávio Coutinho, for veterinary care. The acquisition of the reagents used in this work was supported by the financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq; Projeto Casadinho 620248 / 2004-1) and FAPERN. Financial support provided by CAPES and FAPEAL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Borsonelo EC, Suchecki D, Calil HM, Galduróz JCF (2011) Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. *Int. J. Devl Neuroscience* 29: 521–527.
- Bourre JM (2006) Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2: macronutrients. *J Nutr Health Aging* 10:386-399.
- Bray MS and Young ME (2006) Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev* 8:169-181.
- Cano P, Jiménez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali D, and Esquifino AI (2008) Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33:118-125.
- Challet E, Pévet P, Vivien-Roels B, and Malan A (1997) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12: 65-79.
- Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavialle M, Denis I (2006) Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. *European Journal of Neuroscience* 24: 3084–3090.
- Deuel HJ, Alfin-Slater Jb EB, Wells AF, Krydeh GD, Aftergood L (1954) The effect of fat level of the diet on general nutrition. *J Nutr* 55: 337-346.
- Diau G-Y, Loew ER, Wijendran V, Sarkadi-Nagy E, Nathanielsz PW, and Brenna JT (2003) Docosahexaenoic and arachidonic acid influence on preterm baboon retinal composition and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4559-4566.
- Fedorova I and Salem Jr N (2006) Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 271-289.
- Gazzah N, Gharib A, Delton I, Molière P, Durand G, Christen R, Lagarde M, and Sarda N (1993) Effect of an n-3 fatty acid-deficient diet on the adenosine-dependent melatonin release in cultured rat pineal. *J Neurochem* 61: 1057-1063.
- Golombek DA and Rosenstein RE (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063-1102.
- Hargrave KM, Azain MJ, and Miner JL (2005) Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1737:52-60.
- Hastings M, O'Neill JS, and Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195:187-198.
- Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, Okuyama H (2000a) Diurnal rhythms of retinal phospholipid synthetic enzymes are retained but their activities are decreased in rats under  $\alpha$ -linolenic acid deficiency. *Arch Biochem Biophys* 383:108-113.
- Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, Okuyama H (2000b) Lysosomal enzyme activities are decreased in the retina and their circadian rhythms are different from those in the pineal gland of rats fed an  $\alpha$ -linolenic acid-restricted diet. *J Nutr* 130: 3059–3062.

- Isobe Y, Hida H, Nishino H (2011) Circadian rhythm of metabolic oscillation in suprachiasmatic nucleus depends on the mitochondrial oxidation state, reflected by cytochrome c oxidase and lactate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience Research* 89: 929–935.
- Jeffrey BG, Mitchell DC, Gibson RA, and Neuringer M (2002) n-3 fatty acid deficiency alters recovery of the rod photoresponse in Rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2806–2814.
- Joardar A, Sen AK, Das S (2006) Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and beta-adrenergic transmission in astrocytes. *Journal of Lipid Research* 47: 23–33.
- Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, and Bass J (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6:414–421.
- Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, Decsi T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Holzgreve W, Lapillonne A, Putet G, Secher NJ, Symonds M, Szajewska H, Willatts P, and Uauy R (2008) The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 36:5–14.
- Lavialle M, Champeil-Potokar G, Alessandri JM, Balasse L, Guesnet P, Papillon C, Pévet P, Vancassel S, Vivien-Roels B, and Denis I (2008) An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. *J Nutr* 138:1719–1724.
- Levant B, Ozias MK, Carlson SE (2006) Sex-specific effects of brain LC-PUFA composition on locomotor activity in rats. *Physiol Behav* 89:196–204.
- Levant B, Radel JD, Carlson SE (2004) Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats that are differentially affected by dietary remediation. *Behav Brain Res* 152:49–57.
- Ling P-R, De Leon CE, Le H, Puder M, and Bistrrian BR (2010) Early development of essential fatty acid deficiency in rats: fat-free vs. hydrogenated coconut oil diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83:229–237.
- McNamara RK, Able J, Liu Y, Jandacek R, Rider T, Tso P, Lipton JW (2009) Omega-3 fatty acid deficiency during perinatal development increases serotonin turnover in the prefrontal cortex and decreases midbrain tryptophan hydroxylase-2 expression in adult female rats: Dissociation from estrogenic effects. *Journal of Psychiatric Research* 43: 656–663.
- McNamara RK and Carlson SE (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:329–49.
- Mendoza J (2006) Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19:127–137.
- Mendoza J, Pévet P, and Challet E (2008) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* 586.24:5901–5910.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pévet P, and Challet E (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25:1514–1522.

- Neuringer M, Anderson GJ, and Connor WE (1988) The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* 8:517-41.
- Okuyama H, Ohishi M, Fukuma A, Sato Y, Ikemoto A, and Fujii Y (2001) alpha-linolenate-deficiency-induced alterations in brightness discrimination learning behavior and retinal function in rats. *World Rev Nutr Diet* 88: 35-40.
- Prosser RA, Edgar DM, Heller HC, Miller JD (1994) A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Research* 643: 296-301.
- SanGiovanni JP and Chew EY (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Ret Eye Res* 24: 87-138.
- Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in Neurosciences* 28(3): 152-157.
- Soares MC, Aléssio ML, Léger CL, Bluet-Pajot MT, Clauser H (1995) Effect of essential fatty acid deficiency on membrane fatty acid content and growth hormone stimulation of rat pituitaries during postnatal development. *J Lipid Res* 36(6): 1401-1406.
- Sokolove PG, Bushell WN (1978) The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72: 131-160.
- Uauy R and Dangour AD (2006) Nutrition in brain development and aging: Role of essential fat acids. *Nutr Rev* 64: 24-33.
- Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, and Takeda T (1995) Dietary  $\alpha$ -linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res* 669: 225-233.
- Warren W.S.; Cassone, V.M. (1995). The pineal gland: Photoreception and coupling of behavioral, metabolic and cardiovascular circadian outputs. *J. Biol. Rhythms* 10: 64-79.
- Ximenes da Silva A, Lavielle F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri J-M, and Lavielle M (2002) Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* 81: 1328-1337.
- Yamazaki S, Yoshikawa T, Biscoe EW, Numano R, Gallalpsy LM, Soulsby S, Papadimas E, Pezuk P, Doyle SE, Tei H, Sakaki Y, Block G, and Menaker M (2009) Ontogeny of the circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms* 24:55-63.
- Yang X, Zhang Y-KJ, Esterly N, Klaassen CD, Wan Y-JY (2009) Gender disparity of hepatic lipid homeostasis regulated by the circadian clock. *J Biochem* 145:609-623.
- Yavin E (2006) Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:203-211.
- Zaouali-Ajina M, Gharib A, Durand G, Gazzah N, Claustrat B, Gharib C and Sarda N (1999) Dietary docosahexaenoic acid-enriched phospholipids normalize urinary melatonin excretion in adult (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient rats. *J Nutr* 129:2074-2080.
- Zhang H, Hamilton JH, Salem N Jr and Kim H-Y (1998) N-3 fatty acid deficiency in the rat pineal gland: effects on phospholipid molecular species composition and endogenous levels of melatonin and lipoxygenase products. *J Lipid Res* 39:1397-1403.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Experimental lighting conditions over the 105 days registration of motor activity of the rats. Post-natal days from P21 to P125.

**Figure 2.** In A, soya and coconut comparative analysis of motor activity during the scotophase in the first LD cycle among the post natal days 24 to 33. The animals were maintained in light-dark cycle (12:12) with luminosity 150:1 lux, respectively. ANOVA *post hoc* Turkey test (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,05$ ). In B, soya and coconut comparative analysis of motor activity during the photophase in the first LD cycle among the post natal days 24 to 33. ANOVA *post hoc* Tukey test (\* $p < 0,05$ ).

**Figure 3.** Soya and coconut comparative analysis of general daily motor activity among the post natal days 24 to 33. The animals were maintained in light-dark cycle (12:12) with luminosity 150:1 lux, respectively. ANOVA *post hoc* Tukey test (\* $p < 0,05$ ).

**Figure 4.** Actograms of motor activity of soya (left panel) and coconut (right panel) groups in the resynchronization to 6-h phase delay of light onset in the 12:12 LD cycle ( $5.75 \pm 0.25$  days for the EFAD group,  $3.75 \pm 0.25$  days for the control group). The gray shadow represents the dark phase. The arrow indicates the first day phase delay. The solid line indicates dark onset and the rectangle highlights the interval in days where resynchronization occurs. ANOVA *post hoc* Tukey test (\* $p = 0.016$ ).

**Figure 5.** Soya and coconut comparative analysis of general daily motor activity after the 6-h phase delay and the resynchronization days (P45-55 for the EFA and EFAD groups). Motor activity during the photophase was ~60% lower in the EFAD group. ANOVA *post hoc* Tukey test (\* $p < 0,01$ ).



**Figure 6.** Soya ( $24.31 \pm 0.06$  h) and coconut  $24.33 \pm 0.00$  comparative analysis of the free running activity in constant darkness (P56-P83). ANOVA *post hoc* Tukey test ( $p > 0,05$ ).

**Figure 7.** Actograms (upper panels) and periodograms (lower panels) of soya (left panels) and coconut (right panels) groups during the second LD cycle. The arrow indicates the day of return to initial conditions (LD 12:12, lights on 17 h). The EFAD group (period  $1478 \pm 9.67$ min) does not synchronize to the LD cycle and at P97 it shows a free-running pattern, while the EFA group (period  $1442 \pm 1.3$  min) is synchronized under the new conditions. ANOVA *post hoc* Tukey test ( $*p = 0,014$ ).

**Figure 8.** Soya ( $23.97 \pm 0.04$  h) and coconut ( $24.21 \pm 0.05$  h) comparative analysis of the free running activity in constant darkness (P105 to P125). ANOVA *post hoc* Tukey test ( $*p < 0,05$ ).



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



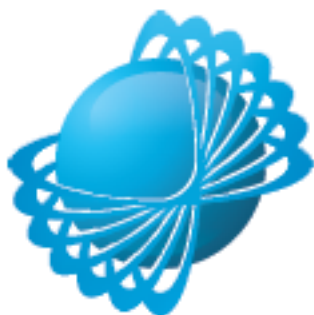
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br





**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br

## **AUTOR CONTRIBUTIONS**

Conceived and designed the experiments: Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Araújo, J. F.<sup>3</sup>, Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>.

Performed the experiments and took care of the animals: Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Freitas, L. M.<sup>2</sup>, Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>.

Byochemical analysis of the fatty acids: Navarro, D. M.A<sup>4</sup>. F., Santos, G. K. N.<sup>4</sup>, Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>.

Data analysis: Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Lima, R. R. M.<sup>2</sup>, Carneiro, B. T. S.<sup>3</sup>, Araújo, J. F.<sup>3</sup>, Silva, V. L.<sup>5</sup>, Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>.

Article writing: Gouveia, K. M. M.<sup>1,2,3</sup>, Silva, V. L.<sup>5</sup>, Andrade da Costa, B. L. S.<sup>5</sup>, Costa, M. S. M. O.<sup>2</sup>.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, analisados à luz dos dados da literatura, nos permitiram concluir que animais submetidos a dieta deficiente em ácidos graxos essenciais com alto teor de ácidos graxos saturados, durante os períodos gestacional e de aleitamento até a idade adulta, apresentam com relação a controles com dieta sem essa deficiência:

1. Aumento da atividade motora durante a escotofase nas idades P27 a P28;
2. Decréscimo da atividade motora na fotofase nas idades P28 a P33;
3. Sincronização ao ciclo claro-escuro inicial sem alterações;
4. Aumento do tempo necessário em dias para ressincronização ao ciclo claro-escuro após atraso de fase de 6 horas;
5. Expressão do período em livre-curso sem alterações iniciais;
6. Incapacidade para ressincronizar a um segundo ciclo claro-escuro após livre-curso.

Os resultados sugerem que a organização funcional do sistema de temporização circadiana pode ser modificada por restrição de ácidos graxos essenciais na dieta, bem como pelo teor de ácidos graxos saturados.

Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes a esses eventos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Acar N, Chardigny J-M, Darbois M, Pasquis B, Sébédio J-L (2003) Modification of the dopaminergic neurotransmitters in striatum, frontal cortex and hippocampus of rats fed for 21 months with trans isomers of alfa-linolenic acid. *Neurosci Res* 45: 375-382.
- Ahmad A, Moriguchi T, Salem N (2002) Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr Neurol* 26: 210-218.
- Ahmad SO, Park J-H, Radel JD, Levant B (2008) Reduced numbers of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area of rats and n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: A stereological study. *Neurosci Lett* 438: 303-307.
- Aid S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Lavielle M (2003) Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res* 44: 1545-1551.
- Almeida SS, Duntas LH, Dye L, Nunes, ML, Prasad C, Rocha JB, Wainwright P, Zaia CT, Guedes RC (2002) Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr Neurosci* 5: 311-320.
- Antalis CJ, Stevens LJ, Campbell M, Pazdro R, Ericson K, Burgess JR (2006) Omega-3 fatty acid status in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot Ess Fatty Acids* 75: 299-308.
- Armstrong VT, Brzustowicz MR, Wassal SR, Jenki LJ, Stillwell W (2003) Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys* 414: 74-82.
- Barber MD, Fearon KC, Ross JA (2005) Eicosapentaenoic acid modulates the immune response but has no effect on a mimic of antigen-specific responses. *Nutrition* 21: 588-593.
- Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C (1998) Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr Res* 44: 201-209.
- Borba JMC, Rocha-de-Melo AP, dos Santos AA, Andrade da Costa BLS, da Silva RP, Passos PP, Guedes RCA (2010) Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. *Nutr Neurosci* 3: 144-150.
- Borsonelo EC, Suchecki D, Calil HM, Galduróz JCF (2011) Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. *Int J Devl Neurosci* 29: 521-527.
- Bourre J (2005) Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging* 9: 31-38.
- Bourre JM, Dumont O, Clément M (2006) Fatty acid alterations in liver peroxisomes from n-3-deficient mice. *Ann Nutr Metab* 50: 214-218.

---

\* De acordo com as normas da revista *Journal of Biological Rhythms*.

- Bourre JM, Piciotti M, Dumont O, Pascal G, Durand G (1990) Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs: minimal requirements of linoleic acid. *Lipids* 25(8): 465–472.
- Bourre JM, Durand G, Pascal G, Youyou A (1989) Brain cell and tissue recovery in rats made deficient in n-3 fatty acids by alteration of dietary fat. *J Nutr* 119: 15-22.
- Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N Jr, Cicchetti F, Calon F (2008) Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 22: 1213-1225.
- Bray MS, Young ME (2006) Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev* 8: 169-181.
- Burdge GC, Dunn RL, Wootton SA, Jackson AA (2002) Effect of reduced dietary protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentrations in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *Br J Nutr.* 88: 379-387.
- Calderon F, Kim H-Y (2004) Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 90: 979-988.
- Calon F, Lim GP, Morihara T, Yang F, Ubeda O, Salem N, Frautschy SA, Cole GM (2005) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 22: 617-626.
- Calon F, Um GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM (2004) Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43: 633-645.
- Cano P, Jiménez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali D, Esquifino AI (2008) Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33: 118-125.
- Cansev M, Ulus IH, Wang L, Maher TJ, Wurtman RJ (2008) Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 62: 206-209.
- Carlson SE, Clandinin MT, Cook HW, Ernken EA, Filer LJ (1997) Trans fatty acids: infant and fetal development. *Am J Clin Nutr* 66: 715-736.
- Carlson SE, Werkman SH, Tolley EA (1996) Effect of long chain n-3 fatty acid supplementation on visual acuity and growth of preterm infants with and without broncho pulmonary dysplasia. *Am J Clin Nutr* 63: 687-697.
- Cassone VM, Speh JC, Card JP, Moore RY (1988) Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 3: 71-91.
- Carneiro BTS, Fortes FS, Araujo JF (2010) Anticipatory behavioral rhythm to scheduled glucose availability in rats. *Sleep Sci* 3(1): 27-31.
- Cavalcante JS, Nascimento Jr, ES, Costa MSMO (2006) Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: o núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculado. *Neurociência* 3: 273-282.



- Challet E, Pévet P, Vivien-Roels B, Malan A (1997) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12: 65-79.
- Chalon S (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 259-269.
- Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peraçoli AM (1995) The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res* 691: 133-141.
- Clifford JJ, Drago J, Natoli L, Wong JYF, Kinsella JL, Waddington JL, Vaddadi KS (2002) Essential fatty acids given from conception prevent topographies of motor deficit in a transgenic model of Huntington's disease. *Neuroscience* 109: 81-88.
- Collison LW, Collison RE, Murphy EJ, Jolly CA (2005) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase T-lymphocyte phospholipid mass and acyl-CoA binding protein expression. *Lipids* 40: 81-87.
- Colombo J (2001a). The development of visual attention in infancy. *Annu Rev Psychol* 52: 337-367.
- Colombo J (2001b) Recent advances in the assessment of infant cognition: Implications for LC-PUFA supplementation studies. *Lipids* 36: 919-926.
- Costa MSMO, Moreira LF, Alones V, Lu J, Santee UR, Cavalcante JS, Moraes PRA, Britto LRG, Menaker M (1998) Characterization of the circadian system in a brazilian species of monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical analysis and retinal projections. *Biol Rhythm Res* 29: 510-520.
- Das UN (2004) Can perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids prevent schizophrenia in adult life? *Med Sci Monitor* 10: 33-37.
- Das UN (2006) Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biothechnol J* 1: 420-439.
- Decsi T, Szász M, Sárkány I, Botykai A, Berthold K (1996) Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids on arachidonate and docosahexaenoic acid in healthy infants in the first four months of life. *Orv Hetil* 137: 2089-2092.
- de Groot RHM (2003) Fatty acids, pregnancy, and cognition. Maastricht: NP, 153p.
- de la Presa OS, Innis SM (1999) Docosahexaenoic and arachidonic acid prevent a decrease in dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in piglets frontal cortex caused by a linoleic and alpha linolenic acid deficient diet in formula-fed piglets. *J Nutr* 129: 2088-2094.
- de la Presa OS, Innis SM (2000) Diverse, region-specific effects of addition of arachidonic and docosahexanoic acids to formula with low or adequate linoleic and alpha-linolenic acids on piglet brain monoaminergic neurotransmitters. *Pediatr Res* 48: 125-130.
- Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Besnard J-C, Durand G (1996) Alpha-linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J Neurochem* 66: 1582-1591.
- Diau GY, Loew ER, Wijendran V, Sarkadi-Nagy E, Nathanielsz PW, Brenna JT (2003) Docosahexaenoic and arachidonic acid influence on preterm baboon retinal composition and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4559-4566.

Dijck-Brouwer DAJ, Hadders-Algra M, Bouwstra H, Decsi T, Boehm G, Martini IA, Boersma ER, Muskiet FAJ (2005a) Lower fetal status docosahexaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty acids is associated with less favorable neonatal neurological condition. *Essent Fatty Acids* 72: 21-28.

Dijck-Brouwer DAJ, Hadders-Algra M, Bouwstra H, Decsi T, Boehm G, Martini IA, Boersma ER, Muskiet FAJ (2005b) Impaired maternal glucose homeostasis during pregnancy is associated with low status of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCP) and essential fatty acids (EFA) in the fetus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 85-87.

Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, García-Hernandez F, Fernández-Cancino F, Bermudez-Rattoni F (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311: 353-357.

Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT (2007) Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 28: 424-439.

Eberhardt O, Schulz JB (2003) Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett* 139: 135-151.

Edelstein K, Amir S (1999) The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. *J Neurosci* 19: 372-380.

Eldho NV, Feller SE, Tristram-Nagle S, Polozov IV, Gawrisch K (2003) Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acid-differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. *J Am Chem Soc* 125: 6409-6421.

Erriquez J, Gilardino A, Ariano P, Munaron L, Lovisollo O, Distasi C (2005) Calcium signals activated by arachidonic acid in embryonic chick ciliary ganglion neurons. *Neurosignals* 14: 244-254.

Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS (2003) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr* 133: 1913-1920.

Fedorova I, Alvheim AR, Hussein N, Salem N Jr (2009) Deficit in prepulse inhibition in mice caused by dietary n-3 fatty acid deficiency. *Behav Neurosci* 123: 1218-1225.

Fedorova I, Salem N Jr (2006) Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 271-289.

Gazzah N, Gharib A, Delton I, Molière P, Durand G, Christen R, Lagarde M, Sarda N (1993) Effect of an n-3 fatty acid-deficient diet on the adenosine-dependent melatonin release in cultured rat pineal. *J Neurochem* 61: 1057-1063.

Golombek DA and Rosenstein RE (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90: 1063-1102.

Green DR (2005) Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell* 121: 671- 674.

Green P, Glozman S, Kamensky B, Yavin E (1999) Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 40: 960-966.

Green P, Yavin E (1996) Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. *Lipids* 31: 859-865.

- Greiner RS, Catalan JN, Moriguchi T, Salem N (2003) Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* 38: 431-435.
- Greiner RS, Moriguchi T, Slotnick BM, Hutton A, Salem N (2001) Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol Behav* 72: 379-385.
- Guedes RCA, Amorim LF, Teodósio NR (1996) Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res* 29: 1407-1412.
- Gurevich EV, Joyce JN (2000) The dopamine D3 receptor is selectively and transiently expressed in the developing whisker barrel cortex of the rat. *J Comp Neurol* 420: 35-51.
- Haag M (2003) Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* 48: 195-203.
- Hagen RM, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A (2010) An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP. *FEBS Lett* 584: 2689-2698.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166.
- Hansen HS, Jensen B (1985) Essential function of linoleic acid esterified acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinic acid and alpha-linoleate. *BBA-Bioenergetics* 834: 357-363.
- Harrington ME, Nance DM, Rusak B (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculospinal tract. *Brain Res Bull* 15: 465-472.
- Harrington ME, Nance DM, Rusak B (1987) Double-labeling of neuropeptide Y-immunoreactive neurons which project from the geniculate to the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 410: 275-282.
- Hartman L, Lago RCA (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. *Lab Pract* 22(6): 475-476.
- Hartvigsen MS, Mu H, Hougaard KS, Lund SP, Xu X, Hoy CE (2004) Influence of dietary triacylglycerol structure and level of n-3 fatty acids administered during development on brain phospholipids and memory and learning ability of rats. *Ann Nutr Metab* 48: 16-27.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195: 187-198.
- Heinemann KM, Waldron MK, Bigley KE, Lees GE, Bauer JE (2005) Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than alpha-linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. *J Nutr* 135: 1960-1966.
- Heinrichs SC (2010) Dietary omega-3 fatty acid supplementation for optimizing neuronal structure and function. *Mol Nutr Food Res* 54: 447-456.
- Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM (1972) An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch* 135: 1-26.
- Hickey TL, Spear PD (1976) Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res* 24: 523-529.
- Holman RT, Johnson SB, Hatch TF (1982) A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr* 35: 617-623.

- Horrobin DF (1992) The relationship between schizophrenia and essential fatty acids and eicosanoid production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46: 71-77.
- Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, Okuyama H (2000a) Diurnal rhythms of retinal phospholipid synthetic enzymes are retained but their activities are decreased in rats under  $\alpha$ -linolenic acid deficiency. *Arch Biochem Biophys* 383:108-113.
- Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, Okuyama H (2000b) Lysosomal enzyme activities are decreased in the retina and their circadian rhythms are different from those in the pineal gland of rats fed an  $\alpha$ -linolenic acid-restricted diet. *J Nutr* 130: 3059–3062.
- Innis SM (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res* 30: 39-103.
- Innis SM (2000) The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev Neurosci* 22: 474-480.
- Innis SM (2004) Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol* 554: 27-43.
- Innis SM (2007) Fatty acids and early human development. *Early Hum Dev* 83: 761-766.
- Inouye S -T, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *P Natl Acad Sci USA* 76: 5962-5966.
- Jeffrey BG, Mitchell DC, Gibson RA, Neuringer M (2002) n-3 fatty acid deficiency alters recovery of the rod photoreponse in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 2806-2814.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP (1989) Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Res Bull* 22: 411-422.
- Kim S-J, Zhang Z, Saha A, Sarkar C, Zhao Z, Xu Y, Mukherjee AB (2010) Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. *Neurosci Lett* 479: 292-296.
- Klein DC, Moore RY (1979) Pineal n-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyl transferase: control by retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174: 245-262.
- Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshi C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J (2007) High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6: 414-421.
- Kuperstein F, Eilam R, Yavin E (2008) Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J Neurochem* 106: 662-671.
- Lang-Lazdunski L, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M, Heruteaux C (2003) Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. *J Vasc Surg* 38: 564-575.
- Lavialle M, Champeil-Potokar G, Alessandri JM, Balasse L, Guesnet P, Papillon C, Pévet P, Vancassel S, Vivien-Roels B, Denis I (2008) An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. *J Nutr* 138: 1719-1724.

- Lehman MM, Silver R, Gladstone WR, Kahn MR, Gibson M, Brittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7: 1626-1638.
- Lev N, Melamed E, Offen D (2003) Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 245-250.
- Levant B, Ozias MK, Carlson SE (2007) Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J Nutr* 137: 130-134.
- Lewis DA, Levitt P (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409-432.
- Li D, Weisinger HS, Weisinger RS, Mathai M, Armitage JA, Vingrys AJ, Sinclair AJ (2006) Omega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid depletion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 74: 391-399.
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM (2005) A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 25: 3032-3040.
- Lim SY, Hoshihara J, Salem N Jr (2005) An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *J Neurochem* 95: 848-857.
- Ling P-R, De Leon CE, Le H, Puder M, Bistrrian BR (2010) Early development of essential fatty acid deficiency in rats: fat-free vs. hydrogenated coconut oil diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83: 229-237.
- Lydic R, Albers HE, Tepper B, Moore-Ede MC (1982) Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. *J Comp Neurol* 204: 225-237.
- Marques N, Menna-Barreto L (2003) *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP, 435 p.
- McNamara RK, Carlson SE (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 75: 329-349.
- Medina JM, Taberero A (2002) Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris* 96: 265-271.
- Mendoza J (2007) Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19: 127-137.
- Mendoza J, Pévet P, Challet E (2008) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* 586.24: 5901-5910.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pévet P, Challet E (2005) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25: 1514-1522.
- Moore RY (1999) Circadian Timing. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds.) *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, p.1189-1206.

- Moore RY, Card JP (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* 344: 403-430.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-216.
- Moore RY, Lenn NJ (1972) A retino hypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 1-14.
- Moore-Ede MC (1986) Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* 250: 735-752.
- Moreira JD, Knorr L, Ganzella M, Thomazi AP, Souza CG, Souza DG, Pitta CF, Mello e Souza T, Wofchuk S, Elizabetsky E, Vinadé L, Perry MLS, Souza DO (2010) Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. *Neurochem Int* 56: 753-759.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O (1978) The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav* 2: 137-230.
- Morin LP, Allen CN (2005) The circadian visual system. *Brain Res Rev* 51: 1-60.
- Morley R, Lucas A (1994) Influence of early diet on outcome in preterm infants. *Acta Paediatr* 405 Suppl: 123-126.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J (2003) Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60: 940-946.
- Nascimento Jr ES, Souza APM, Duarte RB, Magalhães MAF, Silva SF, Cavalcante JC, Cavalcante JS, Costa MSMO (2010) The suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the rock cavy (*Kerodon rupestris*): Retinal projections and immunohistochemical characterization. *Brain Res* 1320: 34-46.
- Neuringer M, Anderson G J, Connor WE (1988) The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* 8: 517-541.
- Nishikawa M, Kimura S, Akaike N (1994) Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurones of rat cerebral cortex. *J Physiol* 475: 83-93.
- Oh-I, Shimizu H, Sato T, Uehara Y, Okada S, Mori M (2005) Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metab* 1: 331-341.
- Okuyama H, Ohishi M, Fukuma A, Sato Y, Ikemoto A, Fujii Y (2001) alpha-linolenate-deficiency-induced alterations in brightness discrimination learning behavior and retinal function in rats. *World Rev Nutr Diet* 88: 35-40.
- Otto SJ, de Groot RH, Hornstra G (2003) Increased risk of postpartum depressive symptoms is associated with slower normalization after pregnancy of the functional docosahexaenoic acid status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69: 237-243.
- Polo-Hernández E, De Castro F, García-García AG, Tabernero A, Medina JM (2010) Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development. *J Neurochem* 114: 1756-1766.

- Puskas LG, Kitajka K (2006) Nutrigenomic approaches to study the effects of n-3 PUFA diet in the central nervous system. *Nutr Health* 18: 227-232.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- Ramaprasad TR, Baskaran V, Krishnakantha TP, Lokesh BR (2005) Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid. *Mol Cell Biochem* 277: 19-26.
- Reddy RD, Keshavan MS, Yao JK (2004) Reduced red blood cell membrane essential polyunsaturated fatty acids in first episode schizophrenia at neuroleptic-naive baseline. *Schizophrenia Bull* 30: 901-911.
- Reuss S (2003) The clock in the brain: anatomy of the mammalian circadian timing system. Peschke E (ed.) *Endokrinologie*. Stuttgart: Verlag, p. 9-48.
- Robson LG, Dyall S, Sidloff D, Michael-Titus AT (2010) Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurons throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging* 31: 678-687.
- Salem N Jr, Loewke J, Catalan JN, Majchrzak S, Moriguchi T (2005) Incomplete replacement of docosahexaenoic acid by n-6 docosapentaenoic acid in the rat retina after an n-3 fatty acid deficient diet. *Exp Eye Res* 81: 655-663.
- Sangiovanni JP, Chew EY (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Ret Eye Res* 24: 87-138.
- Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257: 221-239.
- Saste MD, Carver JD, Stockard JE, Benford VJ, Chen LT, Phelps CP (1998) Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pup. *J Nutr* 128: 740-743.
- Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: Use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 97: 1089-1091.
- Shibata S, Moore RY (1988) Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 438: 374-378.
- Silva AT, Costa FBR, Teodosio NR, Cabral-Filho JE, Guedes RCA (1987) Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human basic regional diet of the northeast of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 20: 383-392.
- Sinitzkaya N, Gourmelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, P'evet P, Challet E (2007) Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clin Sci (Lond)* 113: 417-425.
- Skosnik PD, Yao JK (2003) From membrane phospholipid defects to altered neurotransmission: is arachidonic acid a nexus in the pathophysiology of schizophrenia. *Essent Fatty Acids* 69: 367-384.
- Smale L, Boverhof J (1999) The suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet of *Arvicanthis niloticus*, a diurnal murid rodent from east Africa. *J Comp Neurol* 403: 190-208.

- Soares MC, Aléssio ML, Léger CL, Bluet-Pajot MT, Clauser H, et.al. (1995) Effect of essential fatty acid deficiency on membrane fatty acid content and growth hormone stimulation of rat pituitaries during postnatal development. *J Lipid Res* 36(6): 1401-1406.
- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *P Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1588.
- Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR (2005) Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45: 559-579.
- Sugahara M, Shiraishi H (1998) Synaptic density of the prefrontal cortex regulated by dopamine instead of serotonin in rats. *Brain Res* 814: 143-156.
- Switzer KC, McMurray DN, Chapkin RS (2004) Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on T-cell membrane composition and function. *Lipids* 39: 1163-1170.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian *Clock* mutant mice. *Science* 308: 1043-1045.
- Uauy R, Dangour AD (2006) Nutrition in brain development and aging: Role of essential fatty acids. *Nutr Rev* 64: 24-33.
- Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T (1995) Dietary  $\alpha$ -linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res* 669: 225-233.
- Vancassel S, Aid S, Pifferi F, Morice E, Nosten-Bertrand M, Chalon S, Lavielle M (2005) Cerebral asymmetry and behavioral lateralization in rats chronically lacking n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Psychiat* 58: 805-811.
- Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ (1997) Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev* 18: 716-738.
- Van Den Pol AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191: 661-702.
- Van Den Pol AN (1991) The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. In: Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic Nucleus: the mind's clock*. New York, Oxford University Press, p.17-50.
- Van Den Pol AN, Tsujimoto KL (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15: 1049-1086.
- Van Esseveldt L(K.)E, Lehman MN, Boer GJ (2000) The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev* 33: 34-77.
- Wainwright PE, Huang Y-S, Bulman-Fleming B, Lévesque S, McCutcheon D (1994) The effects of dietary fatty acid composition combined with environmental enrichment on brain and behavior in mice. *Behav Brain Res* 60: 125-136.
- Wainwright PE, Huang Y-S, Bulman-Fleming B, Mills DE, Redden P, McCutcheon D (1991) The role of n-3 essential fatty acids in brain and behavioral development: a cross-fostering study in the mouse. *Lipids* 26: 37-45.



- Wang ZJ, Liang CL, Li GM, Yu CY, Yin M (2007) Stearic acid protects primary cultured cortical neurons against oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin* 28: 315-326.
- Winzell MS, Ahrén B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 215–219.
- Wollin SD, Wang Y, Kubow S, Jones PJ (2004) Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and alpha-lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster. *J Nutr Biochem* 15: 402-410.
- Ximenes da Silva A, Laviaille F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri J, Laviaille M (2002) Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* 81: 1328-1337.
- Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, McGeer EG (1990) Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res* 526: 303-307.
- Yamazaki S, Yoshikawa T, Biscoe EW, Numano R, Gallalphy LM, Soulsby S, Papadimas E, Pezuk P, Doyle SE, Tei H, Sakaki Y, Block G, Menaker M (2009) Ontogeny of the circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms* 24: 55-63.
- Yang X, Zhang Y-KJ, Esterly N, Klaassen CD, Wan Y-JY (2009) Gender disparity of hepatic lipid homeostasis regulated by the circadian clock. *J Biochem* 145: 609-623.
- Yavin E (2006) Versatile roles of docosahexaenoic acid in the prenatal brain: from pro- and anti-oxidant features to regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75: 203-211.
- Young GS, Maharaj NJ, Conquer JA (2004) Blood phospholipid fatty acid analysis of adults with and without attention deficit/hyperactivity disorder. *Lipids* 39: 117-123.
- Zaouali-Ajina M, Gharib A, Durand G, Gazzah N, Claustrat B, Gharib C, Sarda N (1999) Dietary docosahexaenoic acid-enriched phospholipids normalize urinary melatonin excretion in adult (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient rats. *J Nutr* 129: 2074-2080.
- Zhang H, Hamilton JH, Salem N Jr, Kim H (1998) N-3 fatty acid deficiency in the rat pineal gland: effects on phospholipid molecular species composition and endogenous levels of melatonin and lipoxygenase products. *J Lipid Res* 39: 1397-1403.
- Zimmer L, Delpal S, Guilloteau D, Aioun J, Durand G, Chalon S (2000) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* 284: 25-28.
- Zimmer L, Hembert S, Durand G, Breton P, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S (1998) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci Lett* 240: 177-181.

## ANEXOS

## Anexo 1. Documento do Comitê de ética em pesquisa da UFRN



### UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER Nº 299/2007

<b>Prot. nº</b>	A-006/07 – CEP/UFRN	
<b>Projeto de Pesquisa</b>	Efeitos da carência de ácidos graxos essenciais na dieta sobre o ritmo circadiano de ratos: uma abordagem comportamental e neuranatômica.	
<b>Pesquisador Responsável</b>	Miriam Stela Maris de Oliveira Costa	
<b>Instituição Onde Será Realizado</b>	UFRN – Centro de Biociências Departamento de Morfologia.	
<b>Instituições colaboradoras</b>	Departamento de Fisiologia e Farmacologia Departamento de Fisiologia da Nutrição Universidade Federal de Pernambuco - UFPE	
<b>Período de Realização</b>	Início – 2008.2	Término – 2010.2
<b>Revisão Ética em</b>	07 de dezembro/07	

#### RELATO

##### 1. RESUMO

Depreende-se da literatura especializada consultada pelos autores da proposta de estudo ora analisada que: *“os lipídios são componentes fundamentais de uma dieta equilibrada”* e são também fundamentais para o desenvolvimento do organismo.

Considerando essa classe de compostos químicos, os ácidos graxos essenciais (AGEs), aqueles que são obtidos obrigatoriamente a partir dos alimentos, fazem parte das membranas celulares tornando-se, portanto, necessários para a função normal de todos os tecidos.

Em experimentos com animais:

[...] submetidos a dieta pobre em AGEs, foram evidenciados perda progressiva de memória, bem como redução do tecido hipocampal. Inversamente, submetidos a uma dieta rica nesses nutrientes, animais exibem melhora da atividade locomotora e aumento de receptores no hipocampo.

Em um *“primeiro trabalho endereçado a investigar alterações da ritmicidade circadiana, utilizando como parâmetro a atividade /repouso os autores objetivam de uma forma geral: “Verificar os efeitos da dieta carente em AGEs sobre a regulação dos ritmos circadianos, nos níveis comportamental e de substrato neural em ratos Wistar”.*

O experimento proposto será realizado em duas gerações de 32 ratos albinos da raça Wistar. *“Os animais serão divididos em dois grupos, segundo a dieta a que serão submetidos a partir do acasalamento: 1) o grupo controle (C) que receberá uma dieta equilibrada em todos os nutrientes, tendo o óleo de soja como fonte lipídica; 2) o grupo deficiente em ácidos graxos essenciais (DAGES) que receberá uma dieta semelhante em todos os constituintes, exceto pela fonte lipídica que será substituída pelo óleo de coco, o qual é pobre em AGEs”.*

Após 21 dias de vida será feito o desmame dos animais os quais serão avaliados nos seguintes parâmetros: **Registro das respostas circadianas**, para isto os animais serão submetidos a um ciclo claro-escuro (CE) de 24 horas durante 2 semanas, após esse período o horário de apagar as luzes será atrasado em 6 horas por 3 semanas. Os animais serão então submetidos a um regime de escuro constante (4 semanas), seguindo-se outro ciclo de CE por 3 semanas e nova exposição ao escuro constante por mais 3 semanas. Durante esses períodos será medida a atividade locomotora de cada animal por meio de um sensor infravermelho, colocado acima da gaiola.

Ao final dessas observações será feita a avaliação do segundo parâmetro, isto é, os **Estudos neuranatômicos**. Os animais serão anestesiados e feito uma injeção intra-ocular da toxina colérica.

Após "uma sobrevivência de 5 a 7 dias, os animais serão novamente anestesiados e perfundidos por via transcardíaca". A partir dos encéfalos desses animais, que serão armazenados numa solução tampão, serão feitos os seguintes estudos: **microtomia, imuno-histoquímica e análise da composição lipídica das membranas.**

Os autores concluem que o estudo proposto pode gerar resultados que irão fortalecer a área de concentração de Psicologia Fisiológica do Programa de Pós-graduação em Psicobiologia e subsidiará uma tese de doutorado.

## 2. COMENTÁRIOS

Uma das medidas adotadas com vistas a exercer controle social sobre o uso científico de animais, foi a formação das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs). Essas comissões tem como papel fundamental a avaliação de protocolos de pesquisas, assim como do uso de animais em aulas, treinamentos e outros procedimentos científicos.

Como não existe uma legislação fiscal ou algum tipo de resolução que regulamente essas comissões elas atuam tendo como ponto de referência o Princípio dos 3Rs (**Replace – Reduce e Refine**). Esses princípios servem também de guia ética para este comitê, na avaliação de pesquisas que fazem o uso científico de animais.

Nesse sentido exige-se que uma proposta de estudo com experimentações em animais faça abordagem sobre a possibilidade de **substituir** o uso de animais, **reduzir** seu quantitativo e **refinar** os procedimentos científicos, ou seja, minimizar a dor, o estresse negativo e garantir o bem-estar do animal.

Diante do exposto, o pesquisador deve contemplar no seu protocolo os seguintes questionamentos:

1. é possível usar métodos alternativos para o estudo proposto neste protocolo?
2. é possível reduzir o número de animais projetado para cada grupo experimental?
3. a dor e o estresse negativo do animal pode ser minimizado?

Entendemos que ao responder o *Item 11* do **FORMULÁRIO CEP-UFRN** e fazer uma descrição dos procedimentos metodológicos a serem usados o pesquisador contempla estes questionamentos.

É necessário no entanto, que seja apresentado à este Comitê carta de anuência dos Departamentos Acadêmicos da UFPe comprometendo-se a fornecer os animais e a dieta especial para os mesmos, conforme prevê o tópico **V. RECURSOS FINANCEIROS** do projeto em questão.

Isto constitui uma RECOMENDAÇÃO que deve ser cumprida pelo pesquisador responsável.

## 3 – PARECER

O projeto de pesquisa apresentado acha-se bem fundamentado teoricamente em experimentos prévios, pode gerar conhecimentos sobre o tema proposto e foi instruído seguindo recomendações para experimentos em animais (Normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento).

Diante do exposto este Comitê manifesta-se pela **APROVAÇÃO COM RECOMENDAÇÃO** do protocolo em pauta.

Natal, 20 de dezembro de 2007.

  
Dulce Almeida

VICE COORDENADORA – CEP/UFRN

## Anexo 2. Regulamento do periódico.

# Journal of Biological Rhythms

Editor-in-Chief:

[Martin Zatz](#)

Official Publication of the [Society for Research on Biological Rhythms](#)

One electronic copy of each paper should be submitted to the Editor as an attachment to an e-mail. The text and each figure or table should be in separate files. Manuscript pages should be 6.5 inches wide, 9 inches long, and double spaced throughout. Hard copies of text and/or illustrations may be used in special circumstances. There are no publication charges except for circumstances requiring special printing, color reproduction, or unusual length and number of illustrations; in these cases, the publisher will provide cost information before the paper is accepted.

Manuscripts should be written clearly and concisely and should conform generally to the Council of Science Editors Style Manual (*Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed.).

“Letters” should be limited to a total of 2000 words and a few figure panels or equivalent-sized tables. Their format differs from those of regular papers. Consult previously published Letters or the Editor for further information.

Supplementary Online Material may be submitted for ancillary but necessary information. It should be submitted as a pdf file, with the article title, authors, and "Supplementary Online Material" on the first page, followed by text, figures, and tables along with captions. Number figures and tables S1, S2, etc. Supplementary material will appear online exactly as submitted and can be viewed at <http://jbr.sagepub.com/supplemental>.

Regular manuscripts should consist of the following:

- A **Title page**, including the authors' names, the title and a short running title, and the institution(s) (with all words spelled out in full) from which the paper emanates. If current addresses are different, then these should be indicated in a footnote. Also include the name, mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address of the person to whom correspondence and proofs should be sent. Number the pages, illustrations, and tables.
- A succinct **Abstract**, not exceeding 350 words, in a form acceptable to most abstracting services, followed by six to eight key words.
- An **Introduction** that provides a brief review of relevant background material and indicates the purpose of the study.
- A **Materials and Methods** section that provides sufficient information for qualified investigators to reproduce the work in similar fashion. Reference to published procedures by appropriate succinct summary and citation is encouraged but should not replace adequate methodological description. The *Journal of Biological Rhythms* endorses the Declaration of Helsinki and the U.S. National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. It will be assumed that authors have conscientiously followed principles and practices in accord with these documents in experiments involving human subjects and experimental animals.
- A **Results** section that provides a concise description of the findings with appropriate reference to illustrations and tables.
- A **Discussion** section that includes a summary of the main findings (not data), their relation to other published work, and a statement of their significance.
- **References** should be double spaced and listed sequentially in alphabetical order according to the name of the first author with (a) a full list of authors, (b) date, (c) full title of the paper, (d) journal titles abbreviated as per *Index Medicus*, (e) volume number, and (f) first and last pages. Only papers published or in press may be included in the reference list. Papers should be cited in the text by author(s) and date.

- *Examples*  
*Aschoff J (1965) Response curves in circadian periodicity. In Circadian Clocks, J Aschoff, ed, pp 95-111, North-Holland, Amsterdam.*

*Pittendrigh CS and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and liability of spontaneous frequency. J Comp Physiol A 106:223-252.*

*Richter CP (1965) Biological Clocks in Medicine and Psychiatry, Charles C Thomas, Springfield, IL.*

Aschoff J (1965) Response curves in circadian periodicity. In , J Aschoff, ed, pp 95-111, North-Holland, Amsterdam. Pittendrigh CS and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and liability of spontaneous frequency. J Comp Physiol A 106:223-252. Richter CP (1965), Charles C Thomas, Springfield, IL.

- **Tables and illustrations should be submitted in a form suitable for direct reproduction when possible, with all labels, axes, and inserts proportionately large enough to remain readily legible upon reduction in size. Place each numbered figure and table in a separate file. Charges for color figures are \$800.00 for the first figure and \$200.00 for each additional page.**
- **A list of figure legends should follow the references and be the last section in the text. A brief title and description of each illustration should be included. These should be typed consecutively on the same page(s).**
- **Abbreviations should be introduced in parentheses after the first occurrence of the term being abbreviated. Use standard metric units wherever possible.**

should be submitted in a form suitable for direct reproduction when possible, with all labels, axes, and inserts proportionately large enough to remain readily legible upon reduction in size. Place each numbered figure and table in a separate file. Charges for color figures are \$800.00 for the first figure and \$200.00 for each additional page.

Submission of a manuscript implies concurrence of all listed authors and assurance that no similar paper has been submitted for publication elsewhere. Manuscripts are evaluated on their merit and suitability for publication by the editors with the assistance of selected referees.

**Mail submissions to:**

Martin Zatz, PhD, MD  
Editor, *Journal of Biological Rhythms*  
PMB 336  
4938 Hampden Lane  
Bethesda, MD 20814-2914  
tel: 301-656-4655  
e-mail: [edjbr@earthlink.net](mailto:edjbr@earthlink.net)

**Anexo 3.** Documentos da submissão de publicação de manuscrito em colaboração com a UFPE sobre DAGES e sistema dopaminérgico

[Journal of Chemical Neuroanatomy cheneu@np.unimaas.nl](mailto:cheneu@np.unimaas.nl) to show details Jan  
me 17

Ms. Ref. No.: CHENEU-D-12-00003

Title: Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations

Journal of Chemical Neuroanatomy

Dear Andrade da Costa,

Your submission entitled "Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations" will be handled by Editor-in-Chief Harry W.M. Steinbusch, Ph.D..

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

Your username is: belmiracosta

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Journal of Chemical Neuroanatomy

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

Journal of Chemical Neuroanatomy cheneu@np.unimaas.nl to show details Jan  
me 17

Dear Andrade da Costa,

Your submission entitled "Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations" has been received by Journal of Chemical Neuroanatomy

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

Your username is: belmiracosta

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

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Journal of Chemical Neuroanatomy

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



Manuscript Number:

Title: Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations

Article Type: Research Article

Keywords: Brain development; LC-PUFA; Dopaminergic System; Maternal malnutrition; DHA; Stereology.

Corresponding Author: Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco

First Author: Priscila P Passos, Ms

Order of Authors: Priscila P Passos, Ms; Juliana Maria C Borba, Ph.D; Ana Paula Rocha de Melo, Ph.D; Rubem Carlos A Guedes, Ph.D; Reginaldo P Silva, Ph.D; Waldenicio T Melo Filho, Physical Therapist; Kátia Maria M Gouveia, Ms; Daniela Maria A Navarro, Ph.D; Geanne Karla N Santos, Ms; Roseane Borner, Ph.D; Cristovam W Picanço-Diniz, Ph.D; Antônio P Júnior, Ph.D; Miriam Stela Maris O Costa, Ph.D; Marcelo A Rodrigues, Ph.D; Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa, Ph.D

Abstract: ABSTRACT

Essential fatty acids play a crucial role in the activity of several neurotransmission systems, especially in the monoaminergic systems involved in cognitive and motor aspects of behavior. The present study investigated whether essential fatty acid dietary restriction over two generations could differentially affect dopaminergic cell populations located in the substantia nigra rostro-dorso-medial (SN<sub>rm</sub>) or caudo-ventro-lateral (SN<sub>cv</sub>) regions which display distinct neurochemical profile and vulnerability to lesions under selected pathological conditions. Wistar rats were raised from conception on control or experimental diets containing adequate or reduced levels of linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids, respectively. Stereological methods were used to estimate both the number and soma size of tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactive neurons in the SN<sub>rm</sub> and SN<sub>cv</sub>. TH protein levels were assessed with Western blots. Long-term treatment with the experimental diet modified the fatty acid profile of midbrain phospholipids and significantly decreased TH protein levels in the ventral midbrain (3 fold), the number of TH-positive cells in the SN<sub>rm</sub> (~20%) and the soma size of these neurons in both SN<sub>rm</sub> (~20%) and SN<sub>cv</sub> (~10%). The results demonstrate for the first time a differential sensitivity of substantia nigra dopaminergic cell populations to dietary contingencies, indicating a higher vulnerability of SN<sub>rm</sub> to the harmful effects of unbalanced levels of fatty acids during brain development.

Cover Letter



Universidade Federal de Pernambuco, UFPE  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Phone: 55-81-21268530 FAX: 55-81-21268976

To Dr. H. Steinbusch,

*Editor-in-Chief of Journal of Chemical Neuroanatomy*

Dept. of Neuroscience,  
Faculty of Health, Medicine and Sciences,  
Maastricht University,  
Universiteitssingel 50, Box 38, 6229 ER  
Maastricht, Netherlands,  
**Email:** [cheneu@maastrichtuniversity.nl](mailto:cheneu@maastrichtuniversity.nl)

Enclosed is an original paper entitled “**Dopaminergic cell populations of the rat substantia nigra are differentially affected by essential fatty acid dietary restriction over two generations**” that we would like to submit for publication in *Journal of Chemical Neuroanatomy*.

Our research used unbiased stereological method and demonstrated, for the first time, a differential sensitivity of two substantia nigra dopaminergic cell populations to dietary contingencies, indicating a higher vulnerability of cells located in the rostro-dorso-medial region when compared to those of ventro-dorso-lateral region to the harmful effects of unbalanced levels of essential fatty acids. The data also show the effectiveness of the dietary condition in inducing systemic and localized developmental effects on the somatic growth and are in agreement with the hypothesis that inadequate levels of omega-3 fatty acids may contribute to the etiology of some neurological diseases.

There is no conflict of interest in the work reported in the present manuscript. We confirm that the results are original and have not been submitted elsewhere for publication, in whole or in part, and all the authors listed have approved the manuscript that is enclosed.

Finally, we would like to attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.  
Thank you in advance.

Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Centro de Ciências Biológicas, CCB  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE  
Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.  
Phone: 55-81- 21268530/FAX: 55-81-21268976  
E-mail: [bl@ufpe.br](mailto:bl@ufpe.br) or [belmira@gmail.com](mailto:belmira@gmail.com)

## \*Research Highlights

### **Highlights**

1. Differential effects on dopaminergic cell subsets by essential fatty acid restriction
2. Omega 3 dietary restriction reduces soma size of substantia nigra dopaminergic cells
3. Omega-3 dietary restriction for two generations reduces TH levels in the midbrain

**\*Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

## **Dopaminergic Cell Populations of the Rat Substantia Nigra are Differentially Affected by Essential Fatty Acid Dietary Restriction over Two Generations**

Priscila Pereira Passos<sup>1</sup>, Juliana Maria Carrazone Borba<sup>2</sup>, Ana Paula Rocha de Melo<sup>2</sup>, Rubem Carlos Araujo Guedes<sup>2</sup>, Reginaldo Pereira da Silva<sup>1</sup>, Waldenício Teixeira Melo Filho<sup>1</sup>, Kátia Maria Marques Gouveia<sup>3</sup>, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>4</sup>, Geanne Karla Novais Santos<sup>4</sup>, Roseane Borner<sup>5</sup>, Cristovam Wanderley Picanço-Diniz<sup>5</sup>, Antonio Pereira Jr.<sup>6</sup>, Miriam Stela Maris de Oliveira Costa<sup>7</sup>, Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues<sup>1</sup>, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa<sup>1</sup>

**1** Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife (PE), Brazil.

**2** Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife (PE), Brazil

**3** Setor de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário, Maceió (AL), Brazil

**4** Departamento de Química Fundamental – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife (PE), Brazil

**5** Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém (PA), Brazil.

**6** Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brazil.

**7** Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Cidade Universitária, Natal (RN), Brazil.

**Running title:** Effects of unbalanced dietary levels of fatty acids on substantia nigra dopaminergic cells

**Text pages:** 24

**Tables:** 6

**Figures:** 4

### **Corresponding author:**

Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa  
Departamento Fisiologia e Farmacologia,  
Centro de Ciências Biológicas, CCB  
Universidade Federal de Pernambuco  
Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

Phone: 55-81- 21268530

FAX: 55-81-21268976

e-mail: [bl@ufpe.br](mailto:bl@ufpe.br) or [belmira@gmail.com](mailto:belmira@gmail.com)

## **Anexo 4. RELATÓRIO DE ATIVIDADES**

### **PROJETO AC. GRAXOS ESSENCIAIS – RATOS WISTAR LABORATÓRIO DE CRONOBIOLOGIA/DEPTO FISILOGIA/UFRN RESONSÁVEL: KÁTIA MARIA MARQUES GOUVEIA**

#### **CRONOGRAMA DE REGISTROS DE ATIVIDADES MOTORAS CE (12:12h) CLARO :17h ESCURO: 05h**

\* variação de energia \*\* falta de energia

#### **AMBIENTE 1**

##### **GRUPO CONTROLE SOJA - ANIMAIS Nº 01 A 06**

###### **2ª GERAÇÃO - AMBIENTE 1 - CANAIS 1 A 6**

- 1) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 06/12/2008 a 19/12/2008 - CE-12:12h \*\*
- 2) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 20/12/2008 a 09/01/2009 - Atraso de 6 h \*
- 3) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 10/01/2009 a 06/02/2009 - EE
- 4) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 07/02/2009 a 27/02/2009 - CE 12:12h\*\*
- 5) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 28/02/2009 a 20/03/2009 - EE - FIM

**OBS: REGISTROS SENDO OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DE ROEDORES.**

##### **GRUPO EXPERIMENTAL-COCO - ANIMAIS Nº 05 E 06**

###### **1ª GERAÇÃO - AMBIENTE 1 - CANAIS 7 A 8**

- 1) Canais 7 e 8 de 06/12/2008 a /19/2008 - CE-12:12h
- 2) Canais 7 e 8 de 20/12/2008 a 09/01/2009 - Atraso de 6 h
- 3) Canais 7 e 8 de 10/01/2009 a 06/02/2009 - EE \*
- 4) Canais 7 e 8 de 07/02/2009 a 27/02/2009 - CE 12:12h
- 5) Canais 7 e 8 de 28/02/2009 a 20/03/2009 - EE - FIM

**OBS: REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. ROEDORES.**

##### **GRUPO CONTROLE SOJA - ANIMAIS Nº 07 A 10**

###### **1ª GERAÇÃO - AMBIENTE 1 - CANAIS 9 A 12**

- 1) Canais 9, 10, 11 e 12 de 06/12/2008 a 19/12/2008 - CE 12:12h\*
- 2) Canais 7 e 8 de 20/12/2008 a 09/01/2009 - Atraso de 6 h
- 3) Canais 7 e 8 de 10/01/2009 a 06/02/2009 - EE
- 4) Canais 7 e 8 de 07/02/2009 a 27/02/2009 - CE 12:12h \*\*
- 5) Canais 7 e 8 de 28/02/2009 a 20/03/2009 - EE - FIM

**OBS: REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DOS SAGUIS (CANAIAS 9,10,11,12).**

##### **GRUPO EXPERIMENTAL-COCO - ANIMAIS Nº 01 A 06**

###### **2ª GERAÇÃO - AMBIENTE 1 - CANAIS 1 A 6**

- 1) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 28/03/2009 a 13/04/2009 - CE-12:12h \*\*
- 2) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 14/04/2009 a 04/05/2009 - Atraso de 6 h
- 3) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 05/05/2009 a 01/06/2009 - EE \*\*
- 4) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 02/06/2009 a 22/06/2009 - CE 12:12h \*\*
- 5) Canais 1, 2, 3, 4, 5, 6 de 23/06/2009 a 13/07/2009 - EE - FIM

**OBS: REGISTROS SENDO OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DE ROEDORES.**

**GRUPO CONTROLE SOJA - ANIMAIS Nº 07 A 12**

**2ª GERAÇÃO - AMBIENTE 1 - CANAIS 7 A 12**

- 1) Canais 7,8,9,10,11,E,12 de 28/03/2009 a 13/04/2009 - CE-12:12h
- 2) Canais 7,8,9,10,11,E,12 de 14/04/2009 a 04/05/2009 - Atraso de 6 h
- 3) Canais 7,8,9,10,11,E,12 de 05/05/2009 a 01/06/2009 - EE
- 4) Canais 7,8,9,10,11,E,12 de 02/06/2009 a 22/06/2009 - CE 12:12h
- 5) Canais 7,8,9,10,11,E,12 de 23/06/2009 a 13/07/2009 - EE - FIM

**OBS1: REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. RATOS (7 E 8) E SAGUIS (09,10,11 E 12) .**

**OBS 2: TODOS OS CANAIS DO AMBIENTE 1 PASSARAM A REGISTRAR NO COMPUTADOR DO LAB DE ROEDORES A PARTIR DE JUNHO/ 2009.**

**AMBIENTE 2**

**GRUPO CONTROLE SOJA - ANIMAIS Nº 01 A 06**

**1ª GERAÇÃO - AMBIENTE 2**

- 1) Canais P, Q, R, S, T, U de 24/04/2008 a 07/05/2008 - CE-12:12h;
- 2) Canais P, Q, R, S, T, U de 08/05/2008 a 28/05/2008 - atraso de 6 horas;
- 3) Canais P, Q, R,S, T, U de 29/05/2008 a 25/06/2008 - EE
- 4) Canais P, Q, R, S, T, U de 26/06/2008 a 16/07/2008 - CE-12:12h;
- 5) Canais P, Q, R, S, T, U de 17/07/2008 a 06/08/2008 - EE - FIM

Obs.: canais P, Q, R, S, T, U (13, 14, 15, 16 , 17 E 18) correspondem respectivamente aos animais de nº 1 a 6.

**OBS: REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DOS SAGUIS.**

**GRUPO EXPERIMENTAL-COCO ANIMAIS Nº 01- 04**

**1ª GERAÇÃO - AMBIENTE 2 - CANAIS 13, 14, 15 E 16.**

- 1) Canais P, Q, R, S de 16/09/2008 a 29/09/2008 - CE-12:12h;
- 2) Canais P, Q, R, S de 30/09/2008 a 20/10/2008 - atraso de fase de 6 h
- 3) Canais P, Q, R, S de 21/10/2008 a 17/11/2008 - EE;
- 4) Canais P, Q, R, S de 18/11/2008 a 8/12/2008 - CE-12:12h;
- 5) Canais P, Q, R, S de 09/12/2008 a 29/12/2008 - EE FIM

**OBS6:REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DOS SAGUIS,CANAIS 13,14, 15. 16.**

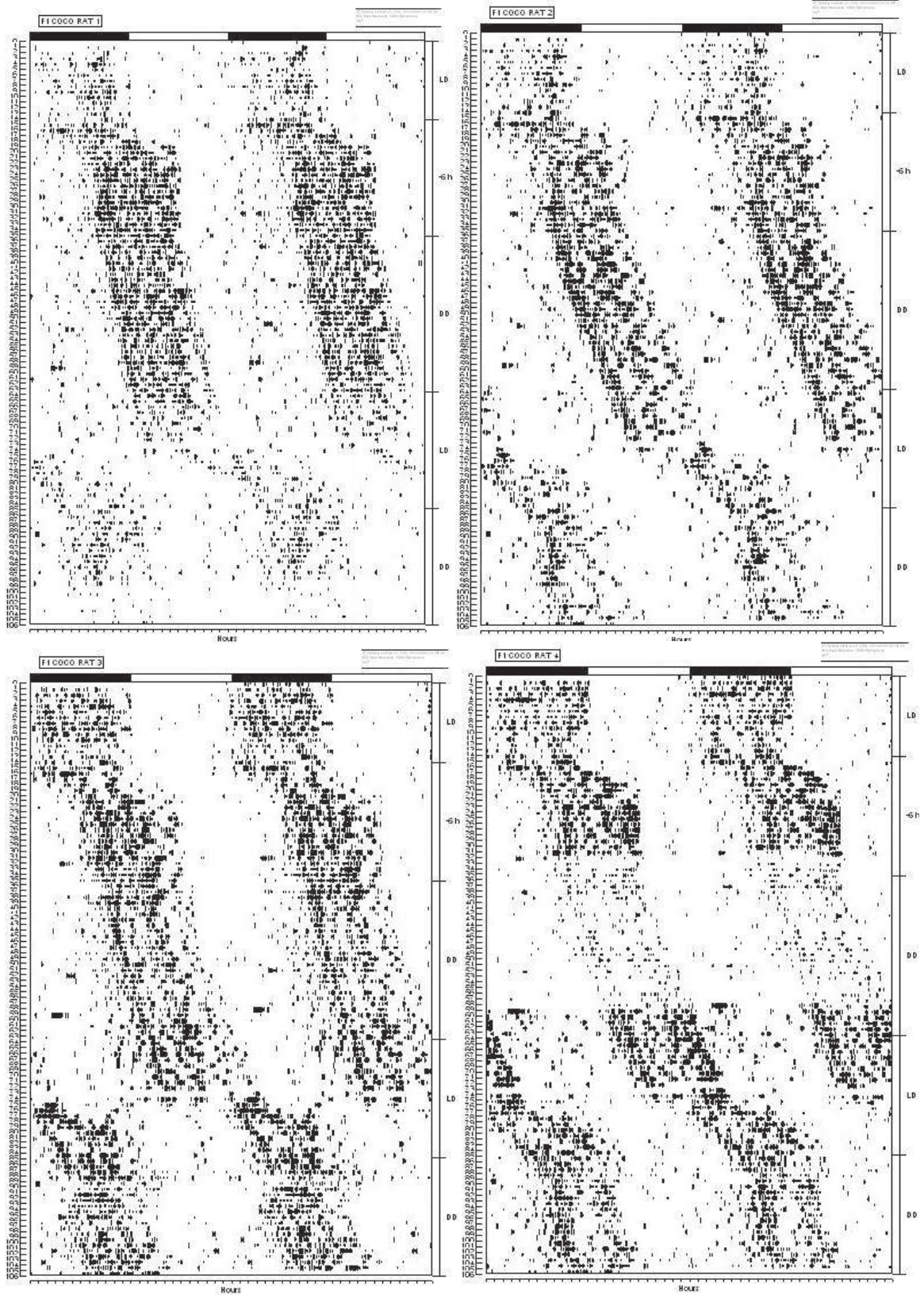
**GRUPO EXPERIMENTAL-COCO ANIMAIS Nº 07 , 08, 09, 10, 11 E 12**

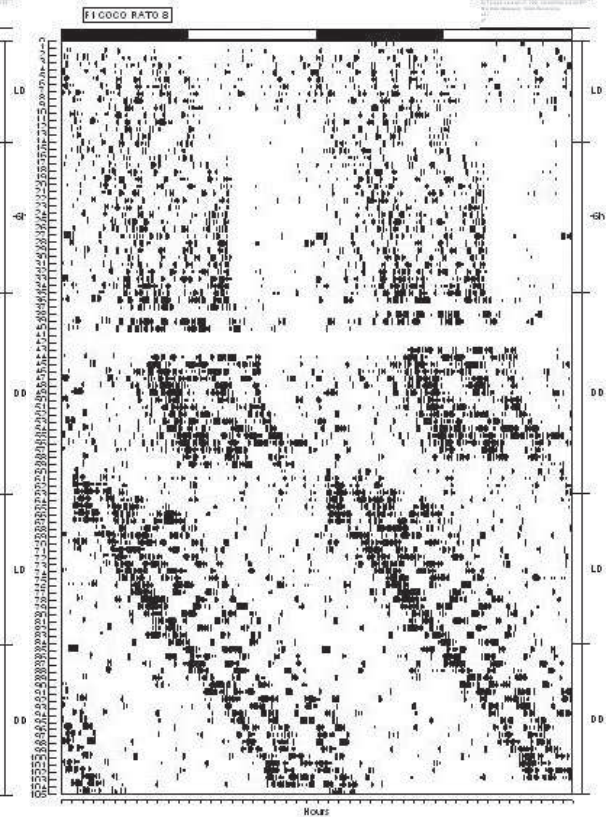
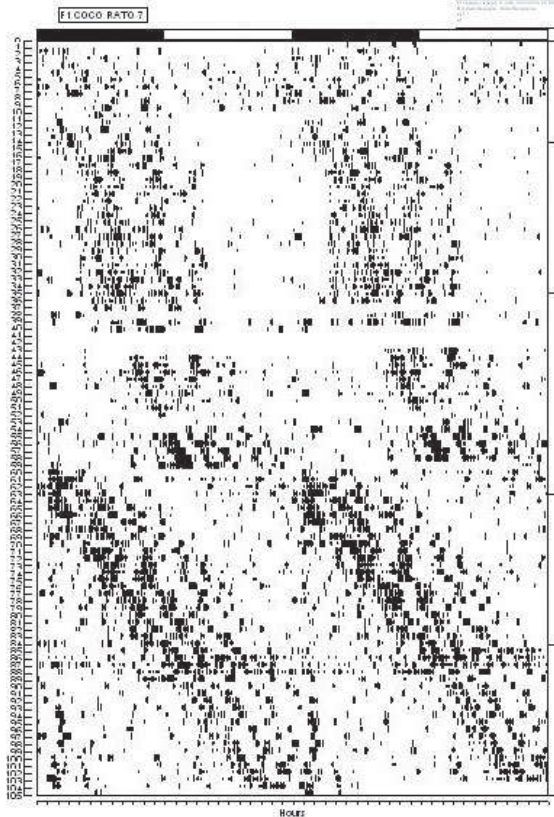
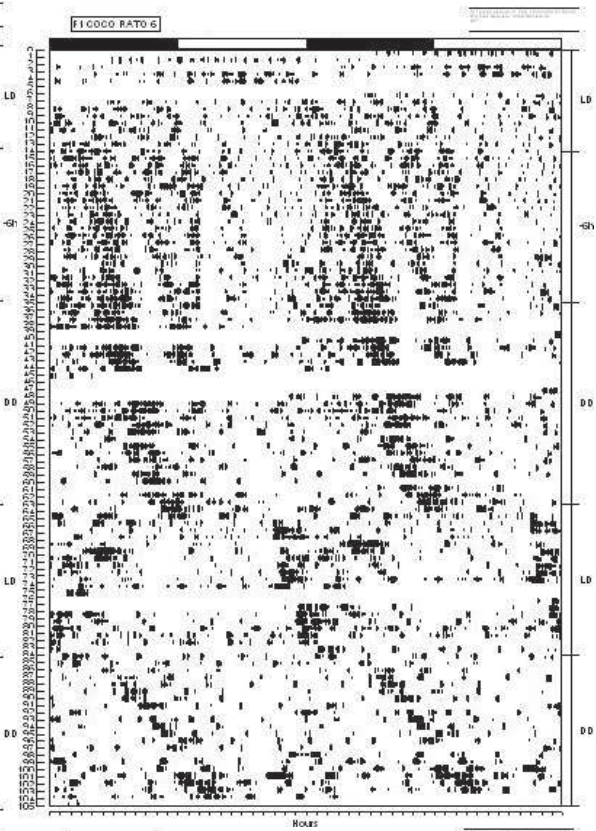
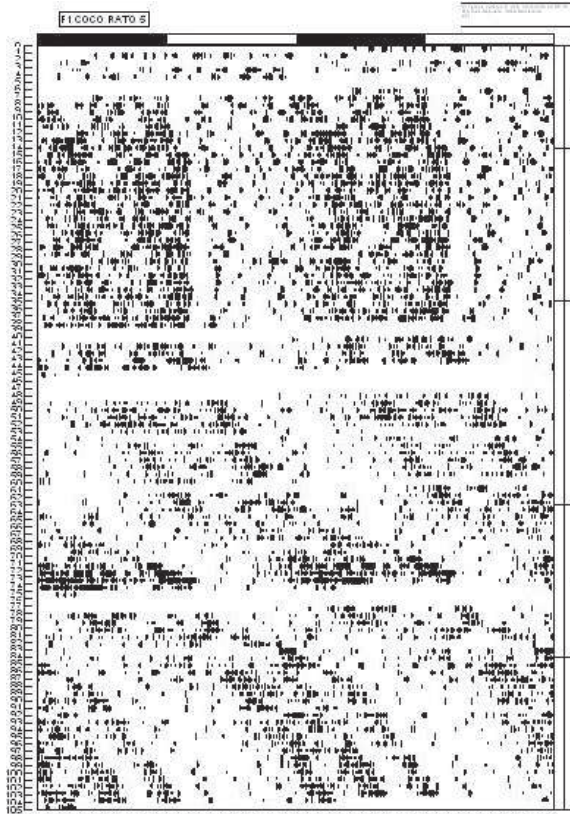
**1ª GERAÇÃO - AMBIENTE 2 - CANAIS 17 E 18.**

- 1) Canais P, Q, R, S T, U de 30/01/2009 a 12/02/2009 CE-12:12h \*
- 2) Canais P, Q, R, S T, U de 13/02/2009 a 05/03/2009 - Atraso de fase de 6h
- 3) Canais P, Q, R, S T, U de 06/03/2009 a 02/04//2009 - EE
- 4) Canais P, Q, R, S T, U de 03/04/2009 a 23/04/2009 - CE-12:12h \*
- 5) Canais P, Q, R, S T, U de 24/04/2009 a 14/05/2009 - EE-FIM

**OBS: REGISTROS OBTIDOS NO COMPUTADOR DO LAB. DOS SAGUIS, CANAIS 13,14, 15. 16,17 E 18**

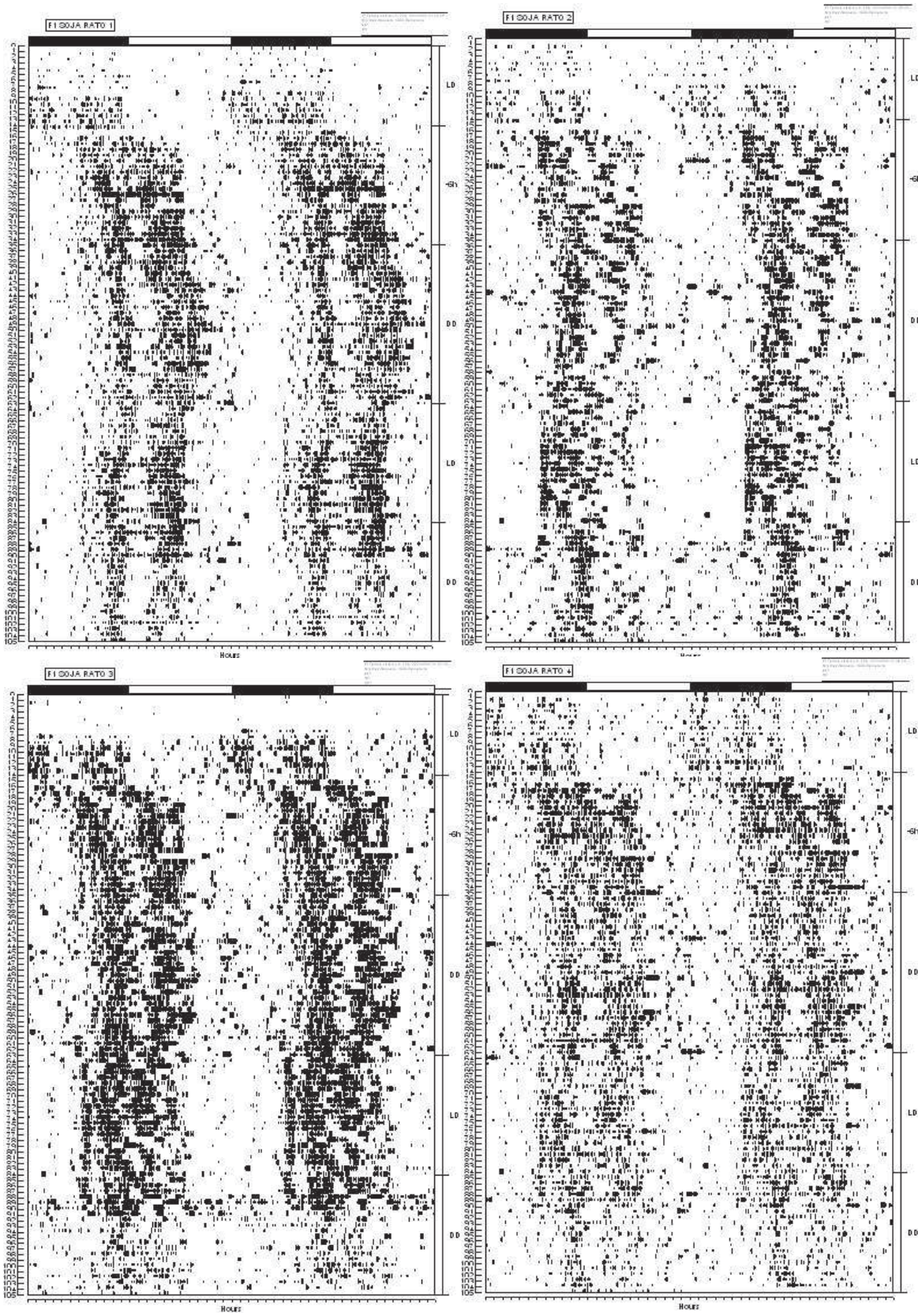
**Anexo 5. Actogramas da atividade motora nas condições de claro/escuro, escuro constante e atraso de fase de 6 horas – controle e experimental**

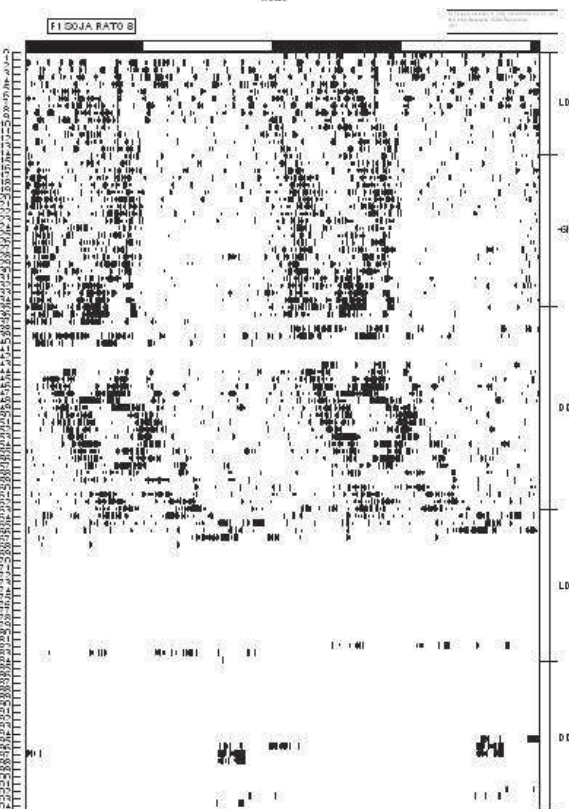
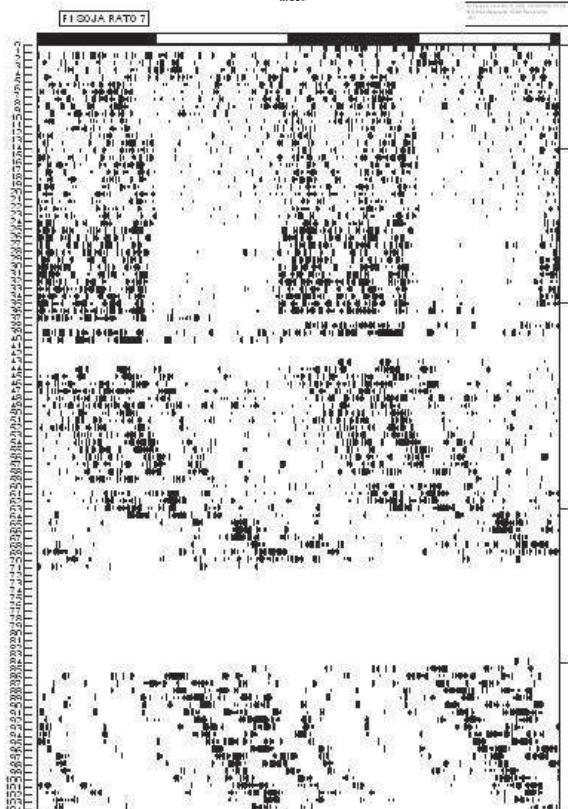
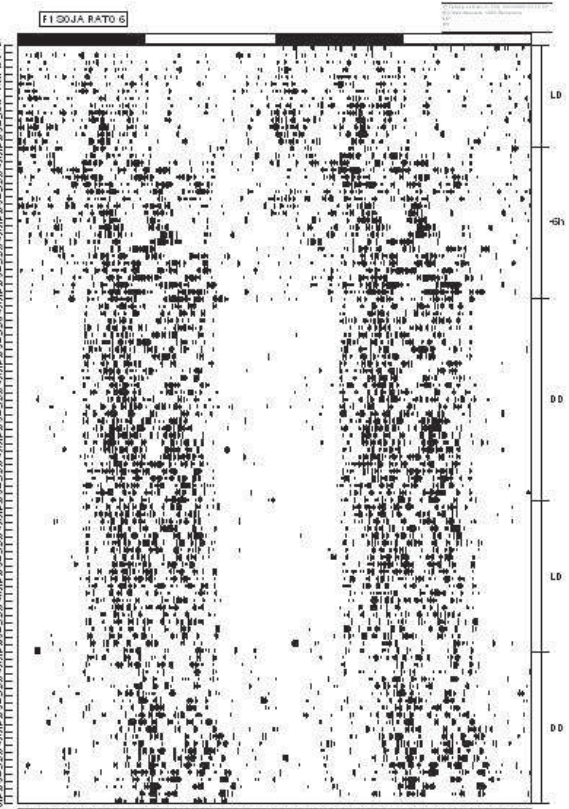
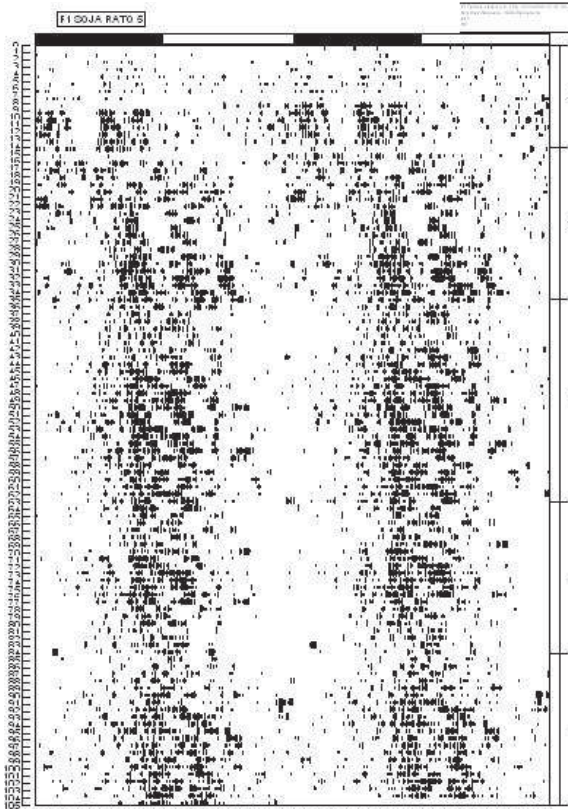


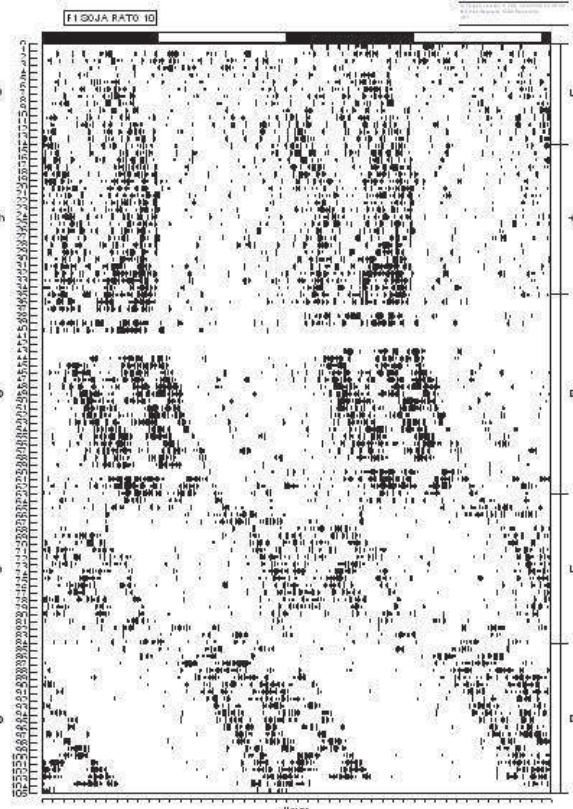
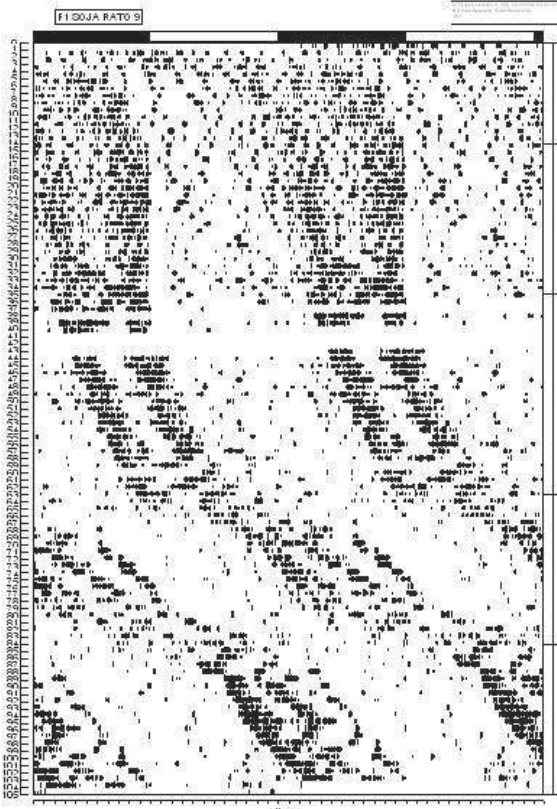












**Anexo 6** Períodogramas da atividade motora nas condições de claro/escuro, escuro constante e atraso de fase de 6 horas – controle e experimental

