ROBERTA BUENO AYRES RODRIGUES

Efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabólica de cães em crescimento

Pirassununga

2021

ROBERTA BUENO AYRES RODRIGUES

Efeitos da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabólica de cães em crescimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal - VNP

Área de concentração:

Nutrição e produção animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

Pirassununga

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4041
FMVZ

Rodrigues, Roberta Bueno Ayres

Efeito da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabolômica de cães em crescimento / Roberta Bueno Ayres Rodrigues. – 2021.

72 f. : il.

Dissertação (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Ácido docosahexaenóico. 2. Aprendizado. 3. Canino. 4. Metabólitos. 5. Óleo de peixe. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabólica de cães em crescimento", protocolada sob o CEUA nº 3416110219 (ID 007693), sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto e equipe; Roberta Bueno Ayres Rodrigues** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "Effects of supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cognitive and metabolomic function of growing dogs", utilizing 12 Dogs (males and females), protocol number CEUA 3416110219 (ID 007693), under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto and team; Roberta Bueno Ayres Rodrigues** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [03/2020](#)

Área: [Nutrição E Produção Animal](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [3 a 7 meses](#)

N: [12](#)

Linhagem: [Coker e Beagle](#)

Peso: [2 a 20 kg](#)

Local do experimento: CEPEN Pet - USP Pirassununga

São Paulo, 26 de julho de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RODRIGUES, Roberta Bueno Ayres

Título: **Efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabólica de cães em crescimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, e aos meus pais Clélia e Roberto, que não mediram esforços em nenhuma etapa da caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amar, me guiar e caminhar comigo, me dando oportunidade de ser melhor ao renascer de cada manhã e por ter colocado cada pessoa mencionada nesses agradecimentos em minha vida.

Aos meus pais Clélia e Roberto por toda dedicação, apoio, esforço, amizade e correções, sem eles eu nada seria. Por serem meus exemplos, meu escudo e o meu porto seguro.

Agradeço as minhas avós, Jandira e Maria Aparecida e avó de consideração Wilma que não se encontram mais conosco, mas estiveram comigo em boa parte da jornada, cada uma delas de forma especial, me ensinando um pouco da vida e se tornando exemplos que levarei para sempre comigo.

Ao meu saudoso avô José (Zeca Bueno), que esteve comigo até o início do meu mestrado e se alegrou com minhas alegrias e conquistas, agradeço por toda preocupação, amor e risadas. Cada pedido dele para que eu me sentasse no sofá mais um pouco em sua casa enchia meu coração de alegria e hoje enche de saudades!

Ao meu avô de consideração Roberto, no qual nunca me esquecerei do apoio que me deu juntamente com a vó Wilma desde o primeiro dia de faculdade. Suas lágrimas ao me deixar em Jaboticabal no primeiro dia de aula nunca permitiram que meu coração estivesse longe do coração deles.

Aos meus tios Célia e Marcio, que com seu amor e compreensão me deram a oportunidade de estar onde estou e fazem parte de cada conquista obtida até aqui.

À minha prima Franciellen, pelo apoio, ajuda, compreensão, que sempre esteve comigo desde criança e, nas horas mais difíceis foi meu abrigo independentemente de qualquer situação ao decorrer do meu mestrado.

À minha prima Rafaela, que ao invés de prima é irmã, agradeço por toda preocupação, dedicação, apoio e amor, com quem eu pude e poderei contar para o resto da minha vida.

Às minhas primas Carolina, Claudia, Gabrielli, Michelli, Pâmela, Letícia, Nayara e todos os demais primos por toda alegria e bons momentos que tornam minha vida mais alegre e divertida!

Às minhas tias e tios, que cuidam de mim como filha, se preocuparam e me apoiaram em toda minha jornada até aqui, se tonando parte de todos meus processos e conquistas.

Agradeço ao meu orientador por todas as oportunidades concedidas desde o primeiro momento, por ter aberto as portas e ter acreditado em mim, por ensinar e permitir que esse período da minha vida tenha se tornado inesquecível.

Aos meus queridos amigos de trabalho, Mel, Larissa, Rafael, Mari Perini, Henrique, Andressa e Cati que estavam comigo no início da jornada. Agradeço pelos infinitos ensinamentos, conselhos, amizade, parceria, companhia, apoio, amor, suporte, compreensão, risadas e momentos que estarão comigo para sempre. Fizem esse período da minha vida ser muito mais alegre, divertido e sem eles não seria a mesma coisa! Em especial, os meus agradecimentos aos grandes amigos Mel e Rafael, que não mediram esforços em me ajudar na realização desse projeto, abdicando de finais de semana, feriados, horários fora do expediente e noites de descanso.

Agradeço ao meu recente amigo de trabalho Lucas, por todas as noites viradas logo de início, por todo apoio, preocupação, amor, paciência, amizade e dedicação e também à Ana e ao Lucca por toda ajuda e parceria.

Agradeço aos alunos de Iniciação científica e amigos, Isabela e Mateus por toda disponibilidade, dedicação e amizade.

A todos os estagiários que passaram pelo CEPEN e me ajudaram com as coletas, assim como com os demais trabalhos, que além de estagiários foram amigos e companheiros.

Agradeço aos funcionários e ex-funcionários do CEPEN, Josane, Lucineia, Diego, Cecília, Cris, Chicão, Ivaldo, Nólíia entre outros, por toda ajuda, apoio, paciência, dedicação e momentos de risadas.

Aos animais do experimento, Timão, Pumba, Dumbo, Kiara, Nala, Helga, Black, Rock, Apolo, Cacau, Uly e Malú, por terem feito parte dessa conquista e juntamente com os demais animais proporcionam muita alegria ao centro de pesquisa.

Às minhas amigas, Galática, Pics e Enxente, que sempre estiveram comigo durante a graduação e continuaram me acompanhando no restante da jornada.

A equipe acesso jovem, que além de amigos são irmãos e estiveram comigo em momentos difíceis, ajudando com orações, amor e compreensão.

Agradeço a equipe de pós-graduandos do campus de São Paulo por todos os ensinamentos e pela amizade.

Agradeço à Amanda pelo apoio com o monitoramento da função neurológica dos animais durante o estudo e dedicação em ajudar.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À empresa Avert, pelo financiamento do projeto.

À empresa Premier pet por todo apoio ao centro de pesquisa e pelas oportunidades de experiências concedidas ao longo do mestrado.

À FMVZ por toda a experiência adquirida.

À empresa VB Alimentos juntamente com o departamento de Pesquisa e Desenvolvimento que me aceitou em sua equipe, me ensinando e apoiando nesta fase final.

Fecho mais esse ciclo muito feliz e grata à Deus por ter tantas pessoas importantes ao meu lado, família, amigos e colegas que o tornaram muito mais especial.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9.

RESUMO

RODRIGUES, R.B.A. Efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabolômica de cães em crescimento. [Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the cognitive function and metabolomic of growing dogs]. 2021. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Está bem estabelecido na literatura que o ácido graxo poli-insaturado (AGPI) ômega-3 docosahexaenóico (DHA) desempenha papel importante no desenvolvimento e funcionalidade do cérebro em humanos e cães idosos. Dessa forma, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de óleo de peixe concentrado em DHA sobre a função cognitiva de cães em crescimento. Foram utilizados 12 cães saudáveis, blocados por raça e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Tratado (GT) (n = 6), com suplementação de 40mg de DHA/kg de peso corporal/dia e Grupo Controle (GC) (n=6), sem suplementação. A ingestão de alimentos dos animais foi acompanhada diariamente. Realizou-se o teste de discriminação de objetos [(para medir a capacidade de aprendizado associada à função cognitiva, consistindo de uma etapa normal (FN) e uma reversa (FR)] e coleta de sangue para análise de metabolômica, concentração sérica de AGPI [Ácidos DHA + Eicosapentaenóico (EPA), araquidônico (AA), linoléico (AL), alfa linolênico (AAL)] e capacidade antioxidante total (CAT) antes (0), 30 (1), 60 (2) e 90 (3) dias após o início da suplementação. Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico SAS, o teste de Shapiro Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos, realizou-se análises de variância com o PROC MIXED e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias e PROC GLM para ingestão de nutrientes. Os animais do grupo GT apresentaram maior ingestão de EPA+DHA (200mg/kg^{0,75}) do que os animais do grupo GC (114,50mg/kg^{0,75}) ($p < 0,0001$). Os resultados obtidos na FN mostraram diferenças entre o tratamento ($p = 0,0039$) e o tempo ($p < 0,0001$), no qual a frequência de respostas corretas do grupo GT (70,12%) foi maior que GC (62,67%). Em relação a FR, houve efeito no tempo ($p < 0,0001$). As concentrações de EPA + DHA no tempo 1, 2 e 3 foram maiores que no tempo 0 para o grupo TG ($p = 0,0159$), que por sua vez apresentou maior concentração no tempo 2, quando comparado ao GC ($p = 0,0245$). As concentrações de AA aumentaram com o tempo, independente do tratamento ($p = 0,0158$), bem como AL ($p < 0,0001$), enquanto para AAL não houve

diferença ($p > 0,05$). As porcentagens séricas médias de EPA + DHA foram de 5,60% e 4,88%, para TG e GC, respectivamente. Em relação a CAT, houve efeito de tempo ($p = 0,0322$). Concluiu-se que a função cognitiva de cães em crescimento pode ser melhorada com a suplementação de óleo de peixe concentrado em DHA sem aumentar a oxidação sérica.

Palavras-chave: Ácido docosahexaenóico, ácido eicosapentaenóico, aprendizado, canino, metabólitos, óleo de peixe.

ABSTRACT

RODRIGUES, R.B.A. **Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the cognitive function and metabolomic of growing dogs.**

[Efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabolômica de cães em crescimento]. 2021. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

It is highlighted that acid docosahexaenoic (DHA) omega-3 polyunsaturated fatty is found in high concentrations in the brain and plays an important role in brain development and functionality in humans and elderly dogs of the nervous system. Thus, this study aimed to evaluate the effect of supplementation of fish oil concentrated in DHA on the cognitive function of growing dogs. 12 healthy dogs were used, blocked by breed and randomly distributed in two groups: Test Group (TG) (n=6), with supplementation of 40 mg DHA/kg/day and Control Group (CG) (n=6), without supplementation. The animals' food intake was monitored daily. The data for the variables: object discrimination test [to measure learning ability associated with cognitive function, consisting of a normal (NP) and a reverse (NR) phase], serum PUFA concentration [DHA + Eicosapentaenoic (EPA), arachidonic (AA), Linoleic (AL), alpha linolenic (AAL) acids] and total antioxidant capacity (CAT) were collected before (0), 30 (1), 60 (2) and 90 (3) days after the start of supplementation. The results obtained were analyzed in the SAS statistical program, the Shapiro Wilk test was used to verify the normality of the residuals, analyzes of variance were performed with PROC MIXED with the application of the Tukey test ($p < 0.05$) for comparison of means and PROC GLM for nutrient intake. The animals in the TG group had a higher intake of EPA + DHA ($200\text{mg/kg}^{0.75}$) than the animals in the CG group ($114.50\text{mg/kg}^{0.75}$) ($p < 0.0001$). The results obtained in the NP showed differences between treatment ($p = 0.0039$) and time ($p < 0.0001$). The frequency of correct answers in the TG (70.12%) was higher than for CG (62.67%). In relation to the RP, there was a time effect ($p < 0.0001$). The concentrations of EPA + DHA at time 1, 2 and 3 were higher than at time 0 for the TG group ($p = 0.0159$), which in turn showed a higher concentration at time 2, when compared to the CG ($p = 0.0245$). AA concentrations increased over time, regardless of treatment ($p = 0.0158$), as well as AL ($p < 0.0001$), while for AAL there were no differences ($p > 0.05$). The mean serum percentages of EPA + DHA were 5.60% e 4.88%, for TG and CG respectively. For CAT, there was a time effect ($p = 0.0322$). it is

concluded that the cognitive function of growing dogs can be improved with the supplementation of fish oil concentrated in DHA without increasing serum oxidation.

Keywords: Docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, learning, canine, metabolites, fish oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição (%) de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 e n-6 em diferentes tecidos corporais de filhotes de ratas que ingeriram 15,0% de ácido linoleico e 3,0% de ácido alfa linolênico durante a gestação.....	21
Figura 2 - Variáveis avaliadas e etapas desenvolvidas durante o experimento.....	31
Figura 3 - Aparato adaptado utilizado para a execução do teste de discriminação de objetos em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA (TGTA)	32
Figura 4 - Representação da execução do teste de discriminação de objetos para avaliação da habilidade de aprendizado em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	34
Figura 5 - Aplicação do teste de discriminação de objetos com o uso do TGTA em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica e perfil de ácidos graxos poli-insaturados dos alimentos e do suplemento fornecidos aos animais durante o experimento.....	30
Tabela 2 - Ingestão diária média de matéria seca e nutrientes (unidade/ kg ^{0,75}) dos cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	37
Tabela 3 - Resumo das análises de variância (ANOVAs) da frequência de respostas corretas apresentadas por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA nas etapas normal e reversa do teste de discriminação de objetos.....	38
Tabela 4 - Médias das frequências de respostas corretas em cada período avaliado nas etapas normal e reversa do teste de discriminação de objetos aplicado em cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	38
Tabela 5 - Resumo das análises de variância (ANOVAs) da concentração sérica dos ácidos graxos poli-insaturados em porcentagem relativa apresentados por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	40
Tabela 6 - Concentração sérica média de EPA + DHA em porcentagem relativa apresentadas por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	40
Tabela 7 - Resumo da análise de variância (ANOVA) da capacidade antioxidante total sérica em eq/TROLOX mM apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de respostas corretas independente do tempo na etapa normal do teste de discriminação de objetos apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	39
Gráfico 2 - Frequência de respostas corretas em cada período independente do tratamento na etapa reversa do teste de discriminação de objetos apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	39
Gráfico 3 - Porcentagem relativa média das concentrações de EPA + DHA apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concentração de ácidos graxos presente em óleos de origem animal e vegetal (g/100g).....	19
Quadro 2 - Trabalhos que avaliaram os efeitos da ingestão de ômega-3 na função cognitiva de pessoas e cães.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ÔMEGA-3 E FUNÇÃO COGNITIVA.....	21
2.2. ÔMEGA-3 E METABOLÔMICA.....	26
2.3.ÔMEGA-3 E A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	28
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS.....	30
4.1. OBJETIVO GERAL	30
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1. LOCAL.....	31
5.2. ANIMAIS E INSTALAÇÕES	31
5.3. ALIMENTAÇÃO.....	31
5.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	32
5.4.1. <i>Habilidade de aprendizado</i>	34
5.4.2. <i>Concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)</i>	37
5.4.3. <i>Capacidade antioxidante total (CAT)</i>	37
5.4.4. <i>Parâmetros bioquímicos, glicemia e hemograma</i>	38
5.4.5. <i>Próximas etapas a serem realizadas</i>	38
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
7.RESULTADOS.....	39
7.1. Ingestão de nutrientes	39
7.2. Habilidade de aprendizado.....	41
7.3. Concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI).....	43
7.4. Capacidade antioxidante total (CAT)	45
8. DISCUSSÃO	45
9. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

Na nutrição de animais de companhia, os lipídeos desempenham papel importante na palatabilidade, transporte de vitaminas lipossolúveis, fontes de energia, imunomodulação, constituição de membranas biológicas, fontes de ácidos graxos essenciais, dentre outros. A principal forma lipídica presente na dieta são os triglicerídeos, que por sua vez fornecem ácidos graxos essenciais, tais como os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ômega-3 (ácido alfa linolênico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico) e AGPI ômega-6 (ácido linoleico e ácido araquidônico).

O ácido graxo poli-insaturado docosahexaenóico (DHA) é um nutriente essencial para cães durante as fases de gestação, lactação e crescimento. A alimentação ou suplementação baseadas em fontes enriquecidas com DHA, como por exemplo o óleo de peixe, durante o desenvolvimento fetal e fase pós-natal, resultam no acúmulo do ácido graxo nas membranas neurais, o que está associado à melhora do desenvolvimento neurológico em seres humanos e alguns animais. Devido a esse papel no desenvolvimento neurológico, foram realizados estudos que avaliaram o efeito da suplementação de AGPI ômega-3 no comportamento, memória e habilidade de aprendizado em diferentes espécies, mas são poucos os experimentos direcionados à espécie canina na fase de crescimento.

Nos dias atuais, a pesquisa passou por grandes mudanças tecnológicas e as ciências ômicas, que buscam entender o funcionamento celular, trouxeram muitos avanços para o meio científico, principalmente na área da nutrição. A influência da alimentação vem sendo investigada em diferentes contextos e a metabolômica global, que caracteriza os metabólitos de um modo geral, pode ser uma interessante abordagem em estudos com cães em crescimento. Em humanos e cães adultos, alguns pesquisadores avaliaram a metabolômica frente à suplementação de ômega-3 e identificaram metabólitos envolvidos na intervenção dietética, dessa forma a caracterização do perfil de metabólitos de cães em crescimento frente ao consumo do óleo de peixe pode tornar-se importante para futuras pesquisas.

Além disso, a deposição desses AGPI nas membranas é questionada por alguns autores, pois estes são altamente sensíveis à oxidação lipídica devido ao número de insaturações presentes em suas estruturas, podendo assim causar danos ao organismo animal.

Diante do exposto, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de óleo de peixe concentrado em DHA na habilidade de aprendizado e também monitorar a capacidade antioxidante de cães em crescimento, bem como caracterizar seu perfil metabolômico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os triglicerídeos constituem a maior parte da gordura consumida pelos animais domésticos, sendo o principal componente lipídico e fonte de ácidos graxos essenciais (GURR et al., 2002; TREVIZAN e KESSLER, 2009). Dentre os triglicerídeos presentes na dieta, encontram-se os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ômega-3, que são ácidos carboxílicos no qual a primeira dupla ligação posiciona-se no terceiro carbono a partir da extremidade metil da molécula e por isso levam o nome de ômega-3. Podem ser divididos em ácido alfa linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (BAZINET et al., 2014).

Os AGPI ômega-3 são considerados essenciais durante a fase de desenvolvimento do cão, pois não podem ser sintetizados em quantidades suficientes pelo organismo (NRC, 2006). A deposição de AGPI ômega-3 nos tecidos corporais pode ser influenciada pela fonte de gordura do alimento, de modo que as fontes deste nutriente provindas de animais marinhos podem apresentar concentrações maiores de DHA quando comparadas às fontes de origem vegetal (JENSEN et al., 1996). No quadro 1 estão apresentadas as composições em ácidos graxos de alguns óleos utilizados na alimentação de cães e gatos.

Quadro 1. Concentração de ácidos graxos presentes em óleos de origem animal e vegetal (g/100g).

Alimento	Ac. Linoleico	Ac. Alfa linolênico	EPA	DHA	AA	Estearico
Sebo bovino	3,1	0,6	-	-	-	18,9
Gordura de frango	19,5	1	-	-	0,1	6
Gordura de peru	21,2	1,4	-	-	0,3	6,2
Óleo de fígado de bacalhau	0,9	0,9	6,9	10,9	0,9	2,8
Salmão	1,5	1,1	13,0	18,2	0,7	4,2
Óleo de sardinha	2,0	1,3	10,1	10,6	1,7	3,9
Óleo de canola	19,0	9,1	-	-	-	2,1
Óleo de semente de linhaça	15,8	48,9	-	-	-	3,4
Óleo de girassol	3,6	-	-	-	-	3,6
Óleo de milho	53,5	1,2	-	-	-	1,8
Óleo de soja	50,9	6,8	-	-	-	4,4
Óleo de semente de algodão	51,5	0,2	-	-	0,1	2,3

Fonte: Adaptado da tabela de composição química dos alimentos da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Legenda: EPA= ácido eicosapentaenóico; DHA= ácido docosahexaenóico; AA= ácido araquidônico.

Devido as diversas funcionalidades na área da nutrição e saúde, há alguns anos os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, principalmente o DHA, vem sendo

estudados por muitos pesquisadores. Encontram-se na literatura estudos que relacionaram esses AGPI com doenças, tais como: câncer em humanos (PIZATO et al., 2017; ORTEA et al., 2018), doença renal crônica em cães e urolitíases em gatos (BROWN et al., 2000; HALL et al., 2017), osteoartrites em cães (BUDDHACHAT et al., 2017; MEHLER et al., 2017), depressão em humanos (HALLAHAN et al., 2016; SONG et al., 2016), além de sua influência em processos pós-operatórios em humanos (WANG et al., 2015; ZHAO e WANG, 2017) e na função cognitiva de idosos (YOUNG et al., 2015).

2.1 ÔMEGA-3 E FUNÇÃO COGNITIVA

Através da esterificação na membrana fosfolipídica, o DHA é depositado no cérebro e encontra-se em altas concentrações. Esse ácido graxo compreende a maior parte dos ácidos graxos do tecido cerebral, enquanto o EPA representa apenas 1,0% dessa constituição (MCNAMARA e CARLSON, 2006; BOS et al., 2016). Com isso, o DHA torna-se fundamental no desenvolvimento e atuação do sistema nervoso, pois pode controlar processos ligados ao humor e habilidade de aprendizagem de um indivíduo (JENSEN, 1996; LUCHTMMAN e SONG, 2013; BAZINET et al., 2014; VASQUEZ et al., 2014). Enquanto que para o EPA, nenhum papel essencial foi até então atribuído a ele sobre funções nervosas (MAS et al., 2012; BAUER, 2016).

Sabe-se que o ácido alfa-linolênico, quando administrado no organismo, pode ser convertido em EPA e DHA através do envolvimento de enzimas chamadas $\Delta 6$ e $\Delta 5$ -dessaturases e elongases, que quebram as duplas ligações e adicionam hidrogênio à molécula, respectivamente (WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al., 2015). Valenzuela et al. (2014) comprovaram que a ingestão de óleos com altas concentrações de ALA por ratos resultou na conversão desse ácido graxo em DHA e houve consequente deposição no organismo.

Salem et al. (2015) forneceram uma dieta composta de 15,0% de ácido linoleico e 3,0% de ácido alfa linolênico, provenientes de óleo de côco, linhaça e cártamo para ratas gestantes e, analisaram as concentrações desses ácidos graxos em 25 diferentes tecidos corporais de filhotes machos. Os autores encontraram maior reserva de AGPI ômega-6 na deposição total dos tecidos, no entanto, as concentrações de DHA foram 5 vezes maiores que as concentrações de ácido linoleico no cérebro (Figura 1). Além disso, observou-se que as concentrações de DHA foram 68 vezes maiores no tecido cerebral, quando comparado ao tecido

adiposo, o que comprova que esses nutrientes são depositados de forma seletiva nas membranas cerebrais e podem influenciar nas funções neurológicas.

Figura 1. Distribuição (%) de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 e n-6 em diferentes tecidos corporais de filhotes de ratos que ingeriram 15,0% de ácido linoleico e 3,0% de ácido alfa linolênico durante a gestação.

Adaptado de Salem et al. (2015).

É importante destacar que a espécie canina possui a capacidade de sintetizar EPA e DHA a partir de seu precursor ativo apenas por curto período de tempo, durante o período neonatal e, posterior a essa fase, essa síntese não ocorre (BAUER et al., 2006). Dessa forma, a ingestão adequada de DHA revela-se essencial, pois uma alimentação deficiente pode influenciar no processo de deposição na membrana neural, promovendo prejuízos ao desenvolvimento neurológico (DYALL e TITUS, 2008; MCNAMARA et al., 2014; BAUER, 2016).

Mediante ao alto potencial de deposição do DHA no cérebro, alterações na função cognitiva frente à suplementação de ômega-3 foram investigadas nos últimos anos. No quadro 2 estão apresentados alguns resultados de trabalhos realizados no âmbito da cognição humana e canina.

Quadro 2. Trabalhos que avaliaram os efeitos da ingestão de ômega-3 na função cognitiva de pessoas e cães.

Referência	Espécie/ idade	Objetivo	Dose/tempo	Resultados/conclusões
Re et al. (2008)	Cães/ 4,9 anos	Investigar o status plasmático de ácidos graxos poli-insaturados de cães agressivos.	Avaliação de 18 cães adultos sem sinais de agressividade e 18 cães adultos com sinais de agressividade.	Em comparação com cães normais, os cães agressivos apresentaram menores concentrações de DHA e maior relação ômega-6/ômega-3.
Zicker et al. (2012)	Cães/ 8 a 52 semanas	Avaliar os efeitos da inclusão de diferentes teores de DHA no alimento na função cognitiva, psicomotora, imunológica e retiniana de cães filhotes saudáveis.	<0,01% MS DHA e EPA; 0,095% MS DHA e 0,13% EPA; 0,19% MS DHA e 0,31% EPA. Do desmame até 1 ano de idade.	A suplementação do óleo de peixe com concentrações médias e altas de DHA após o desmame melhorou a função cognitiva, psicomotora, imunológica e retiniana em cães em crescimento.
Hadley et al. (2017)	Cães/ 9 a 11 anos	Avaliar a biomassa seca de algas como fonte de DHA baseado em alterações nas concentrações plasmáticas de ômega-3 e 8-isoPGF2 α .	26mg de DHA/kg peso corporal durante 25 semanas.	Foram observadas melhores respostas nos protocolos cognitivos nos cães tratados, o que sugere a existência da associação entre o consumo de uma dieta enriquecida com algas e o suporte à função cerebral saudável de cães idosos.
Pan et al. (2018)	Cães/ 9 a 11 anos	Avaliar os efeitos da suplementação dietética de uma mistura de nutrientes composta por antioxidantes, vitaminas do complexo B, óleo de peixe e L-arginina, na cognição de cães idosos.	0,21%MS de DHA e 0,24%MS de EPA, durante 6 meses.	O grupo suplementado apresentou arginina, α -tocoferol, DHA e EPA em maiores concentrações no plasma e melhor desempenho na realização de tarefas de aprendizagem e memória.
Jensen et al. (2005)	Humanos/ 12 e 30 meses	Determinar o efeito da suplementação de DHA em mulheres lactantes sobre o desenvolvimento neurológico e visual dos bebês.	200mg de DHA/dia durante 4 meses após o parto	A suplementação resultou em maiores concentrações de DHA no plasma e em melhor índice de desenvolvimento psicomotor aos 30 meses de idade.
Dunstan et al. (2006)	Humanos/ 30 meses	Avaliar os efeitos do ômega-3 sobre o desenvolvimento cognitivo de crianças cujas mães consumiram óleo de peixe durante a gravidez.	2.2g de DHA e 1.1g de EPA/dia durante 20 semanas antes do parto.	A suplementação pré-natal promoveu bons resultados no desenvolvimento visual e coordenação motora nos bebês nascidos de mães suplementadas com óleo de peixe.
Continua				

Continuação				
Referência	Espécie/ idade	Objetivo	Dose/tempo	Resultados/Conclusões
Henriksen et al. (2014)	Humanos/ 6 meses	Avaliar o efeito da suplementação de DHA e AA na função cognitiva aos 6 meses de idade, de crianças prematuras, alimentadas durante o período de amamentação com leite enriquecido.	32mg de DHA e 31mg de EPA/100mL de leite humano durante as primeiras 9 semanas de vida.	A ingestão do leite enriquecido foi associada a melhor memória de reconhecimento e maiores índices de resolução de problemas aos 6 meses.
Ramakrishnan et al. (2016)	Humanos/ 5 anos	Avaliar a cognição, o comportamento e a atenção aos 5 anos de idade de crianças cujas mães foram suplementadas com DHA durante a gravidez.	400mg de DHA/dia da 18ª a 22ª semana de gravidez até o parto.	Melhores escores nos testes cognitivos em resposta à exposição pré-natal de DHA foram acompanhados de estímulos familiares positivos durante a fase de pré-escola, porém não encontraram outros efeitos.
Yuan et al. (2016)	Humanos/ 55 anos ou mais	Explorar a relação entre o perfil de ácidos graxos dos eritrócitos e disfunção cognitiva em idosos adultos chineses.	Aplicação de questionário de frequência alimentar em idosos saudáveis ou com comprometimento cognitivo leve (CCL).	Indivíduos com CCL ingeriram menor quantidade de peixes e apresentaram baixa concentração de ácidos graxos insaturados e maiores de ácidos graxos saturados eritrocitários. Associação entre concentração de ácidos graxos nos eritrócitos e CCL foi encontrada.
Hashimoto et al. (2017)	Humanos/ 75 anos ou mais	Avaliar os efeitos do consumo de refeições enriquecidas com DHA na função cognitiva de pessoas idosas com déficit cognitivo, residentes em lares de idosos e na melhoria da sobrecarga do cuidador.	1720mg de DHA/dia adicionais, durante 12 meses.	As respostas aos testes de cognição aplicados aos idosos com déficits cognitivos foram melhores para o grupo que ingeriu maior quantidade de DHA nas refeições, assim como melhorou a sobrecarga do cuidador.
Bo et al. (2017)	Humanos/ 65 anos ou mais	Determinar o efeito da suplementação de DHA na função cognitiva e atrofia do hipocampo em idosos com CCL.	2g de DHA/dia durante 12 meses.	Melhores respostas dos exercícios de cognição e maior volume do hipocampo foram encontrados no grupo suplementado, o que indica que a suplementação de DHA em indivíduos com CCL pode melhorar significativamente a função cognitiva e retardar a progressão da atrofia do hipocampo.
Demmelmair et al. (2018)	Humanos/ 4 e 6 anos	Comparar o desempenho cognitivo e motor de crianças alimentadas com salmão ou carne.	Consumo de alimentos à base de salmão (média de 2,18mg de DHA/g) ou carne bovina (média de 0,032mg de DHA/g) durante 16 semanas.	A ingestão de salmão levou ao aumento dos escores de dois testes cognitivos em um total de oito, indicando associação positiva em testes de inteligência fluida, mas não sugeriu influência no desenvolvimento global do quociente de inteligência (QI).
Petrova et al. (2018)	Humanos/ 8 a 14 anos	Investigar se o leite enriquecido com micronutrientes e ômega-3 pode resultar em melhor função cognitiva de crianças em idade escolar.	20mg de DHA e 10mg de EPA/100mL de leite com vitaminas e minerais durante 5 meses	A ingestão do leite proporcionou melhora na memória e velocidade de processamento, porém correlação exclusiva do ômega-3 e os resultados não foi apresentada.

A influência dos ácidos graxos ômega-3 na função cognitiva infantil, especificamente o DHA, foram estudadas em algumas espécies, como seres humanos (ØYEN et al., 2018), ratos (RATHOD et al., 2015) e cães (ZICKER et al., 2012). Sabe-se que a suplementação de AGPI em mulheres caracteriza a composição do leite materno e permite a transferência desse nutriente ao bebê através da amamentação (JENSEN et al., 2005).

Ramakrishnan et al. (2016) mensuraram a habilidade de aprendizado em crianças com cinco anos de idade, filhas de mulheres que foram suplementadas com 400mg de DHA/dia, durante a gestação e, comprovaram que a exposição pré-natal ao ácido graxo pode melhorar a atenção de crianças no período da pré-escola. Esses efeitos também foram encontrados em crianças suplementadas diretamente com DHA. Henriksen et al. (2014) avaliaram o efeito da suplementação de DHA em bebês prematuros alimentados com leite materno enriquecido com 32mg de DHA/100mL de leite no desenvolvimento cognitivo aos 6 meses de idade e demonstraram melhora na memória de reconhecimento.

Diante do exposto, sugere-se que a suplementação dos AGPI ômega-3 também pode ser benéfica durante a fase de crescimento de cães saudáveis. Alguns pesquisadores desenvolveram metodologias que puderam mensurar a capacidade cognitiva de cães e, o quanto este pode ser influenciado por intervenções nutricionais (MILGRAM et al., 2005; LAZAROWSK et al 2014; BAUER, 2016).

A avaliação da função cognitiva em cães pode ser realizada através de diversos testes (HECKLER et al., 2015), o teste de discriminação de objetos que está associado a utilização da região do hipocampo (BECKER et al., 1980) é um deles e segundo Adams et al. (2000), esse tipo de teste avalia principalmente o desenvolvimento da memória semântica.

Embora não sejam encontrados na literatura muitos estudos que correlacionem a função cognitiva à suplementação de DHA em filhotes, o principal estudo com cães em crescimento foi desenvolvido por Zicker et al. (2012), que investigaram o efeito da ingestão de DHA incluso em alimento seco extrusado por cães filhotes da 8ª a 52ª semana de idade. Os autores utilizaram 48 beagles divididos em 3 grupos: baixo DHA (<0,01% na MS), moderado DHA (0,095% na MS) e elevado DHA (0,19% na MS). O grupo que recebeu a maior quantidade de DHA demonstrou melhora na aprendizagem de discriminação visual e desempenho psicomotor, além de apresentar títulos antirrábicos maiores em 1 a 2 semanas após a vacinação, quando comparado aos

demais grupos. Além desses achados, a eletroretinografia foi correlacionada de forma positiva com as concentrações séricas de DHA em todos os momentos avaliados e, portanto, os autores concluíram que o alimento com maiores teores de DHA, após o desmame, melhorou as funções cognitivas, psicomotoras, imunológicas e retinianas de cães em crescimento.

2.2. ÔMEGA-3 E METABOLÔMICA

Nos últimos anos, as ciências ômicas trouxeram muitos avanços em pesquisas direcionadas principalmente à espécie humana e buscam explicar o funcionamento celular e suas alterações biológicas. Podem ser compostas pela genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas) e, a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos) (CANUTO et al., 2018).

A metabolômica pode ser definida como a análise abrangente e quantitativa do metaboloma (conjunto de metabólitos) de um sistema biológico (FIEHN, 2001). Para investigação dos resultados dessa análise, existem duas abordagens que podem ser escolhidas de acordo com o objetivo da pesquisa: metabolômica alvo (*targeted metabolomics*) que consiste na análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química e metabolômica global (*untargeted metabolomics*), definida como análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes à diversas classes químicas (CANUTO et al., 2018).

A metabolômica vem sendo utilizada para responder indagações na ciência em diferentes cenários. Segundo o estudo de Hellmuth et al. (2019), que teve como objetivo identificar os metabólitos humanos maternos e seus determinantes associados à adiposidade neonatal, foi possível se obter informações sobre o risco de obesidade que o bebê pode estar exposto e a importância das intervenções dietéticas da mãe durante a gestação. Além disso, alguns dos metabólitos envolvidos nas alterações que a obesidade pode ocasionar no organismo foram determinados por Bagheri et al. (2019), que identificaram 19 metabólitos associados à doença, sendo 9 originados de aminoácidos e 10 de lipídios polares que podem servir como um potencial biomarcador da obesidade adulta.

Além da obesidade, outros aspectos podem ser esclarecidos através da metabolômica e estudos em diferentes áreas podem ser encontrados na literatura como por exemplo: estresse em cães (PUURUNEN et al., 2016), individualidade de

raças caninas (VIANT et al., 2007; LLOYD et al., 2016), sistema nervoso de ratos (NOGA et al., 2012) câncer em humanos (WANG et al., 2017), longevidade humana (CHENG et al., 2015), dentre outros.

Entre esses diferentes contextos, a nutrição pode influenciar de forma potencial, na qual efeitos sutis causados por mudanças dietéticas podem ser detectados pela alteração de metabólitos (OREŠIČ, 2009; LIU et al., 2019). A pesquisa da metabolômica no âmbito nutricional apresentou grande expansão nos últimos anos e tem o potencial de melhorar as avaliações nutricionais, auxiliar na personalização de dietas e melhorar a compreensão dos efeitos da nutrição na saúde (GONZÁLEZ-PEÑA e BRENNAN, 2019).

Encontram-se na literatura estudos que avaliaram o efeito de diversas dietas sobre a metabolômica, tanto em humanos (BEERMANN et al., 2003; BALDERAS et al., 2010; WONG et al., 2012; PEREZ-CORNAGO et al., 2014) como em ratos (DINIZ et al., 2004; WANG et al., 2006), peixes (LIU et al., 2019), gatos (DENG et al., 2014), cães adultos (SCHMIDT et al., 2018) e cães idosos (GEBRESELASSIE et al., 2018). Da mesma forma, alterações metabolômicas proporcionadas pela ingestão de ômega-3 estão sendo bem estabelecidas na literatura, porém, são escassos os trabalhos com a mesma abordagem em cães filhotes saudáveis.

Rudkowska et al. (2013) avaliaram alterações moleculares e metabolômicas em 30 indivíduos saudáveis (homens e mulheres) frente à suplementação com AGPI ômega-3 (1,9g/dia EPA e 1,1g/dia DHA). Através de espectrometria de massa, os autores investigaram a presença de 163 metabólitos (acilcarnitinas, aminoácidos e lipídeos) e constataram aumento da concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) e glicose após jejum em mulheres e, acilcarnitinas, hexoses e leucina em homens. Para ambos os sexos, a suplementação influenciou no aumento de EPA e DHA nos eritrócitos e na diminuição de glicerofosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina.

Em um estudo semelhante, Ottestad et al. (2012) investigaram o efeito da suplementação de óleo de peixe (1,6g/dia EPA + DHA) durante sete semanas sobre o perfil lipídico plasmático em indivíduos saudáveis, com idade média de 28 ± 8 anos. Os autores detectaram 568 e identificaram 260 metabólitos lipídicos, sendo fosfolipídios e triglicérides em sua maioria. Destes, 23 estavam em concentrações mais baixas e 51 se apresentaram em maior quantidade após 3 semanas de suplementação e, após sete semanas, os grupos suplementados e controle apresentaram resultados similares.

Em cães adultos saudáveis essas alterações também vêm sendo investigadas. Hall et al. (2011) avaliaram os efeitos das vitaminas E e C em combinação com o óleo de peixe na dieta de 53 cães com idade média de 5,3 anos (1,4 a 14,3 anos) sobre metabólitos plasmáticos e urinários. Os pesquisadores observaram que a concentração de vitamina E é determinada primeiramente pela ingestão da mesma e de forma secundária esteve relacionada com o aumento da concentração de colesterol no soro. Além disso, a maior ingestão de ômega-3 pelos animais, seguida do efeito da presença de massa magra, diminuíram as concentrações de 11-dehydro TBX2 na urina, um metabólito do tromboxano (mediador inflamatório) biologicamente ativo correlacionado com a ingestão de EPA e aumentaram os 1-docosaheptaenoil-GPC, lisofosfolípidios séricos que podem ser decorrentes da concentração de DHA. Portanto, baseado nos resultados obtidos através da metabolômica, é possível sugerir que a ingestão de óleo de peixe dietético altera o metabolismo lipídico, podendo aumentar a chance de melhor absorção de nutrientes através do aumento de lisofosfolídeos e pode atuar na redução de mediadores inflamatórios em cães saudáveis.

Dessa forma, ao perceber a gama de metabólitos que podem ser analisados e caracterizados decorrentes de intervenções dietéticas, em especial do consumo de ômega-3, a investigação do efeito da suplementação de DHA no metaboloma de cães em crescimento torna-se importante.

2.3. ÔMEGA-3 E A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A oxidação é um processo fundamental para a produção de energia necessária às funções vitais do organismo. Porém, o metabolismo aeróbico das células também resulta na produção de radicais livres (ROESLER et al., 2007). Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam número ímpar de elétrons em sua camada de valência, fato que confere alta reatividade a eles (HALLIWELL et al., 1992).

A lipoperoxidação é uma das principais consequências do estresse oxidativo, que resulta em lesão celular, esta consiste em reações de oxidação em componentes lipídicos do organismo, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, que fazem parte da constituição das membranas biológicas e também lipoproteínas. Isso resulta em alterações da estrutura, permeabilidade, fluidez das membranas biológicas e atividade enzimática (MELLO FILHO et al., 1984).

O processo de lipoperoxidação em alimentos ou suplementos alimentares pode implicar em várias consequências negativas, incluindo destruição parcial de vários compostos, como ácidos graxos insaturados essenciais, compostos lipossolúveis (vitamina A, carotenóides e tocoferóis), vitamina C; bem como implicar na formação de compostos secundários da oxidação lipídica e compostos de *Maillard*. Os peróxidos podem provocar irritação da mucosa intestinal, o que pode levar a vômito e diarreia, redução da capacidade de absorção e a menor palatabilidade do alimento. Além disso, lipídios oxidados atuam como antagonistas de muitos nutrientes (tiamina, pantotenato de cálcio, riboflavina, ácido ascórbico, vitamina B12, tocoferóis, vitamina A, proteínas, lisina e aminoácidos sulfurados), portanto, dependendo do grau de lipoperoxidação, deficiência nutricional pode ser desenvolvida (KANNER, 1994).

Ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 como EPA e DHA apresentam maior número de duplas ligações, isso os tornam mais sensíveis ao processo de lipoperoxidação. Esses ácidos graxos por sua vez são acumulados facilmente nas membranas plasmáticas, fazendo parte de sua estrutura e atuam em importantes funções celulares e, a peroxidação lipídica destes podem provocar danos ao DNA, podendo levar à apoptose celular (GONZÁLEZ e RIORDAN, 1996).

Alguns autores estudaram o efeito da ingestão de óleo de peixe sobre alterações oxidativas em cães, como Wander et al. (1997) que observaram aumento nas concentrações de coprodutos da peroxidação lipídica e redução nas concentrações de α -tocoferol plasmático ao alimentar cães com dietas contendo óleo de peixe com relação n-6:n-3 de 1,4:1. LeBlanc et al. (2005) também avaliaram esses efeitos, mas não encontraram nenhuma alteração que indicasse oxidação lipídica em cães alimentados com dietas contendo 1,75g de EPA/kg e 2,2g de DHA/kg de alimento durante 12 semanas.

Dessa maneira, apesar dos vários efeitos benéficos da suplementação de óleo de peixe para cães e gatos, é necessário monitorar o fornecimento de ácidos graxos ômega-3, sobre a redução da capacidade antioxidante total no organismo causada pela possível formação de substratos para peroxidação lipídica no organismo.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é de que o grupo suplementado apresente melhor desempenho no teste de habilidade de aprendizado, além de apresentar maiores concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados sem que haja alterações na capacidade antioxidante total sérica.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 provenientes de óleo de peixe, na função cognitiva de cães em crescimento.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se há diferença de desempenho entre os grupos face ao teste cognitivo de discriminação de objeto com utilização do aparelho TGTA (*Toronto General Testing Apparatus*);
- b) Caracterizar a metabolômica de cães em crescimento frente à suplementação de ômega-3;
- c) Avaliar se há diferença das concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados entre os grupos;
- d) Avaliar se há diferença na capacidade antioxidante total entre os dois grupos estudados.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LOCAL

O estudo foi conduzido nas dependências do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN-PET), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP), localizado na cidade de Pirassununga- Brasil.

5.2. ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Foram utilizados 12 cães, machos e fêmeas, com idade de três meses, média de peso inicial de $7,6 \pm 0,22$ kg, escore de condição corporal médio de $5,0 \pm 1,0$; segundo a escala de Laflamme (1997) e escore de massa muscular médio de $2,0 \pm 0,5$ de acordo com a escala de Michel (2009), clinicamente sadios, vermifugados e vacinados. Os animais tiveram sua higidez avaliada previamente por meio de exame físico, hemograma e exames bioquímicos para a avaliação das enzimas hepáticas, ureia e creatinina.

Os cães foram alojados em canis de $3,42\text{m}^2$ em área coberta com solário de $7,21\text{m}^2$; piso de concreto e paredes de azulejo, agrupados de acordo com a afinidade social previamente determinada e acesso à água *ad libitum*. Com o objetivo de promover bem-estar aos animais, estes foram soltos para recreação e atividade física em parques gramados com área de $40\text{m}^2/\text{parque}$, duas vezes ao dia.

5.3. ALIMENTAÇÃO

Os cães receberam alimento comercial *super premium* para filhotes, além de um alimento úmido, completo e balanceado, fornecido com o objetivo de recompensa durante a avaliação da função cognitiva. A ingestão de ambos os alimentos foi monitorada diariamente, e foi realizado o cálculo de ingestão dos nutrientes provenientes de cada alimento. Avaliou-se o escore fecal individual, de acordo com a escala descrita por Moxham (2001), e a necessidade energética para crescimento (NEC) foi determinada pela equação: $130 \times \text{PCA}^{0,75} \times 3,2 \times (e^{-0,87p} - 0,1)$ (NRC, 2006), onde “PCA” é o peso corporal atual, “p” corresponde a razão: peso corporal atual/peso adulto esperado e “e” é a base do logaritmo natural, $\log = 2,718$. Foi adotado como peso adulto estimado: 14kg e 11kg para os cães da raça cocker e beagle, respectivamente.

Para determinação da composição bromatológica dos alimentos consumidos pelos animais, as amostras do alimento úmido utilizado como recompensa durante a

avaliação da função cognitiva foram desidratadas em estufa de ventilação forçada (Marconi MA035/2, Piracicaba, Brasil) a 55°C por 72 horas de acordo com método proposto pela AOAC (2006). Na sequência, a moagem dessas amostras assim como as amostras do alimento seco foi realizada e a matéria seca foi determinada em estufa a 105°C por oito horas (Fanen 315, São Paulo, Brasil). As análises de proteína bruta foram realizadas pelo método de Kjeldahl, as análises de extrato etéreo foram realizadas através do equipamento Ankom XT15 (AOAC, 2006) e a matéria mineral foi determinada por incineração em mufla a 550°C (AOAC, 1995, 2006). As análises de fibra bruta foram realizadas de acordo com método de Weende (WILLIAMS; OLMSTED, 1935). Para a avaliação dos teores de cálcio e fósforo, foi preparada inicialmente a solução mineral por via seca, descrita pela AOAC (1995). O teor de fósforo foi determinado pelo método colorimétrico e para determinação do cálcio, foi utilizado o método de titulometria com EDTA (AOAC, 1995).

As análises foram realizadas em duplicata (proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral) ou triplicata (fibra bruta) no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e realizada repetição quando o coeficiente de variação entre as duplicatas foi maior do que 5,0%.

A quantidade de alimento foi reajustada semanalmente após pesagem dos animais e avaliação do escore de condição corporal (ECC) e escore de massa muscular (EMM) também. Para os animais que não atingiram o ECC ideal (4-5), a equação foi reajustada com aumento (ECC acima de 5) ou diminuição (ECC abaixo de 5) de 5-10% da necessidade energética de crescimento do animal.

5.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os cães foram bloqueados por raça e distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 6 animais cada: Grupo Tratado (GT), com suplementação de óleo de peixe concentrado em DHA e Grupo Controle (GC), sem suplementação. A quantidade de suplemento fornecida foi reajustada de acordo com o peso dos animais e a dose ingerida de DHA foi de aproximadamente 40mg/kg peso corporal, com uma ingestão total de aproximadamente 67mg/kg peso corporal ao considerar o DHA proveniente da alimentação toda, uma vez que durante a fase de crescimento, esse ácido graxo é essencial, portanto estava presente no alimento fornecido. A suplementação foi realizada diariamente, via oral, às 8:00 horas, com o fornecimento da cápsula de

500mg inteira. As coletas de dados foram realizadas antes (período 0), 30 (período 1), 60 (período 2) e 90 dias (período 3) após o início da suplementação. A composição bromatológica e perfil dos ácidos graxos dos alimentos e da cápsula estão apresentados na tabela 1 e um resumo das etapas experimentais realizadas encontra-se esquematizado na figura 2.

Tabela 1. Composição bromatológica e perfil de ácidos graxos poli-insaturados dos alimentos e das cápsulas fornecidos aos animais durante o experimento.

Nutrientes	Alimentos completos			Cápsula
	AR	AUF	AUC	
MS (%)	87,45	94,16	93,48	
MM (%)	6,62	10,74	9,24	
EE (%)	21,50	23,53	26,78	
FB (%)	5,18	11,99	8,21	
Ca (%)	1,55	2,04	1,55	
P (%)	0,89	1,91	1,55	
PB (%)	34,09	48,78	49,20	
Ac. Linolênico (%)	0,24	0,43	0,41	1,38
Ac. Linoleico (%)	4,19	5,95	5,38	9,00
DHA (%)	0,11	0,02	0,04	49,60
EPA (%)	0,15	0,01	0,02	12,50
AA (%)	0,12	0,37	0,41	1,40

Legenda: AR= Alimento seco extrusado; AUF = Alimento úmido de frango; AUC= Alimento úmido de carne; MS= Matéria seca; MM= Matéria mineral; EE= Extrato etéreo, FB= Fibra bruta; Ca= Cálcio; P= Fósforo; PB= Proteína bruta; DHA= Ácido docosahexaenóico; EPA= Ácido eicosapentaenóico; AA= Ácido araquidônico.

Figura 2. Variáveis avaliadas e etapas desenvolvidas durante o experimento.

A habilidade de aprendizado foi avaliada através do teste de discriminação de objetos, em um estudo cego, realizado com o uso do aparato *Toronto General Testing Apparatus* (TGTA) adaptado de estudos prévios (MILGRAM et al., 1994; ZICKER et al., 2012; LAZAROWSKI et al., 2014). O teste consiste na avaliação da capacidade do animal em associar um objeto a presença de uma recompensa e assim, mensurar sua habilidade de aprendizado.

Após jejum noturno de 12 horas, foram coletados 9mL de sangue da veia jugular através do uso de seringa de 10mL e agulha nº 21G para determinação das concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados (2mL) (AGPI), capacidade antioxidante total (2mL), avaliação dos parâmetros bioquímicos (2,5mL) e hemogramas (0,5mL).

5.4.1. Habilidade de aprendizado

Como já citado, a habilidade de aprendizado foi avaliada através do teste de discriminação de objetos, realizado com o uso do TGTA, um aparato adaptado que é composto por uma caixa de madeira de 0,7 x 0,7 x 0,6m, equipada com barras ajustáveis ao tamanho dos animais juntamente com uma bandeja de madeira com dois orifícios, por onde o alimento (recompensa) e o objeto foram posicionados (Figura 3).

Figura 3. Aparato utilizado para execução do teste de discriminação de objetos em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA (TGTA).

Fonte: Arquivo pessoal.

Um primeiro avaliador (avaliador 1) foi separado do cão por uma cortina construída com material TNT para que não houvesse contato visual entre ambos, além de servir de abertura para permitir a passagem da bandeja com a recompensa a ser oferecida pelo avaliador. No lado oposto, encontrava-se um segundo avaliador (avaliador 2) que por sua vez posicionava o animal dentro do aparelho para que ele caminhasse em direção à bandeja (Figura 4). A recompensa oferecida em todas as etapas consistiu em um alimento úmido completo e balanceado para cães filhotes, escolhido por apresentar maior palatabilidade em relação ao alimento de rotina (120g/dia de avaliação) e, dessa forma, garantir que os animais estivessem motivados a realizar as tarefas.

Figura 4. Representação da execução do teste de discriminação de objetos para avaliação da habilidade de aprendizado em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.

Fonte: Adaptado de Heckler et al. (2015).

Legenda: (A)= Avaliador 2; (B)= Avaliador 1; (C)=Aparelho TGTA adaptado; (D)= Cortina de TNT; (E)= Objetos posicionados em cima dos orifícios; (F)= Bandeja com orifícios.

Este teste foi composto por duas etapas: treinamento e avaliação. O treinamento foi constituído por quatro fases, sendo elas:

a) Adaptação: com o objetivo de ambientar o animal e ensiná-lo a caminhar pelo aparelho, os avaliadores o conduziram até a abertura que continha a bandeja. Dessa forma, toda vez que o animal caminhava pelo aparelho e chegava até a abertura com barras ajustáveis, ele era recompensado com um alimento dentro de um recipiente. Esse procedimento foi repetido até que o animal não apresentasse qualquer tipo de medo em relação ao aparelho (recuar, correr, latir).

b) Abordagem de recompensa: o objetivo dessa etapa foi garantir a associação da bandeja com a apreensão do alimento. Dessa forma, a recompensa foi fornecida em um dos orifícios e os animais foram condicionados a buscar pelo

alimento após a ultrapassagem da bandeja pela cortina. Foram realizadas 10 tentativas por sessão, duas vezes ao dia, de modo que quando o animal acertava o orifício onde se encontrava a recompensa em 9 de 10 tentativas em uma sessão ou, 8 de 10 tentativas em duas sessões consecutivas, ele passava para a próxima fase de treinamento. Foi considerado como erro quando o animal procurava pelo orifício da bandeja que não continha alimento.

c) Deslocamento do objeto: o intuito dessa fase foi ensinar o animal a empurrar um objeto colocado em posição aleatória (obtida através de sorteio) sobre um dos orifícios da bandeja que continha o alimento e, assim, induzi-lo a associar a presença do objeto à recompensa. Para evitar que o animal tivesse escolhas influenciadas pelo olfato, o mesmo alimento foi colocado de baixo de ambos os orifícios, em um compartimento que não permitia o acesso. Foi considerado erro, quando o animal se direcionava para a saída que não continha o objeto e, por consequência, não recebia a recompensa. As sessões foram compostas por 10 tentativas, realizadas duas vezes por dia e o animal mudava de fase quando atingia o mesmo critério da etapa anterior.

d) Escolha do objeto: colocou-se um objeto em cada orifício da bandeja no qual apenas um comportava o alimento e, portanto, este foi denominado objeto E+ (estímulo positivo). O objeto posicionado no orifício que não apresentava alimento foi denominado E- e foi representado por 5 cores e formatos diferentes, enquanto o E+ permaneceu com o mesmo formato e cor em todas as tentativas. As posições foram alteradas de forma que E+ e E- apareciam 5 vezes na direita e 5 vezes na esquerda, sem que ficassem na mesma posição três vezes seguidas. Com duas sessões por dia, os critérios para conclusão da fase de treinamento permaneceram como nas etapas anteriores.

O tempo de duração em dias da etapa de treinamento variou de acordo com cada animal. Após a finalização da etapa de treinamento, iniciou-se a etapa de avaliação, com duração de 10 dias (ou seja, 10 sessões) composto por 20 tentativas cada sessão, no qual dois objetos de formatos e cores diferentes foram usados, um laranja e um azul.

Durante os cinco primeiros dias de avaliação, realizou-se a etapa normal, na qual o objeto laranja foi determinado E+ (acompanhado de recompensa) e o objeto azul E- (não apresentava alimento como recompensa) e, durante os últimos cinco dias, a ordem dos objetos foi trocada de modo que o azul se tornou E+ e o laranja E-

, portanto esta foi considerada etapa reversa. Realizou-se uma sessão por dia de 20 tentativas (Anexo 1), na qual as posições de ambos os objetos foram alternadas de acordo com sorteio realizado previamente (10 vezes posicionados na direita e 10 vezes posicionados na esquerda, sem que houvesse três repetições seguidas). Considerou-se como erro quando o objeto E- foi escolhido. Na figura 5 encontra-se ilustrado o momento de avaliação da etapa normal (objeto azul é o E+).

Figura 5. Aplicação do teste de discriminação de objetos com o uso do TGTA em cães filhotes suplementados ou não com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA.

Legenda: (A) Representação de uma das 20 tentativas na qual o animal se dirige ao lado direito onde encontra-se o objeto azul (E+) e recebe a recompensa. (B) Representação de uma das 20 tentativas na qual o animal se dirige ao lado esquerdo onde encontra-se o objeto azul (E+) e recebe a recompensa. (C) Avaliador 2 introduzindo o animal na caixa. (D) Avaliador 1 apresentando a bandeja ao animal.

5.4.2. Concentrações séricas de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)

Em tubos BD Vacutainer® com ativador de coágulo, as amostras de sangue coletadas foram mantidas à temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, em seguida foram centrifugadas por 15 min a 3500 rpm e 4°C e o soro sobrenadante foi transferido para tubos plásticos (eppendorf)® de 2mL rotulados e armazenados a -20°C. No momento das análises, o soro foi descongelado e os ácidos graxos foram quantificados e identificados através do método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) em cromatógrafo a gás CG-14B, Shimadzu, nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), campus de Jaboticabal-SP. Os AGPI mensurados foram: EPA, DHA, AA, AL e ALA.

5.4.3. Capacidade antioxidante total (CAT)

As amostras sanguíneas foram coletadas de maneira similar às amostras para avaliação das concentrações séricas de AGPI. As análises foram realizadas no Laboratório Especializado em Análises Científicas, São Paulo-SP com auxílio de kit específico Antioxidant Assay Kit, DTAC-100, Sigma, Hayward, EUA, que mede a capacidade antioxidante total na qual o Cu^{2+} é reduzido pelos antioxidantes presentes na amostra para o Cu^+ . O Cu^+ resultante forma especificamente um complexo colorido com um reagente corante e a intensidade da cor em 570nm é proporcional a capacidade antioxidante total na amostra.

5.4.4. *Parâmetros bioquímicos, glicemia e hemograma*

Para análise da bioquímica sanguínea e glicemia, as amostras foram armazenadas em tubos BD Vacutainer® com ativador de coágulo e BD Vacutainer® Fluoreto/EDT, respectivamente. A determinação foi realizada com o auxílio de espectrofotômetro automático BS120 (Mindray China), utilizando-se kits comerciais (Labtest, Brasil).

Quanto à realização de hemogramas, foram utilizados tubos BD Vacutainer® com EDTA. Os resultados foram determinados com o auxílio do equipamento hematológico automático BC2800Vet (Mindray, China) e método May-Grunwald-Giemsa modificado. A Proteína total plasmática foi obtida por refratometria (Refratômetro portátil - Quimis, Brasil). Imediatamente após o termino das coletas, as amostras foram enviadas para o Laboratório Clínico da Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga, SP.

5.4.5. *Próximas etapas a serem realizadas*

A análise do perfil metabolômico não pode ser desenvolvida devido ao fato do laboratório da Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP ter interrompido suas atividades em consequência da pandemia de Covid-19 ocasionada pelo vírus SARS-CoV2 que o planeta está enfrentando, dessa forma a declaração de suspensão das atividades do pesquisador responsável encontra-se no anexo 2.

Amostras de sangue foram após serem coletadas de forma similar às análises anteriores foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a análise. Para análise, o plasma será descongelado e os metabólitos serão identificados e quantificados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta frequência nas dependências da Embrapa

Instrumentação, São Carlos – SP. O preparo do soro seguirá o protocolo previamente descrito por Beckonert et al. (2007). Após descongeladas, serão pipetados 200µL da amostra e 400µL de solução salina a 0,9% e marcador em microtubos de 2mL, homogeneizados e centrifugados por 12.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, 550µL da amostra preparada será transferida para os tubos de 5mm de RMN e transferidos para o aparelho de 600MHz para aquisição dos espectros.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo contou com o uso do software *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.4), foi verificada previamente a normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO-WILK e as variáveis que não atenderam as premissas estatísticas sofreram transformação logarítmica ou raiz quadrada e quando necessária, houve retirada de outliers.

Para a realização das análises estatísticas da ingestão de nutrientes realizou-se apenas a análise de variância pelo PROC GLM. Enquanto que para as variáveis do teste de discriminação de objeto (etapa normal e reversa), concentração sérica de ácidos graxos poli-insaturados e capacidade antioxidante utilizou-se a análise de variância pelo PROC MIXED do SAS com medidas repetidas no tempo e quando identificado efeito, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + \gamma_k + (t\gamma)_{jk} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ij} = variável dependente; μ = média geral; t_i = efeito fixo de tratamento; b_j = efeito fixo de bloco; γ_k = efeito fixo de tempo; $(t\gamma)_{jk}$ = efeito de tempo e tratamento; e_{ijk} = erro residual.

Em relação ao teste de discriminação de objetos, foi calculada a porcentagem de respostas corretas de cada grupo e as etapas normal e reversa foram consideradas como variáveis.

7.RESULTADOS

7.1. INGESTÃO DE NUTRIENTES

A quantidade média de alimento consumido por kg de peso corporal durante todo o experimento pelos animais do grupo tratado foi de $23,14 \pm 4,67$ g/kg de peso

corporal, enquanto pelo grupo controle foi de $22,32 \pm 2,06$ g/kg de peso corporal (considerou-se a quantidade de alimento seco e de úmido quando este foi fornecido).

Em relação a ingestão de nutrientes, calculou-se a quantidade consumida por kg de peso metabólico (unidade/kg^{0,75}) e os valores de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, matéria mineral, cálcio, fósforo, ácido alfa linolênico, ácido linoleico e ácido araquidônico não foram diferentes entre os tratamentos ($p > 0,05$, tabela 2).

O grupo controle ingeriu em média $114,5 \pm 5,96$ mg/ kg^{0,75}, com uma proporção de 57,40 % de EPA e 42,60 % de DHA. Por outro lado, o grupo tratado ingeriu $200,02 \pm 18,04$ mg/kg de peso metabólico, representando um aumento de 1,7 vezes em relação ao grupo controle. Dessa forma a porcentagem de EPA e DHA consumida pelo grupo tratado foi de 40,37% e 59,62%, respectivamente, sendo que a proporção de EPA: DHA proveniente apenas da cápsula foi de 12,5% + 49,6 % (1:3,6).

Tabela 2. Ingestão diária média de matéria seca e nutrientes (unidade/ kg^{0,75}) dos cães suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Item (unidade/kg ^{0,75})	GC	GT	EPM	Valor de P
Matéria seca (g)	43,85	42,41	2,08	0,6351
Proteína Bruta (g)	18,25	17,32	0,82	0,4435
Extrato etéreo (g)	11,00	10,53	0,50	0,5268
Fibra bruta	3,00	3,30	0,36	0,5579
Matéria Mineral (g)	3,19	3,00	0,15	0,6636
Cálcio (g)	0,79	0,75	0,03	0,4306
Fosforo (g)	0,51	0,49	0,02	0,5079
Ácido alfa linolênico (mg)	91,15	99,87	7,53	0,4325
EPA + DHA (mg)	114,50	200,00	5,48	<0,001
Ácido linoleico (mg)	1397,20	1653,40	206,20	0,4001
Ácido Araquidônico (mg)	59,53	51,43	5,87	0,3526

Legenda: EPM = erro padrão da média.

Nenhum animal apresentou sinais que possa ser entendido como efeito colateral da ingestão da cápsula de óleo de peixe e mostraram-se hígidos durante todo o experimento (Anexo 3).

7.2. HABILIDADE DE APRENDIZADO

Como demonstrado na Tabela 3, as respostas corretas obtidas na etapa normal apresentaram diferença entre tratamento ($p=0,0039$) e tempo ($p<0,0001$), no qual a média de acertos do GT (70,12%) foi maior que a média do GC (62,67%), independentemente do tempo ($p=0,1134$). Em relação à etapa reversa, houve efeito de tempo ($p<0,0001$).

Tabela 3. Resumo das análises de variância (ANOVAs) da frequência de respostas corretas apresentadas por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA nas etapas normal e reversa do teste de discriminação de objetos.

Variáveis (%)	Tratamentos			Valores de P		
	GT	GC	EPM	Tratamento	Tempo	Tempo*Tratamento
Etapa normal	70,12	62,67	2,98	0,0039	<0,0001	0,1134
Etapa reversa	43,12	42,50	2,35	0,8516	<0,0001	0,5092

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado; EPM= Erro padrão da média.

Para melhor entendimento dos dados, na Tabela 4 estão representadas as médias das frequências de respostas corretas obtidas pelos cães durante as etapas normal e reversa em cada período avaliado durante o experimento.

Tabela 4. Médias das frequências de respostas corretas em cada período avaliado nas etapas normal e reversa do teste de discriminação de objetos aplicado em cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Etapa Normal				
Períodos	Tratamentos		EPM	p-valor
	GT (%)	GC (%)		
0	85,50	82,00	2,98	0,1134
1	77,33	64,16	3,86	
2	61,33	47,66	6,30	
3	56,33	56,83	6,07	

Etapa Reversa				
Períodos	Tratamentos		EPM	p-valor
	GT (%)	GC (%)		
0	27,83	22,16	5,34	0,5092
1	39,16	45,50	4,90	
2	54,16	48,83	3,73	
3	51,33	53,50	4,65	

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado; EPM= Erro padrão da média.

Os gráficos 1 e 2 representam a frequência de respostas corretas na etapa normal sob efeito de tratamento e na etapa reversa sob efeito de tempo, respectivamente.

Gráfico 1. Frequência de respostas corretas independente do tempo na etapa normal do teste de discriminação de objetos apresentadas por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado.

Gráfico 2. Frequência de respostas corretas em cada período independente do tratamento na etapa reversa do teste de discriminação de objetos apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

7.3. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (AGPI)

Na tabela 5 encontra-se o resultado da concentração sérica dos AGPI mensurados durante o experimento. Houve interação tempo e tratamento ($p=0,0159$) na concentração de EPA + DHA, no qual o grupo GT apresentou maior concentração (5,60%) do que o grupo GC (4,88%). Os valores de ácido araquidônico e ácido linoleico diminuíram sob efeito de tempo ($p=0,0158$ e $p<0,0001$, respectivamente), enquanto as concentrações de ácido alfa linolênico não apresentaram resultados significativos.

Tabela 5. Concentração sérica dos ácidos graxos poli-insaturados em porcentagem relativa apresentados por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Variáveis (%)	Tratamentos		EPM	P-valores		
	GC	GT		Tratamento	Tempo	Tempo*Tratamento
EPA + DHA	4,88	5,60	0,32	0,1439	0,00005	0,0159
Ác. Araquidônico	22,59	22,05	1,01	0,3604	0,0158	0,6822
Ác. linoleico	18,14	17,52	0,30	0,1560	<0,0001	0,5088
Ác. alfa linolênico	0,27	0,31	0,06	0,1727	0,1497	0,7946

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado; EPM= Erro padrão da média; DHA= ácido docosahexaenóico; EPA= ácido eicosapentaenoico.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, o gráfico 3 representa a porcentagem de EPA + DHA sérico dos cães do grupo controle e tratado.

Gráfico 3. Porcentagem relativa média das concentrações de EPA + DHA apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado.

Ao analisar o desdobramento da interação apresentada pelos valores de EPA + DHA, foi observado que as concentrações séricas do grupo tratamento após o início da suplementação (1, 2 e 3) foram diferentes dos valores das concentrações no período 0. Além disso, houve diferença significativa entre os tratamentos no período 2 (tabela 6).

Tabela 6. Médias da concentração sérica de EPA + DHA em porcentagem relativa apresentadas por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

EPA + DHA				
Períodos	Tratamentos		EPM	p-valor
	GT (%)	GC (%)		
0	4,26 ^{Ba}	4,50 ^{Aa}	0,36	0,0159
1	5,99 ^{Aa}	5,04 ^{Aa}	0,43	
2	6,30 ^{Aa}	4,80 ^{Ab}	0,53	
3	5,82 ^{Aa}	5,78 ^{Aa}	0,58	

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado; EPM= Erro padrão da média. Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha e da mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

7.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Em relação a capacidade antioxidante total, foi observado efeito de tempo ($p=0,0322$) independente do tratamento. A análise de variância (ANOVA) dessa variável está representada na tabela 7.

Tabela 7. Capacidade antioxidante total sérica em eq/TROLOX mM apresentada por cães filhotes suplementados e não suplementados com cápsulas de óleo de peixe rico em DHA.

Variável	Tratamentos		EPM	P-valores		
	GC	GT		Tratamento	Tempo	Tempo*Tratamento
CAT	0,361	0,375	9,72	0,3211	0,0322	0,9878
eq/TROLOX mM						

Legenda: GC= grupo controle; GT= grupo tratado; EPM= Erro padrão da média.

8. DISCUSSÃO

Por terem consumido a mesma dieta, com um único diferencial entre os grupos sendo a cápsula, a ingestão de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, matéria mineral, cálcio, fósforo, ácido alfa linolênico, ácido linoleico e ácido araquidônico não foi diferente entre os tratamentos. Sendo assim, os valores de ingestão de EPA + DHA diferiram entre os tratamentos com maior ingestão destes nutrientes pelo grupo GT, devido ao fornecimento da cápsula a este grupo.

A comparação dos valores de ingestão dos ácidos graxos EPA + DHA obtidos neste estudo com achados na literatura apresenta algumas limitações, pois poucos trabalhos utilizaram cápsulas, forneceram esses ácidos graxos para filhotes e avaliaram a função cognitiva de cães em crescimento frente a suplementação, assim como as informações das doses utilizadas não estão muito claras.

No estudo de Zicker et al. (2012), os autores forneceram três diferentes concentrações de DHA para beagles filhotes após o desmame, em baixa concentração ($<0,01\%$ de DHA), concentração moderada ($0,095\%$ de DHA) e alta concentração ($0,19\%$ de DHA) e avaliaram a função cognitiva, além de habilidade motora, imunidade e funções retinianas. A partir das informações de quantidade de ingestão do alimento na matéria seca, perfil nutricional das dietas e peso dos cães após o desmame, foi possível extrapolar os valores de ingestão de EPA e DHA por kg de peso metabólico em média fornecido aos animais.

Os cães apresentavam 3,25kg de peso corporal (2,5 a 4kg), sendo o peso metabólico de $2,42\text{kg}^{0,75}$ e ingeriram em média 125 g/dia (100 a 150g/dia), ou seja,

os animais do grupo de baixa concentração consumiram $<9,58\text{mg}$ de EPA + DHA/kg^{0,75} e o grupo de concentração moderada consumiu $107,51\text{mg}$ de EPA + DHA/kg^{0,75}, enquanto os cães do grupo de alta concentração ingeriram $242,14\text{mg}$ de EPA + DHA/kg^{0,75}.

Ao comparar com os valores de ingestão de EPA + DHA do grupo suplementado no presente estudo, a quantidade fornecida por Zicker et al. (2012) foi maior apenas para o grupo de alta concentração (1,2 vezes maior), sendo que os grupos de baixa e moderada concentração foram 20,9 e 1,86 vezes menor respectivamente, que o grupo GT. Os grupos avaliados por Zicker et al. (2012) apresentavam maior quantidade de EPA do que DHA nas dietas fornecidas aos grupos que receberam alto e moderado DHA, porém não é possível obter essa informação do do grupo que recebeu baixo DHA, pois não há informações muito precisas para essa afirmação.

Em cães idosos com idade entre 9,1 e 11,5 anos, Pan et al. (2018) forneceram um blend composto por arginina, antioxidantes, vitaminas do complexo B e óleo de peixe durante 6 meses com objetivo de avaliar a função cognitiva. A partir das informações mencionadas pelos autores também foi possível estimar a quantidade de EPA e DHA ingerida pelos animais deste estudo. O consumo dos animais dos grupos controle e tratamento foram de 179g de alimento/dia e 154g de alimento/dia, assim como a média de peso metabólico de $5,74\text{kg}$ e $6,07\text{kg}$, respectivamente. Dessa forma os animais que não receberam a suplementação ingeriram em média menos que $31,17\text{mg/kg}^{0,75}$ tanto de EPA quanto de DHA, equivalente a menos que $62,34\text{mg}$ de EPA + DHA/kg^{0,75}, enquanto o grupo tratamento recebeu $60,89\text{mg}$ de EPA/kg^{0,75} e $53,21\text{mg}$ de DHA/kg^{0,75} totalizando $114,09\text{mg}$ de EPA + DHA/kg^{0,75}. Logo, a dose ministrada por Pan et al (2018) foi em torno de 42,96% menor em relação a utilizada no presente estudo com cães filhotes.

Por sua vez, Dahms et al. (2016) com o intuito de avaliar alterações plasmáticas e cerebrais, suplementaram cães da raça beagle com altas doses de éster etílico de DHA a partir do sétimo mês de vida durante um período curto (8 semanas) e outro longo (9 meses). Desta forma, forneceram a curto prazo e de forma crônica, as doses de 0, 100, 500, 1000 e 2000mg de DHA/kg de peso corporal e 0, 150, 1000 e 2000mg/kg de peso corporal, respectivamente sem ministração de EPA. Com isso, a dose de DHA fornecida através da cápsula, no atual estudo apresenta 40% da dose mínima fornecida pelos autores. Apesar de serem valores muito altos, os autores

mencionam de uma forma geral que não houve efeitos colaterais associados de forma específica com a ingestão de DHA nos animais do grupo tratado.

Assim como para cães, em humanos não existe um consenso sobre qual a dose ótima para melhorar o desenvolvimento cognitivo e encontra-se na literatura trabalhos com diferentes doses utilizadas.

Em bebês prematuros, Henriksen et al. (2014) forneceram à 141 crianças com peso menor que 1,5 kg, 32mg de DHA e 31 mg de ácido araquidônico a cada 100mL de leite materno, resultando em uma ingestão de 32 mg de DHA/kg/dia e 47 mg de ácido araquidônico/kg/dia. Para avaliação de um melhor desempenho na leitura e no comportamento, a função cognitiva de crianças com idade entre 7 a 9 anos foi avaliada por Richardson et al. (2012), que forneceram 600 mg de DHA por dia, através de 3 cápsulas que continham 200mg de DHA cada, durante 16 semanas. Petrova et al. (2018) compararam o efeito de um leite com 20mg de DHA e 10mg de EPA a cada 100mL com um não suplementado, sobre a função cognitiva de crianças entre 8 e 14 anos, ao considerar a ingestão de 0,6L de leite/dia, é possível estimar que essas crianças consumiram 120mg de DHA e 60mg de EPA por dia.

Em relação às respostas obtidas no teste de aprendizado para avaliação da função cognitiva, sob efeito de tratamento, os resultados mostraram que o grupo suplementado com cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA apresentou maior porcentagem de acertos em relação ao grupo controle durante a etapa normal do teste de discriminação de objetos, o que indica que esses animais obtiveram maior habilidade de aprendizado nesta fase.

De forma semelhante, com o objetivo de avaliar a função cognitiva de cães da raça beagle do desmame até 1 ano de idade, dentre os cinco testes cognitivos aplicados por Zicker et al. (2012), também encontra-se o teste de discriminação de objetos, entretanto, os autores não encontraram diferença ao usá-lo de forma isolada.

Ainda assim, Zicker et al. (2012) encontraram efeito no desempenho cognitivo associado às concentrações de 0,19% de DHA e 0,095% de DHA ($p < 0,05$), através de outros métodos de avaliação, como por exemplo: A) Labirinto em T, no qual suas fases auxiliam na avaliação do aprendizado associada à função do lobo frontal, onde o animal precisa encontrar o objeto dentro do labirinto para receber a recompensa; B) Teste de aprendizado ao ponto de referência, que consiste em avaliar o aprendizado espacial, ou seja a habilidade do animal em localizar o objeto mais próximo a um marco ou ponto de referência que pode ser colocado em três diferentes distâncias de

acordo com o aumento do grau de dificuldade do teste; e C) Sensibilidade ao contraste, no qual avalia a capacidade do animal em identificar figuras em níveis de contrastes decrescentes de acordo com o nível de dificuldade do teste. Além dos testes citados anteriormente, também foi realizado o teste chamado DNPM (*delay non-matched to position*) que avalia a memória a curto e longo prazo, mas não foram observadas diferenças entre os grupos.

Apesar da resposta apresentada pelos animais no teste de discriminação de objetos do estudo de Zicker et al (2012) não ser significativa, ao observar de um modo geral o conjunto dos testes de cognição aplicado pelos autores, o grupo com maior concentração de DHA obteve um desenvolvimento na habilidade de aprendizado aprimorado, assim como os resultados deste estudo durante a etapa normal.

Em relação a etapa reversa, os dados demonstraram efeito de tempo independentemente dos tratamentos, ou seja, ambos os grupos apresentaram aumento de acertos ao longo do experimento. Esses resultados podem ser interpretados mediante ao fato dos animais do grupo GT terem adquirido maior habilidade de aprendizado na etapa normal, de forma que ao executarem a etapa reversa, apresentaram nível semelhante ou maior de dificuldade quando comparados aos animais do grupo GC, permitindo-se obter apenas efeito de tempo nesta etapa.

O fato da porcentagem de respostas corretas ter sido crescente em ambos os grupos na etapa reversa, pode ser explicado pelo grau de repetição que o teste apresenta entre uma sessão e outra, assim, mesmo que essa etapa tenha sido mais complexa do que a anterior, tanto o grupo controle como o tratamento começaram a entender a atividade proposta e responder de forma correta ao longo dos períodos.

Apesar dos valores não apresentarem diferenças o suficiente para apresentar interação tempo e tratamento, é interessante ressaltar que as médias do GT apresentam-se semelhantes ao do GC no período 3 da etapa normal, o que poderia complementar a sugestão de aprendizado por repetição, pois o GC pode ter sido capaz de aprender, porém em uma velocidade menor.

Ainda sobre o estudo de Zicker et al. (2012), no teste de aprendizado ao ponto de referência composto por 3 fases de dificuldades crescentes, os autores compararam os resultados da última fase (de maior dificuldade) com as respostas das duas primeiras (de menor dificuldade) e observaram uma diminuição dos erros apresentados pelos animais ($p < 0,05$). O efeito de fase dessa avaliação se assemelha ao efeito de tempo na etapa reversa do teste de discriminação do presente estudo e

dessa forma pode-se considerar a sugestão de que, independente da dificuldade e do tratamento, os animais possam ter entendido as tarefas dos testes com o passar do tempo devido ao alto grau de repetição dos mesmos.

A suplementação de DHA já foi testada também em seres humanos, o estudo de Henriksen et al. (2014) avaliou a função cognitiva e memória de reconhecimento de crianças aos 6 meses de idade, nascidas prematuras e suplementadas com 120mg de DHA e 60mg de ácido araquidônico por dia. A mensuração do desenvolvimento cognitivo foi realizada através de um questionário respondido pelos pais, que investiga o desenvolvimento infantil sobre a comunicação, desenvolvimento motor, resolução de problemas, desenvolvimento social e memória de reconhecimento, que foi avaliada através de medidas da atividade cerebral derivadas de gravações eletroencefalográficas frente a uma imagem padrão revelada repetidas vezes e imagens nunca vistas pelos bebês. O grupo tratado apresentou pontuação mais alta na área de resolução de problemas de acordo com o questionário aplicado ($p=0,02$), assim como melhor memória de reconhecimento, no qual diminuíram as reações denominada pelos autores de negativas, ao se depararem com a imagem padrão exibida de forma repetida ($p=0,01$).

Além disso, Richardson et al. (2012) avaliaram a suplementação de 600 mg de DHA/dia fornecido via cápsula a crianças com idade entre 7 e 9 anos com baixo desempenho escolar durante 16 semanas. Dentre diversas escalas e testes, puderam observar que o grupo suplementado apresentou melhora na leitura ($p=0,01$) e diminuição dos problemas de comportamento avaliados pelos pais através da aplicação de escalas de escore bem estabelecidas ($p<0,05$).

O DHA possui papel modulador na síntese de fosfolipídeos, principalmente de fosfatidiletalona, que por sua vez tem influência direta na sobrevivência neuronal (AKBAR et al., 2005). Além do acúmulo e alteração na composição de fosfolipídios, o aumento da ingestão de DHA pode acarretar no acréscimo de mediadores sinápticos, apresentar efeitos benéficos no crescimento de neuritos, responsáveis pelo processo de desenvolvimento de neurônios, além de promover sinaptogênese e expressão sináptica (IKEMOTO et al., 1997; CANSEV e WURTMAN, 2007; CAO et al., 2009; DYALL et al., 2015). Dessa forma, a melhora na habilidade de aprendizado obtida neste estudo pode ser explicada pela possível esterificação do DHA na membrana fosfolipídica cerebral.

Sabe-se que este ácido graxo compreende a maior parte dos ácidos graxos do cérebro e dessa forma a suplementação pode ter sido fundamental no desenvolvimento e atuação do sistema nervoso, controlando os processos de aprendizado dos indivíduos (JENSEN, 1996; MCNAMARA e CARLSON, 2006; LUCHTMMAN e SONG, 2013; BAZINET et al., 2014; BOS et al., 2016).

No estudo de Dahms et al. (2016) já citado anteriormente, ao longo do experimento e dois meses após a finalização da suplementação de longo prazo, os autores avaliaram a deposição do DHA no cérebro e observaram que as concentrações cerebrais são passíveis de aumento frente à suplementação dietética em cães dessa idade. Uma dose de 500 mg/Kg peso corporal em curto prazo ou 150 mg/kg peso corporal em longo prazo foram suficientes para apresentarem teores máximos do ácido graxo no cérebro e podem se manter elevados em pelo menos 2 meses após a interrupção dessa suplementação.

Além disso, é conhecido que o desenvolvimento cerebral neonatal do cão ocorre entre os primeiros 60 dias de vida, com uma diminuição acentuada até chegar na idade adulta (ARANT e GOOCH, 1982), e durante o crescimento, há alta deposição de ácidos graxos no cérebro. Apesar de não haver estudos que tenham investigado o efeito de suplementações nas mudanças do cérebro canino até os 6 meses de idade, encontra-se trabalhos que evidenciam a deposição neonatal de DHA no cérebro de ratos (SALEM et al., 2015) e humanos (CLANDININ et al., 1980). Diante dessas informações e tendo em vista que o presente estudo foi realizado com cães em crescimento, a dose de DHA fornecida através das cápsulas pode ter sido suficiente para que os animais suplementados demonstrassem melhora na habilidade de aprendizado devido a uma eficiente deposição cerebral.

A função cognitiva pode ser avaliada tanto em cães jovens como idosos (Milgram et al., 1994). Existem estudos que avaliaram o fornecimento de DHA a cães idosos, como o de Hadley et al. (2017), que avaliaram o efeito na função cognitiva da ingestão de alimento extrusado contendo 0,4% de biomassa seca da alga *Schizochytrium* sp. como fonte de DHA (26mg de DHA/kg peso corporal) em comparação com a ingestão de uma dieta carente de EPA e DHA, durante 25 semanas, em cães beagles idosos com idade entre 8,6 a 11,1 anos. Os autores concluíram que os cães suplementados com a alga apresentaram menor dificuldade durante o aprendizado do teste de sensibilidade ao contraste, no qual necessitaram

de 13,6 sessões para concluí-lo, enquanto o grupo controle necessitou de 22,7 sessões ($p=0,023$), assim como menos respostas incorretas (43 vs 82,9, $p=0,029$).

Outro trabalho que avaliou a função cognitiva de idosos frente a suplementação de nutrientes específicos é o de Pan et al. (2018), no qual forneceram um *blend* composto por arginina, antioxidantes, vitamina C, vitaminas do complexo B e óleo de peixe, a cães idosos com idade média de 9,7 anos. Os autores utilizaram dois testes para avaliar a função cognitiva dos cães: o teste de aprendizado ao ponto de referência citado anteriormente e outro denominado protocolo egocêntrico, que também avalia o aprendizado espacial, porém tem como referência a posição do observador e não um ponto ou marco. Este segundo teste consiste na escolha correta da localização de um objeto pré-determinada por um teste de preferência de posição apresentada pelos animais. Os cães que receberam a dieta com adição do *blend* apresentaram melhor desempenho na tarefa 1 do teste de aprendizado ao ponto de referência no qual apresentava um grau de dificuldade intermediário ($p=0,0466$) e também nas duas etapas de reversão do protocolo egocêntrico ($p=0,005$ e $p=0,001$), demonstrando dessa forma o efeito da suplementação na cognição de cães idosos.

É importante salientar que as respostas de testes de cognição podem ser influenciadas pelo estilo de vida do animal, principalmente se há presença de estímulos como enriquecimento ambiental, no qual pode melhorar o perfil de respostas dos cães (MILGRAM et al., 2005).

Com isso, é perceptível a importância da suplementação de DHA durante a infância em diferentes espécies e idades, e a adição de óleo de peixe ou outras fontes ricas em DHA torna-se essencial na formulação de alimentos de boa qualidade para cães em crescimento, pois uma alimentação deficiente além de não assegurar a saúde cognitiva do animal, pode influenciar no processo de deposição na membrana neural, promovendo prejuízos ao desenvolvimento neurológico (DYALL e TITUS, 2008; MCNAMARA et al., 2014; BAUER, 2016; BO et al., 2017).

Referente às concentrações séricas dos ácidos graxos poli-insaturados analisadas, o GT apresentou maiores concentrações de EPA + DHA em comparação ao GC, enquanto os ácidos graxos ômega-6 ácido araquidônico e ácido linoleico apresentaram diminuições sob efeito de tempo. Ao observar os valores das concentrações de EPA + DHA do GT ao longo do tempo, as concentrações nos períodos 1, 2 e 3 apresentaram-se diferentes do período 0 (antes do início da suplementação), enquanto que para o GC, não houveram diferenças entre os

períodos. Além disso, ao observar o desdobramento da análise de variância, o GT apresentou maior concentração significativa no período 2 em comparação ao GC.

Sabe-se que essa diferença na concentração plasmática total de EPA + DHA entre os grupos se deve a dose de ingestão desses nutrientes oferecida aos animais durante o experimento (HALL et al., 2006). Da mesma forma, no estudo de Zicker et al. (2012), as concentrações séricas de DHA nos períodos após o início da suplementação (12, 16, 24, 36 e 52 semanas) apresentaram-se diferentes entre grupos de animais que receberam três doses distintas de DHA (<0,01%, 0,095 e 0,19% de DHA). O grupo com concentração moderada (0,095% de DHA) apresentou concentrações maiores que o grupo que recebeu menos que 0,01% de DHA e menores concentrações que o grupo que recebeu 0,19% de DHA ($p < 0,05$).

O mesmo acontece em cães idosos, Pan et al (2018) observaram um aumento nas concentrações plasmáticas do grupo tratado (0,21% de DHA durante 6 meses) de 20,67 vezes sobre as concentrações do grupo controle. Da mesma maneira para as concentrações de EPA, o grupo tratado apresentou 5,5 vezes mais, assim como 0,87 vezes menos para as concentrações de ácido linoleico em comparação ao controle.

Stoeckel et al. (2011) compararam a eficácia de um aditivo contendo uma dose semelhante à fornecida no presente estudo (40,8 mg de DHA/kg de peso corporal e 11,9 mg de EPA/kg de peso corporal), um alimento enriquecido com EPA (34,6 mg/kg de peso corporal) e DHA (22,9mg/kg de peso corporal) e um alimento controle sobre a composição das membranas eritrocitárias caninas durante 12 semanas. Tanto os animais que consumiram a dieta enriquecida, quanto os que foram suplementados apresentaram aumento desses ácidos graxos logo na primeira semana, atingindo um platô a partir da 8ª semana para as concentrações de DHA e da 3ª semana até o final da suplementação (12 semanas).

No estudo de Stoecker, et. (2011), para os animais que receberam o aditivo, as quantidades de ômega-6 totais, assim como de ácido araquidônico não reduziram significativamente até a 8ª semana de estudo, apenas a partir daí, assim como não apresentaram diferenças entre as concentrações de ácido alfa linolênico em nenhum momento. Ao levar em consideração que existe relação entre composição dos eritrócitos e composição plasmática (ARTERBURN et al., 2006), o mesmo acontece em nosso estudo, no qual as concentrações de ácido alfa linolênico também não foram significativas. Após o final das 12 semanas, o grupo que recebeu o aditivo começou a

consumir a dieta controle para investigação das concentrações após 4 semanas de interrupção da suplementação e os níveis eritrocitários não atingiram os níveis basais.

Hall et al. (2006) ao diminuírem a ingestão do alimento contendo maiores concentrações de ácidos graxos ômega-3 totais fornecidos à cães de 7 a 10 anos em um período de 24 semanas, constataram que as concentrações plasmáticas de DHA também diminuíram, mas permaneceram maiores do que os valores apresentados pelos animais que receberam alimento com menores concentrações. Além disso, os autores sugerem que doses de 175mg de DHA/kg de peso corporal são necessárias para maximizar os níveis plasmáticos deste ácido graxo em cães idosos. Dahms et al. (2016) ao investigar a cinética das concentrações de DHA no plasma de cães jovens, sugerem que são necessárias concentrações de 1000mg de DHA/kg de peso corporal para atingir saturação plasmática desse ácido graxo; assim como o período para atingir um nível estacionário foi de três meses em cães adultos.

Baseando-se nessas informações é possível sugerir que a dose fornecida no presente estudo pode não ter alcançado a concentração máxima, apesar de não ter sido mensurada, mas foi o suficiente para obter melhores respostas de aprendizado pelos animais do grupo tratado e mais estudos precisam ser realizados para verificar qual a dose mínima para alcançar concentrações plasmáticas máximas e fase estacionária e suas influências sobre o fluxo cerebral e função cognitiva em cães filhotes.

A adição de ácidos graxos ômega-3 tende a influenciar na diminuição de ácidos graxos ômega-6 nas membranas plasmáticas, ocasionada pela competição de substratos e inibição de enzimas (DAHMS et al., 2016). No estudo de Hall et al. (2006), os autores observaram que essa redução pode ocorrer, independentemente, da quantidade de DHA fornecida e, no presente estudo, constatou-se diminuição dos ácidos graxos araquidônico e linoleico, apesar desta diminuição estar atribuída ao tempo.

Apesar dos dados terem apresentado interação tempo e tratamento, encontra-se diferença nas concentrações plasmáticas de EPA + DHA entre os tratamentos apenas no período 2. A explicação para essa resposta não é tão clara, mas pode estar atrelada a alguma variação individual.

Além do mais, nos trabalhos que avaliaram a suplementação de DHA em cães filhotes, houve aumento das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (ZICKER et al. 2012; DAHMS et al., 2019), porém os autores não relacionam esse aumento ao

período de crescimento. Para melhor explicação sobre a diferença no período 2 ou ausência de diferença nos demais períodos, mais estudos avaliando as concentrações em relação ao tempo de crescimento e idade podem promover mais informações.

Em resumo, o conteúdo plasmático de EPA e DHA atua como marcadores razoáveis para os tecidos (ARTERBURN et al., 2006), com isso, o GT ter apresentado corrobora com a sugestão de deposição cerebral e melhora da função cognitiva.

A capacidade antioxidante total foi realizada como medida para monitoramento da oxidação lipídica nos organismos dos cães frente a ingestão de cápsulas de óleo de peixe. Por apresentarem maior número de insaturações, os AGPI presentes na cápsula, sendo o DHA expresso em 50% do total de ácidos graxos, podem estar mais sensíveis ao processo de oxidação (SUGIHARA et al., 1994)

Os resultados demonstraram que a capacidade antioxidante total foi semelhante entre os dois grupos, sendo possível sugerir que uma maior ingestão de EPA e DHA pelos cães do grupo tratado pode não ter sido suficiente para acarretar em processos de oxidações que implicassem na diminuição da capacidade antioxidante total.

A detecção de alterações da capacidade antioxidante no plasma pode ser menos sensível do que sua detecção em outros fluidos corporais, pois numerosas substâncias com atividade antioxidante são encontradas no plasma (ERHARDT et al., 2002). Entretanto, a explicação para esse resultado pode ser baseada no fato que os animais de ambos os grupos receberam o mesmo alimento super premium que continha quantidades nutricionais adequadas para filhotes e ingredientes de boa qualidade que auxiliam no combate a processos antioxidantes, além de que nenhum dos grupos foram submetidos a nenhum tipo de estresse considerável.

Diferente dos resultados do presente estudo, WANDER et al. (1997) ao fornecer dietas para cães com diferentes relações de ômega-6 e 3, observaram que proporções muito baixas (1,4:1) aumentaram as concentrações de metabólitos da oxidação lipídica no plasma. Walters et al (2010) também associaram a ingestão de AGPI com a presença de produtos da peroxidação oxidativa, ao compararem dietas contendo ácido linoleico conjugado vs. EPA e DHA fornecidas a cães com idade entre 1 e 10 anos. Os autores observaram, portanto, a elevação de isoprostanos na urina de cães que consumiram a dieta com ácido linoleico conjugado, no qual são metabólitos consistentes com a peroxidação lipídica, resultantes da reação do ácido araquidônico das membranas celulares e nas espécies oxidantes reativas

Em mulheres, a ingestão de AGPI ômega-3 levou a uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante total e a presença de AGPI nos lipídios totais de glóbulos vermelhos e os autores sugerem que a ingestão de óleo de peixe pode ser acompanhada por um aumento na capacidade antioxidante total plasmática e que não leva a efeitos adversos (THORLAKSDOTTIR et al., 2006).

Por outro lado, Pacheco et al. (2018) avaliaram a produção de marcadores do estresse oxidativo de cães adultos saudáveis e não observaram diferenças entre os grupos que receberam dieta contendo óleo de soja enriquecido com DHA e sebo bovino, suplementadas e não suplementadas com um antioxidante a base de algas.

Diante do exposto, a quantidade de ômega-3 oferecida apresentou-se segura em relação ao risco de oxidações.

9. CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo, conclui-se que a suplementação de cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA para cães em crescimento influencia na habilidade de aprendizado, refletindo em um melhor desempenho da função cognitiva avaliada através do uso do teste de discriminação de objeto com utilização do aparelho TGTA ((*Toronto General Testing Apparatus*). Além disso, a suplementação promoveu aumento das concentrações séricas de EPA + DHA, sem apresentar diferença na capacidade antioxidante total entre os grupos, indicando ausência de riscos de oxidação lipídica monitorada através desse tipo de monitoramento.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.; CHAN, A.; CALLAHAN, H.; MILGRAM, N. W. The canine as a model of human cognitive aging: recent developments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 24, n. 5, p. 675-692, 2000.
- AOAC. Official methods of analysis. 16. ed. Arlington, EUA: AOAC International, 1995.
- AOAC. Official methods of analysis. Gaithersburg, EUA: AOAC International, 2006.
- ARANT JR, B. S.; GOOCH III, W. M. Manford. Developmental changes in the mongrel canine brain during postnatal life. *Early human development*, v. 7, n. 2, p. 179-194, 1982.
- ARTERBURN, L. M.; HALL, E. B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n- 3 fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*, v. 83, n. 6, p. 1467S-1476S, 2006.
- BAGHERI, M.; DJAZAYERI, A.; FARZADFAR, F.; QI, L.; YEKANINEJAD, M. S.; ASLIBEKYAN, S.; UHL, O. Plasma metabolomic profiling of amino acids and polar lipids in Iranian obese adults. *Lipids in health and disease*, v. 18, n. 1, p. 94, 2019.
- BALDERAS, C.; VILLASEÑOR, A.; GARCÍA, A.; RUPÉREZ, F. J.; IBAÑEZ, E.; SEÑORANS, J; BARBAS, C. Metabolomic approach to the nutraceutical effect of rosemary extract plus Ω -3 PUFAs in diabetic children with capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 53, n. 5, p. 1298-1304, 2010.
- BAUER, J. E. The essential nature of dietary omega-3 fatty acids in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 249, p. 1267-1272, 2016.
- BAUER, J. E.; HEINEMANN, K. M.; LEES, G. E.; WALDRON, M. K. Docosahexaenoic Acid Accumulates in Plasma of Canine Puppies Raised on α -Linolenic Acid-Rich Milk during Suckling but Not When Fed α -Linolenic Acid-Rich Diets after Weaning. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 7, p. 2087S-2089S, 2006.
- BAZINET, R. P.; LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, p. 771, 2014.

BECKER, J. T.; OLTON, D. S. Object discrimination by rats: the role of frontal and hippocampal systems in retention and reversal. *Physiology & Behavior*, v. 24, n. 1, p. 33-38, 1980.

BEERMANN, C.; JELINEK, J.; REINECKER, T.; HAUENSCHILD, A.; BOEHM, G.; KLÖR, H. U. Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids in health and disease*, v. 2, n. 1, p. 10, 2003.

BO, Y.; ZHANG, X.; WANG, Y.; YOU, J.; CUI, H.; ZHU, Y.; LU, Q. The n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation improved the cognitive function in the Chinese elderly with mild cognitive impairment: a double-blind randomized controlled trial. *Nutrients*, v. 9, n. 1, p. 54, 2017.

BOS, D. J.; MONTFORT, S. J. T.; ORANJE, B.; DURSTON, S.; SMEETS, P. A. M. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human brain morphology and function: What is the evidence? *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, p. 546-561, 2016.

BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; KANG, C. W.; ALLEN, T.; COWELL, C.; FINCO, D. R. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 135, n. 3, p. 275-286, 2000.

BUDDHACHAT, K.; SIENGDEE, P.; CHOMDEJ, S.; SOONTORNVIPART, K.; NGANVONGPANIT, K. Effects of different omega-3 sources, fish oil, krill oil, and green-lipped mussel against cytokine-mediated canine cartilage degradation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 53, n. 5, p. 448-457, 2017.

CANSEV, M.; WURTMAN, R. J. Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils. *Neuroscience*, v. 148, n. 2, p. 421-431, 2007.

CANUTO, G. A.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARESA, M. F. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim. Nova*, vol. 41, n. 1, p.75-91, 2018.

CAO, Dehua et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *Journal of neurochemistry*, v. 111, n. 2, p. 510-521, 2009.

CHENG, S.; LARSON, M. G.; MCCABE, E. L.; MURABITO, J. M.; RHEE, E. P.; HO, J. E.; DEIK, A. A. Distinct metabolomic signatures are associated with longevity in humans. *Nature communications*, v. 6, p. 6791, 2015.

CLANDININ, M. T.; CHAPPELL, J. E.; LEONG, S.; HEIM, T.; SWYER, P. R.; CHANCE, G. W. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early human development*, v. 4, n. 2, p. 121-129, 1980.

DAHMS, I.; BAILEY-HALL, E.; SALEM JR, N. Kinetics of docosahexaenoic acid ethyl ester accumulation in dog plasma and brain. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 113, p. 1-8, 2016.

DAHMS, I.; BAILEY-HALL, E.; SYLVESTER, E.; PARENTEAU, A.; YU, S.; KARAGIANNIS, A.; FRANZ R; WILSON, J. Safety of a novel feed ingredient, Algal Oil containing EPA and DHA, in a gestation-lactation-growth feeding study in Beagle dogs. *PloS one*, v. 14, n. 6, p. e0217794, 2019.

DEMMELMAIR, H.; ØYEN, J.; PICKERT, T.; RAUH-PFEIFFER, A.; STORMARK, K. M.; GRAFF, I. E.; KOLETZKO, B. The effect of Atlantic salmon consumption on the cognitive performance of preschool children—A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 2018.

DENG, P.; JONES, J. C.; SWANSON, K. S. Effects of dietary macronutrient composition on the fasted plasma metabolome of healthy adult cats. *Metabolomics*, v. 10, n. 4, p. 638-650, 2014.

DINIZ, Y. S. A.; CICOONA, A. C.; PADOVANI, C. R.; SANTANA, L. S.; FAINE, L. A.; NOVELLI, E. L. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*, v. 20, n. 2, p. 230-234, 2004.

DUNSTAN, J. A.; SIMMER, K.; DIXON, G.; PRESCOTT, S. L. Cognitive assessment of children at age 2½ years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a

randomised controlled trial. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, v. 93, p. F45-F50, 2008.

DYALL, S. C.; MICHAEL-TITUS, A. T. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. Neuromolecular medicine, v. 10, p. 219-235, 2008.

DYALL, Simon C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. Frontiers in aging neuroscience, v. 7, p. 52, 2015.

ERHARDT, J. G.; MACK, H.; SOBECK, U.; BIESALSKI, H. K. β -Carotene and α -tocopherol concentration and antioxidant status in buccal mucosal cells and plasma after oral supplementation. British Journal of Nutrition, v. 87, n. 5, p. 471-475, 2002.

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In: Functional genomics. Springer, Dordrecht, 2002. p. 155-171.

GEBRESELASSIE, E. E.; JACKSON, M.; YERRAMILLI, M.; JEWELL, D. Anti. Anti-aging food that improves markers of health in senior dogs by modulating gut microbiota and metabolite profiles. bioRxiv, p. 324327, 2018.

GONZÁLEZ, M. J.; RIORDAN, N. H. The paradoxical role of lipid peroxidation on carcinogenesis and tumor growth: a commentary. Medical hypotheses, v. 46, n. 6, p. 503-504, 1996.

GONZÁLEZ-PEÑA, D.; BRENNAN, L. Recent Advances in the Application of Metabolomics for Nutrition and Health. Annual review of food science and technology, v. 10, p. 479-519, 2019.

GURR, M.I.; HARWOOD J.L.; FRAYN, K.N. Lipid biochemistry – an introduction. 5.ed. Blackwell Science, 2002.

HADLEY, K. B.; BAUER, J.; MILGRAM, N. W. The oil-rich alga Schizochytrium sp. as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine model of senescence. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v. 118, p. 10-18, 2017.

HALL, J. A.; BROCKMAN, J. A.; DAVIDSON, S. J.; MACLEAY, J. M.; JEWELL, D. E. Increased dietary long-chain polyunsaturated fatty acids alter serum fatty acid concentrations and lower risk of urine stone formation in cats. *PloS one*, v. 12, n. 10, p. e0187133, 2017.

HALL, J. A.; PICTON, R. A.; SKINNER, M. M.; JEWELL, D. E.; WANDER, R. C. The (n-3) fatty acid dose, independent of the (n-6) to (n-3) fatty acid ratio, affects the plasma fatty acid profile of normal dogs. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 9, p. 2338-2344, 2006.

HALL, A.; BROCKMAN, J. A.; JEWELL, D. E. Dietary fish oil alters the lysophospholipid metabolomic profile and decreases urinary 11-dehydro thromboxane B2 concentration in healthy Beagles. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 144, n. 3-4, p. 355-365, 2011.

HALLAHAN, B.; RYAN, T.; HIBBELN, J. R.; MURRAY, I. T.; GLYNN, S.; RAMSDEN, C. E.; SANGIOVANNI, J. P.; DAVIS, J. M. Efficacy of omega-3 highly unsaturated fatty acids in the treatment of depression. *The British Journal of Psychiatry*, v. 209, n. 3, p. 192-201, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine*, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HASHIMOTO M.; KATO, S., TANABE, Y., KATAKURA, M., MAMUN, A. A., OHNO, M.; SHIDO, O. Beneficial effects of dietary docosahexaenoic acid intervention on cognitive function and mental health of the oldest elderly in Japanese care facilities and nursing homes. *Geriatrics & gerontology international*, v. 17, n. 2, p. 330-337, 2017.

HECKLER, M. C. T.; SANTOS, F. H.; AMORIM, R. M.; MARTINS R. Teste para avaliação das funções cognitivas de memória e aprendizado em cães. *Neurobiologia*, v. 73, n. 4, p. 141-149, 2010.

HELLMUTH, C.; LINDSAY, K. L.; UHL, O.; BUSS, C.; WADHWA, P. D.; KOLETZKO, B.; ENTRINGER, S. Maternal Metabolomic Profile and Fetal Programming of Offspring

Adiposity: Identification of Potentially Protective Lipid Metabolites. *Molecular nutrition & food research*, v. 63, n. 1, p. 1700889, 2019.

HENRIKSEN, C.; ALMAAS, A. N.; WESTERBERG, A. C.; DREVON, C. A.; IVERSEN, P. O.; NAKSTAD, B. Growth, metabolic markers, and cognition in 8-year old children born prematurely, follow-up of a randomized controlled trial with essential fatty acids. *European journal of pediatrics*, v. 175, n. 9, p. 1165-1174, 2014.

IKEMOTO, A.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, S.; OKUYAMA, H. Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate or docosahexaenoate affect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochemical research*, v. 22, n. 6, p. 671-678, 1997.

JENSEN, C. L.; CHEN, H.; FRALEY, K.; ANDERSON, E. R.; HEIRD, W. C. Biochemical effects of dietary linoleic/ α -linolenic acid ratio in term infants. *Lipids*, v. 31, p. 107-113, 1996.

JENSEN, C. L.; VOIGT, R. G.; PRAGER, T. C.; ZOU, Y. L.; FRALEY, J. K.; ROZELLE, J. C.; TURCICH M. R.; LLORENTE, A. M.; ROBERT E A; HEIRD W. C. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants—. *The American journal of clinical nutrition*, v. 82, n. 1, p. 125-132, 2005.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat science*, v. 36, n. 1-2, p. 169-189, 1994.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, v. 22, n. 4, 10–15, 1997.

LAZAROWSKI, L.; FOSTE, M. L.; GRUEN, M. E.; SHERMAN, B. L.; CASE B. C.; FISH, E. R; MILGRAM, N. W.; DORMAN, D. C. Acquisition of a visual discrimination and reversal learning task by labrador retrievers. *Animal cognition*, v. 17, p. 787-792, 2014.

LEBLANC, C. J.; BAUER, J. E.; HOSGOOD, G.; MAULDIN, G. E. Effect of dietary fish oil and vitamin E supplementation on hematologic and serum biochemical analytes

LIU, Y.; JIAO, J. G.; GAO, S.; NING, L. J.; LIMBU, S. M.; QIAO, F.; DU, Z. Y. Dietary oils modify lipid molecules and nutritional value of fillet in Nile tilapia: A deep lipidomics analysis. *Food chemistry*, v. 277, p. 515-523, 2019.

LLOYD, A. J.; BECKMANN, M.; TAILLIART, K.; BROWN, W. Y.; DRAPER, J., ALLAWAY, D. Characterisation of the main drivers of intra-and inter-breed variability in the plasma metabolome of dogs. *Metabolomics*, v. 12, n.4, p. 72, 2016.

LUCHTMAN, D. W.; SONG, C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology*, v. 64, p. 550-565, 2013.

MAS, E.; CROFT, K. D.; ZAHRA, P.; BARDEN, A.; MORI, T. A. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin Chem* v. 58, p. 1476-1484, 2012.

MCNAMARA, R. K.; CARLSON, S. E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 75, p. 329-349, 2006.

MCNAMARA, R. K.; RIDER, T.; JANDACEK, R.; TSO, P. Abnormal fatty acid pattern in the superior temporal gyrus distinguishes bipolar disorder from major depression and schizophrenia and resembles multiple sclerosis. *Psychiatry research*, v. 215, n. 3, p. 560-567, 2014.

MEHLER, S. J.; MAY, L. R.; KING, C.; HARRIS, W. S.; SHAH, Z. A prospective, randomized, double blind, placebo-controlled evaluation of the effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on the clinical signs and erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acid concentrations in dogs with osteoarthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, v. 109, p. 1-7, 2016.

MELLO FILHO, A. C.; MENEHINI, R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, v. 781, n. 1-2, p. 56-63, 1984.

MICHEL, K. E. Validation of a subjective muscle mass scoring system for cats. *J Anim Physiol Anim Nutr*, v. 93, p. 806, 2009.

MILGRAM, N. W.; HEAD, E.; WEINER, E.; THOMAS, E. Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. *Behavioral neuroscience*, v. 108, p. 57, 1994.

MILGRAM, N. W.; HEAD, E.; ZICKER, S. C.; IKEDA-DOUGLAS, C. J.; MURPHEY, H.; MUGGERNBURG, B.; SIWAK, C.; TAPP, D.; COTMAN, C. W. Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. *Neurobiology of aging*, v. 26, p. 77-90, 2005.

MOXHAM, G. The WALTHAM Feces Scoring System—a tool for veterinarians and pet owners: How does your pet rate. *Waltham focus*, v. 11, p. 24-25, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, D.C.: National Academies Press, 2006.

NOGA, M. J.; DANE, A.; SHI, S.; ATTALI, A.; VAN AKEN, H.; SUIDGEEST, E.; ROB J. VREEKEN; REIJMERS, T. H. Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics*, v. 8, n. 2, p. 253-263, 2012.

oil from 8 to 52 weeks of age. *J Am Vet Med Assoc* v. 241, p. 583-594, 2012.

OREŠIČ, M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 19, n. 11, p. 816-824, 2009.

ORTEA, I.; GONZALEZ-FERNANDEZ, M. J.; RAMOS-BUENO, R. P.; GUIL GUERRERO, J. L. Proteomics Study Reveals That Docosahexaenoic and Arachidonic Acids Exert Different In vitro Anticancer Activities in Colorectal Cancer Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2018.

OTTESTAD, I.; HASSANI, S.; BORGE, G. I.; KOHLER, A.; VOGT, G.; HYÖTYLÄINEN, T.; MYHRSTAD, M. C. Fish oil supplementation alters the plasma

lipidomic profile and increases long-chain PUFAs of phospholipids and triglycerides in healthy subjects. *PLoS One*, v. 7, n. 8, p. e42550, 2012.

ØYEN, J.; KVESTAD, I.; MIDTBØ, L. K.; GRAFF, I. E.; HYSING, M.; STORMARK, K. M.; DEMMELMAIR, H. Fatty fish intake and cognitive function: FINS-KIDS, a randomized controlled trial in preschool children. *BMC medicine*, v. 16, n. 1, p. 41, 2018.

PACHECO, G. F.; BORTOLIN, R. C.; CHAVES, P. R.; MOREIRA, J. C.; KESSLER, A. M.; TREVIZAN, L. Effects of the consumption of polyunsaturated fatty acids on the oxidative status of adult dogs. *Journal of animal science*, v. 96, n. 11, p. 4590-4598, 2018.

PAN, Y.; KENNEDY, A. D.; JÖNSSON, T. J.; MILGRAM, N. W. Cognitive enhancement in old dogs from dietary supplementation with a nutrient blend containing arginine, antioxidants, B vitamins and fish oil. *British Journal of Nutrition*, v. 119, n. 3, p. 349-358, 2018.

PEREZ -CORRADO, A.; BRENNAN, L.; IBERO-BARAIBAR, I.; HERMSDORFF, H. H. M.; O'GORMAN, A.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Metabolomics identifies changes in fatty acid and amino acid profiles in serum of overweight older adults following a weight loss intervention. *Journal of physiology and biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 593-602, 2014.

PETROVA, D.; LITRÁN, M. A. B.; GARCÍA-MÁRMOL, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.; CUETO-MARTÍN, B.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; FONOLLÁ, J. Effects of fortified milk on cognitive abilities in school-aged children: results from a randomized-controlled trial. *European journal of nutrition*, p. 1-10, 2018.

PIZATO, N.; LUZETE, B. C.; KIFFER, L. F. M. V.; CORRÊA, L. H.; SANTOS, I. O.; ASSUMPÇÃO, J. A. F.; KIYOMI, M.; MAGALHÃES, K. G. Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1952, 2018.

PUURUNEN, J.; TIIRA, K.; LEHTONEN, M.; HANHINEVA, K.; LOHI, H. Non-targeted metabolite profiling reveals changes in oxidative stress, tryptophan and lipid metabolisms in fearful dogs. *Behavioral and Brain Functions*, v. 12, n. 1, p. 7, 2016.

RAMAKRISHNAN, U.; GONZALEZ-CASANOVA, I.; SCHNAAS, L.; DIGIROLAMO, A.; QUEZADA, A. D.; PALLO, B. C.; HAO, W.; NEUFELD, L. M.; RIVERA, J. A.; STEIN, A. D.; MARTORELL, R. Prenatal supplementation with DHA improves attention at 5 y of age: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, v. 104, p. 1075-1082, 2016.

RATHOD, R. S.; KHAIRE, A. A.; KALE, A. A.; JOSHI, S. R. Beneficial effects of omega-3 fatty acids and vitamin B12 supplementation on brain docosahexaenoic acid, brain derived neurotrophic factor, and cognitive performance in the second-generation Wistar rats. *Biofactors*, v. 41, n. 4, p. 261-272, 2015.

RE, SIMONA; ZANOLETTI, M.; EMANUELE, E. Aggressive dogs are characterized by low omega-3 polyunsaturated fatty acid status. *Veterinary research communications*, v. 32, n. 3, p. 225-230, 2008.

RICHARDSON, A. J.; BURTON, J. R.; SEWELL, R. P.; SPRECKELSEN, T. F.; MONTGOMERY, P. Docosahexaenoic acid for reading, cognition and behavior in children aged 7–9 years: a randomized, controlled trial (the DOLAB Study). *PLoS one*, v. 7, n. 9, p. e43909, 2012.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUDKOWSKA, I.; PARADIS, A. M.; THIFAUULT, E.; JULIEN, P.; TCHERNOF, A.; COUTURE, P.; VOHL, M. C. Transcriptomic and metabolomic signatures of an n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in a normolipidemic/normocholesterolemic Caucasian population. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 24, n. 1, p. 54-61, 2013.

SALEM, N. M.; LIN, Y. H.; MORIGUCHI, T.; LIM, S. Y.; SALEM J. N.; HIBBELN, J. Distribution of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in the whole rat body and 25 compartments. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, v. 100, p. 13-20, 2015.

SCHMIDT, M.; UNTERER, S.; SUCHODOLSKI, J. S.; HONNEFFER, J. B.; GUARD, B. C.; LIDBURY, J. A.; KÖLLE, P. The fecal microbiome and metabolome differs

between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PloS one*, v. 13, n. 8, p. e0201279, 2018.

SONG, C.; SHIEH, C. H.; WU, Y. S.; KALUEFF, A.; GAIKWAD, S.; SU, K. P. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: acting separately or synergistically? *Progress in lipid research*, v. 62, p. 41-54, 2016.

STOECKEL, K.; NIELSEN, L. H.; FUHRMANN, H.; BACHMANN, L. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 53, n. 1, p. 57, 2011.

SUGIHARA N.; TSURUTA Y.; DATE Y.; FURUNO K.; KOHASHI K. High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. May;126(1):124–128, 1994.

THORLAKSDOTTIR, A. Y.; SKULADOTTIR, G. V.; PETURSDOTTIR, A. L.; TRYGGVADOTTIR, L.; OGMUNDSDOTTIR, H. M.; EYFJORD, J. E.; JONSSON, J. J. Positive association between plasma antioxidant capacity and n– 3 PUFA in red blood cells from women. *Lipids*, v. 41, n. 2, p. 119-125, 2006.

TREVIZAN, L.; KESSLER, A. de M. Lipídeos na nutrição de cães e gatos: metabolismo, fontes e uso em dietas práticas e terapêuticas. *Revista brasileira de zootecnia. Brazilian journal of animal science*. Viçosa, MG. Vol. 38, supl. especial (2009), p. 15-25, 2009.

VALENZUELA, R.; BARRERA, C.; GONZÁLEZ-ASTORGA, M.; SANHUEZA, J.; VALENZUELA, A. Alpha linolenic acid (ALA) from *Rosa canina*, *sacha inchi* and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. *Food & function*, v. 5, n. 7, p. 1564-1572, 2014.

VIAANT, M. R.; LUDWIG, C.; RHODES, S.; GÜNTHER, U. L.; ALLAWAY, D. Validation of a urine metabolome fingerprint in dog for phenotypic classification. *Metabolomics*, v. 3, n. 4, p. 453-463, 2007.

WALTERS, J. M.; HACKETT, T. B.; OGILVIE, G. K.; FETTMAN, M. J. Polyunsaturated fatty acid dietary supplementation induces lipid peroxidation in normal dogs. *Veterinary Medicine International*, v. 2010, p. 1-4.

WANDER, R. C.; HALL, J. A.; GRADIN, J. L.; DU, S. H.; JEWELL, D. E. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *The Journal of nutrition*, v. 127, n. 6, p. 1198-1205, 1997.

WANG, C.; QIN, N.; ZHU, M.; CHEN, M.; XIE, K.; CHENG, Y.; JIN, G. Metabolome-wide association study identified the association between a circulating polyunsaturated fatty acids variant rs174548 and lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 11, p. 1147-1154, 2017.

WANG, C.; QIN, N.; ZHU, M.; CHEN, M.; XIE, K.; CHENG, Y.; JIN, G. Metabolome-wide association study identified the association between a circulating polyunsaturated fatty acid variant rs174548 and lung cancer. *Carcinogenesis*, v. 38, n. 11, p. 1147-1154, 2017.

WANG, D.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LI, W.; SUN, X.; XING, Y.; SUO, J. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on postoperative inflammatory reaction and clinical efficacy. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi= Chinese journal of gastrointestinal surgery*, v. 18, n. 7, p. 651-655, 2015.

WANG, Y.; HOLMES, E.; TANG, H.; LINDON, J. C.; SPRENGER, N.; TURINI, M. E.; NICHOLSON, J. K. Experimental metabonomic model of dietary variation and stress interactions. *Journal of proteome research*, v. 5, n. 7, p. 1535-1542, 2006.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; BEREZINSKA, M.; NOWAK, J. Z. PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med*, v. 24, n. 6, p. 931-41, 2015.

WILLIAMS, R. D.; OLMSTED, W. H. A biochemical method for determining indigestible residue (crude fiber) in feces: lignin, cellulose, and non-water-soluble hemicelluloses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 108, n. 3, p. 635-666, 1935.

WONG, M.; LODGE, J. K. A metabolomic investigation of the effects of vitamin E supplementation in humans. *Nutrition & metabolism*, v. 9, n. 1, p. 110, 2012.

YOUNG, J.; ANGEVAREN, M.; RUSTED, J.; TABET, N. Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. The Cochrane Library, 2015.

YUAN, L.; ZHEN, J.; MA, W.; CAI, C.; HUANG, X.; XIAO, R. The erythrocyte fatty acid profile and cognitive function in old Chinese adults. *Nutrients*, v. 8, n. 7, p. 385, 2016.

ZHAO, Y.; WANG, C. Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acid-supplemented parenteral nutrition on inflammatory and immune function in postoperative patients with gastrointestinal malignancy: A meta-analysis of randomized control trials in China. *Medicine*, v. 97, n. 16, 2018.

ZICKER, S. C.; JEWELL, D. E.; YAMKA, R. M.; MILGRAM, N. W. Evaluation of cognitive, learning, memory, psychomotor, immunologic, and retinal functions in healthy puppies fed foods fortified with docosahexaenoic acid-rich fish.

ANEXOS

ANEXO 1. Planilha de avaliação do teste de discriminação de objetos.

Cão:	Avaliador:	Data:	Sessão:
Posição E+	Resposta	Observações	
Direita			
Esquerda			
Direita			
Esquerda			
Esquerda			
Direita			
Esquerda			
Direita			
Direita			
Esquerda			
Esquerda			
Direita			
Esquerda			
Direita			
Esquerda			
Esquerda			
Direita			
Direita			
Esquerda			
Direita			

ANEXO 2. Declaração de suspensão das atividades realizadas pelo laboratório da Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP

Declaração de suspensão das atividades

São Carlos, 21 de agosto de 2020.

Eu, Luiz Alberto Colnago, pesquisador da Embrapa Instrumentação, declaro que desde o dia 19 de março de 2020, a diretoria executiva da Embrapa cancelou todas as atividades laboratoriais de pessoal não pertencente aos quadros da empresa, devido à pandemia do novo coronavírus (COVID-19) e que somente trabalhos essenciais fossem realizados presencialmente nas dependências da unidade. Dessa forma as análises de metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do projeto intitulado “Efeito da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 sobre a função cognitiva e metabolômica de cães em crescimento” não puderam ser realizadas até o momento.

Estamos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente

Luiz Alberto Colnago
Pesquisador
Laboratório de RMN

ANEXO 3. Variáveis bioquímicas avaliadas durante o experimento e suas respectivas referências.

Valores	GC	GT	Referências
Uréia (mg/dL)	33,80	33,94	15,0 - 53,6
Creatinina (mg/dL)	0,64	0,65	0,5 - 1,4
ALT (U/L)	50,65	45,43	15 - 58
AST (U/L)	39,09	39,57	16 - 43
FA (U/L)	109,04	110,96	10 - 73
GGT (U/L)	3,35	3,22	1,0 - 5,0
PT (G/dL)	5,23	5,34	1,0 - 5,0
Globulinas (g/dL)	1,98	2,03	2,4 - 4,0
Glicose (mg/dL)	110,40	104,99	77 - 120
Albumina (g/dL)	3,25	3,30	2,5 - 3,6
Colesterol (mg/dL)	209,19	205,88	108 - 266
Triglicérides (mg/dL)	43,43	42,29	20 - 112

GC = Grupo controle; GT= Grupo Tratado; ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase; FA= Fosfatase alcalina; GGT= Gama glutamil transpeptidase; PT= Proteínas totais.