

A FUNÇÃO COGNITIVA DE CÃES EM CRESCIMENTO MELHORA COM A SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)

Resumo

O ácido graxo docosahexaenóico (DHA) se apresenta em altas concentrações no cérebro e desempenha papel importante na funcionalidade do sistema nervoso. Existem estudos que relacionaram o DHA à função cognitiva de diversas espécies, porém poucos são direcionados à espécie canina. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os possíveis efeitos da suplementação de cápsulas de óleo de peixe concentrado em DHA na função cognitiva de cães em crescimento. Foram utilizados 12 cães com três meses de idade, blocados por raça e distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais: Grupo Controle (GC), sem suplementação de óleo de peixe e grupo teste (GT), com suplementação diária de 40mg de DHA/kg de peso corporal. Para avaliar a habilidade de aprendizado associada à função cognitiva foi utilizado o teste de discriminação de objetos, composto por duas etapas de avaliação (etapa normal e etapa reversa) aplicado antes, 30, 60 e 90 dias após o início da suplementação. O software utilizado para as análises estatísticas foi o *Statistical Analysis System* (SAS) versão 9.4. Utilizou-se o teste de Shapiro Wilk para verificação da normalidade dos resíduos, PROC MIXED para análise de variância e teste Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$). Os resultados obtidos na etapa normal apresentaram diferenças 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 de GC (62,67%). Em relação à etapa reversa, houve apenas efeito de tempo ($p < 0,0001$). Dessa forma, pode-se concluir que o ácido

graxo DHA influencia a habilidade de aprendizado e melhora a função cognitiva de cães em crescimento.

Palavras-chave: cognição, canino, desenvolvimento neurológico, triglicerídeos, lipídeos.

1. Introdução

Na nutrição de animais de companhia, os lipídeos desempenham papel importante na palatabilidade, transporte de vitaminas lipossolúveis, atuam como fontes de energia, imunomodulação, constituição de membranas biológicas, fontes de ácidos graxos essenciais, dentre outros (TREVIZAN e KESSLER, 2009). 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) (BAZINET et al., 2014).

O ácido graxo poli-insaturado docosahexaenóico (DHA) é um nutriente essencial para cães durante o crescimento (NRC, 2006). 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 imunológico e neurológico em seres humanos e animais de companhia (JENSEN et al., 2005; ZICKER et al., 2012).

Devido a esse papel no desenvolvimento neurológico, foram realizados alguns estudos que avaliaram o efeito da suplementação de AGPI ômega-3 no comportamento, memória e habilidade de aprendizado em humanos e ratos

(RATHOD et al., 2016; ØYEN et al., 2018), mas são poucos os experimentos direcionados à espécie canina, principalmente em filhotes. Diante do exposto, essa pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de DHA na habilidade de aprendizado de cães em crescimento.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 12 cães, machos e fêmeas, não castrados, com idade de três meses, peso médio de $9,1 \pm 1,3$ kg, escore de condição corporal (ECC) médio de $5,0 \pm 1,0$ segundo a escala descrita por Laflamme (1997) e escore de massa muscular médio (EMM) de $2,0 \pm 0,5$, de acordo com a escala de Michel (2009), clinicamente saudáveis, desverminados e vacinados.

Os cães receberam alimento comercial *super premium* para filhotes, além de um alimento úmido completo fornecido com o objetivo de recompensa durante a avaliação da função cognitiva. A ingestão de ambos os alimentos foi monitorada diariamente. 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 dado como peso corporal atual e “p” corresponde a razão: peso corporal atual/peso adulto esperado. A composição dos alimentos ingeridos pelos animais durante o experimento encontra-se descrita na tabela 1.

Os cães foram blocados por raça e distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 6 animais cada: Grupo Controle (GC), sem suplementação de óleo de peixe e Grupo Teste (GT), com suplementação de óleo de peixe. 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. A suplementação foi realizada diariamente, via oral, às 8:00 horas. As coletas de dados foram realizadas antes (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 90 dias (T90) após o início da suplementação.

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

Nutrientes	Alimentos completos			Suplemento
	AR	AUF	AUC	
MS (%)	87,45	94,16	93,48	
MM (%)	6,62	10,74	9,24	
EE (%)	21,50	23,53	26,77	
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 (%)	0,25	0,43	0,41	1,38
Ac. Linoleico (%)	4,19	5,95	5,37	9,00
DHA (%)	0,11	0,02	0,04	49,6
EPA (%)	0,15	0,01	0,02	12,5
AA (%)	0,12	0,37	0,41	1,40

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.

2.1. Protocolo de avaliação da habilidade de aprendizado

A habilidade de aprendizado foi avaliada através do teste de discriminação de objetos realizado com o uso do aparelho *Toronto General Testing Apparatus* (TGTA) adaptado de estudos prévios (MILGRAM et al. 1994; ZICKER et al., 2012; LAZAROWSKI et al., 2014) 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 1).

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

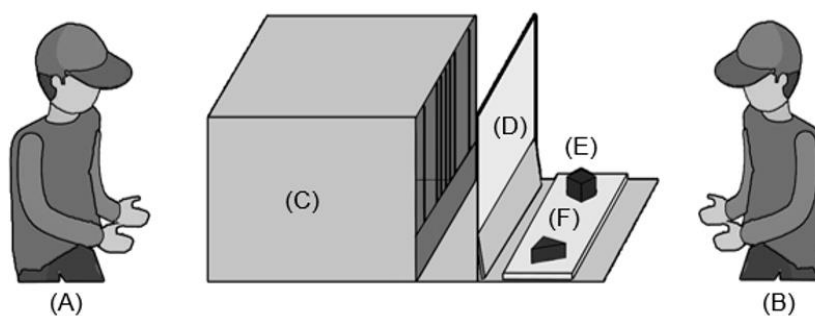
caminhasse em direção à bandeja (Figura 2). A recompensa oferecida em todas as etapas consistiu em um alimento úmido completo escolhido por apresentar maior palatabilidade em relação ao alimento de rotina e, dessa forma, garantir que os animais estivessem motivados a realizar as tarefas.

Figura 1. Aparelho adaptado utilizado para execução do teste de discriminação de objetos (TGTA) e objetos utilizados.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2. Representação da execução do teste de discriminação de objetos para avaliação da habilidade de aprendizado em cães em crescimento.



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

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

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 caminhasse pelo aparelho e chegasse até a abertura com barras ajustáveis, ele era recompensado com 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 por parte do animal. Dessa forma, a recompensa foi fornecida em um dos orifícios e os animais foram condicionados a buscar pelo alimento após a exposição da bandeja ao animal. Foram realizadas 10 tentativas por sessão, duas vezes ao dia, de modo que se o animal acertasse 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 passaria 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 através do olfato, o mesmo alimento foi colocado de baixo de ambos os orifícios, de forma que não houvesse acesso pelo cão. 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 e apenas um comportava o alimento, portanto, este foi denominado objeto S+. O objeto posicionado no orifício que não apresentava alimento foi denominado S- e foi representado por 5 cores e formatos diferentes, enquanto o S+ permaneceu com o mesmo formato e cor em todas as tentativas. As posições foram alteradas de forma que S+ e S- 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 dessa etapa, iniciou-se a avaliação com duração de 10 dias, período no qual dois objetos de formatos e cores diferentes foram usados, um laranja e um azul (figura 1).

Durante os cinco primeiros dias de avaliação, realizava-se a etapa normal, no qual o objeto laranja foi determinado S+ (acompanhado de recompensa) e o objeto azul S- (não apresentava alimento) e, durante os últimos cinco dias, a ordem dos objetos foi trocada de modo que o azul se tornasse S+ e o laranja S-, portanto esta foi considerada etapa reversa. Realizou-se uma sessão por dia de 20 tentativas, 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). Foi considerado como erro os momentos em que o objeto S- foi escolhido.

Tabela 2. Resumo das análises de variância (ANOVAs) da frequência de acertos apresentados pelos cães 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 teste; EPM= Erro padrão da média.

Para melhor entendimento dos dados, na Tabela 3 estão representadas as médias das frequências de acertos obtidas pelos cães durante as etapas normal e reversa em cada período avaliado durante o experimento.

Tabela 3. Médias das frequências de acertos em cada período avaliado nas etapas normal e reversa do teste de discriminação de objetos.

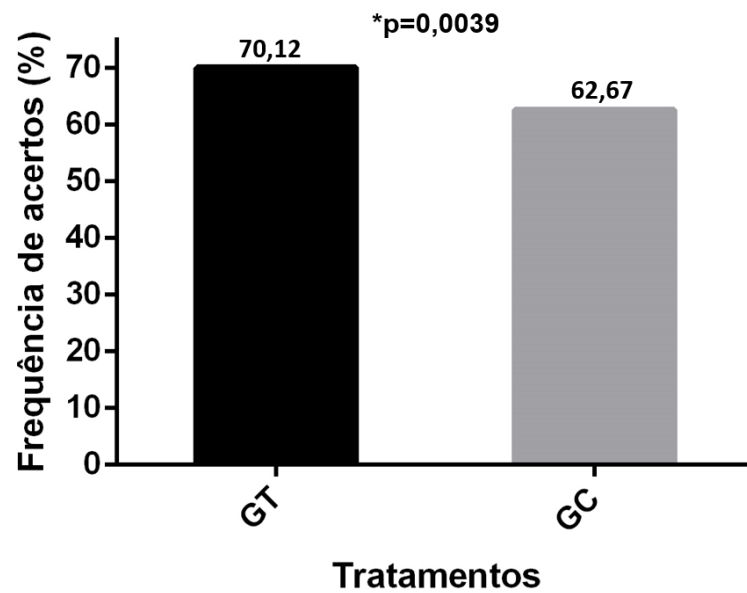
Etapa normal				
Períodos	Tratamentos		EPM	Valor de P
	GT (%)	GC (%)		
0	85,5	82	2,98	0,1134
1	77,33	64,16	3,86	
2	61,33	47,66	6,30	
3	56,33	56,83	6,07	

Etapa reversa				
Períodos	Tratamentos		EPM	Valor de P
	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 teste; EPM= Erro padrão da média.

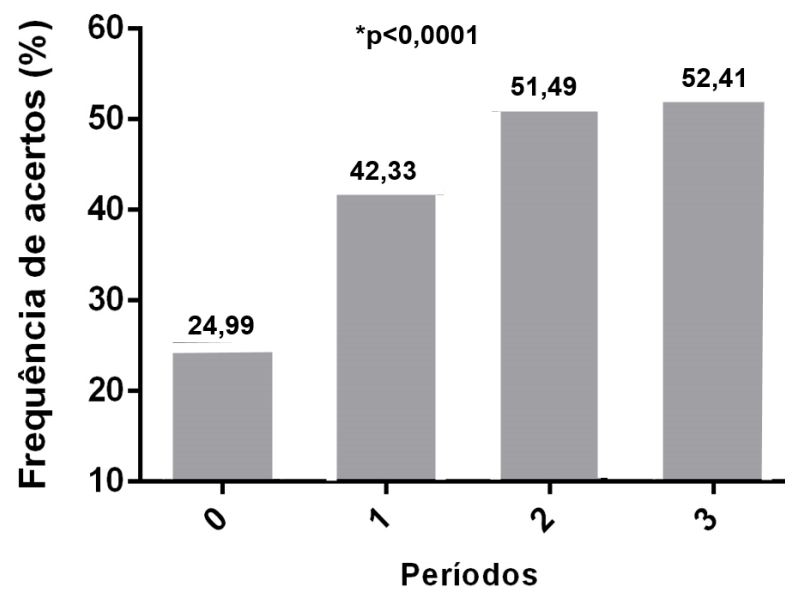
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2 (ANOVAs), os gráficos 4 e 5 representam respectivamente a frequência de acertos na fase normal sob efeito de tratamento e na fase reversa sob efeito de tempo.

Figura 4. Frequência de acertos independente do tempo na etapa normal do teste de discriminação de objetos.



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

Figura 5. Frequência de acertos em cada período independente do tratamento na etapa reversa do teste de discriminação de objetos.



4. Discussão

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. Em relação a etapa reversa, os dados demonstraram efeito de tempo independentemente dos tratamentos, ou seja, ambos os grupos apresentaram aumento crescente 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 das porcentagens de acertos terem sido crescentes 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 dar respostas certas ao longo dos períodos.

Ao analisar os dados da Tabela 3, é possível perceber que os valores não foram diferentes o suficiente para apresentar interação entre tempo e tratamento. Contudo, é interessante ressaltar que as médias do grupo GT apresentam-se semelhantes ao do grupo GC no período 3 da etapa normal, o que poderia corroborar com a sugestão de aprendizado por repetição, pois o grupo GC pode ter sido capaz de aprender, porém em uma velocidade menor.

Hadley et al. (2017) avaliaram o efeito da ingestão de biomassa seca de algas marinhas como fonte de DHA (26mg DHA/kg peso corporal) durante 25 semanas na função cognitiva de cães idosos através de um teste semelhante ao usado neste estudo. Os autores encontraram diferenças entre os grupos, sendo que o grupo controle apresentou maiores porcentagens de erros do que o grupo tratado, porém, ambos apresentaram resultados semelhantes quando os testes foram repetidos. Zicker et al. (2012) ao avaliarem três diferentes concentrações de DHA em rações secas para cães em crescimento, não encontraram diferença ao usar o teste de discriminação de objeto de forma isolada, apesar das médias de acertos terem sido superiores para os grupos com maior ingestão de DHA. No entanto, encontraram efeito no desempenho cognitivo com outros métodos de avaliação, como por exemplo, o teste de labirinto, no qual requer que o animal decore o caminho de um labirinto para ter acesso a uma recompensa.

A melhora na habilidade de aprendizado evidenciada pela frequência de acertos obtida durante a etapa normal pelo grupo GT pode ser explicada pela possível esterificação do DHA na membrana fosfolipídica cerebral. Sabe-se que este ácido graxo compreende cerca de 40% do total 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).

Dessa maneira, além da suplementação através de cápsulas, a adição de óleo de peixe ou outras fontes ricas em DHA torna-se essencial na formulação de alimentos de boa qualidade, 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).

5. Conclusões

É possível concluir que a função cognitiva de cães em crescimento pode ser melhorada através da suplementação do ácido graxo poli-insaturado docosahexaenóico (DHA).

6. Referências bibliográficas

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.

BAZINET, R. P.; LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, p. 771, 2014.

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.

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

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.

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

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.; 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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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