

JANATAR STELLA VASCONCELOS DE MELO

**EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE
PEIXE EM RATOS NO INÍCIO DA VIDA: EFEITOS SOBRE
ANSIEDADE, MEMÓRIA E EXCITABILIDADE CEREBRAL**

RECIFE/PE

2016

JANATAR STELLA VASCONCELOS DE MELO

**EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE
PEIXE EM RATOS NO INÍCIO DA VIDA: EFEITOS SOBRE
ANSIEDADE, MEMÓRIA E EXCITABILIDADE CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby, professora adjunta do Departamento de Nutrição da UFPE.

RECIFE/PE

2016

M528e Melo, Janatar Stella Vasconcelos de.
Exercício em esteira e suplementação com óleo de peixe em ratos no início da vida: efeitos sobre ansiedade, memória e excitabilidade cerebral / Janatar Stella Vasconcelos de Melo. – 2016.
93 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Óleos de peixe. 2. Exercício. 3. Sistema nervoso. 4. Período crítico. I. Hornsby, Manuella Batista-de-Oliveira (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-223)

JANATAR STELLA VASCONCELOS DE MELO

**EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE
PEIXE EM RATOS NO INÍCIO DA VIDA: EFEITOS SOBRE
ANSIEDADE, MEMÓRIA E EXCITABILIDADE CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em 03 de março de 2016

Banca examinadora:

Profº. Rubem Carlos Araújo Guedes

Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Ângela Amâncio dos Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Eduardo Carvalho Lira

Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE – PE

2016

Dedico este trabalho à minha mãe, ***DJANIRA***, por toda sua dedicação durante esses anos de minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por todas as bênçãos derramadas em minha vida e pela certeza de que estás sempre ao meu lado, me guiando em cada etapa de minha vida;

À minha mãe, **Djanira**. Sempre ao meu lado em todos os momentos. Sem você não teria conseguido ir tão longe;

À meu pai **Severino Targino de Melo** (*in memoriam*). Sei que se estivesse aqui, mesmo distante, se alegraria com mais uma vitória de sua filha “Janatinha”;

À meu PAIdastro, **José**, que me acolheu como sua filha e que se alegra com minhas vitórias;

À toda minha **família e amigos**;

À minha orientadora **Manuella Batista**, pela orientação, ensinamentos durante as etapas de realização desse trabalho;

À minhas amigas “Mosqueteiras”, **Patrícia e Laís**. Pergunto-me como seriam esses dois anos sem vocês e chego à conclusão que não seria fácil. Deus preparou tudo de uma forma tão especial, que olho para trás e vejo o longo caminho que trilhamos sempre confiantes de que tudo iria acabar bem. Amigas para sempre;

Às minhas companheiras paraibanas de mestrado, **Larissa Brito e Bárbara Paulino**, quantas conversas entre estados, sempre nos dando forças;

Aos estagiários, **Keyla Torres, Rai Santiago e Roberta Ferrer**, pela ajuda durante as longas horas de experimentos;

Ao professor **Rubem Guedes** pelos ensinamentos e acolhimento e a todos do **LAFINNT**, por toda disponibilidade que foi imprescindível para conclusão deste trabalho;

Às professoras **Cláudia Lagranha e Mariana Fernandes**, ao professor **Eduardo Lira**, pelas parcerias nos diversos trabalhos desenvolvidos;

Ao médico veterinário **Edeone França**, pelos cuidados aos animais e ensinamentos sobre o cuidado com os animais de laboratório;

Ao Programa de Pós-graduação em Nutrição –UFPE e às secretárias do programa de pós-graduação, ***Cecília e Neci***, pela disponibilidade;

À ***CAPES***, pela concessão de bolsa de estudos durante os meses de realização deste trabalho;

“Porque para Deus nada é impossível.”

(Lucas 1, 37)

RESUMO

As fases iniciais da vida representam um período crítico no desenvolvimento do sistema nervoso. O objetivo desse estudo foi avaliar efeitos da associação entre exercício físico em esteira e suplementação com óleo de peixe em ratos no início da vida, sobre ansiedade, memória e excitabilidade cerebral. Ratos *Wistar* foram divididos em: Óleo de Peixe ou Veículo e subdivididos em Exercitados ou Sedentários. O período de treinamento ocorreu do 15º ao 45º dias de vida. A partir dos 46 dias de vida, foi realizada avaliação dos efeitos dessa associação sobre peso corporal, murinometria, respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, memória e eletrofisiologia cortical. Os resultados demonstram que não houve alteração nos dados murinométricos. No teste de labirinto em cruz elevado, os animais exercitados apresentaram comportamento menos ansioso a julgar pelo maior número de entradas nos braços abertos. Além disso, animais suplementados e/ou exercitados apresentaram memória preservada para reconhecimento da identidade do objeto. Por outro lado, a análise intragrupo demonstrou prejuízo dependente do tratamento, quando os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento quanto à localização do objeto. Com relação à análise intergrupo, a suplementação e o exercício aumentaram o índice de discriminação para o objeto estacionário. Sobre a eletrofisiologia cerebral, houve potencialização da suplementação sobre o exercício na redução da velocidade de propagação da depressão alastrante cortical. Neste contexto, os resultados indicam que é necessária cautela no uso da associação dessas estratégias referentes à modulação comportamental ou neural em períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso.

Palavras chaves: Óleos de peixe. Exercício. Sistema nervoso. Período crítico.

ABSTRACT

The early stages of life represent a critical period in the development of the nervous system. The aim of this study was to evaluate how the association between treadmill exercise and supplementation with fish oil in rats during lactation affect anxiety, memory and brain excitability. Wistar rats performed two experimental groups as Fish Oil or vehicle, and then divided into exercised or sedentary. The training period was from the 15th to 45th days of life. From the 46 days of life, the effects of this combination on body weight, murimetric parameters, behavioral assessment, and cortical electrophysiology were evaluated. The results demonstrate that there was no change in murinometric data. In the elevated plus maze, exercised animals were less anxious as judged by the largest number of entries into the open arms as compared to the respective controls. Furthermore, supplemented and / or trained animals showed preserved memory to recognize the identity of the object. On the other hand, the intra-group analysis showed treatment-dependent impairment when the animals were subjected to the recognition test on the object location. The inter-group analysis supplementation and exercise increased the discrimination index for the stationary object. In addition, supplementation with fish oil enhanced the effect of exercise on brain excitability by reducing the velocity of propagation of cortical spreading depression. Therefore, the present data indicate that caution is required in use of the association of these strategies concerning behavioral or neural modulation.

Key-words: Fish oils. Exercise. Nervous system. Critical period of development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Desenho experimental/Distribuição dos grupos experimentais (A) e Cronograma Experimental (B).....Pg.23

TABELA 1. Parâmetros do treinamento físico.....Pg. 24

RESULTADOS

FIGURA 2. Peso pós-natal (2A) e dados murinométricos (2B e C) de animais jovens apresentados como média±EPM.....Pg. 29

FIGURA 3. Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua identidade (A) e localização espacial (B), em animais jovens sobre diferentes condições experimentais.....Pg. 32

FIGURA 4. Velocidade de propagação na DAC (em mm/min) em ratos jovens exercitados (E) ou sedentários (S), que foram suplementados com óleo de peixe (OP) ou solução veículo (V).....Pg. 33

TABELA 2. Dados murinométricos.....Pg. 30

TABELA 3. (A) Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA) e (B) Labirinto em Cruz elevada (LCE).....Pg. 31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag-AgCl	Prata – cloreto de prata
AGI	Ácidos graxos insaturados
ANOVA	Análise da variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Circunferência abdominal
CC	Comprimento da cauda
CFA	Comprimento focinho-ânus
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Circunferência torácica
DAC	Depressão alastrante cortical
DHA	Ácido docosaexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
IL	Índice de Lee
IMC	Índice de massa corpórea
KCl	Cloreto de potássio
LCE	Labirinto em cruz elevado
PCo	Peso do coração
PF	Peso do fígado
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Teste de adaptação ao campo aberto
TRO	Teste de reconhecimento de objetos
VLV	Variação lenta de voltagem
ω-3	Ômega 3

Grupos Experimentais

OP	Óleo de Peixe
V	Veículo
E	Exercitados
S	Sedentários

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. HIPÓTESE	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1. Aspectos éticos e delineamento experimental	22
5.2. Procedimentos gerais para o exercício físico	23
5.3. Determinações ponderais	24
<i>5.3.1. Evolução ponderal</i>	24
<i>5.3.2. Avaliação murinométrica</i>	24
5.4. Análise comportamental	25
<i>5.4.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	25
<i>5.4.2. Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA)</i>	25
<i>5.4.3. Teste de reconhecimento de objetos (TRO)</i>	26
5.5. Registro eletrofisiológico	27
6. Análise Estatística	28
7. RESULTADOS	29
8. DISCUSSÃO	34
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE-A	44
APÊNDICE-B	69
ANEXO - A	93

1. APRESENTAÇÃO

As fases iniciais da vida representam um período crítico no desenvolvimento do sistema nervoso (SN). Nesta fase da vida, ocorrem processos de hiperplasia, hipertrofia, mielinização e migração neuronal com velocidade máxima, em relação a outras etapas da vida pós-natal, o que torna o cérebro vulnerável às demandas do ambiente, como por exemplo, as nutricionais (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1993).

Em ratos de laboratório, esse período crítico de desenvolvimento do SN é representado pela fase pré-natal perdurando até a terceira semana pós-natal, coincidindo com o desmame (CHEN & SU, 2013; HASHIMOTO et al., 2014).

Neste contexto, um dos principais avanços científicos nos últimos 40 anos foi o reconhecimento da estreita relação entre o consumo de lipídios dietéticos, a composição lipídica do encéfalo e sua repercussão sobre o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SNC). E devido aos efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) do tipo ômega 3 (ω -3), comumente presentes no óleo de peixe (OP), boa parte dos estudos tem sido direcionados para essa classe de lipídeos (YEHUDA et al., 2005; PERINI et al., 2010).

Além dos fatores dietéticos, o exercício físico moderado tem sido investigado pela comunidade científica devido sua: (1) influência sobre a função e plasticidade cerebral (RACHETTI et al., 2013), (2) modulação da neurogênese hipocampal (DURING & CAO, 2006; VAN PRAAG et al., 1999) e (3) prevenção da ocorrência de doenças psiquiátricas (GOMEZ-PINILLA, 2006).

Dessa forma, nos últimos anos o interesse na suplementação de PUFA do tipo ômega 3 (ω -3) e/ou exercício físico aumentou significativamente, sendo demonstrado em muitos estudos os efeitos benéficos dessas estratégias sobre a maturação cortical, sinaptogênese e mielinização, redução do risco de déficits cognitivos e inflamação, bem como benefícios neuroplásticos na juventude e envelhecimento (DIK et al., 2003; BOURRE, 2005; ENGSTRÖM et al., 2009; VINES et al., 2011; NYBERG et al., 2013).

Além disso, esta associação torna-se importante para a prevenção do desenvolvimento de distúrbios relacionados à ansiedade (GOMEZ-PINILLA & YING, 2010), uma vez que, segundo dados epidemiológicos, estes distúrbios estão entre as doenças mentais mais comuns, acometendo de 3 a 18% da população mundial a cada ano (RAVIDRAN & SILVA, 2013).

Apesar de atualmente a literatura apresentar diversas informações clínicas e experimentais acerca dos efeitos da suplementação com ácidos graxos insaturados (AGI) e/ou exercício físico sobre diversas condições, incluindo distúrbios cardiovasculares, neurológicos e psiquiátricos, há uma preocupação da comunidade científica quanto à influência dessas estratégias, de forma isolada ou associada, nas fases iniciais da vida, bem como a duração e dose necessárias para garantir o bom desenvolvimento e funcionamento dos sistemas orgânicos.

Assim, a pergunta que norteou a realização deste trabalho foi: a associação entre exercício físico em esteira e suplementação com óleo de peixe no início da vida apresenta efeitos positivos sobre parâmetros relacionados à ansiedade, memória episódica, excitabilidade cortical e murinometria em ratos jovens *Wistar*? A partir desta pergunta condutora foi hipotetizado que a associação entre a suplementação com óleo de peixe (dose de 85mg/kg) e o exercício físico em esteira no início da vida mantém a murinometria adequada para idade. Além de promover efeitos positivos relacionados ao desempenho dos animais em avaliações comportamentais, melhorando: (1) as respostas aos testes para reconhecimento de objetos (TRO) e, consequentemente, memória episódica e (2) reduzindo indicadores ansiogênicos a julgar pelo comportamento durante a realização da tarefa no teste de adaptação ao campo aberto (TCA) e no labirinto em cruz elevado (LCE). Bem como promove a diminuição da excitabilidade cerebral através da redução da velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (DAC).

Diante disto, a abordagem proposta neste estudo está distante do uso de tratamentos de alto custo, uma vez que utiliza a suplementação com o OP e/ou exercício físico em esteira, que representa uma abordagem natural, de baixo custo e acessível, cuja simplicidade se traduz em dois aspectos básicos da vida – nutrição e movimento.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da associação da suplementação com OP e exercício físico em esteira no início da vida de ratos *Wistar*, sobre parâmetros murinométricos, ansiedade, memória episódica e eletrofisiologia cerebral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Efeitos do exercício físico e/ou ácidos graxos ômega-3 sobre memória e ansiedade

Cerca de 50 a 60% do peso seco do cérebro é constituído por lipídios, dos quais aproximadamente 35% são representados pelos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA). Estes desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do cérebro, estando sua disponibilidade na dieta associada ao processo de aprendizagem, humor e habilidades motoras de animais em desenvolvimento (NICULESCU et al., 2011; BRENNAN, 2011; LONG & BENTON, 2013).

Os PUFA do tipo ω -3 (ácidos α -linolênico-ALA, 18:3) e ω -6 (ácido linolêico-LA, 18:2), são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) uma vez que não podem ser sintetizados por mamíferos, e são considerados críticos para o desenvolvimento, estrutura e função do sistema nervoso central (SNC). O ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n -3) e ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n -3), metabólitos do ALA, podem ser obtidos a partir de peixes, sendo essenciais para o crescimento e desenvolvimento em mamíferos, facilitando a formação de sinapses dendríticas e crescimento neuronal (CHYTROVA et al., 2010; MIZUNOYA, 2013).

O óleo de peixe (OP), por sua vez, é uma fonte alimentar que apresenta alta quantidade de EPA e DHA, tipos de PUFA comumente ausentes em outros óleos (MIZUNOYA et al., 2013).

Um dos PUFA do tipo ω -3 presentes em maior concentração no cérebro é o DHA, perfazendo até 17% do total de ácidos graxos, o qual apresenta papel importante no desenvolvimento neuronal nas fases fetal e infantil precoce (FERRAZ et al., 2011), estando sua suplementação ligada à melhora da aprendizagem e memória relacionada ao hipocampo em roedores, e à redução da incidência de desordens de humor em seres humanos (CHYTROVA et al., 2010). Além disso, o DHA está envolvido em diversos processos neurais, tais como promoção do crescimento dos neurônios na região do hipocampo, redução da atividade inflamatória e melhora da neurotransmissão de sinais (CHYTROVA et al., 2010).

O EPA por sua vez, está presente em concentrações menores no SNC, porém apresenta papel importante no sistema cardiovascular e imunológico (RACHETTI et al., 2013).

Particularmente, os PUFA do tipo ω -3 podem modular a fluidez da membrana plasmática cerebral através do deslocamento do colesterol (GOMES-PINILLA & TYAGI, 2013) bem como aumentar o número de receptores, levando a uma melhora da funcionalidade dos canais iônicos e modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas na transdução de sinais. Juntos esses efeitos parecem otimizar os processos cognitivos (MURPHY et al., 2014).

Por sua vez, o exercício físico de forma regular, está relacionado a processos adaptativos que trazem efeitos benéficos ao funcionamento cerebral, incluindo aprendizagem, potenciação de longo prazo, memória e ansiedade (RADAK et al, 2001; OGONOVSKY et al, 2005, FULK et al., 2004). Além disso, o exercício físico parece manter a integridade cerebrovascular, aumentar o crescimento dos capilares e conexões dendríticas (DING et al, 2006; LUCAS et al, 2012).

Em humanos, estudo utilizando auto-relatos de ansiedade tem apresentado um efeito ansiolítico associado ao exercício físico (DISHMAN, 1998). O exercício físico regular parece induzir efeitos positivos sobre o humor enquanto reduz a ansiedade, incluindo sentimentos negativos relacionados à frustração e irritabilidade (LONG et al., 1995).

Atualmente acredita-se que ambas as estratégias, exercício físico e suplementação com PUFA, estejam envolvidas em benefícios para a saúde mental, devido ao suporte dado ao funcionamento cerebral tanto em condições normais quanto naquelas consideradas críticas (CHYTROVA et al., 2010; RACHETTI et al., 2013), porém há poucos estudos que avaliem os efeitos da associação dessas estratégias sobre aspectos comportamentais.

No que diz respeito à memória, a suplementação com OP e o exercício físico em esteira nas fases iniciais da vida, parecem ser estratégias com efeitos independentes sobre os prejuízos à memória associados ao envelhecimento. Porém os efeitos positivos dependem do tipo de tarefa utilizada para avaliar a memória (RACHETTI et al., 2013).

Também tem sido demonstrada a influência do período de suplementação dos ácidos graxos na dieta bem como o perfil dos ácidos graxos suplementados sobre testes comportamentais. MESSERI et al. (1975), ao avaliar filhotes de ratas alimentadas durante a gestação com óleo de milho, oliva, e óleo de cártamo, demonstraram que estes filhotes apresentaram aversão duas vezes maior a choques elétricos em tarefas de aprendizagem de esquivas, quando comparados à ratas que tiveram a gordura saturada como fonte lipídica no mesmo período.

A suplementação perinatal também revela uma melhora consistente da neurogênese hipocampal em filhotes de ratas submetidas à suplementação de PUFA do tipo ω -3

durante o período gestacional (NICULESCU et al., 2011). Em contrapartida a deficiência de PUFA promove prejuízos permanentes sobre a aprendizagem de filhotes avaliados a partir do LCE, quando os PUFA foram retirados da dieta das ratas nos últimos 7 dias de gestação. Porém esses prejuízos não foram observados quando esses ácidos graxos foram retirados da dieta materna durante o período de lactação (LAMPTEY & WALKER, 1978).

Apesar de uma variabilidade de desenhos experimentais para avaliar os efeitos dos componentes dietéticos sobre as habilidades cognitivas, há um consenso de que a deficiência dos PUFA do tipo ω -3 em roedores resulta em prejuízos à memória e aprendizagem. Porém os mecanismos pelos quais estes ácidos graxos afetam a plasticidade cerebral e a cognição estão em processo de elucidação (WU et al., 2008).

No mesmo sentido, a deficiência do DHA tem sido associada a diversas doenças mentais como depressão, esquizofrenia, bem como ao risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer, estando sua suplementação ligada à efeitos opostos (WU et al., 2008; WU et al., 2004; CORRIGAN, 1998; DUBNAU et al., 2003).

Sobre o comportamento ansioso, estudos têm demonstrado a relação do exercício físico e os níveis de ansiedade em animais, porém os resultados mostram-se controversos, demonstrando efeitos ansiolíticos (FULK et al., 2004) e ansiogênicos quando avaliados através do LCE e TCA (BURGHARDT et al., 2004) ou nenhum efeito (CHAOULOFF, 1994).

No entanto, a deficiência de PUFA do tipo ω -3 tem sido associada ao aumento do fenótipo relacionado à ansiedade, bem como diminuição dos níveis cerebrais de DHA e de marcadores de plasticidade, como por exemplo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de sua sinalização através do receptor BDNF TrKB (BHATIA et al., 2011).

2.2. Efeitos dos ácidos graxos ômega-3 e exercício físico sobre a Depressão alastrante cortical (DAC)

O tecido nervoso apresenta como característica fisiológica principal a capacidade de produzir atividade elétrica. Por meio desta, o encéfalo é capaz de executar diversas ações fisiológicas, desde as consideradas mais simples, até as mais complexas. Logo, as técnicas que permitam o registro e a análise dessa atividade podem fornecer informações relevantes para a compreensão do funcionamento do sistema nervoso, tanto em condições consideradas normais, como patológicas (GUEDES, 2005).

Neste contexto, o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC) tem sido utilizado para avaliação, por exemplo, dos efeitos do exercício físico (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al, 2012) e dieta hiperlipídica (GERMANO et al., 2013), entre outras condições, sobre a excitabilidade cortical. Dessa forma a proposta do presente estudo é dar continuidade à linha de pesquisa do qual este projeto faz parte dando subsídios para criação de uma nova equipe de trabalho nessa área com o objetivo de investigar os efeitos do exercício e da suplementação com ácidos graxos essenciais.

A DAC foi descrita pela primeira vez como uma depressão da atividade elétrica cortical espontânea em resposta a uma estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cortical (LEÃO, 1944).

Essa depressão se propaga de forma concêntrica por todo o córtex (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min) e ao final, cerca de 10 a 15 min, o tecido cortical se acha recuperado. À medida que a DAC se propaga para regiões cada vez mais afastadas, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir do ponto estimulado. Acompanhando esta depressão da atividade elétrica espontânea, foi observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical onde estava ocorrendo a DAC (LEÃO, 1944; LEÃO 1947).

O fenômeno é caracterizado pela despolarização neuronal (DREIER, 2011) e tem sido demonstrado no cérebro de diversas espécies de vertebrados (BURES et al., 1974) como também em humanos (FABRICIUS et al., 2008; GORJI & SPECKMANN, 2004).

Atualmente não há pesquisas que demonstrem os efeitos da suplementação dos PUFA do tipo ω -3 sobre a eletrofisiologia cerebral. Porém, foi demonstrado que dietas deficientes em ácidos graxos essenciais do tipo ω -3 e ω -6 ofertadas desde o início da vida até a idade adulta em ratos promove redução da velocidade de propagação da DAC com persistência desse efeito até a segunda geração de filhotes (BORBA et al., 2010).

Por outro lado, no que se refere ao exercício físico e eletrofisiologia cerebral, dados presentes na literatura demonstram efeitos duradouros a depender da idade, prática de exercício e estado nutricional prévio (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

Diante do exposto, o uso da DAC se mostra como uma maneira simples e interessante de estudar aspectos nutricionais e do desenvolvimento da eletrofisiologia cerebral (GUEDES, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da associação entre exercício físico em esteira e suplementação com óleo de peixe no início da vida, sobre ansiedade, memória e excitabilidade cerebral em ratos *Wistar*.

3.2. Objetivos específicos

- Acompanhar a evolução ponderal durante o período de experimentação;
- Obter a avaliação murinométrica, através do índice de Lee, do IMC e da relação entre circunferência abdominal e torácica;
- Averiguar o efeito do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre a memória episódica e ansiedade;
- Investigar o efeito do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre a velocidade de propagação da DAC;

4. HIPÓTESE

A associação entre exercício físico em esteira e suplementação com óleo de peixe no início da vida mantém a murinometria adequada para idade, além de promover efeitos positivos relacionados ao desempenho dos animais em avaliações comportamentais, melhorando: (1) as respostas aos testes para reconhecimento de objetos (TRO) e, consequentemente, memória episódica e (2) reduzindo indicadores ansiogênicos a julgar pelo comportamento durante a realização da tarefa no teste de adaptação ao campo aberto (TCA) e no labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, haverá diminuição da excitabilidade cerebral através da redução da velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (DAC).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos éticos e delineamento experimental

Os métodos utilizados estão de acordo com o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e, especialmente, respeitando as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (protocolo nº 23076.027072/2014-20).

Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Ratos neonatos foram aleatoriamente distribuídos, 24 horas após o parto, em ninhadas de 9 filhotes por mãe. ***Destes, foram separados dois grupos experimentais conforme descrito na Figura 1A.*** Assim, em cada ninhada, os filhotes foram subdivididos em exercitados (E) ou controles sedentários (S). O período de treinamento ocorreu do 15º ao 45º dias de vida. Durante o período de treinamento, tanto os animais exercitados, quanto os sedentários foram suplementados por via oral (gavagem) com uma solução contendo óleo de peixe (OP), água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®) ***ou*** solução veículo (V) contendo apenas água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®). Durante todo o período de experimentação, os ratos foram alimentados com a dieta de manutenção do biotério (“Presence”, Purina do Brasil). A partir dos 46 dias de vida, foi realizada avaliação dos efeitos da associação do exercício com a suplementação com óleo de peixe sobre a evolução ponderal, respostas comportamentais, murinometria e eletrofisiologia cortical (Figura 1B). Para complementar as análises metodológicas, os tecidos coletados foram avaliados, quanto ao estresse oxidativo, por equipes lideradas pelas Prof^a Cláudia Lagranha e Prof^a Mariana Fernandes. ***Foram 4 grupos experimentais, cada grupo contendo 12 animais, com número total de 48 animais.***

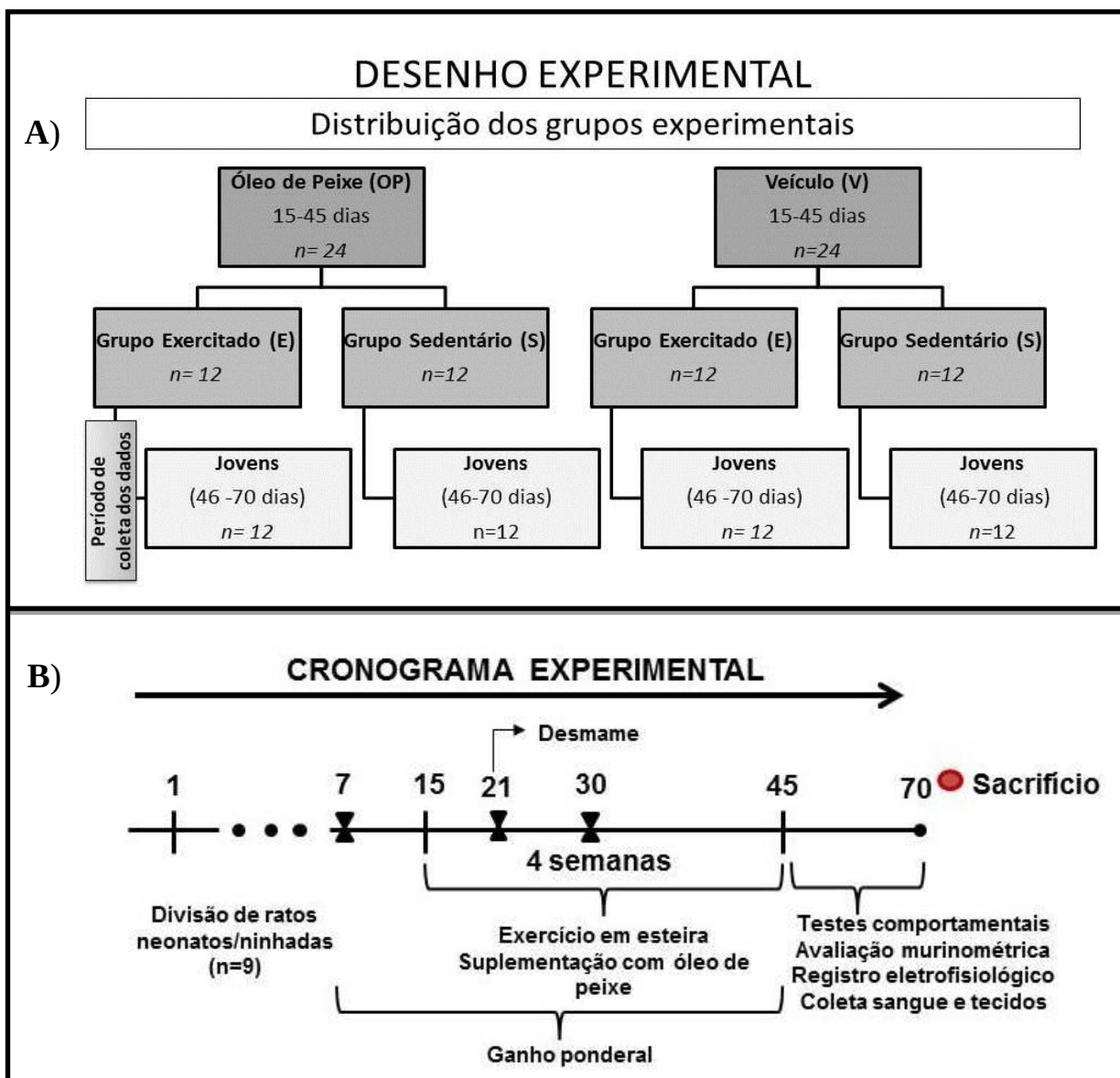


FIGURA 1. Desenho experimental/Distribuição dos grupos experimentais (A) e Cronograma Experimental (B). Sequência de experimentos realizados com ratos jovens da linhagem *Wistar*. A partir do primeiro dia de vida, os animais foram distribuídos em ninhadas de 9 filhotes/rata. Em cada ninhada, os filhotes foram subdivididos em treinados (E) ou controles sedentários (S). O período de treinamento ocorreu do 15º ao 45º dias de vida. Durante o período de treinamento, tanto os animais exercitados, quanto os sedentários foram suplementados por via oral (gavagem) com óleo de peixe (OP) ou solução veículo (V). Após quatro semanas de tratamento, foram realizados os testes comportamentais, avaliação murinométrica e registro eletrofisiológico.

5.2. Procedimentos gerais para o exercício físico

Conforme parâmetros descritos na literatura (SCOPEL et al., 2006 e BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012), os animais foram submetidos ao exercício físico em esteira motorizada (Insight EP-131, 0º inclinação). Os animais do grupo sedentário (S) também foram mantidos na esteira pelo mesmo período de tempo, conforme descrito na tabela 1.0 (número de sessões), no entanto a esteira permaneceu desligada.

TABELA 1. Parâmetros do exercício físico.

Grupo experimental	Parâmetros do exercício	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
E	Número de sessões por semana	5	5	5	5
	Velocidade	5m/min	10m/min	15m/min	20m/min
	Tempo	20 min	20 min	20 min	20min

Adaptado de Batista-de-Oliveira et al., 2012.

O exercício e a suplementação com os ácidos graxos essenciais foram realizados concomitantemente, do 15º ao 45º dias de vida. Doses diárias de 85 mg/kg/dia de ômega-3 nos grupos OP foram administradas por via oral (técnica de gavagem). Nos grupos controles, a solução V de cremophor 0,009% (Sigma) foi administrada.

A solução de OP foi preparada a partir de cápsulas (Sundown - Naturalis®) contendo os seguintes ácidos graxos poliinsaturados: DHA (85 mg/ 1 g) e EPA (128mg/ 1 g) e diluída em água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®). A solução veículo foi preparada utilizando somente água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®).

5.3. Determinações Ponderais

5.3.1. Ganho ponderal

O peso corporal foi obtido aos 7, 14, 21, 30 dias de vida; além disso, os animais foram pesados também no primeiro e último dia de cada semana de treino. Estes pesos corporais foram comparados entre os grupos suplementados (OP e V) e de exercício físico (S e E).

5.3.2. Avaliação Murinométrica

No dia do registro eletrofisiológico (procedimentos descritos a seguir), após anestesia (**procedimento descrito no tópico 5.5**), os animais tiveram o comprimento da ponta do focinho até o ânus (CFA), circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT) aferidos, para análise dos parâmetros murinométricos:

- Índice de Massa Corpórea (IMC): peso corporal (g)/ comprimento² (cm²) (NOVELLI et al., 2007).
- Índice de Lee (IL): raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento (cm) (NOVELLI et al., 2007).
- Relação circunferência abdominal/ circunferência torácica (CA/CT) (cm) (NOVELLI et al., 2007).

5.4. Análise comportamental

5.4.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste consistiu em colocar o animal em um LCE, elevado do solo, formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos (perpendiculares aos primeiros), analisando-se a frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço, e outros comportamentos como deslocamentos, levantar-se, esticar-se etc. O animal explora os dois tipos de braço, porém entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW & FILE, 1986).

O procedimento foi realizado entre as 10:00–14:00h, utilizando no mínimo 12 animais de cada grupo dos 46 a 55 dias de vida. No dia do experimento, os ratos machos foram colocados na ante-sala experimental, individualmente, em gaiola apropriada e permaneceram 5 minutos antes do início do teste, para adaptação ao novo ambiente.

O animal foi colocado no centro do aparato cuidadosamente com o focinho voltado para um dos braços fechados onde foi permitida a exploração livre por 5 minutos. A cada animal testado, o labirinto era limpo com álcool à 70%, respeitando um intervalo de 5 minutos.

Posteriormente, as seguintes categorias comportamentais foram analisadas:

- a) Distância total percorrida;
- b) Tempo de imobilidade;
- c) Número de entradas no braço aberto: foi considerada uma entrada quando o animal entrou com as quatro patas no braço;
- d) Tempo gasto nos braços abertos;

5.4.2. *Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA)*

Todos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto para adaptação à arena. O aparato consiste em uma arena circular (campo aberto), feito de madeira, com 1 metro de diâmetro, localizada em um ambiente com iluminação reduzida. Por vez, cada animal foi colocado, por 5 minutos na arena, para exploração ao ambiente, permitindo a análise da ansiedade pelo tempo gasto e o número de entradas na área central, a distância percorrida e o tempo de imobilidade. O teste foi validado segundo PLATEL & PORSOLT, 1982.

5.4.3. *Tarefa de reconhecimento de objetos (TRO)*

Entre os 46 e 55 dias de idade, os animais foram submetidos a TRO. O aparato consistia em uma arena (campo aberto) localizada em um ambiente com iluminação reduzida. Os animais foram colocados, por 5 minutos na arena, para se adaptarem ao ambiente e o experimento comportamental propriamente dito foi realizado no dia seguinte à adaptação. Foram avaliadas as diferenças, entre os grupos, na capacidade de identificação de objetos com base na sua forma e localização no campo aberto.

Em cada uma dessas duas tarefas, os animais, em uma primeira sessão, exploraram por 5 minutos o ambiente. Numa segunda sessão, após 50 minutos, foi avaliado o reconhecimento das características de forma e localização espacial dos objetos, como descrito adiante. Se, nessa segunda sessão, diante de dois objetos, um conhecido (da sessão anterior – com características “familiar”) e outro com características de “novidade” (seja na forma, ou na posição), o rato reconhecer o objeto apresentado na primeira análise, ele, então, passará mais tempo explorando o objeto “desconhecido”.

Entre as sessões, os objetos e o campo aberto foram limpos adequadamente com álcool a 70% para eliminar pistas olfativas que pudessem influenciar o ensaio seguinte.

O critério para definir exploração é baseado na “exploração ativa”, ou seja, quando o rato está tocando os objetos pelo menos com o focinho (O’CALLAGHAN et al., 2007; MELLO et al., 2008; DERE et al., 2005). ENNACEUR & DELACOUR (1988) (apud DERE et al., 2005) demonstram esses métodos utilizados para os testes de reconhecimento de objetos, brevemente descritos a seguir:

Na discriminação das formas: dois objetos idênticos (A e B) foram posicionados na arena para a primeira análise. Após 50 minutos, os animais foram recolocados no campo aberto (segunda sessão) com o mesmo objeto A (conhecido), porém, o objeto B foi substituído por outro, C (desconhecido), da mesma cor, tamanho e cheiro do objeto A, mas com uma forma

diferente. O animal, então, diferenciara as formas quando, nessa segunda sessão, passar mais tempo explorando o objeto com a forma desconhecida.

Para avaliar a distinção de localização espacial: dois objetos idênticos (A e B) foram colocados em determinadas posições no campo aberto. Passados 50 minutos, os animais foram novamente colocados no campo aberto (segunda sessão) na presença dos mesmos objetos (A e B), todavia, neste segundo momento a posição de A se mantém (posição conhecida), e a localização de B se modificou. Se o animal distinguir uma posição desconhecida, ele gastará mais tempo explorando o objeto nessa posição.

Para a análise do comportamento no reconhecimento de objeto, foram utilizados dados referentes ao índice de discriminação (%), fundamentado no tempo de exploração no objeto novo e no objeto familiar (quanto a identidade ou localização) em relação ao tempo total de exploração do animal (AKKERMAN et al., 2012).

Todos os testes comportamentais foram filmados através de uma câmera instalada no teto da sala e conectada a um programa computacional preparado para aquisição de imagens. Para o processamento e análise dos parâmetros comportamentais gravados em vídeo foi utilizado o software *ANY-maze Video Tracking System version 4.99m*.

5.5. Registro eletrofisiológico

Para a realização dos registros eletrofisiológicos, os animais entre 55 e 70 dias de vida foram anestesiados com uma solução de uretana 10% + cloralose 0,4%, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intra-peritoneal (ambos da Sigma Co., EUA). O animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico. Por meio de trepanação, foram feitos três orifícios, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada, alinhados paralelamente à linha média.

Os registros da variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a DAC foram feitos durante 4 horas, por eletrodos de Ag/AgCl (GUEDES & BARRETO, 1992), com um par para o registro localizados no hemisfério parietal. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre o osso nasal e serviu de referência comum aos dois eletrodos de registro. A DAC foi provocada a cada 20 minutos por estimulação química com KCl a 2%, durante 1 minuto no orifício de estimulação na região frontal.

A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os eletrodos de registro e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância. Para cada uma das horas de registro foram calculadas as velocidades médias de propagação do fenômeno.

6. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos em média $\pm$ EPM ou mediana com intervalo interquartilico e analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O teste estatístico foi escolhido mediante a análise no teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). Para a distribuição paramétrica, na análise intergrupo referente aos dados murinométricos, testes para avaliação do comportamento ansioso (LCE e TCA) e registro eletrofisiológico foram utilizados ANOVA *two-way*, seguida de “post hoc” (Tukey) ou do teste “t” de *Student* não pareado. Para a avaliação das diferenças significativa intragrupo referente aos dados comportamentais de reconhecimento de objeto, os índices de discriminação foram analisados através do teste “t” de *Student* pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Evolução Ponderal e Dados murinométricos

A associação do exercício físico em esteira e da suplementação com o óleo de peixe realizada do 15º ao 45º dia de vida pós-natal, não modificou de maneira significativa o peso corporal e os dados murinométricos, entre os animais dos diferentes grupos experimentais (ANOVA *two-way*, $p>0,05$), conforme demonstrado na FIGURA 2 e TABELA 2.

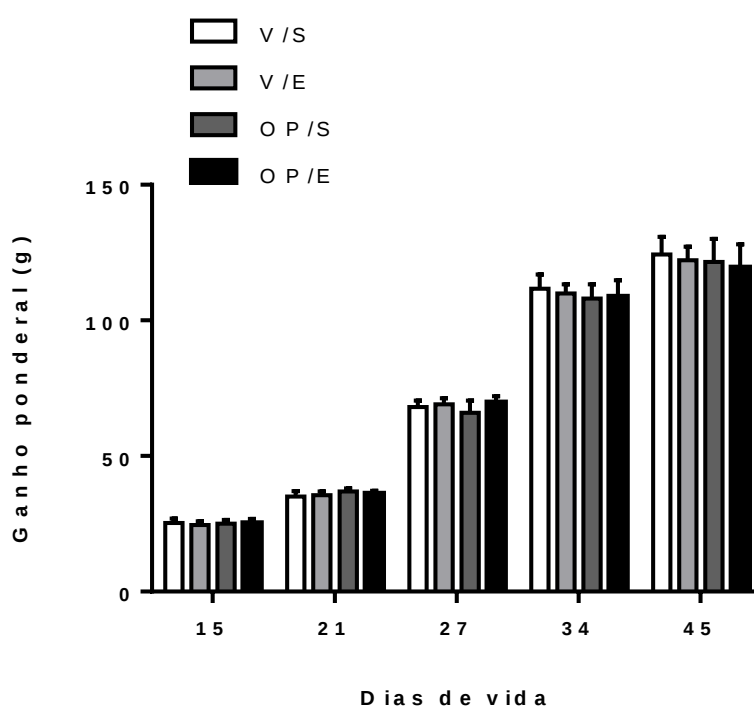


FIGURA 2. Ganho ponderal pós-natal apresentado como média±EPM. Estes animais foram previamente divididos em exercitado (E) (n=20, por grupo) e sedentários (S) (n=20, por grupo). A partir do 15º dia de vida, peso corporal foi mensurado até o 45º dia de vida. No mesmo período os animais receberam uma dose diária de óleo de peixe (OP), por 4 semanas. A análise realizada com ANOVA *two-way* ($p>0,05$) não apresentou diferença estatística significativa no peso corporal, entre os grupos experimentais.

TABELA 2. Os dados murinométricos são apresentados como média±EPM. No 1º dia de vida pós natal, os animais foram distribuídos aleatoriamente em ninhadas de 9 filhotes/mãe. Ao 15º dia de vida, os animais foram subdivididos conforme a suplementação e/ou exercício físico em esteira.

Grupo Experimental (n)	Dados murinométricos								
	CA	CT	CA/CT	CC	CFA	IL	IMC	PCo/PC	PF/PC
V&S (n=12)	15,15±0,35	12,50±0,34	15,15±0,35	15,02±0,30	20,50±0,43	0,30±0,003	0,55±0,01	0,45±0,01	1,32±0,06
V&E (n=12)	14,96±0,29	12,63±0,18	14,96±0,29	15,04±0,28	20,64±0,35	0,30±0,003	0,55±0,01	0,49±0,19	1,25±0,01
OP&S (n=12)	14,92±0,38	12,54±0,18	14,92±0,38	15,33±0,50	20,68±0,50	0,29±0,005	0,53±0,02	0,51±0,04	1,30±0,12
OP&E (n=12)	15±0,36	12,64±0,20	15,00±0,36	14,91±0,5	20,60±0,63	0,29±0,14	0,53±0,02	0,50±0,02	2,02±0,44

V&S – solução veículo e sedentários; V&E – solução veículo e exercitados; OP&S óleo de peixe e sedentários; OP&E –óleo de peixe e exercitados; CA(cm) - circunferência abdominal; CT(cm) -circunferência torácica; CA/CT – Relação circunferência abdominal/torácica; CC(cm) - comprimento caudal; CFA(cm) - comprimento focinho-ânus; IL (g/cm) – índice de *Lee*; IMC (Kg/m²) – índice de massa corporal; %PCo/PC- peso do coração; PF – peso do fígado.

7.2. Avaliação comportamental

7.2.1. Teste de Adaptação ao Campo Aberto (TCA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O comportamento ansioso avaliado pelo teste de adaptação ao campo aberto (TCA) e labirinto em cruz elevado (LCE) estão apresentados na TABELA 3. No TCA não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados, quando comparados os diferentes grupos experimentais (ANOVA *two-way*, $p>0,05$). Por outro lado, no LCE os animais exercitados apresentaram maior número de entradas no braço aberto, quando comparados ao grupo controle (V/E 8 (3-9,75); *versus* V/S 3 (0,5-5,25); (ANOVA *two-way*, seguida do teste de Tukey, $p=0.01$).

TABELA 3. (A) Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA) e (B) Labirinto em Cruz elevado (LCE). Os valores dos dados estão descritos em média±EPM ou mediana (intervalo interquartilico). A letra sobrescrita representa diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA two-way, seguida do teste de Tukey, $p=0.01$), V&S: sedentário suplementado com solução veículo. V&E: exercitado suplementado com solução veículo; OP&S: sedentário suplementado com óleo de peixe; OP&E: exercitado suplementado com óleo de peixe.

Testes comportamentais	Grupos experimentais			
	V&S (n=7)	V&E (n=7)	OP&S (n=8)	OP&E (n=9)
(A) TCA				
Distância total percorrida (m)	21,72±3,64	22,10±2,10	23,58±4,61	26,27±3,61
Tempo de imobilidade (s)	59,41±20,66	61,51±21,39	45,33±17,24	42,12±16,96
Nº de linhas cruzadas	93 (82-102)	86 (80-100)	92 (86-112,8)	96 (91,5-112,5)
Nº de entradas na área central	8 (3-8)	7 (4-10)	7,5 (6-9,5)	7 (6-9)
Tempo na área central (s)	17,87±6,05	17,61±8,89	15,49±5,43	17,87±6,05
	V&S (n=8)	V&Ex (n=6)	OP&S (n=9)	OP&Ex (n=8)
(B) LCE				
Distância total percorrida (m)	9,17±3,09	11,27±1,29	10,63±3,01	10,63 ±3,01
Tempo de imobilidade (s)	102,99±19,32	78,15±29,92	83,79±25,90	83,79 ±25,90
Nº de entradas no braço aberto	3 (0,5-5,25) ^a	8 (3-9,75) ^a	6 (4-6,5)	6 (3,5-8)
Tempo no braço aberto (s)	12,31±12,44	33,92±20,40	33,16±21,72	33,16 ±21,72

7.2.2. Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO)

No que se refere ao desempenho dos animais nos testes relacionados à memória episódica, a análise intragrupo (teste “t” *Student* pareado) demonstrou que os animais tiveram a memória preservada para o reconhecimento da identidade do objeto apresentando um índice de discriminação acima de 60% para o objeto novo *versus* o objeto familiar (OP&E, 63,3±2,5 *versus* 36,7±2,5, $p<0,001$; OP&S, 71,3±3,8 *versus* 28,7±3,8, $p<0,001$; V&E, 66,0±4,0 *versus* 34,0±4,0, $p<0,005$ e V&S, 68,7±3,5 *versus* 31,3±3,5, $p<0,001$). A análise intergrupo (ANOVA two-way, $p>0,005$) não apresentou nenhuma diferença significativa.

Por outro lado, a comparação intragrupo (teste “t” *Student* pareado) com os dados obtidos do teste de reconhecimento espacial, demonstrou um prejuízo dependente do tratamento como julgado pelos valores de índice de discriminação para o deslocado *versus* o objeto estacionário (OP&E, 39,6±2,7 *versus* 60,4±2,7, $p<0,005$; OP&S, 39,3±3,1 *versus* 60,7±3,1, $p<0,01$). Este prejuízo não foi observado nos ratos controles (V&E, 48,0±3,8 *versus* 52,0±3,8, $p>0,05$; V&S, 62,2±2,6 *versus* 37,8±2,6, $p<0,01$). A análise intergrupo (ANOVA two-way seguida do teste “post hoc” Tukey) para o desempenho no teste de reconhecimento espacial demonstrou que a suplementação e o exercício físico em esteira aumentam o índice de discriminação relacionado ao reconhecimento da posição estacionária, e diminuiu os

índices relacionado à discriminação do objeto deslocado (OP&S *versus* V&S, $p<0,001$, e V&E *versus* V&S, $p<0,05$) (FIGURA 3 A e 3B)

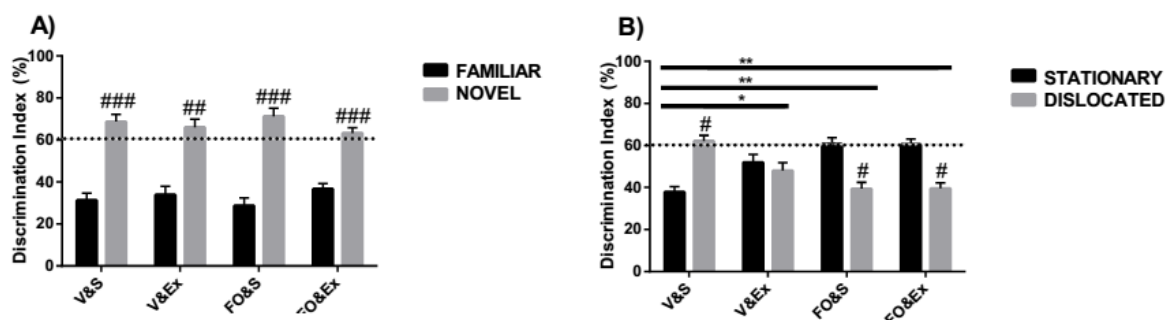


FIGURA 3. Figura do artigo “Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus” (APÊNDICE A). Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua identidade (A) e localização espacial (B), em animais sobre diferentes condições experimentais. * $p<0,05$ ou ** $p<0,001$ indica diferenças significantes intergrupo (ANOVA two-way seguida do teste *a posteriori* Tukey), V&S *versus* OP&S, V&S *versus* V&E and V&S *versus* OP&Ex; # $p<0,001$, ## $p=0,001$ ou ### $p<0,0001$ indica diferenças significativas intragrupo (teste “t” Student pareado) V&S: sedentário suplementado com solução veículo; V&E: exercitado suplementado com solução veículo; OP&S: sedentário suplementado com óleo de peixe; OP&E: exercitado suplementado com óleo de peixe.

7.4. Registro eletrofisiológico

Na avaliação eletrofisiológica dos efeitos da suplementação com óleo de peixe e exercício físico, utilizando o fenômeno da DAC, a figura 4(A), representa de forma esquemática o registro eletrofisiológico. Na análise estatística intergrupo, demonstrou que a associação da suplementação com óleo de peixe e o exercício físico foi capaz de diminuir a velocidade de propagação do fenômeno da DAC tanto em relação aos animais apenas suplementados (OP&E, $2,65\pm0,2$ *versus* OP&S, $3,23\pm0,3$, $p<0,001$ ANOVA de duas vias) e os animais controles (OP&E, $2,65\pm0,2$ *versus* V&S, $3,21\pm0,2$, $p<0,001$ ANOVA de duas vias, V&Ex, $3,06\pm0,2$), como apresentado na figura 4 (B).

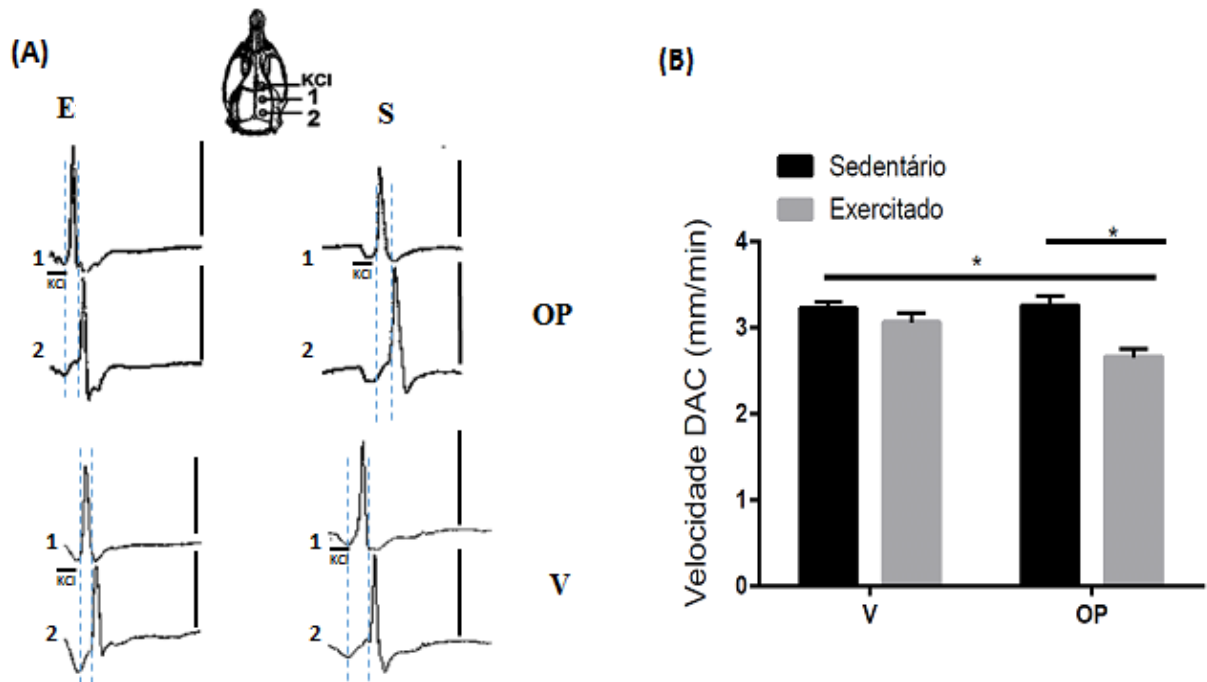


FIGURA 4. (A) Figura do crânio de roedor adaptada de Francisco & Guedes (2015) representando os três orifícios na superfície ventral do animal sendo o anterior para estímulo com KCl e os dois parietais posteriores para os registros eletrofisiológico; abaixo, as barras verticais correspondem a 10 mV (alteração negativa de voltagem). Na DAC foi realizado estímulo químico no córtex frontal com KCl a 2% durante 1 minuto, como indicado pelas barras horizontais. As linhas tracejadas verticais indicam a latência para uma onda da DAC atravessar a distância entre os eletrodos. As variações de lenta voltagem (VLV) registradas nos pontos 1 e 2 em quatro animais, sendo um de cada grupo experimental: a esquerda VLVs de animais exercitados (E) e a direita de animais sedentários (S), suplementados com óleo de peixe (OP) ou veículo (V); (B) Velocidade de propagação da DAC (mm/s). Valores expressos em média $\pm$ DP. ANOVA de duas vias, seguido do teste “post hoc” Tukey’s) mostrou diferenças significativas entre os grupos (* $p < 0,001$).

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado os efeitos da suplementação com óleo de peixe (OP) em uma dose diária de 85 mg/kg/dia concomitante ao exercício físico em esteira durante 4 semanas, dos 15 aos 45 dias de vidas de ratos jovens *Wistar*.

Durante o período de realização do protocolo de exercício físico, que ocorreu na fase considerada de crescimento rápido e desenvolvimento, o peso corporal e o índice de massa corpórea (IMC) foram realizados para determinar se o exercício influenciaria o estado nutricional do animal e poderia, assim, influenciar o crescimento normal. Como demonstrado, o protocolo de exercício combinado com a suplementação de OP durante todo o período do estudo, não modulou de forma negativa a evolução ponderal e demais parâmetros murinométricos.

Recentemente, PEDROZA et al. (2015) também demonstraram que ratos machos *Wistar* adultos e idosos, quando submetidos ao mesmo protocolo de suplementação e exercício físico utilizado no presente estudo, não apresentaram alterações significativa sobre peso corporal, IMC e razão CA/CT, porém, neste mesmo estudo também foi observado um aumento do peso do coração nos animais suplementados e exercitados comparado com os animais apenas suplementados.

Para este parâmetro, nos dados obtidos neste trabalho, não foram encontradas alterações significativas, possivelmente devido ao protocolo de exercício físico utilizado. Porém dados presentes na literatura sugerem que o exercício a longo prazo possa induzir uma diminuição da razão peso do coração/peso corporal devido a uma diminuição do peso corporal (RADOVITS et al., 2013).

No que se refere à ansiedade, foi observado que o exercício tem ação ansiolítica, ao comparar os resultados de animais exercitados com seus respectivos controles. Nesse caso devido ao aumento do número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Como descrito na literatura, o percentual de tempo e a frequência de entrada nos braços abertos no LCE são considerados índices do nível de ansiedade em animais (FEDEROVA & JR, 2006). De forma semelhante, FULK et al. (2004) também observaram efeitos ansiolíticos associados a um protocolo de exercício físico crônico e de intensidade moderada, com maior percentual de entradas nos braços abertos e tempo na área central durante o LCE.

Curiosamente, em estudo realizado com objetivo de avaliar os efeitos de um protocolo de exercício a curto prazo (4 dias) sobre o comportamento ansioso no LCE, não demonstrou efeitos ansiolíticos relacionado ao exercício a curto prazo (CHAOULOFF, 1994).

No que se refere aos efeitos dos ácidos graxos dietéticos sobre os níveis de ansiedade avaliados através do LCE, esses efeitos têm sido relacionados à sua deficiência, demonstrando maior frequência de entradas e maior tempo gasto nos braços fechados em camundongos deficientes em ácidos graxos poli-insaturados do tipo ω -3 (NAKASHIMA et al., 1993; FRANCES et al., 1995; CARRIE et al., 2000). No entanto, os animais deficientes em ácidos graxos poli-insaturados do tipo ω -3, quando suplementados por um curto período (1 semana) apresentavam uma melhora significativa da ansiedade em termos de entrada nos braços abertos (TAKEUCHI et al., 2003). Acredita-se ainda, que esses achados possam ser também influenciados pelas diferentes condições experimentais (FEDEROVA & JR, 2006).

Outro teste utilizado neste estudo com o objetivo de avaliar o estado de ansiedade foi o teste do campo aberto (TCA). Porém, os parâmetros avaliados não demonstraram alteração significativa em relação à ansiedade. Neste teste, os baixos níveis de exploração, aumento do “freezing” e número de bolo fecal são comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto que o aumento da atividade exploratória, como por exemplo, o tempo na área central e o comportamento de “levantar” do animal são considerados características de níveis reduzidos de ansiedade (ROYCE, 1977; WALSH & CUMMINS, 1976). Da mesma forma que o observado no LCE, o exercício físico em esteira com intensidade moderada também parece promover efeitos ansiolíticos durante o TCA (FULK et al., 2006).

A associação da suplementação com OP e exercício em esteira também tem sido associada à melhora do desempenho de ratos submetidos a diferentes tarefas relacionadas à memória (RACHETTI et al., 2013). Estes mesmos autores observaram que ratos suplementados com uma dose diária de 85 mg/Kg de óleo de peixe apresentaram efeitos positivos contra déficits de memória quando submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos.

Similarmente, os animais suplementados e exercitados avaliados no presente estudo, apresentaram memória preservada a julgar pelos índices de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos em relação à sua forma. Por outro lado, o mesmo não foi observado nos animais suplementados com óleo de peixe avaliados através da tarefa de reconhecimento de objetos quanto à sua localização.

Estes dados corroboram os achados descritos na literatura, onde se observa que os efeitos da suplementação com óleo de peixe e exercício físico sobre a memória dependem do tipo de tarefa empregada (RACHETTI et al., 2013).

Na literatura há diversos relatos demonstrando uma forte e influente relação entre a intervenção dietética com os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, o exercício e o funcionamento do cérebro (MURPHY et al., 2014).

Sobre a eletrofisiologia cerebral, estudada através do fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC), diversas condições podem interferir no aumento ou diminuição da velocidade de propagação do fenômeno. No presente estudo, a suplementação do óleo de peixe potencializou os efeitos do exercício sobre a redução do grau de excitabilidade do tecido à passagem do fenômeno da DAC.

Os efeitos de ácidos graxos essenciais sobre a eletrofisiologia cerebral foram descritos por BORBA et al. (2010) demonstrando que a deficiência crônica de ácidos graxos essenciais reduziu a suscetibilidade à DAC, a julgar pelas baixas velocidades de propagação. Diante desses efeitos da deficiência de ácidos graxos insaturados é possível supor que a suplementação de forma isolada, poderia agir de forma contrária aos efeitos observados sobre a redução da DAC, porém o mesmo não foi observado diante do protocolo de suplementação utilizado no presente estudo.

Em condições consideradas fisiológicas, acredita-se que os PUFA tenham efeitos diretos sobre o sistema glutamatérgico e que poderia induzir uma hiperexcitabilidade neuronal (MILLER et al., 1992; NISHIKAWA et al., 1994). Da mesma forma que a DAC é um fenômeno relacionado à excitabilidade cerebral, é importante destacar que os efeitos do exercício físico regular por sua vez, relacionados à melhoria dos processos de aprendizagem, potenciação à longo prazo e memória, estão intrinsicamente ligados a excitabilidade cerebral (RADAK et al., 2001; OGONOVSKY et al., 2005; PASSECKER et al., 2011).

Adicionalmente, respostas comportamentais (envolvendo ansiedade) têm sido diretamente relacionados à incidência da DAC (DELPRATO, 1965; BOGDANOV et al., 2013). Nesse sentido, os animais estudados nesse protocolo, quando exercitados, apresentaram um comportamento ansiolítico significativo em relação aos controles, bem como houve uma redução da velocidade de propagação da DAC, quando o exercício foi associado à suplementação com óleo de peixe.

Diante do exposto, é possível supor que a suplementação do óleo de peixe e/ou exercício físico em esteira no início da vida apresenta efeitos comportamentais, relacionados à ansiedade e memória, e sobre a eletrofisiologia cerebral.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que a suplementação com o óleo de peixe e o exercício físico no início da vida, período considerado crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso, não modula de forma negativa parâmetros murinométricos, porém é necessário ter cautela quanto ao uso dessas estratégias no que se refere às ações em nível comportamental e neural.

É importante destacar que este trabalho vem a preencher algumas lacunas de interesse da comunidade científica, quanto aos efeitos da associação dessas estratégias no início da vida sobre aspectos orgânicos diferentes.

Apesar de preenchermos de maneira pioneira algumas lacunas, conforme supracitado há necessidade de se compreender melhor a relação entre: (1) a dose e volume da suplementação com óleo de peixe, (2) a associação entre óleo de peixe e exercício físico moderado, e (3), sobretudo o período apropriado para se observar os efeitos dessa associação.

A realização deste trabalho permitiu ainda a elaboração do artigo “Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus” submetido ao periódico “Journal of Nutritional Biochemistry” conforme objetivo proposto pela presente dissertação, bem como a elaboração do artigo “Treadmill exercise and Fish oil supplementation during development: A study of cardiac oxidative metabolism.” submetido ao periódico “Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism” em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela professora Cláudia Jacques Lagranha.

REFERÊNCIAS

- AKKERMAN, S. PRICKAERTS, J., STEINBUSCH, H. W. M., BLOKLAND, A. Object recognition testing: statistical considerations. **Behavioral Brain Research**. v. 232 (2), p. 317-22, 2012.
- BATHIA, H. S.; AGRAWAL, R.; SHARMA, S.; HUO, Y. X.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Omega-3 Fatty Acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 28451, 2011.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; GUEDES, R. C. A. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**. v. 6, n. 47, p. 452-457, 2012.
- BOGDANOV, V. B.; BOGDANOVA, O. V.; KOULCHITSKY, S. V.; CHAUVEL, V.; MULTON, S.; MAKARCHUK, M. Y.; BRENNAN, K. C.; RENSHAW, P. F.; SCHOENEN, J. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 236, p. 90-93, 2013.
- BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; PEREIRA DA SILVA, R.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 3, 2010.
- BOURRE, J. M. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful? **Journal of Nutrition Health Aging**. v. 9, n. 4, p. 232-242, 2005.
- BRENNA, J. T. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. **Maternal and Child Nutrition**. v. 7, p. 59-79, 2011.
- BURES, J.; BURESOVA, O.; KRIVANEK, J. The Mechanism and Applications of Leao's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity. **Journal of Neurobiology**. v. 6, n. 6, p. 619, 1974.
- BURGHARDT, P. R. et al. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. **Brain Research**. n. 1019, p. 84-96, 2004.
- CARRIE, I.; GUESNET, P.; BOURRE, M.; FRANCES, H. J. Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behavior differently during development than aging in mice. **British Journal of Nutrition**. v. 83, p. 439-447, 2000.
- CHAOULOFF, F. Influence of physical exercise on 5-HT1A receptor- and anxiety-related behaviours. **Neuroscience Letters**. n. 176, p. 226-230, 1994.
- CHEN, H. F.; SU, H. U. Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, n. 1, p. 70-80, 2013.

CHYTROVA, G.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. **Brain Research**. v. 23, p. 32-40, 2010.

CORRIGAN, P. W. The impact of stigma on severe mental illness. **Cognitive and Behavioral Practice**. v. 5, p. 201-222, 1998.

DELPRATO, D. J. Note on the effect of cortical spreading depression on open-field behavior. **Psychological Reports**. v. 17, p. 714, 1965.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DA SILVA, M. A. S. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols**. v. 16, n. 1-3, p. 10-19, 2005.

DIK, M.; DEEG, D. J.; VISSER, M.; JONKER, C. Early life physical activity and cognition at old age. **Journal Clinical Experimental Neuropsychology**. v. 25, n. 5, p. 643-653, 2003.

DING, Y. H.; LI, J.; YAO, W. X.; RAFOLS, J. A.; CLARK, J. C.; DING, Y. Exercise preconditioning upregulates cerebral integrins and enhances cerebrovascular integrity in ischemic rats. **Acta Neuropathology**. v. 112, n. 1, p. 74-84, 2006.

DISHMAN, R. K. Physical activity and mental health. **Encyclopedia of Mental Health**. v. 3, p. 171-188, 1998.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: lipids, malnutrition & the developing brain. **Applied Neurochemistry**. p. 287-316, 1968.

DREIER, J.P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nature Medicine**. v. 17, n. 4, p. 439-447, 2011.

DUBNAU, J.; CHIANG, A. S.; TULLY, T. Neural Substrates of Memory: From Synapse to System. **Journal of Neurobiology**. v. 54, n. 1, p. 238-253, 2003.

DURING, M. J.; CAO, L. VEGF a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. **Current Alzheimer Research**. v. 3, n. 1, p. 29-33, 2006.

ENGSTRÖM, K.; SALDEEN, A. S.; YANG, B.; MEHTA, J. L.; SALDEEN, T. Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. **Uppsala Journal of Medical Sciences**. V. 114, p. 206-213, 2009.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research**. v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

FABRICIUS, M.; FUHR, S.; WILLUMSEN, L.; DREIER, J.P.; BHATIA, R.; BOUTELLE, M.G.; HARTINGS, J.A.; BULLOCK, R.; STRONG, A.J.; LAURITZEN, M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clinical Neurophysiology**. v. 119, n. 9, p. 1973-1984, 2008.

FEDOROVA, I.; JR, N. S. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 75, n. 4-5, p. 271-289, 2006.

FERRAZ, A. C. et al. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 1, p. 116–122, 2011.

FRANCES, H.; MONIER, C; BOURRE; M. J. Effects of dietary α -linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. **Life Science**. v. 57, p. 1935-1947, 1995.

FRANCISCO, E. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**. v. 47, n. 11, p. 2437-2445, 2015.

FULK, L. J.; STOCK, H. S.; LYNN, A.; MARSHALL, J.; WILSON, M. A.; HAND, G. A. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. **International Journal of Sports Medicine**. v. 1, n.25, p. 78-82, 2004.

GERMANO, P. C. P. S.; SILVA, D. L.; SOARES, G. S. F.; SANTOS, A. M.; GUEDES, R. C. A. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**. v. 16, n. 6, p. 275-281, 2013.

GOMEZ-PINILLA, F. The impact of diet and exercise on brain plasticity and disease. **Nutrition Health**. v. 18, n. 3, p. 261-268, 2006.

GOMEZ-PINILLA, F.; TYAGI, E. Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuronal plasticity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 16, n. 6, p. 726-733, 2013.

GOMEZ-PINILLA, F.; YING, Z. Differential effects of exercise and dietary docosahexaenoic acid on molecular systems associated with control of allostasis in the hypothalamus and hippocampus. **Neuroscience**. v. 168, n. 1, p. 130-137, 2010.

GORJI, A.; SPECKMANN, E. J. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. **European Journal of Neuroscience**. v. 19, n. 12, p. 3371-3374, 2004.

GUEDES R. C. A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: "Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field, Liebermann, H., Kanarek, T. and Prasad, C (eds.), CRC Press, New York. **Nutrition, Brain and Behavior Series**, v. 3, cap. 4, p. 39-54, 2005.

GUEDES, R. C. A.; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 25, n. 4, p. 393-397, 1992.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacology**. v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HASHIMOTO, M.; MAEKAWA, M; KATAKURA, M; HAMAZAKI, K; MATSUOKA Y. Possibility of Polyunsaturated Fatty Acids for the Prevention and Treatment of Neuropsychiatric Illnesses. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 124, n. 3, p. 294- 300, 2014.

LAMPTEY, M. S.; WALKER, B. L. Physical and neurological development of the progeny of female rats fed on essential fatty acid-deficient diet during pregnancy and/or lactation. **Journal of Nutrition**. v. 108, n. 3, p. 351-357, 1978.

LEÃO, A. A. P. Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**. v. 10, n. 6, p. 409-14, 1947.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal Neurophysiol**, v. 7, p. 359-390, 1944.

LONG, B. C.; VAN STAVEL, R. Effects or exercise training anxiety. **Journal of Applied Sport Psychology**. v. 7, p. 167-189, 1995.

LONG, S. J.; BENTON, D. A double-blind trial of the effect of docosahexaenoic acid and vitamin and mineral supplementation on aggression, impulsivity, and stress. **Human psychopharmacology**. v. 28, n. 3, p. 238-247, 2013.

LUCAS, S.J.; AINSLIE, P. N.; MURRELL, C. J.; THOMAS, K. N.; FRANZ, E. A.; COTTER, J. D. Effect of age on exercise-induced alterations in cognitive executive function: Relationship to cerebral perfusion. **Experiemental Gerontology**. v. 8, n. 47, p. 541-51, 2012.

MELLO, P. B. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. v. 80, n. 2, p. 301-309, 2008.

MESSERI, G. P.; OLIVERIO, A.; PAOLETTI, R.; GALLI, C. Deficiency of essential fatty acids during pregnancy and avoidance learning in the progeny. **Pharmacological Research Communications**. V. 7, p. 71-80, 1975.

MILLER, B; SARANTIS, M.; TRAYNELIS, S. F., ATTWELL, D. Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. **Nature**. v. 355, p. 722-725, 1992.

MIZUNOYA, W. Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 165, 2013.

MORGANE P. J. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience Biobehavioral Review**. v. 17, n. 1, p. 91- 128, 1993.

MURPHY, T.; DIAS, G.P.; THURET, S. Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies: Mind the Gap. **Neural Plasticity**. v. 2014, p. 32, 2014.

NAKASHIMA, Y; YUASA, S; HUKAMIZU, Y.; OKUYAMA, H.; OHHARA, T.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Effect of a high linoleate and a high α -linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice. **Journal of Lipid Research**. v. 34, p. 239-247, 1993.

NICULESCU, M. D.; LUPU, D. S.; CRACIUNESCU, C. N. Maternal α -linolenic acid availability during gestation and lactation alters the postnatal hippocampal development in the mouse offspring. **International Journal Developmental Neuroscience**. v. 29, n. 8, p. 795-802, 2011.

NISHIKAMA, M.; KIMURA, S.; AKAIKE, N. Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurones of rat cerebral cortex. **The Journal of Physiology**. v. 475, n. 1, p. 83-93, 1994.

NOVELLI, E. L.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M. X.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOONA, A. C.; NOVELLI-FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111-9, 2007.

NYBERG, J.; ABERG, M. A.; TORÉN, K.; NILSSON, M.; BEN-MENACHEM, E.; KUHN, H. G. Cardiovascular fitness and later risk of epilepsy: a Swedish population-based cohort study. **Neurology**. v.81, n. 12, p. 1051-1057, 2013.

O'CALLAGHAN, R. M.; OHLE, R.; KELLY, A. M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behavioral Brain Research**. v. 176, n. 2, p. 362-366, 2007.

OGONOVSKY, H.; BERKES, I.; KUMAGAI, S.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; GOTO, S.; RADÁK, Z. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochemistry International**. v. 46, n. 8, p. 635-640, 2005.

PASSECKER, J.; HOK, V.; DELLA-CHIESA, A.; CHAH, E.; O'MARA, S.M. Dissociation of dorsal hippocampal regional activation under the influence of stress in freely behaving rats. **Behavioral Neuroscience**. v. 66, n. 5, p. 1-7, 2011.

PEDROZA, A. A. S.; LOPES, A.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; BRAZ, R. B.; FERREIRA, D. F.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; BATISTA-DE-OLIVEIRA-HORNSBY, M.; LAGRANHA, C. J. Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? **Life Sciences**. v. 137, p. 133-141, 2015.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PERINI, J. A. L. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**. v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PLATEL, A.P., PORSOLT, R.D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. **Psychopharmacology**. v. 78, p. 7, 1982.

RACHETTI, A. L. F.; ARIDA, R. M.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. A.; FERNANDES-SANTOS, L.; FRUSSA-FILHO, R.; GOMES DA SILVA, S.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**. v. 237, p. 283-289, 2013.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochemistry International**. v. 38, n. 4, p. 17-23, 2001.

RADOVITS, T.; OLÁH, A.; LUX, A.; NÉMETH, B. T.; HIDI, L.; BIRTALAN, E.; KELLERMAYER, D.; MÁTYÁS, C.; SZABÓ, G.; MERKELY, B. Rat model of exercise-

induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. **American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology**. v. 305, n. 1, p. 124-134, 2013.

RAVIDRAN, A. V.; SILVA, T. L. Complementary and alternative therapies as add-on to pharmacotherapy for mood and anxiety disorders: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**. v. 150, n. 3, p. 707-719, 2013.

ROYCE, J. T. On the construct validity of open field measures. **Psychological Bulletin**. v. 84, p. 1098-1106, 1977.

SCOPEL, D. et al. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**, v. 71, n. 1-3, p. 155-159, 2006.

TAKEUCHI, T.; IWANAGA, M.; HARADA, E. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. **Brain Research**. v. 964, p. 136-143, 2003.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, n. 23, p. 13427–13431, 1999.

VINES, A.; DELATTRE, A. M.; LIMA, M. M.; RODRIGUES, L. S.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R. B.; TUFIK, S.; PEREIRA, S. I.; ZANATA, S. M.; FERRAZ, A. C. The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**. v. 62, n. 1, p. 184-191, 2012.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83, p. 482-504, 1976.

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

WU, A.; YING, Z.; PINILLA, F. G. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 10, p. 1457-1467, 2004.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; MOSTOFSKY, D. I. Essential fatty acids and the brain: From infancy to aging. **Neurobiology of Aging**. v. 26, n. 1, p. 98-102, 2005.

APÊNDICE A

Artigo original submetido ao periódico “Journal of Nutritional Biochemistry”.

From: **Journal of Nutritional Biochemistry** <jnb@uky.edu>

Date: 2016-03-08 17:08 GMT-03:00

Subject: Journal of Nutritional Biochemistry: Submission Confirmation

To: batistadeoliveiram@gmail.com, manuella.oliveira@ufpe.br

Title: Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus

Corresponding Author: Prof. Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby

Authors: Patricia F Macêdo; Janatar S Melo; Laís A Costa; Glauber R Braz; Shirley M Sousa; Claudia J Lagranha;

Dear Prof. Batista-de-Oliveira Hornsby,

Thank you for submitting your manuscript which has been received by the Editorial Office of the Journal of Nutritional Biochemistry. Each manuscript is internally reviewed and prioritized before a full external peer review takes place.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for the Journal of Nutritional Biochemistry as an author:

<http://ees.elsevier.com/jnb/>

Your username is: *****

If you need to retrieve password details, please go

to: http://ees.elsevier.com/jnb/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference. Please let me know if there are any questions or concerns, and thank you for your submission

Sincerely,

Joseph R. Richardson

Editorial Manager

The Journal of Nutritional Biochemistry

Bernhard Hennig, Editor-in-Chief

Title: Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus

Patrícia Fortes Cavalcanti de Macêdo^{a*}; Janatar Stella Vasconcelos de Melo^{a*}; Laís Alves Ribeiro Costa^a; Glauber Rudá F. Braz^b, Shirley M. de Sousa^b; Cláudia J. Lagranha^{b*}; Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby^{a*#}

^a Department of Nutrition / CCS. Federal University of Pernambuco. *Campus* of Recife. Recife – PE, Brazil.

^b Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry. Federal University of Pernambuco. *Campus* of Vitoria de Santo Antao. Vitoria de Santo Antao – PE, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding author

Mailing addresses:

Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby

Avenida Prof. Moraes Rego, s/n – CEP 50670-901 – Departamento de Nutrição – Cidade Universitaria – Recife, PE – Brazil.

E-mail: batistadeoliveiram@gmail.com

Abstract

There is a high interest to better understand how lifestyle choices can improve memory functions. Exercise (Ex) and long-chain n–3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) found in fish oil (Fo) are able to reduce inflammation, to stimulate hippocampal antioxidant defenses, and to improve memory. The aim of this study is to test whether (Fo) and treadmill (Ex) can improve the rat performance on memory tasks and optimize hippocampal antioxidant state in an age-dependent manner. Therefore, young and adults *Wistar* rats were exercised and received (Fo) during 4 weeks. Afterwards episodic memory was measured by the recognition of object identity and spatial location tests, and hippocampal oxidative state was investigated with the levels of malondialdehyde (MDA), carbonyls content, antioxidant enzymatic activity (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)), and antioxidant non enzymatic activity (reduced glutathione (GSH) and sulfhydryl content). Data show that (Fo&Ex) adult rats were able to recognize objects shape and placement, however (Fo&Ex) young rats had impaired spatial recognition ($p<0.05$). (Fo&Ex) young rats did not have reduced MDA or protein content, though, either (Fo) or (Ex) reduced MDA ($p<0.05$) and carbonyl levels ($p<0.01$). (Ex) increased SOD ($p<0.001$) and CAT activities ($p<0.05$), and (Fo) enhanced SOD activity ($p<0.05$). At adulthood, (Ex) increased MDA levels ($p<0.05$), and (Fo&Ex) reduced MDA ($p<0.001$). Lastly, (Ex) and (Fo) improved non-enzymatic antioxidant defense ($p<0.05$) only in adult rats. Results support an age-dependent effects of the (Fo) and (Ex) on memory functions and oxidative state of the hippocampus during either neurodevelopment or adulthood.

Keywords: fish oil, EPA, DHA, treadmill exercise, object recognition, hippocampal oxidative stress.

Chemical compounds studied in this article

Eicosapentaenoic acid (PubChem CID 446284); Docosahexaenoic acid (PubChem CID: 445580); Malondialdehyde (PubChem CID: 10964); Reduced glutathione (PubChem CID: 7048684);

1. Introduction

Memory disorders are associated to the malfunctioning of neuroanatomical structures that are related to the storage, retention and recollection of memories. The prevalence and complications of memory disorders such as Alzheimer's disease, Dementia and Parkinson's disease represent a worldwide problem. Despite the ongoing research, underlying mechanisms and preventive lifestyle choices related to these neurodegenerative diseases are still unclear.

Therefore, there is a growing interest to better understand how lifestyle choices and their underlying mechanisms can improve cognition, memory and brain function to benefit neurodevelopment, and to prevent or counteract neurodegenerative diseases [1, 2]. The object recognition task is based on the natural curiosity towards novelty, the test is one-trial learning task, that allows to separately analyze different memory processes, such as acquisition, consolidation and retrieval [3]. This one-trial task has proven to be very useful and suitable for accessing memory functions, and for studying the neurobiology of memory [4, 5].

Studies in humans [2, 6, 7] and animals [2, 8, 9] suggest that the effects of long chain omega-3 (n-3) fatty acids and physical exercise can act on cognition and improve brain function. Since the consumption of (n-3) PUFA and exercise can be simultaneously present in daily life, the association between them could indicate that their effects on the brain are complementary [10].

From early fetal life to adulthood, the adequate nutrition is an essential requirement for morphogenesis of the brain, during this initial *period*, PUFAs play an important role [11]. The n-3 consumption can benefits brain's health, these benefits have been investigated by experimental and epidemiologic studies. Specific features caused by n-3 consumption are associated to hippocampal BDNF elevation, stimulation of mitochondrial function and reduced oxidative stress [12].

Experimental designs have been focused on the use of different sources of fish oil supplementation on injury situations and their effects to minimize oxidative stress in aged mice [13], as well as in young rats [14]. Furthermore, beneficial properties of fish oil can be extended to a better performance of memory tests in animal models of Alzheimer's disease [15] and brain injury [16].

Fish oil intake can lead to differential effects if the animal was exposed to an early life stress. For example, when adult rats were previously submitted to maternal separation, n-3 PUFAs had little benefit in those animals that were exposed to the early life stress, on the other hand, the benefits were seen in the neurodevelopment of normal animals [17].

Furthermore, exercise can be useful for both maintaining health and in specific pathological conditions. In animal studies, exercise can improve cognitive function depending on which life stage the animal was submitted to the exercise routine [6], [8]. The underlying mechanisms demonstrated beneficial effects such as preventing oxidative stress in brain regions of adolescent [18] and aging rats [19].

Considering the association between two interventions, n-3 supplementation and physical exercise improved cognitive function of healthy animals [9]. Interestingly, the effect was observed in a long-lasting manner since it was seen in early life stages as well as at adulthood. It is also known that beneficial effects provided by the association between fish oil supplementation and exercise are characterized by enhanced antioxidant defenses that can prevent deleterious effects of aging [20]. However, there is an age-dependent effect for the fish oil intake and physical exercise, depending on the life stage, effects of fish oil supplementation or exercise can be contradictory [2, 17, 21].

Notwithstanding, evidence show beneficial effects for the use of fish oil coupled with exercise on oxidative stress and memory, there is still a lack of information about the appropriate timings to maximize results of this therapeutic approach, as well as the underlying

mechanisms for these effects are still unclear. Therefore, we aimed to investigate whether the daily supplementation with fish oil coupled with moderate treadmill exercise in both young and adult rats would influence memory and hippocampal oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1 Animals and experimental design

Wistar rats were used from the colony of the Nutrition Department at the Federal University of Pernambuco (Brazil). The experimental design followed the recommendations of the Ethics Committee for Research on Animals (23076.027072/2014-20). These recommendations were in accordance to the "Principles of Laboratory Animal Care" (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Every effort has been made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals per group.

The animals were randomly distributed, 24 hours after birth, in 9 rats per litter. They were kept in a room with a temperature of 23 ± 1 ° C and raised in a 12h light / dark cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm). After weaning, 21 days-old animals were divided into cages with 3-4 rats with free access to water and food - standard diet of pellets laboratory (Presence of Brazil Ltd, Present, São Paulo, Brazil) with 23% of protein.

Either 15, or 90 days-old rats were randomly assigned into 4 different experimental groups: (1) supplemented with fish oil and exercised (Fo&Ex, n=12 (young) and n = 11 (adult rats)); (2) supplemented with fish oil and sedentary (Fo&S, n= 12 (young) and n = 11 (adult rats)); (3) supplemented with vehicle solution and exercised (V&Ex, n= 12 (young) and n = 11 (adult rats)) (4) supplemented with vehicle solution and sedentary (V&S, n=12 (young) and n = 11 (adult rats)). The trial period was 4 weeks.

2.2 Supplementation with fish oil

The daily supplementation was performed by gavage. Rats received a single daily dose of fish oil (Fo, 85mg/kg/d and 1ml/250g/d) or vehicle solution (V, 1 ml/250g/d) as adapted from [9, 20]. The capsules of fish oil (Sundown®) containing polyunsaturated fatty acids [docosahexaenoic (DHA; 85mg/1g) and eicosapentaenoic (EPA; 128mg/1g)] were dissolved in Cremophor (Sigma ®) 0.009% then in distilled water and administered via gavage. To perform the control group, a vehicle solution (V) was given with the same amount of Cremophor and distilled water that were used to prepare the solution provided to supplement the fish oil.

2.3 Treadmill exercise

All exercised rats were placed on the treadmill (Insight EP-131, 0° inclination) following parameters of moderate exercise that were adapted from previous studies [21]. Briefly, animals were placed 30min/day on the treadmill and the speed was increased as it follows: 5m/min (first week); 10 m/min (second week) and 15m/min (third and fourth weeks). The rats in the sedentary group (S) were placed at same time in the apparatus but it remained off.

The treadmill exercise lasted 4 weeks, it was performed at the same timeframe of the supplementation with fish oil. Therefore, either from 15 to 45 or 90 to 120 days old, rats were submitted to the treadmill and supplementation to perform the experimental groups with young and adult animals, respectively.

2.4 Behavioral analysis

All the behavioral tests were assessed individually at either 46 or 121 days old to perform the young and adult groups, respectively. Detailed protocols and the rationale for the test choices provided are discussed elsewhere [5, 22, 23]. Briefly, the experiment consisted of a paradigm that utilizes the natural tendency of rodents to discriminate between a familiar and a novel object, or a novel location, spending more time in exploring the novel objects, or locations, as compared to the familiar ones.

In the present study, two experiments were designed to test the novelty recognition paradigm, regarding the object's novel shape or location. These experiments consist of three days. In the **first day**, the rats were placed during five minutes in the open field apparatus to explore and familiarize itself with the experiment's environment. The apparatus consisted of a circular arena with brown walls and an opened top. The floor of the arena is divided into 17 fields which are separated by black lines. In this arena, there are three concentric circles, and it was located in a sound-attenuated room, with reduced lighting.

24 and 48 hours later, in the **second and third days**, each rat was returned to the circular arena, which now contained two equal objects, made of clear glass. These objects were explored by each rat during five minutes, and this constituted the trial session. After a fifty-min interval, the animal returned to the arena to perform a five-min test session, in which the capability of the rats to recognize novel object's shape or novel object's location (dislocated object) was tested in the second and third day, respectively. Each experiment was recorded by a camera installed in the room roof. The files were analyzed with the ANY-Maze Software (version 4.99 m) by two previously trained observers, who were "blinded" regarding the previous treatment of the animal. The videos were analyzed to assess the time spent by the rat to explore each object. The criteria to define the time spent by the rats were based on the "active exploration", when rats were touching the objects with the vibrissae, snout or forepaws, as previous published [22, 23]. In the trial session, the preference ratio was

calculated for each animal as being the time spent by the rat in exploring each object/total exploration time. The trial sessions ensured that rats employed equal time in exploring each of the two objects, and therefore there was no preference for one of them. Rats that presented in the trial session a ratio near 0.5, indicating equal exploration of the two objects, were eligible to realize the test session; otherwise they were discarded.

In each test session, the rats were expected to recognize the familiar object or the familiar (stationary) position previously presented (in the trial session). The preference ratios for the familiar and for the novel shape or position (dislocated) were also calculated for these animals, which would be expected to spend more time actively exploring the objects representing novel shape or dislocated position in the arena.

The performance was represented by a ***discrimination index*** (%) which consisted of the exploration time for each analyzed criteria (familiar *versus* novel shape and stationary *versus* dislocated position), expressed as a percentage of the total time of exploration. This paradigm does not involve the learning of any rule, since it is entirely based on the spontaneous exploratory behavior of rats towards objects [5]. The objects were devoid of any ethological meaning, they had never been paired as a reinforce, and were heavy enough to prevent being moved by the animal. Because the objects were made with the same material, the rats could not distinguish them by olfactory cues during the trial session. After each session, the objects and the apparatus were thoroughly cleaned with 70% ethanol solution.

2.5 Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (Sinc Pernambuco, Brazil).

2.6 Oxidative Stress Biomarkers

2.6.1 Sample preparation for oxidative stress and antioxidant analyses

Hippocampus from young and adult rats were homogenized in 50 mM-TRIS and 1mM-EDTA (pH 7.4), with the addition of 1 mM-sodium orthovanadate and 200µg/mL phenylmethanesulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at 4000 RPM for 10 min at 4°C and the protein supernatant used for biochemical analyses after the protein content had been quantified by Bradford method [24] .

2.6.2 Evaluation of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated using malondialdehyde (MDA) levels as previously published [25]. Three hundred µg protein was sequentially mixed to 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM-TRIS buffer (pH 7.4). This mixture was centrifuged at 2500g for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment yielded then was measured at 535 nm absorption at RT and expressed as nmol/mg protein.

2.6.3 Evaluation of Protein Oxidation

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer (1994)[26]. With the samples on ice, 30% (w/v) TCA was added to the sample and then centrifuged for 14 min at 4000 RPM. The pellet was suspended in 10 mM 2,4dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark room for 1h with shake turned on each 15min. Then the samples were washed and centrifuged three times in an ethyl/acetate buffer and then final pellet was suspended in 6M guanidine hydrochloride, incubated for 30 min at 37°C and the absorbance read at 370nm. The results were expressed as □M/mg protein.

2.6.4 Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity

SOD determination was performed in accordance with the protocol developed by Misra and Fridovich (1972)[27]. In brief, 300 µg protein were added to 0.05 M-Carbonate buffer with 0.1 mM-EDTA (pH 10.2). The reaction was started with 150mM-epinephrine and the SOD activity was determined by adrenaline auto-oxidation inhibition at 30°C. The decrease in absorbance was followed for 1.5 min at 480 nm and the results expressed as U/mg protein [27].

2.6.5 Measurement of Catalase (CAT) activity

The CAT activity was performed as previously described by Aebi (1984)[28]. Briefly, 0.3 M-hydrogen peroxide and 300 µg protein were added to a 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0) at 20° C and the absorption decay was monitored for 3 min at 240nm with the results expressed as U/mg protein [28].

2.6.6 Measurement of Glutathione-S-transferase (GST) activity

GST activity was measured as described previously by Habig, Pabst (1974) [29]. Two hundred µg of protein was incubated in a 0.1 M-phosphate buffer (pH 6.5) containing 1mM-EDTA at 30° C and had the assay started with the addition of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM-GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored through the absorbance at 340 nm. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 µmol-2,4-dinitrophenyl-S-glutathione [30].

2.6.7 Measurement of reduced glutathione (GSH)

To assess GSH levels, the samples were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM-EDTA (pH 8.0). Then, an aliquot from the diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde at room temperature for exactly 15 min. Fluorescence intensities measured at 420 nm and excitation at 350 nm were compared with a standard curve of known concentrations of GSH (0.5-10 mM) as previously described [31].

2.6.8 Sulfhydryl content

To evaluate the levels of sulfhydryl we based the assay on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) that absorb at 412 nm in spectrophotometry [32]. Briefly, at TRIS buffer, pH7.4, 0.450 mg of homogenate was added in addition to 1 mM DTNB. This mix was incubated 30 min at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as mmol TNB/mg protein.

2.7 Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ the standard error of the mean (SEM). A two-way ANOVA test was performed to assess significant differences between the groups. The tests of significance were recommended based on the results of the tests of normality (Kolmogorov-Smirnov test). Data were considered as statistically significant for $p < 0.05$. To evaluate intragroup differences regarding behavioral data, paired t test was used to evaluate significant differences between the discrimination indexes of the object identity recognition (novel *versus* familiar) and object placement (dislocated *versus* stationary) tasks. All data were plotted and the statistical analysis performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3.0 Results

3.1 Behavioral assays

Discrimination indexes (MEAN $\pm$ SEM) regarding the performance of young and adult rats on the object identity and placement recognition tests are shown in Figure 1. The intragroup analysis (paired t-test) demonstrated that young animals had preserved memory for object identity recognition with a discrimination index above 60% for the novel *versus* familiar object (Fo&Ex, 63.3 $\pm$ 2.5 *versus* 36.7 $\pm$ 2.5, $p < 0.001$; Fo&S, 71.3 $\pm$ 3.8 *versus* 28.7 $\pm$ 3.8, $p < 0.001$; V&Ex, 66.0 $\pm$ 4.0 *versus* 34.0 $\pm$ 4.0, $p < 0.005$ and V&S, 68.7 $\pm$ 3.5 *versus* 31.3 $\pm$ 3.5, $p < 0.001$). Intergroup analysis (two-way ANOVA, $p > 0.05$) did not show any significant differences.

On the other hand, the intragroup comparisons (paired t-test) with the data obtained from the object placement recognition tests showed a treatment-dependent impairment as judged by the values of the discrimination index for the dislocated *versus* stationary object (Fo&Ex, 39.6 $\pm$ 2.7 *versus* 60.4 $\pm$ 2.7, $p < 0.005$; Fo&S, 39.3 $\pm$ 3.1 *versus* 60.7 $\pm$ 3.1, $p < 0.01$). This impairment was not observed in young rats from the respective control groups (V&Ex, 48.0 $\pm$ 3.8 *versus* 52.0 $\pm$ 3.8, $p > 0.05$; V&S, 62.2 $\pm$ 2.6 *versus* 37.8 $\pm$ 2.6, $p < 0.01$). The intragroup analysis (two-way ANOVA followed by Tukey) for the performance in the object placement recognition tests showed that fish oil supplementation and treadmill exercise increased the discrimination indexes related to the recognition of the stationary position, and decreased the indexes related to the discrimination of the dislocated object (Fo&S *versus* V&S, $p < 0.001$, and V&Ex *versus* V&S, $p < 0.05$). These results are described in **Figure 1 A and C**.

At adulthood, rats had the ability to recognize the novel and dislocated objects as shown by the intragroup differences (paired t-tests) of the discrimination indexes for the object identity recognition (novel *versus* familiar) and object placement tests (dislocated *versus* stationary) (figure 1). In regards of the object identity recognition, adult rats presented higher

values of the discrimination indexes (MEAN $\pm$ SEM) for the novel when compared to the familiar object (Fo&Ex, 69.3 $\pm$ 2.9 *versus* 30.7 $\pm$ 2.9, $p < 0.001$; Fo&S, 72.9 $\pm$ 2.9 *versus* 27.0 $\pm$ 2.9, $p < 0.001$; V&Ex, 76.0 $\pm$ 3.6 *versus* 24.0 $\pm$ 3.6, $p < 0.001$ and V&S, 75.5 $\pm$ 4.26 *versus* 24.5 $\pm$ 4.26, $p < 0.001$). Similar results were observed for the object placement tasks as judged by the increased discrimination indexes (MEAN $\pm$ SEM) for the dislocated as compared to the stationary object (Fo&Ex, 61.8 $\pm$ 2.7 *versus* 38.2 $\pm$ 2.7, $p < 0.01$; Fo&S, 64.4 $\pm$ 3.1 *versus* 35.6 $\pm$ 3.1, $p < 0.01$; V&Ex, 63.2 $\pm$ 3.6 *versus* 36.8 $\pm$ 3.6, $p < 0.01$ and V&S, 63.9 $\pm$ 3.7 *versus* 36.1 $\pm$ 3.7, $p < 0.01$). **Figure 1 B and D** describe these results.

3.2 Oxidative state

In addition to previous data, we observe that in young rats the exercise induces decrease in lipid peroxidation evaluated by malondialdehyde (MDA) levels (V&S: 37.7 $\pm$ 8.0 nmol/mg prot, $n=6$; V&Ex: 16.1 $\pm$ 0.6 nmol/mg prot, $n=6$, $p < 0.05$) and protein oxidation evaluated by carbonyls content (V&S: 19.4 $\pm$ 1.7 μ mol/mg prot, $n=6$; V&Ex: 14.4 $\pm$ 0.9 μ mol/mg prot, $n=7$, $p < 0.01$). Moreover, fish oil supplementation decreases lipid peroxidation (V&S: 37.7 $\pm$ 8.0 nmol/mg prot, $n=6$; Fo&S: 17.0 $\pm$ 2.7 nmol/mg prot, $n=6$, $p < 0.01$) and protein oxidation (V&S: 19.4 $\pm$ 1.7 μ mol/mg prot, $n=6$; Fo&S: 10.5 $\pm$ 0.6 μ mol/mg prot, $n=7$, $p < 0.001$); however the association between exercise and fish oil supplementation did not induce a significant difference. In adult rats, exercise induces a different response, it causes a significant increase in MDA levels (V&S: 11.3 $\pm$ 2.4 nmol/mg prot, $n=6$; V&Ex: 55.1 $\pm$ 8.0 nmol/mg prot, $n=6$, $p < 0.001$), on the other hand there was no differences in carbonyl content (V&S: 1.6 $\pm$ 0.2 μ mol/mg prot, $n=5$; V&Ex: 1.4 $\pm$ 0.2 μ mol/mg prot, $n=5$, $p < 0.05$). However, when exercise is associated to fish oil supplementation, we observed a significant decrease in MDA levels (Fo&S: 15.9 $\pm$ 2.8 nmol/mg prot, $n=6$; Fo&Ex: 1.7 $\pm$ 0.4 nmol/mg prot, $n=6$,

$p < 0.001$), and in regards of protein oxidation (Fo&S: 1.7 ± 0.1 $\mu\text{mol/mg prot}$, $n=5$; Fo&Ex: 1.1 ± 0.1 $\mu\text{mol/mg prot}$, $n=5$; $p < 0.05$). These results are described in **figure 2**.

To better understand effects of the association between exercise and fish oil supplementation, we evaluated antioxidant defenses, such as enzymatic and non-enzymatic mechanisms. In young rats, the exercise increases SOD activity (V&S: 31.5 ± 2.9 U/mg prot, $n=8$; V&Ex: 46.8 ± 1.7 U/mg prot, $n=8$, $p < 0.001$); in addition, in supplemented rats, exercise also induces increase in SOD activity (Fo&S: 46.4 ± 1.7 U/mg prot, $n=8$; Fo&Ex: 55.9 ± 1.3 U/mg prot, $n=8$, $p < 0.05$). It was interesting to note that fish oil supplementation *per se* increases SOD activity in sedentary as well as in exercised rats (V&S: 31.5 ± 2.9 U/mg prot, $n=8$; Fo&S: 46.4 ± 1.7 U/mg prot, $n=8$, $p < 0.001$ and V&Ex: 46.8 ± 1.7 U/mg prot, $n=8$; Fo&Ex: 55.9 ± 1.3 U/mg prot, $n=8$, $p < 0.05$).

Furthermore, in terms of the capacity to convert H_2O_2 in H_2O by catalase, we observed that exercise is the only variable that can induce a significant increase. This increase does not depend on the supplementation with or without fish oil (V&S: 1.0 ± 0.1 U/mg prot, $n=6$; V&Ex: 1.7 ± 0.1 U/mg prot, $n=7$, $p < 0.01$, and Fo&S: 0.9 ± 0.1 U/mg prot, $n=6$; Fo&Ex: 1.6 ± 0.3 U/mg prot, $n=6$, $p < 0.05$). However, in regards to glutathione-S-Transferase, neither exercise, nor fish oil supplementation induce differences in GST activity. In adult rats, the antioxidant defense had a different response than observed in young rats, either exercise or fish oil supplementation were able to induces differences in SOD, CAT or GST activity. All the data of SOD, CAT and GST are described in **figure 3**.

Since the antioxidant defense is constituted by enzymatic and non-enzymatic mechanisms, we also investigated non-enzymatic mechanisms. GSH is an important non-enzymatic antioxidant that can be found in mammalian cells. In the reduced state, the thiol group of cysteine present in GSH is able to donate a reducing equivalent to unstable molecules, such as reactive oxygen species, that can decrease the toxicity of the unstable

molecules. Young rats did not present any significant differences among the groups. Moreover, when we evaluate the sulfhydryl content in samples from young rats we also did not observe any difference.

On the other hand, in adult rats we observed that fish oil supplementation associated to exercise can increase GSH levels in a significant manner (Fo&S: 4.5 ± 0.5 $\mu\text{M}/\text{mg}$ prot, $n=5$; Fo&Ex: 8.5 ± 1.1 $\mu\text{M}/\text{mg}$ prot, $n=6$, $p<0.05$). The same effect was observed in the Sulfhydryl content (Fo&S: 0.1 ± 0.01 mM/mg prot, $n=6$; Fo&Ex: 0.26 ± 0.04 mM/mg prot, $n=5$, $p<0.05$). Similar results (**figure 4**) were also observed when we compared exercised supplemented with fish oil to exercised animals that received vehicle (GSH levels V&Ex: 4.1 ± 0.2 $\mu\text{M}/\text{mg}$ prot, $n=5$; Fo&Ex: 8.5 ± 1.1 $\mu\text{M}/\text{mg}$ prot, $n=6$, $p<0.01$ and Sulfhydryl content V&Ex: 0.1 ± 0.02 mM/mg prot, $n=6$; Fo&Ex: 0.26 ± 0.04 mM/mg prot, $n=5$, $p<0.05$).

4.0 Discussion

Fish oil intake coupled with treadmill exercise has been associated to improvements on rat performance in different memory tasks. Evidence show that these improvements on brain function can be long-lasting. The improvements depend on the memory task that is performed [9].

Our data suggests that fish oil supplementation changes the rat performance on the task of placement recognition in an age-dependent manner. In fact, young rats that received fish oil during the brain critical development period had reduced ability to recognize the novel object placement as compared to the performance of the respective controls. Since, depending on the life stage, effects of fish oil supplementation can be contradictory, the present data highlight the need to better understand the relationship between: (1) the dose and volume of fish oil

supplementation, (2) the combination between (Fo) and moderate exercise, (3) and most importantly an appropriate timing for this intervention.

Similarly to the present data, previous findings show that PUFAs and exercise have been implicated in enhancing cognition and memory functions in healthy, adult rodents [2]. These authors reviewed a variety of data demonstrating a strong and influential relationship between dietary intervention with PUFAs, exercise, and brain function. Besides these previous findings in adult rodents, there are published data showing that the perinatal supplementation with essential fatty acids improved hippocampal development in the offspring, only when the dam received the enriched diet also during pregnancy [33]. Herein, we observed an impairment to recognize the novel object placement when young rats received fish oil during the brain critical development period. Present and previous data highlight the importance of the appropriate timings for this lifestyle intervention to maximize results on memory functions [2, 33].

Fish oil is a reliable source of (LC-PUFAs). These lipids have important role in one's health state; they are considered essential because mammals are not able to produce them, therefore LC-PUFAs have to be obtained by dietetic sources [34]. On the other hand, there are challenges to reach the daily standard LC-PUFA recommendations through dietetic sources, and to achieve beneficial effects on health care. Therefore, the supplementation with fish oil as well as with other dietetic sources of LC-PUFA has grown exponentially either prescribed by several physicians and nutritionists; or by the use from the general population without an acknowledgement from a health care professional. In fact, the use of LC-PUFA has been pointed out in a variety of acute and chronic inflammatory settings [35]. However, experimental and clinical data about LC-PUFA underlying mechanisms and clinical efficacy are still weak in some settings [2].

Experimental data shows that LC-PUFA and treadmill exercise underlying mechanisms on heart metabolism are related to enhancement of antioxidant defenses [20]. On the other hand, clinical trials describe LC-PUFA benefits by reducing the time to fatigue, increased grip strength, and decreased use of nonsteroidal antiinflammatory drugs [35].

Similarly to the age-dependent effects of fish oil and exercise on the rat behavior, we observed that this intervention affected hippocampal oxidative stress also depending on the life stage. The present data demonstrated that fish oil supplementation or exercise reduced lipid peroxidation and protein content as judged by the amount of MDA and carbonyl content in young rats. On the other hand, if fish oil was associated to exercise, there was a significant reduction in MDA and protein content in adult rats. In regards of the antioxidant defenses, while exercise increased SOD and CAT activity in young rats, fish oil supplementation only increased SOD activity. In adult rats, we observed that the fish oil and exercise improved non-enzymatic antioxidant defenses because of the increased activity of GSH and sulfhydryl content.

We believe that there is a timing-related association between the behavioral data and the changes on hippocampal defenses as judged by the present results. According to recently published data diet coupled with exercise are key modulators of brain structure and function. Together, diet and exercise can influence multiple aspects of brain plasticity, such as neurodevelopment, neurotrophins, neurogenesis, synaptogenesis, and ultimate activity at the brain network level [2].

In conclusion, we present relevant findings with the effects of fish oil supplementation and treadmill exercise on memory function and hippocampal oxidative state. These findings are highlighting a timing-related effect of this low-cost and suitable lifestyle intervention.

5.0 Acknowledgements

The authors are thankful to the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development MCTI/CNPq/Universal 2014/APQ 444500/2014-6) and FACEPE (Foundation

to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ 1026.4-09/12). CNPq and FACEPE provided grants to fund this work. The authors also acknowledge the scholarships provided by CNPq to PFCM, by FACEPE to GRFB, and by CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) to LARC and JSVM.

6.0 Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

7.0 Authors contribution

PFCM and JSVM equally contributed to this work.

Figure captions

Figure 1. Object identity (A, B) and placement recognition (C, D) tests. The discrimination indexes with the performance of young and adult rats under different experimental conditions are presented in the left (A and C) and right (B and D) panels, respectively. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ indicate intergroup significant difference (two-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test, V&S *versus* Fo&S, V&S *versus* V&Ex and V&S *versus* Fo&Ex); # $p < 0.001$, ## $p = 0.001$ or ### $p < 0.0001$ indicate intragroup significant difference (paired t-test). V&S: sedentary supplemented with vehicle solution; V&Ex: exercised supplemented with vehicle solution; Fo&S: sedentary supplemented with fish oil; Fo&Ex: exercised supplemented with fish oil.

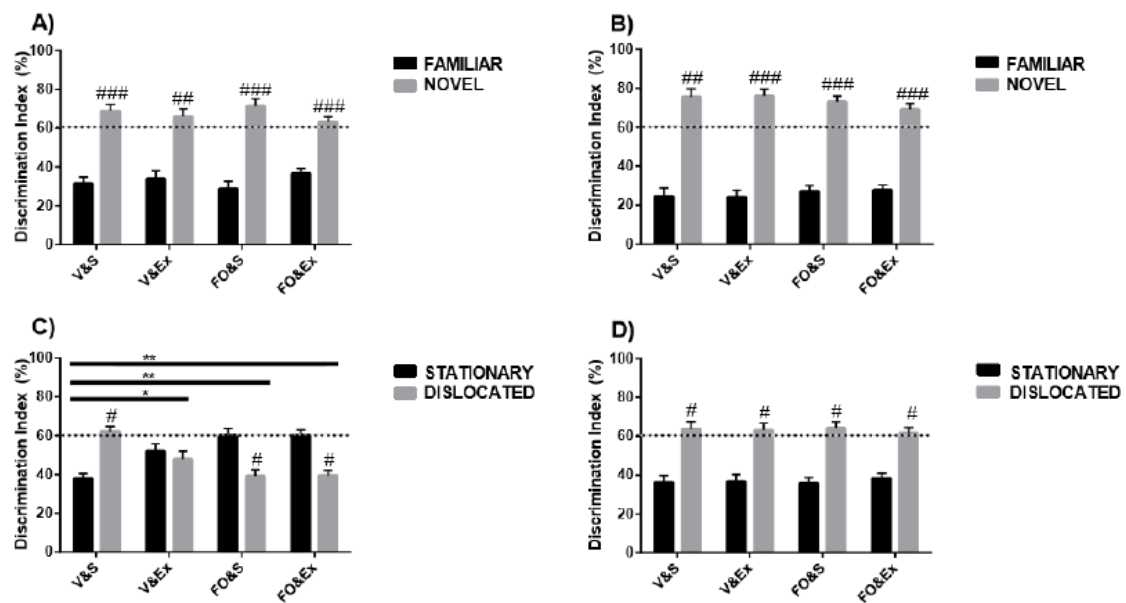


Figure 2. Oxidative stress biomarkers. Evaluation of lipid peroxidation and protein oxidation in hippocampus from young and adult rats under different treatment (fish oil and/or exercise) and control. A) MDA levels in young rats; B) MDA levels in adult rats; C) Carbonyls content in young rats; D) Carbonyls content in adult rats. Values are presented as mean $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant difference (two-way ANOVA, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

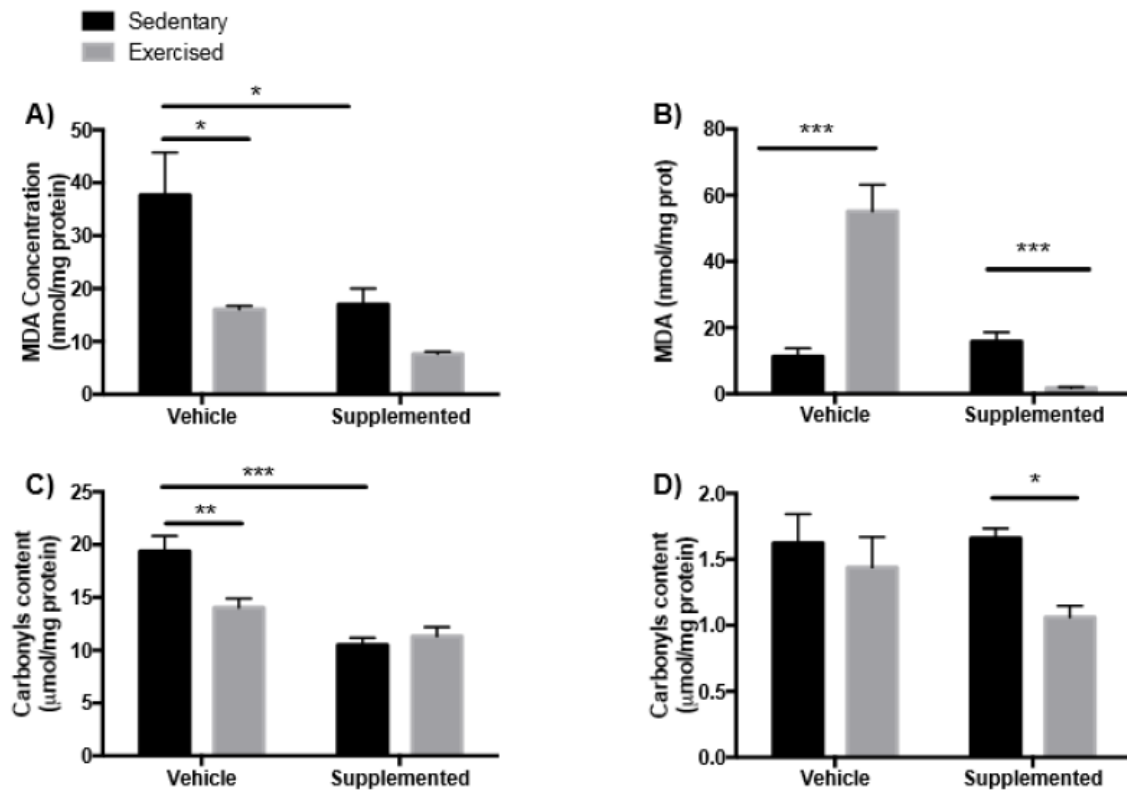


Figure 3. Enzymatic antioxidant defense. Evaluation of enzymatic defense in hippocampus from young and adult rats under different treatment (fish oil and/or exercise) and control. A) SOD activity in young rats; B) SOD activity in adult rats; C) Catalase activity in young rats; D) Catalase activity in adult rats; E) GST activity in young rats; D) GST activity in adult rats. Values are presented as mean $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant difference (two-way ANOVA, * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

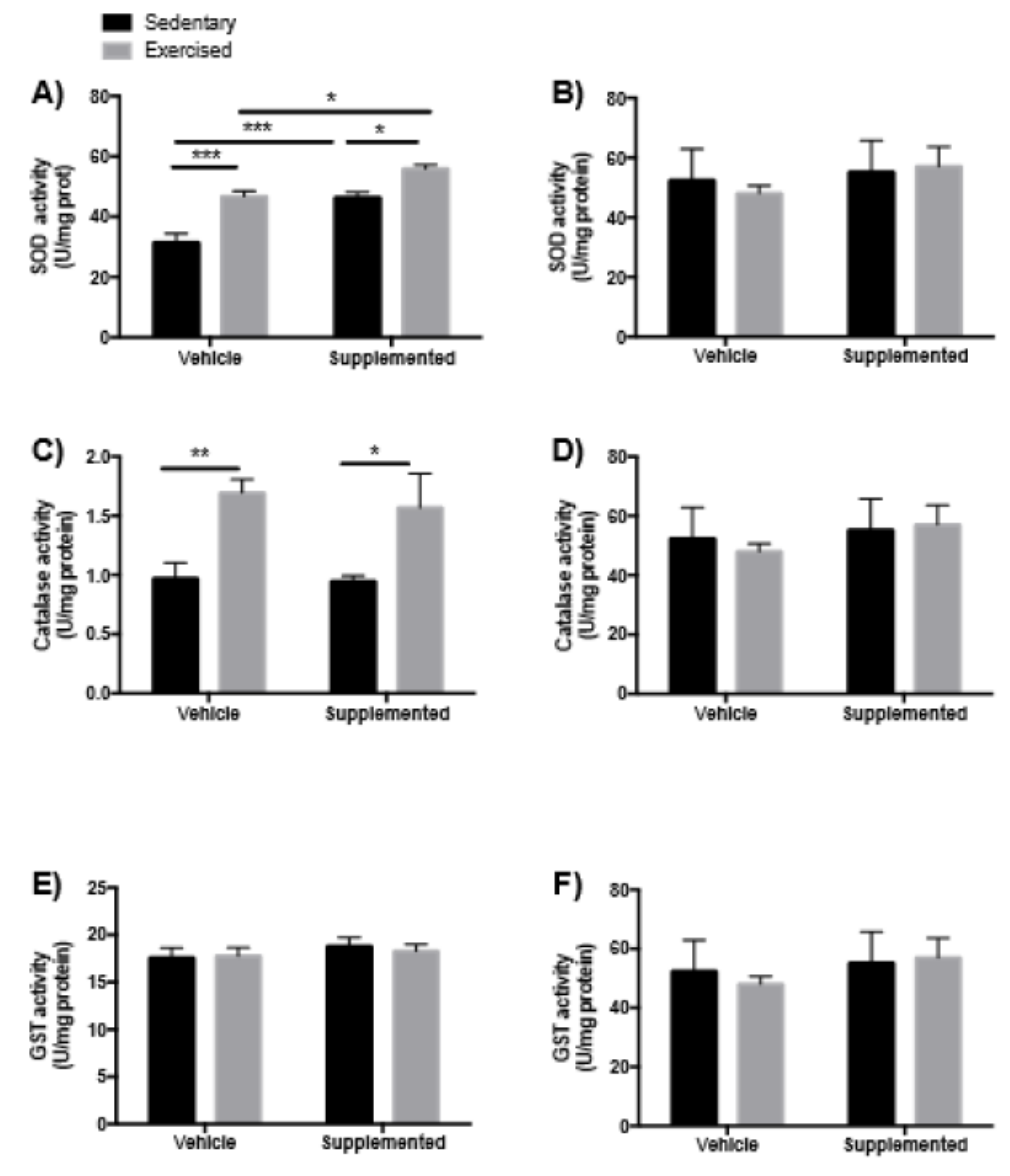
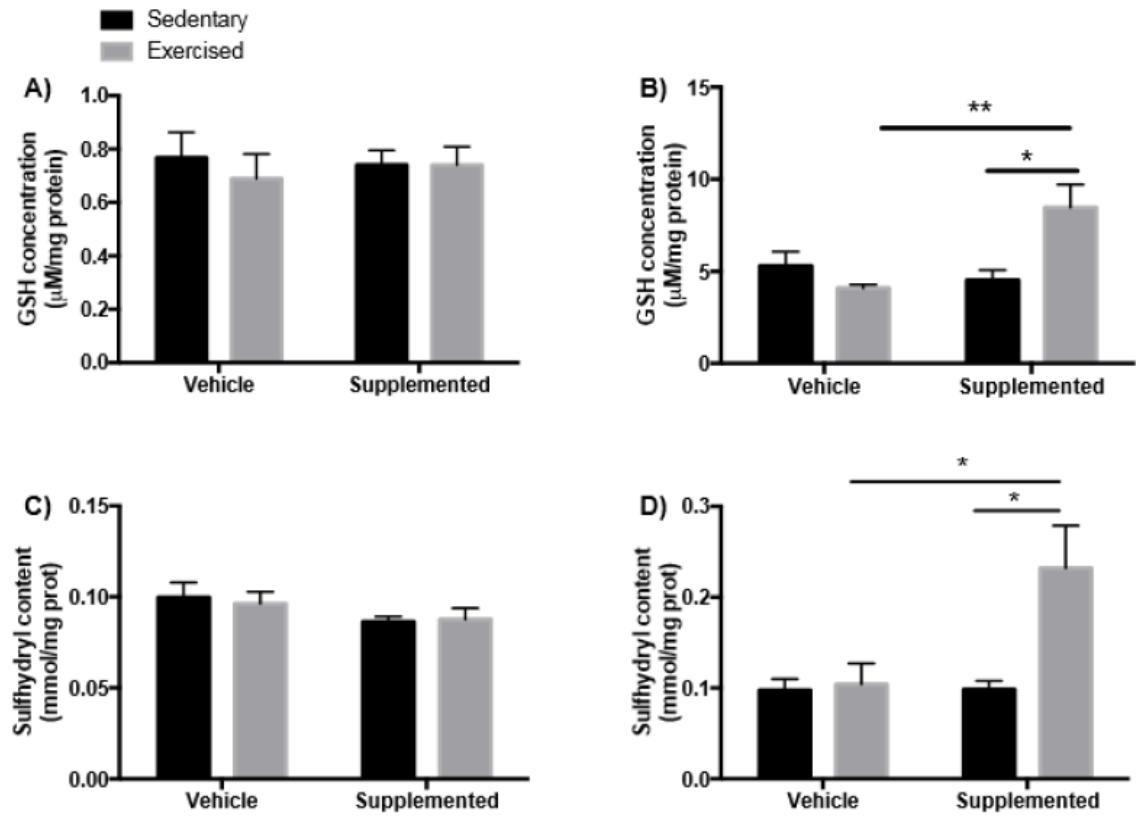


Figure 4. Non-enzymatic antioxidant defense. Evaluation of non-enzymatic antioxidant defense in hippocampus from young and adult rats under different treatment (fish oil and/or exercise) and control. A) GSH concentration in young rats; B) GSH concentration in adult rats; C) Sulfhydryl content in young rats; D) Sulfhydryl content in adult rats. Values are presented as mean $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant difference intragroup (two-way ANOVA, *p < 0.05; **p < 0.01).



Primary Sources

Secondary Sources

Uncategorized References

1. Reijs, B.L., et al., *The Central Biobank and Virtual Biobank of BIOMARKAPD: A Resource for Studies on Neurodegenerative Diseases*. Front Neurol, 2015. **6**: p. 216.
2. Murphy, T., G.P. Dias, and S. Thuret, *Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap*. Neural Plast, 2014. **2014**: p. 563160.
3. Prickaerts, J., et al., *Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **177**(4): p. 381-90.
4. Akkerman, S., et al., *Object recognition testing: statistical considerations*. Behav Brain Res, 2012. **232**(2): p. 317-22.
5. Ennaceur, A. and J. Delacour, *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. Behav Brain Res, 1988. **31**(1): p. 47-59.
6. Churchill, J.D., et al., *Exercise, experience and the aging brain*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(5): p. 941-55.
7. Sachdeva, A., K. Kumar, and K.S. Anand, *Non Pharmacological Cognitive Enhancers - Current Perspectives*. J Clin Diagn Res, 2015. **9**(7): p. VE01-VE06.
8. Radak, Z., et al., *Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain*. Neurochem Int, 2001. **38**(1): p. 17-23.
9. Rachetti, A.L., et al., *Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks*. Behav Brain Res, 2013. **237**: p. 283-9.
10. Wu, A., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition*. Neuroscience, 2008. **155**(3): p. 751-9.
11. Gharami, K., M. Das, and S. Das, *Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain*. Neurochem Int, 2015. **89**: p. 51-62.
12. Gomez-Pinilla, F., *Brain foods: the effects of nutrients on brain function*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(7): p. 568-78.
13. Cutuli, D., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 220.
14. Zugno, A.I., et al., *Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia*. Neuroscience, 2014. **259**: p. 223-31.
15. Hashimoto, M., et al., *Protective effects of prescription n-3 fatty acids against impairment of spatial cognitive learning ability in amyloid beta-infused rats*. Food Funct, 2011. **2**(7): p. 386-94.
16. Wang, T., et al., *Effect of fish oil supplementation in a rat model of multiple mild traumatic brain injuries*. Restor Neurol Neurosci, 2013. **31**(5): p. 647-59.
17. Pusceddu, M.M., et al., *n-3 PUFAs have beneficial effects on anxiety and cognition in female rats: Effects of early life stress*. Psychoneuroendocrinology, 2015. **58**: p. 79-90.
18. Chalimoniuk, M., et al., *Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats*. J Physiol Pharmacol, 2015. **66**(4): p. 539-47.
19. Flores, M.F., et al., *Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging*. Neurochem Int, 2014. **78**: p. 53-60.
20. da Silva Pedroza, A.A., et al., *Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts?* Life Sci, 2015. **137**: p. 133-41.

21. Batista-de-Oliveira, M., et al., *Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis*. Exp Gerontol, 2012. **47**(6): p. 452-7.
22. Viana, L.C., et al., *Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry*. Neuroscience, 2013. **238**: p. 280-96.
23. Dere, E., J.P. Huston, and M.A. De Souza Silva, *Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory*. Brain Res Brain Res Protoc, 2005. **16**(1-3): p. 10-9.
24. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
25. Buege, J.A. and S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1978. **52**: p. 302-10.
26. Reznick, A.Z. and L. Packer, *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 357-63.
27. Misra, H.P. and I. Fridovich, *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3170-5.
28. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
29. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
30. Habig, W.H., et al., *The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(10): p. 3879-82.
31. Hissin, P.J. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem, 1976. **74**(1): p. 214-26.
32. Aksenov, M.Y. and W.R. Markesbery, *Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2001. **302**(2-3): p. 141-5.
33. Niculescu, M.D., D.S. Lupu, and C.N. Craciunescu, *Maternal alpha-linolenic acid availability during gestation and lactation alters the postnatal hippocampal development in the mouse offspring*. Int J Dev Neurosci, 2011. **29**(8): p. 795-802.
34. Yehuda, S., S. Rabinovitz, and D.I. Mostofsky, *Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging*. Neurobiol Aging, 2005. **26 Suppl 1**: p. 98-102.
35. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.

APÊNDICE – B

Artigo original submetido ao periódico “Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism”.

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

Manuscript ID

apnm-2016-0190

Title

Treadmill exercise and Fish oil supplementation during development: A study of cardiac oxidative metabolism

Authors

de Melo, Janatar Stella
Freitas, Cristiane
Macedo, Patrícia
Costa, Lais Alves
Barbosa, Humberto
Lira, Eduardo
Batista-de-Oliveira-Hornsby, Manuella
Lagranha, Claudia

Date Submitted

31-Mar-2016

Payment Method

Waived
31-Mar-2016

Title: Treadmill exercise and Fish oil supplementation during development: A study of cardiac oxidative metabolism.

Janatar Stella Vasconcelos de Melo^a; Cristiane de Moura Freitas^b; Patrícia Fortes Cavalcanti de Macêdo^a; Laís Alves Ribeiro Costa^a; Humberto de Moura Barbosa^c; Eduardo Carvalho Lira^c; Manuella Batista-de-Oliveira-Hornsby^{a*}, Claudia J. Lagranha^{b*#}

^a Department of Nutrition / CCS. Federal University of Pernambuco. *Campus* of Recife. Recife – PE, Brazil.

^b Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry / CAV. Federal University of Pernambuco. Vitoria de Santo Antao – PE, Brazil.

^c Department of Physiology and Pharmacology/ CCB. Federal University of Pernambuco. *Campus* of Recife. Recife – PE, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding author

Claudia J. Lagranha

Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

Phone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: lagranha@hotmail.com

Abstract

Studies indicate that lifestyle intervention since childhood may decrease the risk for cardiovascular disease. Since the utilization of ω -3 PUFA and exercise can be present in daily life, the association between them may improve cardiac health. Here we aimed to investigate the effect of moderate physical training and ω -3 present in fish oil (FO) on oxidative metabolism in hearts of juvenile rats. Rats with fifteen-days of life were submitted to exercise training and FO supplementation during a period of 4 weeks. At 46 days old, were evaluated murinometric parameters, fasting glucose, lipid profile and oxidative status. There were no differences of postnatal body weight, body mass index, and the AC/TC ratio. FO associated to exercise decreased TG and VLDL-C levels. FO also reduced atherogenic index and the levels of total cholesterol. On the other hand, FO increased HDL values. Additionally, exercise and FO supplementation decreases oxidative stress biomarkers, increases antioxidant defense and oxidative metabolism biomarker. Our findings suggest that intervention in childhood indeed improve cardiac metabolism.

Key words: Exercise, Fish oil, Heart oxidative metabolism, Developmental period

1. Introduction

Heart is the first organ to complete its formation in vertebrates, playing an important role in the distribution of nutrients and oxygen to the embryo, meeting the body's metabolic needs in response to the interference of the external environment to maintain homeostasis (Buckingham et al. 2005). Each system has a physiological critical period of development that varies with each species (Dobbing et al. 1985). According to Morgane et al. (Morgane et al. 2002) the susceptible phase occurs during the high proliferation and cell differentiation, that normally comprises gestational and lactation period. Due to the organ plasticity, heart can be influenced by external factors such as nutritional manipulation or physical exercise modulating the biochemical milieu, which may induce a number of adaptations to maintain its internal balance (Porrello et al. 2008; Wang et al. 2012). Studies indicate that lifestyle intervention since childhood may decrease the severity of many adult diseases such as heart disease, stroke, obesity among others, that can cause death (Pratt et al. 2007).

In rats, the adequate nutrition during lactation period is essential to contribute to the maintenance of the structural and functional integrity of cells (Stillwell et al. 1997). Therefore, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) present in fish oil play an important role for the maintenance of the cardiac homeostasis (Gharami et al. 2015). A compile evidences demonstrates that omega(n)-3 enhances the activity of mitochondria, decreases the reactive oxygen species production and increase antioxidant defense either in human as in rat hearts (Bourre et al. 1993; Bourre 2005; Garrel et al. 2012; Rodrigo et al. 2013; Anderson et al. 2014; Castillo et al. 2014; Uygur et al. 2014).

Cardiovascular disease remains the leading cause of death in the United States, where ischemic heart disease and stroke remain the leading causes of premature death in the world (Roth et al. 2015). A variety of studies have demonstrated that exercise can be useful to

maintain health and preventing pathological conditions. When moderate exercise is practiced regularly, it can decrease the chances of dying from cardiovascular disease by the reduction of risk factors such as hypertension, obesity and hyperlipidemia (Smith 2010; Fiuza-Luces et al. 2013; Youtz et al. 2014).

Since the consumption of n-3 and exercise can be simultaneously present in daily life, the association between them may improve health (Nakamura et al. 2008). Corroborating with these observations, study from our laboratory, using adult and aged rats demonstrate that the combination of fish oil supplementation and physical training enhances antioxidant defense in aged rat heart, suggesting that even in a natural process with oxidative stress accumulation the combined strategy can ameliorate cardiac metabolism and decreases further oxidative stress damage (da Silva Pedroza et al. 2015).

Previous data demonstrate how fish oil and exercise can be good to maintain heart health and decrease the risk of dying due to cardiac diseases. However, there is still a lack of information about the best timing to achieve the optimal effects of this therapeutic approach. Therefore, we aimed to investigate whether a daily moderate treadmill exercise coupled with supplementation with fish oil during an early-life period would influence the cardiac metabolism, lipid profile and BMI.

2. Material and Methods

2.1 Animals and experimental design

All the experimental procedures were performed to minimize animal suffering, and to reduce the number of animals per group. The present experimental design used offsprings of an outbred colony strain of Wistar rats obtained from *Departamento de Nutrição* at *Universidade Federal de Pernambuco (Brazil)*. Each experimental phase was performed in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee for Animal Research

(approval protocol no. 23076.027072/2014-20), which comply with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Newborn pups from 4 to 6 litters were first joined in a big pool. Male pups from this pool were randomly assigned to perform the litters of this study. After weaning, all pups were housed in groups of 3–4 per cage (51×35.5×18.5 cm). Rats were reared in a room with a temperature of 23±1°C and a 12-h light/dark cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm), with free access to water and food – a commercial laboratory chow diet (Presence of Brazil Ltd., São Paulo, Brazil) with 23% protein.

Fifteen days-old rats were randomly assigned into 4 different experimental groups: (1) supplemented with fish oil and exercised (Fo&Ex, n=10); (2) supplemented with fish oil and sedentary (Fo&S, n= 10); (3) supplemented with vehicle solution and exercised (V&Ex, n= 10); (4) supplemented with vehicle solution and sedentary (V&S, n=10).

2.2 Fish oil supplementation

Rats with Fifteen days-old received one single daily dose of fish oil (Fo, 85 mg/kg/d and 1 ml/250g/d) or vehicle solution (V, 1 ml/250g/d) in order to obtain, respectively, the supplemented group (Fo, n=20) and the control group (V, n=20). The capsules of fish oil (Sundown®) containing polyunsaturated fatty acids [docosahexaenoic (DHA; 85mg/1g) and eicosapentaenoic (EPA; 128mg/1g)] were dissolved in Cremophor (Sigma ®) 0.009% then in distilled water, and administered via gavage. To perform the control group, a vehicle solution (V) was given with the same amount of Cremophor and distilled water that were used to prepare the solution provided to supplement the fish oil. The groups were supplemented with daily Fo (85 mg/kg/d) or V (1 mL/250g/d) during a period of 4 weeks, from Monday to Friday as adapted from (da Silva Pedroza, Lopes et al. 2015) (Rachetti et al. 2013).

2.3 Treadmill exercise

Animals that were supplemented with fish oil or vehicle were subdivided into sedentary (S) and exercised. The exercised groups were subjected to treadmill running during the same 4 weeks period of supplementation. Rats exercised in a treadmill apparatus (Insight EP-131, 0° inclination) as adapted from the routine of moderate exercise previously described by (Batista-de-Oliveira et al. 2012) (da Silva Pedroza, Lopes et al. 2015). Periods of treadmill exercise lasted 4 weeks. In summary, during the first 3 weeks, the animals were placed in the treadmill for 30 min/day. The running speed was increased from 5 m/min during the first week to 10 m/min during the second week, and increased again to 15 m/min during the third week and fourth week. Rats from the sedentary groups were placed in the treadmill for the same period as the exercised animals, but the treadmill remained off.

2.4 Postnatal body weight, murinometric evaluations and heart weight

At postnatal days 15, 21, 27, 34 and 45 the body weight (BW) was evaluated to test whether the fish oil supplementation or the treadmill exercise would influence it. Therefore, the rats were weighted in a semi-analytical digital electronic scale (Marte®, Minas Gerais State, Brazil) and their weights were compared to the respective controls.

Abdominal circumference (AC, immediately anterior to the forefoot), thoracic circumference (TC, immediately behind the foreleg), body weight (BW) and body length (BL, muzzle-to-anus length) were determined in all rats as described by Novelli et al. (Novelli et al. 2007). The measurements were made in rats under anesthesia with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA) immediately before blood and heart collection. The (BW), (BL), (AC) and (TC) were used to determine: body mass index (BMI) = $\text{body weight (g)} / \text{length}^2 (\text{cm}^2)$ and AC/TC ratio.

2.5 Blood analysis

Fasted (12–14 h) rats were anesthetized with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA), and blood samples were obtained. The sample collected from the tail was used to measure glucose levels with a glucometer (G-Tech Free Sistema NoCode Accumed-Glicomed, Brazil). Then 4ml of blood sample was obtained by cardiac puncture and immediately placed in separated tubes. After 20 minutes, the sample was centrifuged at 8 000 rpm for 10 minutes. The serum was frozen at -15°C until assayed for content of lipids. The lipid panel analysis was used as an initial broad medical screening tool for abnormalities in lipids. The analyses of cholesterol (total cholesterol, TC and high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) and triglycerides (TG) were performed by commercial kits (Labtest®, Lagoa Santa, MG). Very low-density lipoprotein (VLDL= triglycerides/5) and atherogenic index were also calculated [$\log (\text{triglycerides}/\text{HDL-cholesterol})$] (Dobiasova et al. 2001) (Jurgonski et al. 2012). After the blood samples were obtained, the anesthetized animals were then sacrificed by the collection of the hearts as described previously (Nascimento et al. 2014).

2.6 Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (Sinc Pernambuco, Brazil).

2.7 Heart preparations for biochemical analysis

Homogenate of heart tissues were prepared in 50 mM Tris buffer containing 1 mM EDTA (pH 7.4), 1 mM sodium orthovanadate, 200 µg/ml phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and centrifuged at 4000 RPM for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and used in the following experiments as described below. Concentration of protein in supernatant was estimated using crystalline bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford 1976).

2.8 Oxidative Stress Biomarkers

I. Evaluation of Malondialdehyde production

A total of 0.3 mg/ml heart homogenates were used to measure malondialdehyde production following reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 100 °C according to the method of Draper(Draper et al. 1993). In the TBA test reaction, malondialdehyde or MDA-like substances react to produce a pink pigment with a maximum absorption at 535 nm. The reaction was developed by the sequential addition to the sample of 30% trichloroacetic acid and Tris-HCl (3mM) followed by thorough mixing and centrifugation at 2 500 g for 10 min. Supernatant was transferred to another tube and 0.8% TBA (v/v) was added before mixing and boiling for 30 min. After cooling, the absorbance of the organic phase was read at 535nm in a spectrophotometer. Results were expressed as nmol per mg of protein(Nascimento, Freitas et al. 2014).

II. Evaluation of Carbonyls content

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer (Reznick et al. 1994). With samples on ice, 30% (w/v) TCA was added to the samples (0.3 mg/ml heart homogenates) and then centrifuged for 14 min at 4000 RPM. The pellet was suspended in 10mM 2,4dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in a dark room for 1h shake each 15min. Then the samples were washed and centrifuged three times in ethyl/acetate buffer and then the final pellet was suspended in 6M guanidine hydrochloride, incubated for 30 min at 37°C and the absorbance read at 370nm.

III. Total and protein-bound sulfhydryl group content

This assay was performed according to Aksenov and Markesbery(Aksenov et al. 2001). Homogenates (0.5 mg/ml) were used to the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic

acid) (DTNB) by thiol groups, generating a yellow-stained compound TNB whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated as mmol/mg protein.

IV. Superoxide dismutase assay

The determination of total superoxide dismutase enzyme activity (t-SOD) was performed according to the method of Misra and Fridovich (Misra et al. 1972). Supernatants (0.2 mg/ml heart) were collected from homogenized tissues following centrifugation were incubated with 880 μ l sodium carbonate (0.05%, pH 10.2, 0.1 mM EDTA) at 37°C before development of the reaction by the addition of 30 mM epinephrine (in 0.05% acetic acid) and determined by measuring the kinetic of the inhibition of adrenaline auto-oxidation at 480 nm expressed at U/mg protein.

V. Catalase assay

Catalase (CAT) activity was measured according to the method described by Aebi (Aebi 1984). The principle of the assay is based on the determination of the rate constant (k) of H₂O₂ decomposition, which in our conditions of temperature and pH was defined as 4.6×10^7 . The assay content was composed by 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM H₂O₂ and samples (0.3 mg/ml heart homogenates). The rate constant of the enzyme was determined by measuring change in absorbance (at 240 nm) per minute over a 4 minutes period at 20 °C and the CAT activity was expressed as U/mg protein.

VI. Glutathione S-transferases activity

Glutathione S Transferase (GST) is an antioxidant enzyme involved in the detoxification of a wide range of toxic agents including peroxide and alkylating agents present in the tissues. The activity of GST was measured by the method described by Habig (Habig et

al. 1974). The principle of the assay is based on the determination through absorbance spectroscopy of the conjugation of 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione (GSH). Absorbance was measured at 340nm at 30 °C. One unit of enzyme conjugates 10.0 nmol of CDNB with reduced glutathione per minute.

2.9 Oxidative capacity biomarker

I. Citrate synthase activity

Enzymatic activity was determined as described previously (Le Page et al. 2009). Briefly, frozen ventricular tissue was homogenized in extraction buffer containing (100 mM-Tris base, 10 mM-EDTA, 2 mM-PMSF, 10 mM sodium orthovanadate) using a sampling homogenizer (Tecnal, Sao Paulo, Brazil). After homogenization for 30 s, protein contents of the homogenates were determined with the Bradford protein assay. For citrate synthase activity 100 µg of protein was incubated in a reaction mixture containing (in mM) 100 Tris·HCl (pH 8.2), 1 MgCl₂, 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ($\epsilon=13.6 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 3 acetyl-CoA, and 5 oxaloacetate. Citrate synthase activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 412 nm over 3 min (30-s intervals) (da Silva et al. 2015).

2.10 Statistical Analyses

Results are expressed as means±S.E.M. Two-way ANOVA test followed by Tukey test were performed to assess significant differences between the groups. Data were considered as statistically significant for $p < 0.05$. All data were plotted and the statistical analysis performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1 Postnatal body weight and Murinometric evaluations

Beside the training and supplementation been conducted during development, there were no significant differences of body weight (figure 1A), body mass index (figure 1B) and the AC/TC ratio (figure 1C) among rats from the different experimental groups, suggesting that neither exercise nor supplementation induces a detrimental effect in the normal growth.

3.2 Fasting glycemia, lipid profile and atherogenic index

There is no significant difference in the values of the fasting glucose (V&S 124.38 ± 4.92 mg/dL; V&Ex 121.33 ± 4.89 mg/dL; Fo&S 114.90 ± 5.35 mg/dL; Fo&Ex 118.56 ± 6.80 mg/dL). However, fish oil associated to exercise reduced the levels of total cholesterol, triglycerides and very low-density lipid (TC: Fo&S 109.66 ± 4.77 vs. Fo&Ex 81.72 ± 6.18 mg/dL, $p < 0.05$; TG: V&Ex 82.01 ± 4.29 vs. Fo&Ex 60.24 ± 6.25 mg/dL, $p < 0.05$); VLDL: V&Ex 16.40 ± 0.86 vs. Fo&Ex 12.05 ± 1.25 mg/dL, $p < 0.05$; (table 1). On the other hand, the fish oil intake increased HDL-C values (V&S 43.90 ± 2.50 vs. Fo&S 59.43 ± 3.15 mg/dL, $p < 0.05$), and reduced atherogenic index (V&S 1.14 ± 0.03 vs. Fo&S 1.01 ± 0.04 ; V&Ex 1.16 ± 0.02 vs. Fo&Ex 1.04 ± 0.05) (table 1).

3.3 Oxidative capacity biomarkers

3.3.1 Oxidative stress biomarkers

The exercise training significantly decreases MDA and Carbonyls levels in heart of juvenile rats (MDA: V&S 105.8 ± 10.8 vs. V&Ex 67.3 ± 13.5 nmol/mg prot, $p < 0.05$; Carbonyls: V&S 7.3 ± 0.6 vs. V&Ex 5.2 ± 0.5 μ mol/mg prot, $p < 0.05$, figure 2), in addition fish oil supplementation also demonstrate a significant effect against lipid peroxidation and protein oxidation, decreasing both biomarkers (MDA: V&S 105.8 ± 10.8 vs. Fo&S 56.6 ± 5.5 nmol/mg

prot, $p < 0.01$; Carbonyls: V&S 7.3 ± 0.6 vs. Fo&S 4.5 ± 0.5 $\mu\text{mol/mg prot}$, $p < 0.001$, figure 2). Interesting the association of exercise and fish oil supplementation did not induce an incremental protective effect against lipid peroxidation and protein oxidation (MDA: Fo&Ex 63.3 ± 4.6 nmol/mg prot; Carbonyls: Fo&Ex 5.4 ± 0.3 $\mu\text{mol/mg prot}$, figure 2).

3.3.2 Antioxidant defenses

Related to enzymatic defense, fish oil supplementation increases superoxide dismutase-SOD activity either in sedentary as well as in trained exercise, when compared to non-supplemented sedentary and trained animals (SOD: V&S 5.27 ± 0.28 vs. Fo&S 6.5 ± 0.2 U/mg prot, $p < 0.05$; V&Ex 5.25 ± 0.33 vs. Fo&Ex 6.7 ± 0.4 U/mg prot, $p < 0.05$, figure 3 A). Related to the H_2O_2 detoxification, we observed that the association of fish oil supplementation with exercise training has an increase in catalase-CAT activity either when compared to exercised vehicle, as well as in comparison to sedentary supplemented (CAT: V&Ex 1.21 ± 0.04 vs. Fo&Ex 1.51 ± 0.1 U/mg prot, $p < 0.05$; Fo&S 1.09 ± 0.06 vs. Fo&Ex 1.51 ± 0.1 U/mg prot, $p < 0.01$, figure 3B). Beside the tendency of the increment, glutathione-S-transferase-GST activity doesn't show a significant difference among groups (figure 3C).

Enzymatic and non-enzymatic molecules compose our antioxidant defense, which works in association to maintain our oxidative status in equilibrium combating reactive oxygen species-ROS responsible to the oxidative stress. Glutathione reduced-GSH is a very important intracellular thiol that combats ROS directly and indirectly acting as a co-factor in enzymatic reactions. Our results demonstrated that exercise training in juvenile rats increases GSH in heart (GSH: V&S 1.27 ± 0.1 vs. V&Ex 1.96 ± 0.2 $\mu\text{M/mg prot}$, $p < 0.01$, figure 3D) and fish oil supplementation did not induce alteration in this molecule. In addition, we evaluate total thiol in our groups; it's important mention here that protein sulfhydryl groups from cysteine residues can be oxidized to form disulfide, altering the redox state of proteins. As

observed in figure 3E, the association of exercise and fish oil supplementation increases sulfhydryl-bound groups when compared to vehicle exercised and supplemented sedentary (Thiol: V&Ex 19.6 ± 1.2 vs. Fo&Ex 30.8 ± 5.4 μ M/mg prot, $p < 0.05$; Fo&S 17.8 ± 1.2 vs. Fo&Ex 30.8 ± 5.4 μ M/mg prot, $p < 0.05$, figure 3E)

3.3.3 Oxidative metabolism biomarker

Citrate synthase is the first enzyme in Krebs cycle responsible for catalyzing the condensation reaction of the two-carbon acetate residue from acetyl coenzyme A and molecule of four-carbon, oxaloacetate, to form the six-carbon, citrate and its activity has been commonly used as oxidative metabolic marker in a number of tissues. In juvenile rats, we observed that there was an increased activity of citrate synthase in the trained group (85%) when compare with sedentary (V&S 0.27 ± 0.02 vs. V&Ex 0.50 ± 0.05 μ M/mg prot, $p < 0.05$, figure 4); in addition we observe that fish oil supplementation increases the citrate synthase activity only in sedentary groups (V&S 0.27 ± 0.02 vs Fo&S 0.53 ± 0.07 μ M/mg prot, $p < 0.05$, figure 4).

4. Discussion

To our knowledge there have been no published studies examining effects of physical exercise combined with fish oil supplementation during developmental period on the hearts of juvenile rats to assess possible relationships of this combination to strengthen antioxidant defense and metabolic enzyme activity. Our results indicated that moderate exercise coupled with fish oil supplementation induces an improvement on oxidative metabolism in the heart of juvenile rats. To the best of our knowledge the majority of the studies associating exercise with antioxidant and metabolic biomarkers are conducted in adult or aged rats, our data suggest that early-life intervention influence positively cardiac metabolism, lipid profile without alteration in BMI.

During the 30-day exercise-training period (15 to 45 days of age), which occurred during a phase of rapid growth and development, the body weight and BMI was measured to determine whether exercise interferes with normal growth. As demonstrates in our results the exercise protocol and the fish oil supplementation, at any time during the study period did not negatively modulate the body evolution of the juvenile rats.

With respect to lipid profile, we observed that the effect of the exercise coupled with fish oil supplementation decreases the values of total cholesterol when compared Fo&Ex to Fo&S. In addition Fo&Ex showed decreases in TG, VLDL and atherogenic index when compared to exercised not supplemented. Additionally, it's interesting highlight that supplemented group showed the highest HDL levels and the lowest atherogenic index, suggesting that fish oil supplementation even without exercise can help markedly to decreases the risk of develop cardiovascular diseases in juvenile rats. According to the criteria for metabolic syndrome diagnosis, high levels of HDL as well as decreased levels of triglyceridemia are both considered as important factors associated to the lowest risk of cardiovascular diseases(Alberti et al. 2009). Both data from the literature and our results

regarding the lipid profile strongly support the idea that fish oil supplementation combined with moderate treadmill exercise can decrease the risk of cardiovascular disease in rats.

More than 30 years ago, Holloszy and his colleagues first reported that endurance exercise training improves oxidative metabolism and it is generally recognized that endurance exercise training elevates the activities of mitochondrial enzymes. Our data showed that exercise and fish oil supplementation is able to increase citrate synthase activity in the heart of juvenile rat. In agreement with our data, a recent study using maternal omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation showed significantly enhanced activities of citrate synthase, isocitrate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase (i.e. enzymes of Krebs cycle) (Kasbi-Chadli et al. 2014). Last year, we have published a manuscript here we showed that moderate exercise coupled with fish oil supplementation increases the activity of citrate synthase in adult and aged rats [21]. Since heart needs high level of ATP, situations that may improve ATP production will be always a positive modulation for heart function. It's worth mention here that an increase in the accumulation of Krebs cycle products (i.e. NADH and FADH₂) results in a stronger regulation of mitochondrial function, coupling Krebs cycle product with ATP production (Chance et al. 1956; Harris et al. 1991).

Taken together, our data suggest that moderate exercise coupled with fish oil supplementation affect positively lipid profile, antioxidant and metabolic enzymes in juvenile rats during development. To the best of our knowledge, the present data are the first findings to demonstrate that there is a reduction of atherogenic risk by direct improvement of lipid profile in association with an increase of antioxidant and metabolic enzymes in the hearts of juvenile rats. Therefore our results suggest that an early intervention with moderate exercise with omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation could help to decrease the incidence and severity of cardiometabolic diseases, in part by the reduction of the damage that occurs through oxidative stress.

5. Acknowledgements and Funding Information

The authors are thankful to the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development MCTI/CNPq/Universal 2014-444500/2014-6) and FACEPE (Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ 1026.4-09/12) that provided financial fund for this work. The authors also acknowledge the scholarships provided by CNPq to PFCM, and by CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) to JSVM, CFM and LARC.

6. References:

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. **Methods Enzymol** 105: 121-6.
- Aksenov, M.Y. and Markesbery, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 302: 141-5.
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., Smith, S.C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S., and International Association for the Study of, O. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation** 120: 1640-5.
- Anderson, E.J., Thayne, K.A., Harris, M., Shaikh, S.R., Darden, T.M., Lark, D.S., Williams, J.M., Chitwood, W.R., Kypson, A.P., and Rodriguez, E. (2014). Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPARgamma activation? **Antioxid Redox Signal** 21: 1156-63.
- Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A., Mendes-da-Silva, R.F., and Guedes, R.C. (2012). Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Exp Gerontol** 47: 452-7.
- Bourre, J.M. (2005). Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful ? **J Nutr Health Aging** 9: 232-42.
- Bourre, J.M., Dumont, O., Pascal, G., and Durand, G. (1993). Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. **J Nutr** 123: 1313-9.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-54.
- Buckingham, M., Meilhac, S., and Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. **Nat Rev Genet** 6: 826-35.
- Castillo, R.L., Arias, C., and Farias, J.G. (2014). Omega 3 chronic supplementation attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury through reinforcement of antioxidant defense system in rats. **Cell Biochem Funct** 32: 274-81.
- Chance, B. and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol Relat Subj Biochem** 17: 65-134.
- da Silva, A.I., Braz, G.R., Silva-Filho, R., Pedroza, A.A., Ferreira, D.S., Manhaes de Castro, R., and Lagranha, C. (2015). Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. **Appl Physiol Nutr Metab** 40: 565-74.
- da Silva Pedroza, A.A., Lopes, A., Mendes da Silva, R.F., Braz, G.R., Nascimento, L.P., Ferreira, D.S., dos Santos, A.A., Batista-de-Oliveira-Hornsby, M., and Lagranha, C.J. (2015).

Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? **Life Sci** 137: 133-41.

Dobbing, J. and Sands, J. (1985). Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediatr** 42: 199-203.

Dobiasova, M. and Frohlich, J. (2001). The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). **Clin Biochem** 34: 583-8.

Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., and Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med** 15: 353-63.

Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N.A., and Lucia, A. (2013). Exercise is the real polypill. **Physiology (Bethesda)** 28: 330-58.

Garrel, C., Alessandri, J.M., Guesnet, P., and Al-Gubory, K.H. (2012). Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. **Int J Biochem Cell Biol** 44: 123-31.

Gharami, K., Das, M., and Das, S. (2015). Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain. **Neurochem Int** 89: 51-62.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., and Jakoby, W.B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A** 71: 3879-82.

Harris, D.A. and Das, A.M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. **Biochem J** 280 (Pt 3): 561-73.

Jurgonski, A., Juskiewicz, J., Zdunczyk, Z., and Krol, B. (2012). Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. **Nutrition** 28: 300-6.

Kasbi-Chadli, F., Boquien, C.Y., Simard, G., Ulmann, L., Mimouni, V., Leray, V., Meynier, A., Ferchaud-Roucher, V., Champ, M., Nguyen, P., and Ouguerram, K. (2014). Maternal supplementation with n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during perinatal period alleviates the metabolic syndrome disturbances in adult hamster pups fed a high-fat diet after weaning. **J Nutr Biochem** 25: 726-33.

Le Page, C., Noirez, P., Courty, J., Riou, B., Swynghedauw, B., and Besse, S. (2009). Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. **Exp Gerontol** 44: 177-82.

Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem** 247: 3170-5.

Morgane, P.J., Mokler, D.J., and Galler, J.R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev** 26: 471-83.

Nakamura, Y., Ueshima, H., Okuda, N., Higashiyama, A., Kita, Y., Kadowaki, T., Okamura, T., Murakami, Y., Okayama, A., Choudhury, S.R., Rodriguez, B., Curb, J.D., Stamler, J., and Group, I.R. (2008). Relation of dietary and other lifestyle traits to difference in serum adiponectin concentration of Japanese in Japan and Hawaii: the INTERLIPID Study. **Am J Clin Nutr** 88: 424-30.

- Nascimento, L., Freitas, C.M., Silva-Filho, R., Leite, A.C., Silva, A.B., da Silva, A.I., Ferreira, D.S., Pedroza, A.A., Maia, M.B., Fernandes, M.P., and Lagranha, C. (2014). The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab** 39: 880-7.
- Novelli, E.L., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A., Cicogna, A.C., and Novelli Filho, J.L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim** 41: 111-9.
- Porrello, E.R., Widdop, R.E., and Delbridge, L.M. (2008). Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart? **Clin Exp Pharmacol Physiol** 35: 1358-64.
- Pratt, H.D. and Tsitsika, A.K. (2007). Fetal, childhood, and adolescence interventions leading to adult disease prevention. **Prim Care** 34: 203-17; abstract v.
- Rachetti, A.L., Arida, R.M., Patti, C.L., Zanin, K.A., Fernandes-Santos, L., Frussa-Filho, R., Gomes da Silva, S., Scorza, F.A., and Cysneiros, R.M. (2013). Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. **Behav Brain Res** 237: 283-9.
- Reznick, A.Z. and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol** 233: 357-63.
- Rodrigo, R., Prieto, J.C., and Castillo, R. (2013). Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. **Clin Sci (Lond)** 124: 1-15.
- Roth, G.A., Huffman, M.D., Moran, A.E., Feigin, V., Mensah, G.A., Naghavi, M., and Murray, C.J. (2015). Global and Regional Patterns in Cardiovascular Mortality From 1990 to 2013. **Circulation** 132: 1667-78.
- Smith, J.K. (2010). Exercise and cardiovascular disease. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets** 10: 269-72.
- Stillwell, W., Jenski, L.J., Crump, F.T., and Ehringer, W. (1997). Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. **Lipids** 32: 497-506.
- Uygur, R., Aktas, C., Tulubas, F., Alpsoy, S., Topcu, B., and Ozen, O.A. (2014). Cardioprotective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Hum Exp Toxicol** 33: 435-45.
- Wang, K.C., Botting, K.J., Padhee, M., Zhang, S., McMillen, I.C., Suter, C.M., Brooks, D.A., and Morrison, J.L. (2012). Early origins of heart disease: low birth weight and the role of the insulin-like growth factor system in cardiac hypertrophy. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 39: 958-64.
- Youtz, D.J., Isfort, M.C., Eichenseer, C.M., Nelin, T.D., and Wold, L.E. (2014). In vitro effects of exercise on the heart. **Life Sci** 116: 67-73.

7. Figure Captions

Table 1. Lipid profile in juvenile rats that was submitted to moderate exercise and fish oil supplementation during development. V&S – vehicle and sedentary; V&Ex – vehicle and exercised; Fo&S – fish oil and sedentary; Fo&Ex – fish oil and exercised; FG – fasting glycaemia; TC – total cholesterol; TG – triglyceride; VLDL – very low density lipid; HDL – high density lipid and AI – atherogenic index. Values from different groups that are marked with the same letters were significantly different.

Experimental Group (n)	Blood data					
	FG (mg/dl)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	AI (arbitrary unit)
Fo&Ex (n=10)	118.56±6.80	81.72±6.1 ^a	60.24±6.25 ^a	12.05±1.25 ^a	48.85±5.14	1.04±0.05 ^a
Fo&S (n=10)	114.90±5.35	109.66±4.77 ^a	64.97±5.47	12.99±1.09	59.43±3.15 ^a	1.01±0.04 ^b
V&Ex (n=10)	121.33±4.89	84.69±3.66	82.01±4.29 ^a	16.40±0.86 ^a	51.14±4.51	1.16±0.02 ^a
V&S (n=10)	124.38±4.92	97.66±9.66	79.27±5.75	15.85±1.15	43.90±2.50 ^a	1.14±0.03 ^b

Figure 1. Murinometric data of the young rats are presented as mean $\pm$ SEM. These rats were previously subdivided into exercised and sedentary groups, and they received one single daily dose of fish oil or vehicle solution (for 4 weeks). The body weight (A), body mass index (B) and abdominal and thoracic circumferences ratio (c) were determined as previously described (Novelli, 2007). The measurements were made in rats under anesthesia with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA). Two-way ANOVA test ($p>0.05$) did not find significant differences of body mass index and the AC/TC ratio among young rats from distinct experimental groups.

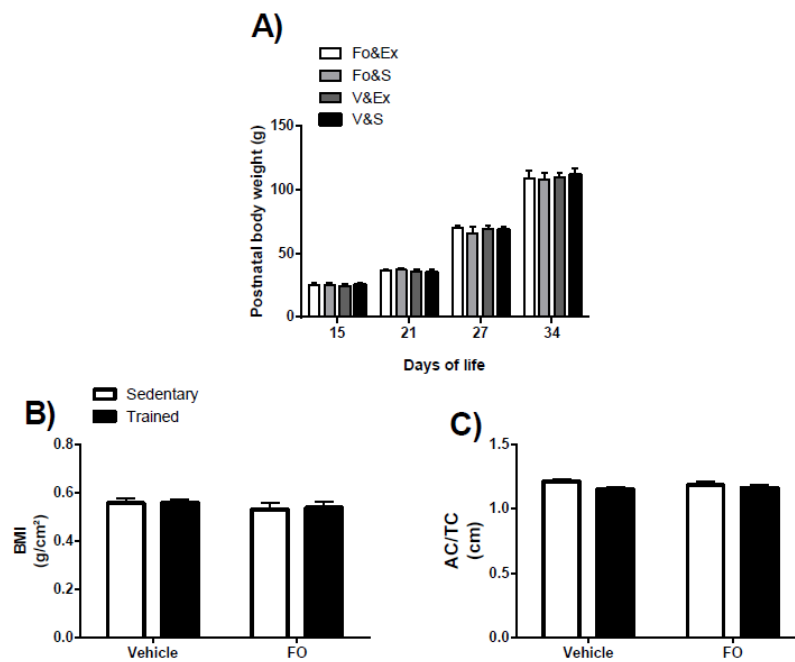


Figure 2. Oxidative stress biomarkers evaluated in heart from juvenile rats. All data are presented as mean $\pm$ SEM. These rats were previously subdivided into exercised and sedentary groups, and they received one single daily dose of fish oil or vehicle solution (for 4 weeks). A) Lipid peroxidation evaluated by malondialdehyde concentration; B) Protein oxidation evaluated by the concentration of carbonyls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

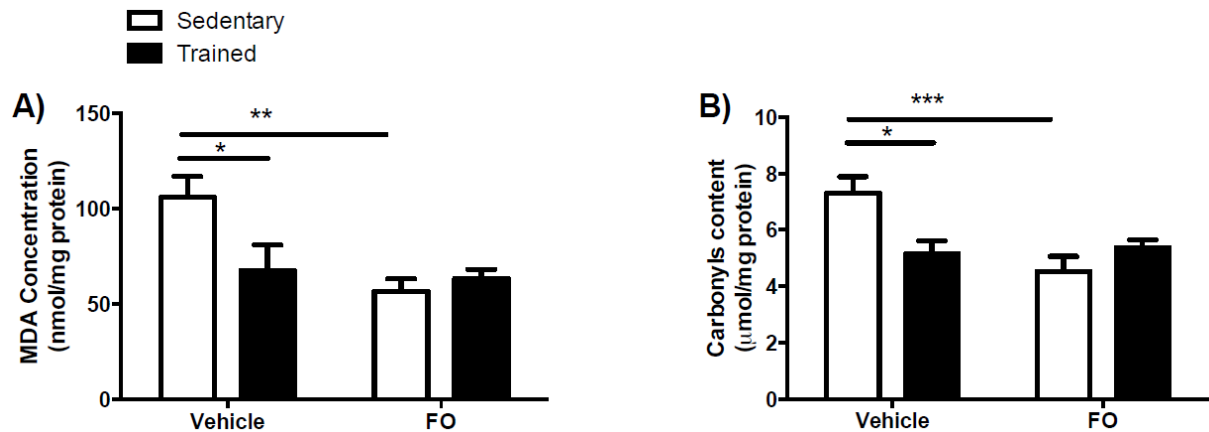


Figure 3. Antioxidant defense evaluating enzymatic and non-enzymatic system in heart from juvenile rats. All data are presented as mean $\pm$ SEM. These rats were previously subdivided into exercised and sedentary groups, and they received one single daily dose of fish oil or vehicle solution (for 4 weeks). A) Superoxide dismutase activity; B) Catalase activity; C) Glutathione-S-transferase activity; D) Reduced Glutathione; E) Thiol levels. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

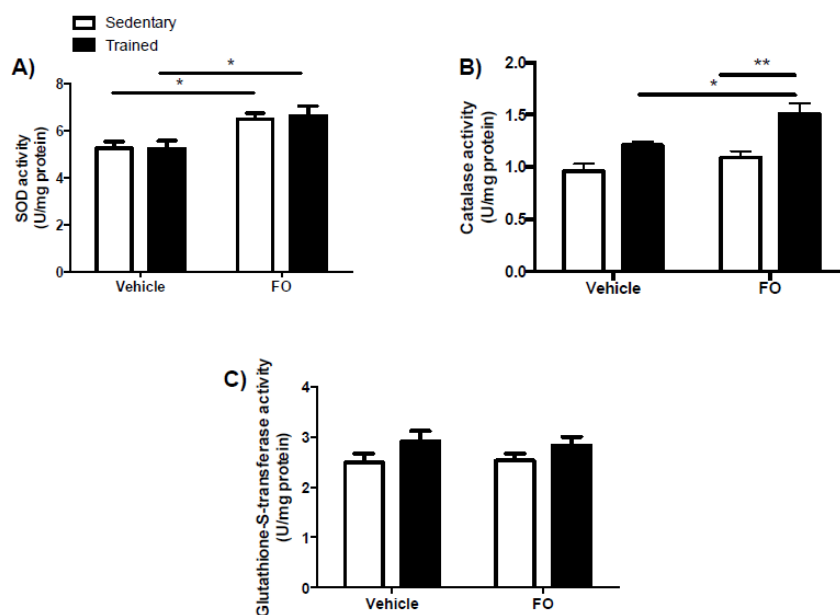
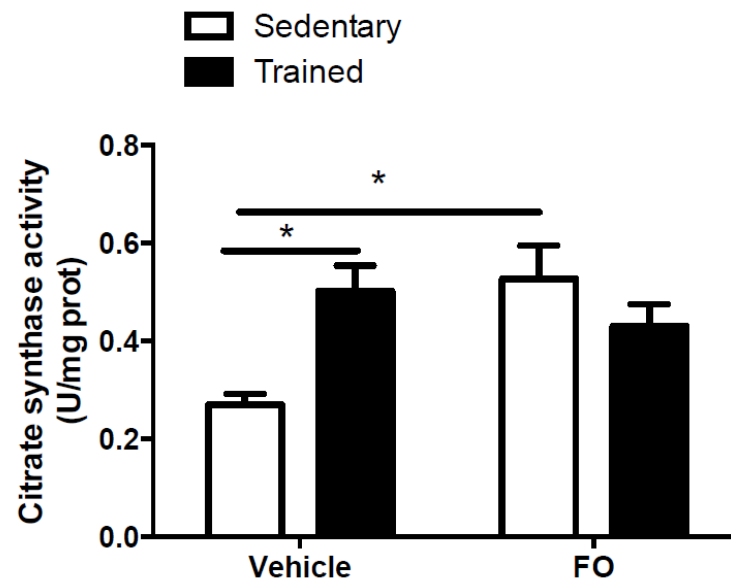


Figure 4. Oxidative metabolic marker evaluated heart from juvenile rats. All data are presented as mean $\pm$ SEM. These rats were previously subdivided into exercised and sedentary groups, and they received one single daily dose of fish oil or vehicle solution (for 4 weeks). * $p < 0.05$



ANEXO

A – Folha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do CCS/UFPE.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 19 de novembro de 2014.

Ofício nº 75/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª Manuella Batista de Oliveira Hornsby**
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.027072/2014-20

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeitos do exercício em esteira e da suplementação com óleo de peixe sobre ansiedade, estresse oxidativo, proliferação celular, memória episódica e excitabilidade cerebral em ratos Wistar.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE;
Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 7 a 150 dias; Peso: 15 a 500g; Sexo: machos; Nº total de animais: 144.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver