



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM NUTRIÇÃO



ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BASES EXPERIMENTAIS DA NUTRIÇÃO

HELOÍSA MIRELLE COSTA MONTEIRO

**REPERCUSSÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA
FLUOXETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO: ANÁLISE DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS
PRECOCEMENTE HIPERNUTRIDOS**

RECIFE-PE
2016

HELOÍSA MIRELLE COSTA MONTEIRO

**REPERCUSSÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA
FLUOXETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO: ANÁLISE DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS
PRECOCEMENTE HIPERNUTRIDOS**

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-graduação em
Nutrição/UFPE, para a obtenção do
título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Dr^a. Ângela Amâncio dos Santos

Prof^a Associada do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

**RECIFE-PE
2016**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M775r Monteiro, Heloisa Mirelle Costa.
Repercussões do exercício físico e da fluoxetina sobre o sistema nervoso: análise da depressão alastrante cortical em ratos precocemente hipernutridos / Heloisa Mirelle Costa Monteiro. – 2016.
127 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Ângela Amâncio dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Depressão alastrante cortical. 2. Exercício físico. 3. Fluoxetina. 4. Hipernutrição. 5. Parâmetros murinométricos. I. Santos, Ângela Amâncio dos (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-045)

HELOÍSA MIRELLE COSTA MONTEIRO

**REPERCUSSÕES DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA
FLUOXETINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO: ANÁLISE DA
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS
PRECOCEMENTE HIPERNUTRIDOS**

Tese aprovada em: 15 de fevereiro de 2016.

Banca examinadora:

Dra. Ana Paula Rocha de Melo / UFPE

Dra. Angélica da Silva Tenório / UFPE

Dr. Filipe Silveira Duarte / UFPE

Dra. Gisélia de Santana Muniz / UPE

Dr. Ricardo Abadie Guedes / UFPE

Recife – PE
2016

Dedico este trabalho a Deus, meus pais, Maria Madalena Monteiro Costa e Benedito da Costa Guimarães, e marido, João Guedes Peixoto Neto. A presença de todos dá sentido à minha vida e o incentivo diário me impulsiona a seguir adiante em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, iluminar meu caminho e me proporcionar saúde e disposição em busca dos meus ideais;

À minha família, que através do seu amor contribui para meu enriquecimento pessoal e profissional. Em especial, minha mãe, que nunca mediu esforços para me proporcionar a melhor educação e para me ver feliz, mesmo que isso tenha nos custado viver longe uma da outra. Te amo, mãe. Nunca terei palavras para agradecer tudo que fez e faz por mim.

Ao meu marido, João, pelo companheirismo. Considerado meu “IC nos finais de semana” pelos nossos amigos, nunca se recusou a me acompanhar ao laboratório nos finais semana e feriados ou fez cara de desaprovação pelas inúmeras festividades que tivemos que perder para a realização dos experimentos. Você é meu anjo protetor, meu amigo e meu amor. Te amo. Obrigada.

À minha família recifense, composta por amigos que conquistei desde o período da residência em Nutrição Clínica, mestrado e doutorado, Thays Kallyne, Rebbeca Peixoto, Isis, Danielle Carvalho (Dan), Leila, Daniela Wanderley, Claudete Xavier, Amanda Marcelino, Gisélia Muniz, Alinny Roseno, Riciele Lopes, Gisele Machado, Emerson Alexandre. Obrigada pelo incentivo, pelos momentos agradabilíssimos e pelo carinhoso acolhimento em Recife. A presença de vocês na minha vida minimiza a solidão por estar longe de casa.

Às minhas amigas, também professoras da UFS, Carolina de Oliveira e Adriana Souza. Encontrar amigos no ambiente de trabalho torna o dia a dia mais leve e mais alegre. Obrigada pelo incentivo e disponibilidade de vocês em me auxiliar nas demandas exigidas durante o período em que estive afastada.

À companheira de doutorado Mariana Séfora, pela disponibilidade, troca de idéias e por ter desenvolvido comigo parte deste trabalho. Além disso, apesar de nos conhecermos a apenas dois anos, você me mostrou uma amizade que só faz crescer. Te admiro muito.

À Ângela Amâncio dos Santos, minha orientadora, pelas incontáveis horas dedicadas ao meu ensinamento, levantando sempre questões pertinentes e que me faziam pensar. Agradeço

também por sua confiança em meu trabalho e pela sua imensurável contribuição, sem a qual esse trabalho não teria sido realizado da maneira valiosa como foi. Agradeço por sua disponibilidade irrestrita e por ter acompanhando boa parte das minhas conquistas profissionais. Terás sempre minha gratidão e amizade.

Aos estudantes de Iniciação Científica que passaram no laboratório ao longo desses 4 anos e me ajudaram na realização dos experimentos, Nathalia Silva, Glacyelle Santos, Amanda Santos, Débora Mendonça, Vanessa Gondim, Ana Cristina Alves, Adson Cruz e Yasmin Holanda. Vocês fazem parte deste trabalho.

Aos mestrandos Ivanildo Júnior e Humberto Moura, pela amizade, disponibilidade e paciência ao repassarem seus conhecimentos sobre as técnicas de dosagem bioquímica e coleta de tecidos.

As pessoas maravilhosas que conheci no departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFPE, Prof^a Belmira, Prof. Reginaldo, Djanah Cota. Agradeço pela disponibilidade e gentileza de vocês.

Aos veterinários Diogénes França e Cláudia Oliveira pelo fornecimento dos animais;

À professora Ana Paula, pelo acompanhamento no desenvolvimento da tese, com valiosas contribuições realizadas nas qualificações anuais do Programa de Pós-graduação em Nutrição / UFPE;

A todos os professores que passaram por mim ao longo da minha vida acadêmica e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia / UFPE;

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que tornaram possível a realização deste trabalho.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar”.

Paulo Freire

RESUMO

Introdução: Evidências experimentais anteriores mostram que fatores ambientais ou farmacológicos, como o exercício físico e a fluoxetina, reduzem a velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (DAC) em ratos. Contudo, o tratamento com 10 mg/kg/d s.c. de fluoxetina foi menos eficiente em antagonizar a DAC, quando comparado com doses maiores. **Objetivos:** No presente trabalho foi inicialmente avaliado se o exercício em esteira poderia potencializar o efeito daquela dose de fluoxetina em ratos adultos jovens. Adicionalmente, conhecendo-se a influência do estado nutricional no início da vida sobre a propagação da DAC, foi observado se o efeito daquela combinação poderia ser modulado pela hipernutrição no período de aleitamento. **Materiais e métodos:** Os animais foram separados em grupos que receberam, por gavagem, 10 mg/kg/d de fluoxetina ou água destilada (grupos F e A, respectivamente) por 21 dias. Metade dos animais de cada situação acima realizou exercício em esteira (grupos E) e a outra parte não se exercitou (grupo sedentário; S) no mesmo período. Aos 40 e 60 dias de idade foram realizadas medições murinométricas e aos 61-81 dias de vida, foi registrada a DAC. Os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados com animais que receberam durante a lactação dieta hipercalórica/hiperlipídica manipuladas pela Rhoster® (grupos H) ou dieta normocalórica/normolipídica manipuladas pela Rhoster® (grupos N), para comparação com os grupos H. Metade dos animais N também realizou o protocolo de exercícios. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que em condições nutricionais padrão de lactação, o grupo FE apresentou redução significativa de ganho de peso, porém não houve diferença significativa entre os grupos sobre os outros parâmetros murinométricos avaliados. A hipernutrição na lactação aumentou significativamente o peso corporal, as circunferências torácica (CT) e abdominal (CA) e o índice Lee dos animais aos 40 dias de vida. Aos 60 dias, as CA e CT permaneceram aumentadas nos animais H. O exercício diminuiu CA no grupo H comparados com o seu controle sedentário. Nos animais hipernutridos, a fluoxetina reduziu, enquanto o exercício aumentou a quantidade do tecido adiposo retroperitoneal. Nossos resultados também mostraram que o exercício físico, bem como a fluoxetina, isoladamente, reduziu a velocidade de propagação da DAC tanto nos animais normonutridos, como nos hipernutridos. Nos normonutridos, a associação exercício físico + fluoxetina potencializou a redução da velocidade da DAC. A hipernutrição no aleitamento aumentou a velocidade de propagação da DAC, mas não impediu o efeito antagônico das duas variáveis ambientais sobre a DAC. **Conclusão:** Nossos resultados fortalecem os achados de que o estado nutricional precoce, o exercício físico, e a fluoxetina, todos afetam o funcionamento eletrofisiológico cerebral.

Palavras chave: Depressão Alastrante Cortical. Exercício físico. Fluoxetina. Hipernutrição. Parâmetros murinométricos.

ABSTRACT

Introduction: Previous experimental evidence shows that environmental or pharmacological factors, such as physical exercise and fluoxetine reduce the propagation velocity of cortical spreading depression (CSD) in rats. However, treatment with 10 mg/kg/d s.c. fluoxetine was less effective in antagonizing CSD, when compared with higher doses. **Aims:** In the present study, it evaluated initially whether treadmill exercise could potentiate the effect of that dose of fluoxetine in young adult rats. Additionally, by knowing the influence of nutritional status early in life on the CSD features, it observed if over-nutrition during lactation could modulate the association above. **Materials and methods:** Animals from standard Lab chow diet condition, received either fluoxetine (10 mg/kg/day, by gavage) or distilled water (groups F and W, respectively) for 21 days. Half of the animals in each diet condition ran on treadmill (group exercised; E) and the other half did not exercise (group sedentary; S) on the same period above. Body parameters were obtained at 40 and 60 days of life and CSD was recorded at 61-81 days. Animals, which mothers received during lactation high caloric and fat diet by Rhooster® (groups H), underwent the same approaches as above described. Another fifteen animals were from mothers that received during lactation a normocaloric and normolipidic diet by Rhooster® (group N), in order to compare to groups H. Half of animals N also performed the exercise protocol. **Results:** Our findings show that in standard nutritional lactating condition, FE group had significant reduction in weight gain, but there was no significant difference between the groups on the other body parameters evaluated. The over-nutrition in lactation increased significantly body weight, thoracic circumference (TC), abdominal circumference (CA) and Lee index of the animals at 40 days of life. At 60 days of life, TC and AC remained increased in animals H. Physical exercise reduced AC in the group H. In the over-nourished animals, fluoxetine reduced, while exercising increased the amount of retroperitoneal adipose tissue. Our results also showed that physical exercise as well as fluoxetine reduced the CSD velocity in both well-nourished and over-nourished animals. In well-nourished animals, the combination physical exercise+fluoxetine enhanced the reduction on CSD velocity. The over-nourishment increased the velocity of propagation of CSD and did not impaired the antagonistic effect of those two environmental variables on CSD. **Conclusion:** Our results support the findings that early nutritional status, exercise, and fluoxetine, all affect the brain electrophysiological functioning.

Keywords: Cortical spreading depression. Physical Exercise. Fluoxetine. Overnutrition. Body parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Sequência de eventos (A-F) que ocorrem durante o fenômeno reversível da depressão alastrante cortical (DAC). 27
- Fig. 2 Representação esquemática do delineamento experimental. Foi utilizado um número de animais entre 7 e 11 em cada grupo. 34
- Fig. 3 Sequência de eventos para determinação do comprimento nasoanal. 35
- Fig. 4 Procedimentos para avaliação das circunferências torácica (A) e abdominal (B). 36

Figuras do 1º artigo:

- Fig. 1 Ganho de peso dos animais entre 40 e 60 dias. 42
- Fig. 2 Registos representativos da alteração lenta de potencial (P) da depressão alastrante cortical (DAC) elicitada pelo KCl de quatro ratos entre 61-81 dias de idade, como se segue: um rato do grupo de controle (W) e outros a partir dos três grupos experimentais, exercitados (E), fluoxetina (F) e exercício + fluoxetina (EF). 44
- Fig. 3 Velocidades da DAC em ratos adultos jovens tratados, por gavagem, durante 40-60 dias após o nascimento, com fluoxetina (F; 10 mg/kg /dia) ou o volume equivalente de veículo (água destilada, W). 45

Figuras do 2º artigo:

- Fig. 1 Evolução corporal de ratos previamente amamentados por mães que receberam dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica (HF) durante a lactação. 56
- Fig. 2 **A** - Registos representativos da alteração lenta de potencial (P) da depressão alastrante cortical (DAC) elicitada pelo KCl em 6 ratos com 61-81 dias de idade, como segue: dois ratos controle - água, dois hiperlipídicos - água e dois hiperlipídicos - fluoxetina. **B** - Velocidade de propagação da DAC em ratos adultos previamente amamentados por mães que receberam o controle (C) ou dieta hiperlipídica (HF). 59

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Ingredientes utilizados nas dietas experimentais utilizadas no estudo.	32
Tab. 2	Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo.	32
Tab. 3	Composição percentual dos ácidos graxos das dietas experimentais utilizadas no estudo.	33

Tabela 1º artigo

Tab. 1	Efeito da administração de fluoxetina e exercício em esteira em parâmetros morfométricas em ratos Wistar.	43
--------	---	----

Tabelas 2º artigo

Tab. 1	Composição das dietas experimentais controle (C) e hiperlipídica (HF) no período de lactação.	53
Tab. 2	Efeito do exercício e/ou administração de fluoxetina sobre parâmetros corporais e gordura visceral em ratos Wistar.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT1A – Transportador da serotonina 1A

AIN - American Institute of Nutrition

ATP-CP – sistema fosfagênio – fosfato de creatina , Adenosina trifosfato – fosfocreatina

BDNF – Fator neurotrófico Derivado do Cérebro

CSD – Cortical Spreading Depression

DAC – Depressão Alastrante Cortical

FCEV - Fator de crescimento endotelial vascular

GLUT 4 – Transportador de glicose – 4

IMC – Índice de Massa Corporal

ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

mRNA – RNA mensageiro

NPY – Neuropeptídeo Y

POMC – Pro-opiomelanocortina

TMR – Taxa metabólica de repouso

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

VLV – Variação Lenta de Voltagem

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Importância do exercício físico no tratamento da obesidade e no funcionamento adequado do sistema nervoso.....	19
2.2 Sistema serotoninérgico e fluoxetina: relação com a obesidade e sistema nervoso.....	21
2.3 Efeitos metabólicos e cerebrais da hipernutrição materna no período perinatal.....	23
2.4 Depressão Alastrante Cortical: estudo da excitabilidade neuronal.....	26
3. JUSTIFICATIVA	29
4. HIPÓTESE.....	29
5. OBJETIVO.....	30
5.1 Objetivo geral.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
6.1 Animais	30
6.2 Manipulação nutricional.....	31
6.3 Tratamento farmacológico.....	33
6.4 Exercício Físico.....	34
6.5 Determinações murinométricas	35
6.5.1 Peso corporal	35
6.5.2 Determinação do Índice de Lee	35
6.5.3 Determinação das circunferências abdominais e torácicas	35
6.6 Procedimentos para registro da depressão alastrante cortical.....	36
6.6.1 Cirurgia	36
6.6.2 Registros eletrofisiológicos	36

6.7 Coleta de tecido adiposo.....	37
6.8 Análise estatística.....	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Artigo Original 1: Exercício físico versus fluoxetina: efeitos antagônicos sobre a depressão alastrante cortical em ratos Wistar.....	38
7.2 Artigo Original 2: Exercício físico e/ou fluoxetina atenua o efeito facilitador da exposição de uma dieta hiperlipídica sobre a depressão alastrante cortical na prole de ratos.....	50
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES.....	84
ANEXOS.....	125

1. APRESENTAÇÃO

A serotonina (5- hidroxitriptamina; 5-HT) é amplamente distribuída no sistema nervoso central, onde funciona como neurotransmissor e neuro-hormônio. Essa monoamina atua em diversas funções no organismo, tais como, controle do ritmo circadiano, nocicepção, secreção hormonal, alimentação, comportamento sexual, humor, entre outros (CIRANNA e CATANIA, 2014).

Alguns estudos mostram que níveis diminuídos desse neurotransmissor podem estar envolvidos com doenças psíquicas, como a depressão (SHARP e COWEN, 2011; CRESCENZO et al., 2014). Assim, alternativas terapêuticas que visam reverter ou atenuar aquela alteração incluem a utilização de drogas que aumentam a concentração de 5-HT na fenda sináptica, agindo através da inibição seletiva da recaptação de serotonina (ISRS). Dentre essa classe de medicamentos está a fluoxetina (WONG, PERRY e BYMASTER, 2005).

O aumento da disponibilidade de 5-HT, por sua vez, pode amplificar suas ações em seus múltiplos receptores nas várias regiões cerebrais. No córtex, por exemplo, a fluoxetina foi capaz de reduzir a excitabilidade (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). Adicionalmente, algumas pesquisas demonstraram que esse aumento da 5-HT parece também promover a redução do apetite em humanos e em animais experimentais (GUIMARÃES et al., 2006; LEIBOWITZ, WEISS e SUH, 1990).

Além do uso de medicamentos, medidas comportamentais são utilizadas para melhorar os níveis cerebrais de serotonina, dentre elas o exercício físico (BECKMAN e SANTOS, 2013). Sua prática parece aumentar a neuroplasticidade em vários locais do sistema serotoninérgico central (GREENWOOD e FLESHNER, 2011). Ademais, é sabido sobre os benefícios do exercício físico para a qualidade de vida (TAIROVA E DE LORENZE, 2011). Experimentalmente, o exercício físico foi capaz de atenuar as alterações dos padrões bioquímicos e murinométricos de roedores alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica (ESTADELLA et al., 2004) e ainda atenuar novo ganho de peso (HIGGINS et al., 2011).

O incentivo ao exercício físico para emagrecimento tem se tornado bastante relevante, devido ao aumento da prevalência global da obesidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (SIKORSKI et al., 2011). Vários aspectos podem estar envolvidos com a epidemia da obesidade, por exemplo, fatores genéticos, mas também fatores ambientais. Nesse último, destaca-se a abundância de alimentos palatáveis de baixo custo associado com a diminuição da atividade física (FRENCH, STORY e JEFFERY, 2001; SIKORSKI et al.,

2011). A obesidade provocada através de dieta hiperlipídica em ratos também parece estar relacionada positivamente com alterações na atividade da 5-HT em áreas cerebrais envolvidas com humor (PAPAZOGLU et al., 2015). Adicionalmente, o uso de medicamentos que atuam sobre o sistema serotoninérgico, como os ISRS, influenciam o humor (STUNKARD, FAITH e ALLISON, 2003).

Pode-se perceber que tanto o exercício físico, quanto o tratamento farmacológico com fluoxetina, são capazes de ativar o sistema serotoninérgico (WEN et al., 2014). Entretanto, os efeitos decorrentes da interação de ambos requer um esclarecimento maior. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou compreender se o efeito de uma dose subefetiva de fluoxetina pode ser potencializado pela prática de exercícios físicos em ratos adultos jovens. Adicionalmente, é bastante reconhecida a vulnerabilidade do sistema nervoso a insultos ocorridos no período perinatal (MORGANE et al., 1993), bem como tem sido descrita a influência da dieta materna no desenvolvimento da obesidade na fase adulta (BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007). Assim, nesse trabalho também investigamos o efeito da combinação do exercício físico com a fluoxetina em ratos adultos cujas mães receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica no período de lactação. Para tanto foi utilizado o modelo da “depressão alastrante da atividade elétrica cortical”, ou simplesmente “depressão alastrante cortical” (DAC) (LEÃO, 1944).

O fenômeno eletrofisiológico da DAC ocorre quando o córtex cerebral é estimulado por agentes químicos, físicos ou mecânicos; e consiste na diminuição (“depressão”) da atividade elétrica do tecido cerebral que se propaga (“alastrante”) de forma concêntrica e reversível (LEÃO, 1944). Ele vem acompanhado por uma variação lenta de voltagem (VLV), que se apresenta como uma onda de forma bem definida, com característica do tipo tudo-ou-nada, que expressa com clareza o início e o fim do fenômeno. Por essa razão, a VLV é muito utilizada para calcular a velocidade com que a DAC se propaga pelo tecido nervoso (GUEDES, ROCHA-DE-MELO e TEODÓSIO, 2004). A associação das três variáveis, hipernutrição, exercício físico e o tratamento com fluoxetina, sobre a eletrofisiologia cerebral ainda não foi investigada. Por isso, este tema é bastante relevante no que concerne a possíveis terapias no combate à depressão, obesidade, bem como à compreensão dos mecanismos eletrofisiológicos cerebrais subjacentes a estas patologias. Considerados juntos, todos esses aspectos tornaram o desenvolvimento desse estudo deveras motivador.

Os resultados da presente investigação estão contidos em dois artigos originais. O primeiro foi publicado na revista “European Journal of Pharmacology”, intitulado de “*Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in*

Wistar rats". O segundo foi submetido à revista "Neuroscience" com o título de "*Physical exercise and/or fluoxetine attenuate the facilitator effect of high fat diet exposure on cortical spreading depression in rat offspring*".

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do exercício físico no tratamento da obesidade e no funcionamento adequado do sistema nervoso

O exercício físico é compreendido como toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva (CASPERSEN, POWELL e CHISTENSON, 1985). Durante sua execução, geralmente, operam todos os três sistemas de transferência de energia: o sistema fosfogênio-fosfato de creatina (ATP-CP), o sistema glicolítico ou do ácido láctico e o aeróbico (MACDARLE et al., 2008).

As atividades físicas rápidas contam quase exclusivamente com a energia “imediate” gerada pelo fracionamento dos fosfatos de alta energia armazenados nos músculos. À medida que o exercício progride, a maior parte da energia ainda é gerada através das vias anaeróbicas, utilizando-se o sistema de energia em curto prazo, glicólise, com formação subsequente de ácido láctico. Com o prolongamento do tempo de exercício, 99% da demanda energética são gerados pelo metabolismo aeróbico (MACDARLE et al., 2008).

Os benefícios do exercício físico estão nos aspectos relacionados aos seus efeitos agudos e crônicos sobre a mobilização e utilização de gorduras, contribuindo com o emagrecimento (TROMBETTA, 2003). Além de influenciar diretamente o gasto calórico, a atividade física mantém o metabolismo aumentado por um longo período após a sua execução (TROMBETTA, 2003). Por conseguinte, as respostas fisiológicas do exercício físico sobre a obesidade podem ser alcançadas com intensidade baixa, moderada ou alta, indicando que a manutenção de um estilo de vida ativa é o mais importante para evitar o desenvolvimento dessa doença ou suas consequências (CIOLAC e GUIMARÃES, 2004; MARCON, GUS e NEUMANN, 2011; REGNAUX et al., 2015).

Além da redução de peso, o exercício parece contribuir para o controle do diabetes do tipo 2, da resistência à insulina, da hipertensão arterial e da dislipidemia, todos esses relacionados com a obesidade (TEODORO et al., 2010; PÓVOA et al., 2014; MILIONI et al., 2014; KESHEL e COKER, 2015). Experimentalmente, o exercício físico foi capaz de atenuar as alterações dos padrões bioquímicos e murinométricos de roedores alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica (ESTADELLA et al., 2004) e ainda atenuar novo ganho de peso (HIGGINS et al., 2011).

Para o tratamento da obesidade é necessário que o gasto energético seja maior que o consumo energético diário. Neste sentido, tem sido demonstrado que mudança no estilo de vida, através da prática de exercício físico e reeducação alimentar é o melhor tratamento (CIOLAC e GUIMARÃES, 2004; KESHEL e COKER, 2015). A inclusão do exercício físico

melhora os resultados de programas de redução de peso de longo período, pois eleva a taxa metabólica de repouso (TMR) após a sua realização, pelo aumento da oxidação de substratos, níveis de catecolaminas e estimulação da síntese protéica (HORTON, 1985). A maior oxidação de substratos ocorre principalmente pelo aumento da atividade da enzima lipase hormônio sensível (enzima responsável pela maior mobilização de lipídios no tecido adiposo) e pelo aumento da densidade mitocondrial, potencializando a oxidação de lipídios e favorecendo assim o emagrecimento (TROMBETTA, 2003)

O exercício físico, tanto em seres humanos como em animais experimentais, parece atuar em outros sistemas corporais, como o sistema nervoso (KNAEPEN et al., 2010; JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015). Por exemplo, foi observado que a prática de exercícios físicos traz benefícios à manutenção da integridade cerebral, produz angiogênese e aumenta a densidade das conexões dendríticas (PYSH e WEISS, 1979; GAO et al., 2014; JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015). Ele também tem sido relacionado com o aprimoramento da aprendizagem e memória, processos cognitivos associados à neurogênese cerebral (RADAK et al., 2001).

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar os efeitos neurofisiológicos decorrentes da prática de exercícios físicos. Dentre elas, destacam-se alterações nos níveis de neurotransmissores; ativação da ação de neurotrofinas; aumento da vascularização, dos níveis de proteínas sinápticas (sinapsinas e sinaptofisinas; VAYNMAN, et al. 2006), do número de receptores glutamatérgicos (FARMER, et al. 2004), estimulação de neurogênese hipocampal (VAN PRAAG, 2008; HAMILTON e RHODES, 2015) e regeneração axonal (ZHANG et al., 2014).

O exercício físico também se relaciona positivamente o sistema serotoninérgico (WANG et al., 2013). Por exemplo, o exercício em esteira por uma hora estimulou a liberação de serotonina no hipocampo em ratos em jejum (MEEUSEN et al., 1996). Em outro estudo, foi verificado que os efeitos do exercício físico sobre o sistema serotoninérgico podem ser superiores que os de drogas utilizadas para aumentar os níveis desse neurotransmissor no cérebro e tratar doenças psíquicas, como a fluoxetina (WEN et al., 2014). Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido quanto aos benefícios do exercício físico sozinho ou combinado com uso de medicamentos sobre o sistema nervoso.

2.2 Sistema serotoninérgico e fluoxetina: relação com a obesidade e sistema nervoso

A serotonina (5- hidroxitriptamina; 5-HT) é um neurotransmissor produzido nos núcleos da rafe do tronco cerebral e formam o sistema eferente mais complexo do cérebro humano (CHARNAY e LÉGER, 2010). Os neurônios serotoninérgicos estão entre os que nascem mais precocemente no sistema nervoso central e a 5-HT parece atuar como um fator neurotrófico que participa do crescimento e desenvolvimento do sistema serotoninérgico e de outros sistemas neurotransmissores cerebrais (BERUMEN et al., 2012). Essas evidências são claras, uma vez que os neurônios serotoninérgicos se projetam para uma grande variedade de regiões do sistema nervoso central, incluindo medula espinal, cerebelo, córtex frontal, hipotálamo, hipocampo e estriado (BEST, NIJHOUT e REED, 2010). Entretanto, no cérebro, os maiores níveis de 5-HT são encontrados no complexo nuclear dorsal e mediano da rafe (SGHENDO e MIFSUD, 2012).

A 5-HT no cérebro é sintetizada a partir do aminoácido essencial L-triptofano (FERNSTROM, 1983). É produzida e estocada em vesículas na área pré-sináptica e, após o surgimento de um potencial de ação, é liberada na sinapse, onde pode interagir com receptores pré e pós-sinápticos (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Alterações nesse sistema de transmissão estão relacionadas com várias disfunções, como por exemplo, obesidade e depressão psíquica (BELLO e LIANG, 2011; SHARP e COWEN, 2012).

A relação da 5-HT com a obesidade advém do fato de que essa amina é o principal neurotransmissor modulador do apetite e um agente anorético potente. Adicionalmente, a administração de dieta hiperlipídica em ratos está relacionada com alterações na atividade da 5-HT (PAPAZOGLU et al., 2015). Nesse sentido, sabendo-se que há um número considerável de projeções neuronais serotoninérgicas desde os núcleos da rafe até os núcleos hipotalâmicos (paraventricular e arqueado) (CHURRUCA et al., 2004) é possível que alterações genéticas ou induzidas por dieta na via de transmissão sináptica núcleos de rafe-hipotálamo podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e perpetuação da obesidade (BELLO e LIANG, 2011; NASCIMENTO et al., 2015).

Com relação à depressão psíquica, estudos mostram que há uma forte associação entre diminuição da função da 5-HT e estado depressivo agudo, bem como maior vulnerabilidade à depressão (BHAGWAGAR, WHALE e COWEN, 2002; SHARP e COWEN, 2011). Nesses casos, o mecanismo que tem sido sugerido envolve alterações relacionadas com o transportador de 5-HT (SERT), o qual é responsável pela recaptação da amina na fenda sináptica (BEST, NIJHOUT e REED, 2010; KAMBEITZ e HOWES, 2015; OLIVIER, 2015).

O processo de recaptação promove a reabsorção neuronal pré-sináptica do neurotransmissor e tem função regulatória (OLIVIER, 2015). No entanto, cabe ressaltar que, essa doença não é determinada apenas pela forma e atividade desses circuitos neuronais, podendo ser resultado de uma interação entre insulto ambiental e fatores genéticos (CASPI et al., 2002; NORDQUIST e ORELAND, 2010).

A provável participação da 5-HT nos mecanismos subjacentes à obesidade e depressão incentivou o desenvolvimento de drogas que estimulam a neurotransmissão serotoninérgica, como a fluoxetina (MACGILLIVRAY et al., 2012; SUN et al., 2015). Esta pertence a uma classe de medicamentos conhecidos como inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), cujo mecanismo de ação principal é o aumento da disponibilidade daquela amina na fenda sináptica (HIEMKE e HÄRTTER, 2000).

Estudos com humanos e animais experimentais mostram que o aumento da disponibilidade cerebral de serotonina (5-HT) promove redução de apetite (LEIBOWITZ, WEISS e SUH, 1990; GUIMARÃES et al., 2006). A fluoxetina parece agir diretamente no tecido adiposo, diminuindo *in vitro* o acúmulo de gordura através da inibição da proliferação e diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo (SUN et al., 2015). Em animais geneticamente obesos, o tratamento com 10 mg/kg i.p. por duas semanas, reduziu a ingestão alimentar, o peso e a gordura corporal total (CHURRUCA et al., 2004). Postula-se que esse efeito da fluoxetina seja devido a diminuição da ação do neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo paraventricular do hipotálamo, local em que o NPY produz efeitos hiperfágicos (GUTIÉRREZ et al., 2002). No tratamento da depressão, o efeito antidepressivo da fluoxetina é decorrente do bloqueio da recaptação de 5-HT na fenda sináptica, o que promove aumento da disponibilidade neuronal daquela amina (OLIVIER, 2015).

Entretanto, o tratamento com ISRS apresenta um longo período de latência até o início de sua eficácia terapêutica (SHARP e COWEN, 2011). Ademais, provoca efeitos adversos, muitas vezes mal tolerados, como ansiedade, insônia, que comprometem a aderência ao tratamento (SHARP e COWEN, 2011). Assim, se exercício físico, reconhecidamente um ativador do sistema serotoninérgico, reforçar o efeito do tratamento com ISRS, a combinação desses fatores farmacológico e comportamental seria uma estratégia simples e de baixo custo no combate aos transtornos depressivos. Isto poderia uma relevância ainda mais expressiva na vigência de obesidade/hipernutrição.

2.3 Efeitos metabólicos e cerebrais da hipernutrição materna no período perinatal

A condição nutricional é um fator ambiental que influencia de forma importante o crescimento e o desenvolvimento do organismo (PEDRAZA e QUEIROZ, 2011). Esta participação se inicia ainda em fases tenras de vida, de forma indireta, através da mãe (VALLE, DURCE e FERREIRA, 2008).

A nutrição fetal é influenciada pelo tamanho e composição corporal, bem como pela dieta materna. O desequilíbrio de nutrientes, além de contribuir para o desenvolvimento de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (AYRES et al., 2012), se persistente, durante o período fetal e início do pós-natal, pode influenciar de forma permanente o crescimento, a estrutura e o metabolismo de seus descendentes (FALL, 2012; LECOUTRE e BRETON, 2015).

Segundo a definição de Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença, experiências ambientais individuais no útero e durante o desenvolvimento precoce podem afetar a saúde e a susceptibilidade à doença nas fases posteriores da vida nos descendentes (GAGE, MUNAFÒ e DAVEY SMITH, 2016). Por exemplo, a subnutrição ou excesso nutricional maternos parecem modificar alguns marcadores epigenéticos, afetando a expressão gênica e as adaptações fisiológicas ao ambiente nos seus descendentes (CHAVATTE-PALMER, TARRADE e LÉVY, 2012; CHANGO e POGRIBNY, 2015). Este conceito é suportado por evidências em humanos que relacionam o crescimento infantil e a nutrição com a saúde na fase adulta, e por experimentos em animais que mostram, por exemplo, que a sub e hipernutrição materna, durante a gravidez, podem conduzir a alterações no metabolismo e composição corporal na prole adulta (SINCLAIR et al., 2007; NIGHTINGALE et al., 2015).

Em se tratando de desequilíbrios nutricionais maternos, eles podem ocorrer ou por insuficiência no consumo de energia e/ou nutrientes da mãe para o feto ou por excesso nutricional, ou seja, por consumo elevado de alimentos ricos em gorduras e/ou energia (FRENCH, STORY e JEFFERY, 2001; LECOUTRE e BRETON, 2015). Essas duas condições nutricionais, quando ocorrem no período perinatal podem programar obesidade no desenvolvimento da prole em roedores (SPENCER, 2012; LECOUTRE e BRETON, 2015).

Com relação a obesidade, esta é definida como acúmulo de gordura anormal ou excessivo que pode prejudicar a saúde e sua prevalência em todo o mundo mais do que duplicou entre 1980 e 2014, atingindo mais de 600 milhões de adultos (WHO, 2015). Sua etiologia é devido, principalmente, ao desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, resultando no aumento da massa de tecido adiposo (FRANCO et al., 2012). As consequências

dessa patologia, que incluem diabetes tipo 2, hipertensão e doença cardíaca isquêmica, representam um ônus enorme para o sistema de saúde (HOWIE et al., 2009). É importante mencionar que, em 2014, 39% das pessoas com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% da população mundial adulta eram obesos, destes 15% eram mulheres (WHO, 2015).

Os problemas com a obesidade materna estão bem documentados. Além do aumento na incidência de diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e as taxas de cesariana, estes efeitos podem ser transmitidos para os descendentes, tornando-os susceptíveis a obesidade e síndrome metabólica na idade adulta (efeitos transgeracionais) (HOWIE et al., 2009). Essas consequências são apoiadas por dados de estudos experimentais em animais, que sugerem que a hipernutrição materna programa o risco de obesidade da prole com influência no apetite, metabolismo e níveis de atividade (OKEN, 2009).

Dentro do contexto sobre a relação entre a hipernutrição materna e desenvolvimento de obesidade na prole, podemos salientar que manipulações nutricionais durante a lactação influenciam fortemente o fenótipo metabólico da prole. O período de aleitamento coincide com o período de máxima adipogênese em roedores e a modificação da ingestão de leite por filhotes oriundos de pequenas (supernutrição) ou grandes ninhadas (desnutrição) tem sido amplamente utilizada para investigar alterações no desenvolvimento do tecido adiposo (LECOUTRE e BRETON, 2015). Além disso, é sabido que a composição do leite pode ser alterada de acordo com o tipo de alimentação materna (TINOCO et al., 2007). Foi observado, por exemplo, altas concentrações de proteínas, lactose e triglicerídios no leite materno de ratas que consumiram dieta hiperlipídica e essas modificações parecem ter sido responsáveis pela indução da hipernutrição da prole (FRANCO et al., 2012). Adicionalmente, foi observado que dentre a exposição pré ou pós natal a este tipos de dietas, o período da amamentação foi mais crítico para determinar as consequências metabólicas nos descendentes (SUN et al., 2012).

Dentre os mecanismos metabólicos relacionados com a programação decorrente da hipernutrição perinatal, pode-se mencionar hiperleptinemia e hiperinsulinemia dos filhotes, os quais foram associados com maior ganho de peso e adiposidade (HOWIE et al., 2009). Esses efeitos foram encontrados mesmo na ausência de excesso de peso materno, sugerindo efeito específico da gordura saturada no metabolismo da prole (FRANCO et al., 2012). A leptina é descrita como um fator neurotrófico envolvido na plasticidade e regulação dos circuitos que regulam o apetite (FERNANDES et al., 2013). Manipulações nutricionais podem produzir alterações em longo prazo na sensibilidade da leptina do hipotálamo devido a alterações na expressão de mRNA, na localização do receptor na membrana plasmática e/ou na sinalização do receptor de leptina, resultando em diferentes efeitos sobre a capacidade dos descendentes

desenvolverem ou resistirem à obesidade (PATTERSON et al., 2010). Com relação à insulina, achados mostram que ratos alimentados por mães que receberam dieta hiperlipídica na lactação apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose, ou seja, a obesidade materna pode resultar em *downregulation* do transportador de glicose (GLUT4) no músculo esquelético na prole (SIMAR et al., 2012; VOGT et al., 2014).

A hipernutrição no início da vida parece também promover alterações cerebrais na prole (REYNOLDS et al., 2015). O consumo materno de dieta hiperlipídica reprograma permanentemente o sistema de apetite hipotalâmico, favorecendo precursores orexígenos (neuropeptídeo Y; NPY) e reduzindo os precursores anorexígenos (pro-opiomelanocortina - POMC) com consequente hiperfagia em ratos avaliados durante o período do desmame até a fase adulta (BRETON, 2013). Em contraste com os seres humanos, o desenvolvimento destes neurocircuitos hipotalâmicos em roedores não está concluída no momento do nascimento, mas continua até a terceira semana de vida pós-natal (VOGT et al., 2014). Ou seja, a saúde materna prejudicada devido à exposição da mãe a um ambiente nutricional desfavorável, pode alterar a expressão de genes de neuropeptídeos, o número de células neuronais hipotalâmicas, bem como diminuir a formação de projeções axonais hipolâmicas (VOGT et al., 2014).

A leptina e a insulina também participam das alterações neuronais decorrentes da hipernutrição materna. A leptina tem sido considerada como um fator trófico crítico que influencia o desenvolvimento de projeções hipotalâmicas, o qual continua durante o aleitamento (SUN et al., 2012). Alterações nos padrões de secreção desse hormônio (excesso ou deficiência) durante o período perinatal podem ocasionar efeitos no desenvolvimento do hipotálamo (LECOUTRE e BRETON, 2015). A hipernutrição na lactação através de dietas de cafeteria ou ricas em frutose sugere resistência central à leptina (ALZAMENDI et al., 2010). A hiperinsulinemia e a resistência à insulina resultantes de dietas hiperlipídicas no período perinatal resultou em aumento da sinalização da insulina neuronal, através da sua atuação no eixo hipotálamo-tecido adiposo (LECOUTRE e BRETON, 2015).

O excesso de gordura corporal, por sua vez, está associado com atrofia cerebral generalizada e regional, bem como mudanças na substância branca, sugerindo, portanto, que a obesidade abdominal e a gordura visceral são importantes determinantes da associação entre excesso de gordura corporal e menor volume cerebral em adultos de meia idade (DEBETTE et al., 2010; DRISCOLL et al., 2012). O excesso de peso ainda alteram respostas neurológicas de áreas do córtex cerebral, como a diminuição da ativação do córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo, quando comparados a indivíduos não obesos (LE et al., 2009).

Estudos com animais de laboratório mimetizam experiências alimentares de humanos através da administração de dietas hiperlipídicas e/ou hipercalóricas, as quais resultam em obesidade, alterando padrões murinométricos e metabólicos em ratos, mesmo quando ofertadas durante curto período de tempo (ESTADELLA et al., 2004; TORRES-LEAL et al., 2011; RHEE, PHELAN e MCCAFFERY, 2012). Adicionalmente, a exposição indireta a estas dietas em períodos críticos de desenvolvimento, como na gestação e lactação, é capaz de modificar as características sensoriais da prole, com animais obesos na fase adulta (BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007; HOWIE et al., 2009; SUN et al., 2012).

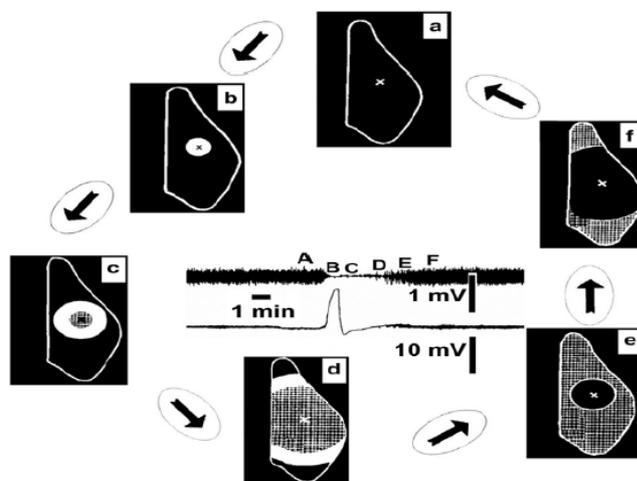
O entendimento da origem fetal da obesidade é importante, pois o excesso de peso, além de aumentar o risco de enfermidades crônicas, está relacionado com alterações psíquicas, especialmente a depressão na infância e adolescência (MANCINI e HALPERNL, 2006; MCCLURE et al., 2012). Logo, fazem-se necessárias medidas de intervenção que visem tanto a melhoria dos padrões físicos, metabólicos e funcionais, bem como dos sintomas depressivos. Dentre estas, estão o exercício físico e, em alguns casos, o uso de medicamentos como, por exemplo, a fluoxetina (MANCINI e HALPERNL, 2006; MARCON, GUS e NEUMANN, 2011; SUN et al., 2015). Ambas as situações, exercício físico e administração de fluoxetina, reduzem também a neuroexcitabilidade cortical, analisada através do fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2011).

2.4 Depressão Alastrante Cortical: estudo da excitabilidade neuronal

O fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC) foi descoberto e descrito pela primeira vez por um pesquisador brasileiro, Aristides Azevedo Pacheco Leão (1944), quando realizava estudos sobre a epilepsia experimental, na superfície do córtex cerebral de coelhos anestesiados. Ele observou que quando o córtex cerebral era estimulado por agentes químicos, físicos ou mecânicos, surgia uma diminuição (“depressão”) da atividade elétrica do tecido cerebral, que se propagava (“alastrante”) de forma concêntrica e reversível (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min), do ponto onde se iniciou, para todo o restante da população de neurônios (LEÃO, 1944). Ou seja, quando uma região do cérebro é invadida pela DAC ocorre uma depressão na amplitude do eletrocorticograma, de forma que esse registro gráfico da atividade neuronal se torna praticamente isométrico (LEÃO 1944, 1947). A DAC é acompanhada pelo aparecimento de uma variação lenta de voltagem (VLV), a qual também se

propaga de forma concêntrica e é igualmente reversível. A VLV se apresenta como uma forma de onda bem definida, com característica do tipo tudo-ou-nada; ela expressa com clareza o início e o final do fenômeno. Por essa razão, é muito utilizada para calcular a velocidade com que a DAC se propaga pelo tecido nervoso (GUEDES, ROCHA-DE-MELO e TEODÓSIO, 2004; **FIGURA 1**).

Figura 1. Sequência de eventos (A-F) que ocorrem durante o fenômeno reversível da depressão alastrante cortical (DAC). Em A, x representa o ponto do tecido cortical que é estimulado, deflagrando um episódio de DAC. O círculo branco marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, que se propaga concêntrica de forma concêntrica para outras áreas do córtex (pontos C e D). O círculo em preto mostrado em E e F indica as áreas recuperadas após a DAC. A área quadriculada representa a refratariedade cortical a uma nova estimulação após a DAC, e antes da total recuperação. Percebe-se que a recuperação é gradativa e também ocorre de forma concêntrica até finalmente retornar à condição inicial pré-DAC, mostrada em A. Ao centro, é mostrado o eletrocorticograma (ECoG) com a variação lenta de potencial (VLV) da DAC. Nota-se, no eletrocorticograma, a redução da amplitude das ondas eletrográficas, no momento em que ocorre a VLV (B, C e D), característica da DAC.



Fonte: Adaptado de GUEDES, 2011.

A ocorrência da DAC tem sido demonstrada não somente no córtex cerebral de aves, répteis e anfíbios, como também no cérebro de mamíferos, incluindo o homem (BERGER et al., 2008). O fenômeno foi evidenciado em várias estruturas do Sistema Nervoso Central como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmio, bulbo olfatório, córtex cerebelar, teto óptico e medula espinhal (LEÃO e MARTINS FERREIRA, 1958, 1961; FIFKOVA et al., 1961; STREIT, FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA, 1995; GORJI e SPERCKMANN, 2004; GUEDES et al., 2005; BERGER et al., 2008). Nesse sentido, situações experimentais

que possam alterar a susceptibilidade do tecido à DAC podem oferecer dados importantes para o entendimento deste fenômeno, cuja importância clínica reside no fato dele estar relacionado a algumas doenças neurológicas humanas, como injúria cerebral, enxaqueca e isquemia cerebral (SOMJEN et al., 1992; DREIER et al., 2011; TORRENTE et al., 2014).

Tem-se demonstrado que alterações nutricionais precoces (no aleitamento), tanto no sentido da desnutrição como no da hipernutrição, aumentam e diminuem, respectivamente, a propagação da DAC e esses efeitos persistem até a idade adulta (ROCHA-DE-MELO et al., 2006; GERMANO et al., 2013). Além disso, observou-se que o tratamento com fluoxetina na dose de 10 mg/kg/dia reduziu de forma pouco significativa a velocidade de propagação da DAC, comparada com doses maiores (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006).

Assim, reconhecendo-se a vulnerabilidade do sistema nervoso a insultos ocorridos no período perinatal (MORGANE et al., 1993), a influência da dieta materna no desenvolvimento da obesidade na fase adulta (BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007) e desta sobre o sistema nervoso, é que o presente trabalho visou investigar se a atividade eletrofisiológica cortical de ratos adultos que foram amamentados por mães alimentadas com dieta hipercalórica e hiperlipídica pode ser modificada pelo exercício físico e/ou tratamento farmacológico com uma dose subefetiva de fluoxetina.

Assim como o estado nutricional, outras condições de importância clínica que influenciam a excitabilidade neuronal podem interferir com a incidência da DAC e sua propagação. Dentre essas condições, pode-se citar como exemplo, a fluoxetina (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006), a suplementação de aminoácidos, como a arginina e a glutamina (MAIA et al., 2006; FRAZÃO, MAIA e GUEDES, 2008; LIMA et al., 2009), tratamento com doses elevadas de ácido ascórbico (MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014), consumo de álcool (ABADIE-GUEDES, GUEDES e BEZERRA, 2012) e, mais recentemente, o exercício físico (MONTEIRO et al., 2011; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Porém, os efeitos sobre a eletrofisiologia cerebral do exercício físico tardio combinado com droga capaz de aumentar a serotonina cerebral em animais hipernutridos no início da vida ainda não foram estudados. Em longo prazo, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de ações preventivas e terapêuticas concernentes aos efeitos da obesidade.

3. JUSTIFICATIVA

A serotonina é um neurotransmissor que desempenha funções importantes no organismo, tais como controle da nocicepção, alimentação, humor, entre outros (CIRANNA e CATANIA, 2014). Manipulações que envolvem esse sistema de transmissão neuronal alteram também a neuroexcitabilidade cortical, observada através da DAC. Por exemplo, a administração de fluoxetina diminui a velocidade de propagação da DAC em ratos, mas na dose de 10 mg/kg/dia foi subefetiva sobre esse fenômeno (AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). O exercício físico, que parece ativar o sistema serotoninérgico, também exerce efeito antagônico sobre esse fenômeno (MONTEIRO et al., 2011). Assim, conhecendo-se a participação dessas duas manipulações sobre o mesmo sistema neuronal, justifica-se a necessidade de investigar se o exercício físico poderia potencializar o efeito de uma dose subefetiva de fluoxetina sobre a DAC.

Além disso, sabe-se que a prevalência da obesidade no mundo quase duplicou entre 1980 e 2014 (WHO, 2015). Diante desse panorama, a exposição infantil à hipernutrição no período perinatal também pode estar aumentada. Por outro lado, alterações nutricionais nessa fase da vida podem alterar irreversivelmente o desenvolvimento cerebral e metabólico (BAYOL, FARRINGTON e STICKLAND, 2007; GERMANO et al., 2013). A desnutrição perinatal pode alterar a resposta eletrofisiológica a vários medicamentos e/ou situações metabólicas (GUEDES et al., 2002; GUEDES, ROCHA-DE-MELO e TEODÓSIO, 2004). No entanto, o efeito da hipernutrição precoce diante uma manipulação farmacológica e ambiental sobre DAC ainda não foi estudada, justificando o presente trabalho.

4. HIPÓTESES

✓ O exercício físico é capaz de reforçar o efeito antagônico da fluoxetina sobre a DAC na dose de 10 mg/kg.

✓ A hipernutrição reduzirá a excitabilidade cortical, avaliada pela DAC;

✓ A combinação dessas duas variáveis (exercício físico e dose subefetiva de fluoxetina) sobre a DAC é exacerbada pela hipernutrição no início da vida.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico e da fluoxetina em ratos adultos amamentados por mães que receberam dieta padrão ou dieta hipercalórica e hiperlipídica durante o período de desenvolvimento do cérebro sobre as características da depressão alastrante cortical (DAC).

5.2 Específicos

Em filhotes de ratos, cujas matrizes receberam dieta padrão ou hipercalórica e hiperlipídica durante a gestação:

- ✓ Acompanhar o ganho ponderal durante o aleitamento;

- ✓ Analisar o estado nutricional decorrente da realização de exercício físico e/ou tratamento com dose subefetiva de fluoxetina. Para tanto, foram adquiridas medidas ponderais e murinométricas aos 40 e 60 dias de idade;

- ✓ Avaliar, na idade adulta, os efeitos do exercício físico e/ou tratamento com dose subefetiva de fluoxetina sobre a eletrofisiologia cerebral através da deflagração e do registro de propagação da DAC.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizados 93 ratos albinos, da linhagem *Wistar*, do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE, número de controle 453/12 (Anexo A). No período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, à temperatura ambiente

de $22\pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 h (a fase clara se inicia às 6:00 h) e livre acesso à ração e água. Após a fecundação, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais.

Vinte e quatro horas após o parto (primeiro dia de vida, considerando-se o dia de nascimento como dia zero), os filhotes foram distribuídos aleatoriamente, em ninhadas de seis filhotes por mãe. Em seguida, os animais foram agrupados de acordo com a descrição abaixo.

6.2 Manipulação nutricional

A primeira parte do presente trabalho, que visou avaliar o efeito da combinação do exercício físico e da fluoxetina sobre a DAC, foi composta de animais que foram alimentados durante toda a vida com a dieta padrão usada no biotério, a ração comercial Presence (Presence Nutrição Animal). Esses animais formaram os grupos experimentais denominados de “Padrão” (grupos **P**).

Para a análise da influência da hipernutrição no início da vida, filhotes de várias mães constituíram dois grupos experimentais, nutricionalmente distintos:

1) Grupo nutrido (**N**): os filhotes foram amamentados por mães que receberam a dieta normocalórica e normolipídica baseada na AIN para fase de crescimento (Rhoster Industria e Com Ltda). Após o desmame (vigésimo primeiro dia de vida), os filhotes receberam a dieta padrão do biotério (Presence) até o dia dos experimentos eletrofisiológicos.

2) Grupo hipernutrido (**H**): os filhotes foram amamentados por mães que receberam a dieta hipercalórica e hiperlipídica baseada na AIN para fase de crescimento (Rhoster Industria e Com Ltda). Após o desmame (vigésimo primeiro dia de vida), os filhotes receberam a dieta Presence até o dia dos experimentos eletrofisiológicos.

A composição e a distribuição calórica estão descritas nas **TABELAS 1 e 2**. A composição percentual dos ácidos graxos foi realizada pela empresa CBO Análises Laboratoriais, Campinas/ São Paulo (**TABELA 3**).

Tabela 1: Ingredientes utilizados nas dietas experimentais utilizadas no estudo.

Produtos	Composição %	
	Dieta Normocalórica/normolipídica	Dieta Hipercalórica/ hiperlipídica
Caseína Láctea	22,00	21,00
Amido de Milho	39,53	28,00
Amido Dextrinizado	10,00	-
Óleo de Palma	-	30,00
Sacarose	10,0	8,00
Óleo de Soja	7,00	2,50
Celulose Microfina	5,00	4,00
Mix Mineral AIN-76	4,00	4,00
Mix Vitamínico AIN-93	1,20	1,20
DL-Metionina	0,60	0,60
Carbonato de Cálcio	0,67	0,70

Fonte: Rhooster Indústria e Com Ltda

Tabela 2: Composição centesimal das dietas experimentais utilizadas no estudo.

Análises	Dieta Normocalórica/normolipídica		Dieta Hipercalórica/ hiperlipídica	
	%	Kcal %	%	Kcal %
Proteínas	20,14	21,15	23,79	20,35
Carboidratos	58,75	62,12	38,54	33,80
Lipídios	7,08	16,73	22,68	45,85
Umidade	10,09	-	9,04	-
Cinzas	3,53	-	3,88	-
Kcal/g	3,81		4,67	

Fonte: Rhooster Indústria e Com Ltda

Tabela 3: Composição percentual dos ácidos graxos das dietas experimentais utilizadas no estudo.

	Dieta Normocalórica/ normolipídica	Dieta Hipercalórica/ hiperlipídica
Capróico (C6:0)	0,85	-
Caprílico (C8:0)	0,71	0,04
Cáprico (C10:0)	-	0,08
Láurico (C12:0)	0,28	0,25
Mirístico (C14:0)	0,85	0,97
Pentadecanóico (C15:0)	0,28	0,08
Palmítico (C16:0)	20,34	36,50
Palmitoleico (C16:1)	0,28	0,17
Esteárico (C18:0)	6,50	10,84
Margárico (C17:0)	-	0,17
Elaídico (C18:1n9t)	-	2,98
Oleico (C18:1n9c)	29,38	32,26
Linolelaídico (C18:2n6t)	-	0,42
Linoleico (C18:2n6c)	35,73	13,40
Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	2,68	0,88
Araquídico (C20:0)	0,56	0,42
Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,28	0,13
Behenico (C22:0)	0,72	0,25
Tricosanóico (C23:0)	0,56	0,04
Lignocérico (C24:0)	-	0,12

Fonte: CBO Análises Laboratoriais

6.3 Tratamento Farmacológico

A partir dos 40-60 dias de idade, os animais das condições P e H foram tratados, por gavagem, durante 21 dias com uma solução diária de água (**A**) ou de Fluoxetina (**F**; cloridrato

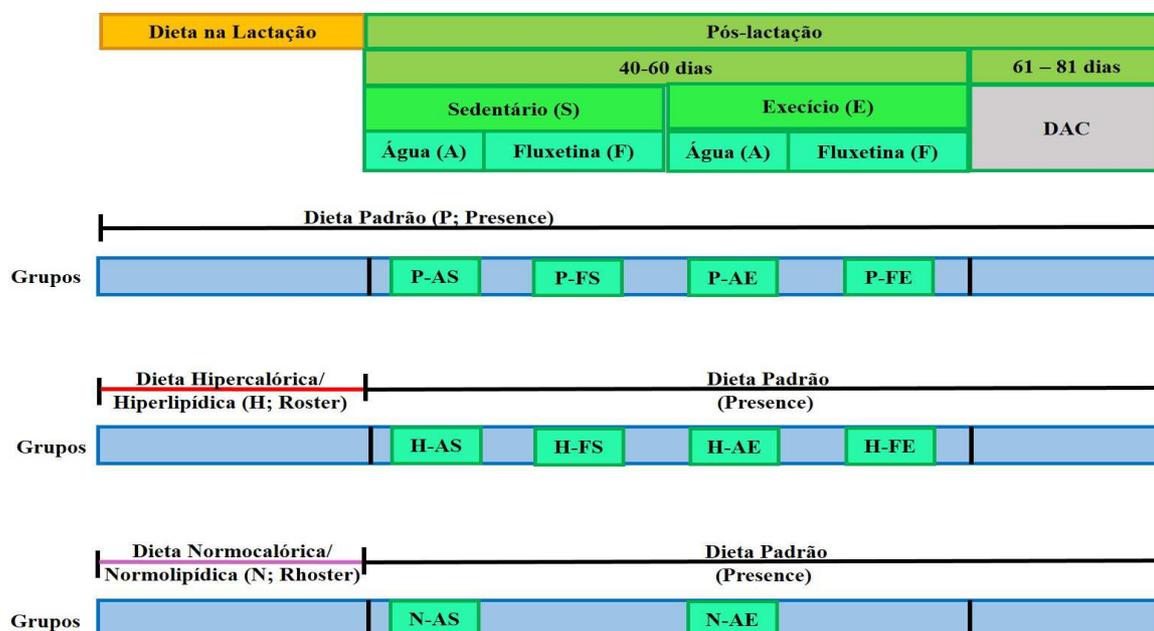
de fluoxetina - Medley). Esse fármaco foi dissolvido em água e administrado à dose de 10 mg/kg/dia (adaptação de AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006).

6.4 Exercício físico

Aos 40-60 dias de vida, metade dos animais foi submetido ao protocolo de exercício físico (grupo **E**) em esteira motorizada (Insight EP-131, 0° inclinação). O exercício físico foi realizado durante 3 semanas, sendo 5 sessões semanais (uma sessão por dia), com duração de 30 minutos (MONTEIRO et al., 2011).

A velocidade da corrida na esteira aumentou gradualmente de acordo com a semana de treino. A velocidade é de 5 m/min na primeira semana e depois, aumentou para 10 m/min e 15 m/min na segunda e terceira semanas, respectivamente. Para efeito de comparação, a outra metade dos animais formou o grupo controle (não exercício; aqui chamado de sedentário, **S**). Esses animais foram submetidos às mesmas condições supra descritas, porém, estando a esteira desligada (MONTEIRO et al., 2011; **FIGURA 2**).

Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental. Foi utilizado um número de animais entre 7 e 11 em cada grupo.



6.5 Determinações murinométricas

6.5.1 Peso corporal

A evolução do peso corporal foi obtida a partir do 1º dia de vida dos filhotes até o dia do experimento eletrofisiológico. Os animais foram pesados (balança com sensibilidade até 0,1 g) nos dias 1, 7, 14, 21(dia do desmame), 30, 40, 60 e no dia de experimento. O ganho de peso dos animais também foi avaliado nos intervalos de 30-40 dias e 40-60 dias.

6.5.2 Determinação do Índice de Lee

Foi avaliado um índice de composição corporal e de percentual de gordura de animais segundo protocolo adaptado de protocolo de NOVELLI et al. (2007). Nas idades de 30, 40 e 60 dias foi obtido o índice de Lee através da equação: Índice de Lee= $\sqrt[3]{\text{peso (g)}/\text{comprimento nasoanal (cm)}}$; **FIGURA 3**).

Figura 3. Sequência de eventos para determinação do comprimento nasoanal.

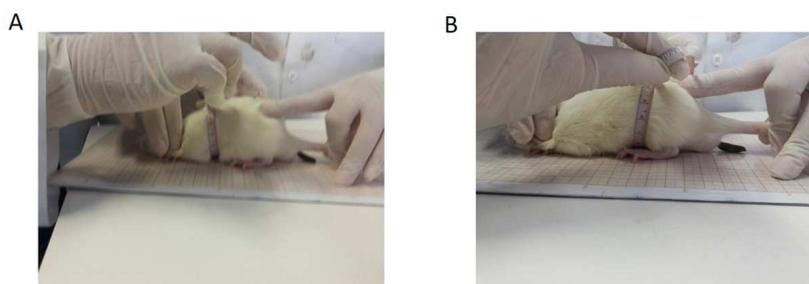


Fonte: Autor

6.5.3 Determinação das circunferências abdominais e torácicas

Os animais, nas idades de 30, 40 e 60 dias foram contidos em um ambiente calmo e livre de ruídos onde foi posicionada uma fita métrica posteriormente às patas dianteiras para obtenção da circunferência torácica. Para a medição da circunferência abdominal, a fita métrica foi posicionada anteriormente às patas traseiras (NOVELLI et al., 2007; **FIGURA 4**).

Figura 4. Procedimentos para avaliação das circunferências torácica (A) e abdominal (B).



Fonte: Autor

6.6 Procedimentos para registro da DAC

6.6.1 Cirurgia

Aos 61-81 dias de idade, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC). Para o registro da DAC, cada animal foi anestesiado com uma solução contendo mistura de uretana a 10 % + cloralose a 0,4 %, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intraperitoneal. Foi procedida uma traqueostomia para introdução de uma cânula de polietileno. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada em aparelho estereotáxico (marca "David - Kopf" USA, modelo 900), de modo a permitir a incisão e remoção da pele e do perióstio para exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos 3 orifícios (anterior, médio e posterior, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada), alinhados paralelamente à linha média, ao nível do hemisfério cerebral direito. A temperatura retal do animal foi mantida em torno de $37\pm 1^\circ\text{C}$.

6.6.2 Registros eletrofisiológicos

A DAC foi provocada aplicando-se o estímulo (solução de KCl a 2%) a um ponto da superfície cortical frontal, durante um minuto, através do orifício anterior. Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando-se eletrodos impolarizáveis (tipo "Ag-AgCl"), conectados a um polígrafo. Em dois pontos corticais parietais (um em cada orifício) foram registradas, simultaneamente, a atividade elétrica cortical (eletrocorticograma) e a variação lenta de voltagem que acompanha a DAC. As variações corticais de voltagem foram registradas contra um eletrodo de referência comum, colocado sobre os ossos nasais, nos

quais o potencial é invariável. O registro foi feito por um período de 4 horas. A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância.

6.7 Coleta de tecido adiposo

Após cirurgia para registro da DAC, os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal foram dissecados dos animais ainda anestesiados. Após a coleta, os tecidos foram pesados em uma balança digital eletrônica, com capacidade de 220 g e sensibilidade de 0,01 g (modelo AY220, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, Brasil).

6.8 Análise estatística

A análise estatística entre as duas condições nutricionais, nutrido e hipernutrido, foi realizada, usando-se o Teste – *t* de Student. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para analisar os demais dados. Nas comparações em que a mesma apontou diferenças significantes foi aplicado o teste para comparação múltipla de Holm-Sidak. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para rejeição da hipótese nula, um valor de $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 ARTIGO 1: Exercício físico versus fluoxetina: efeitos antagônicos sobre a depressão alastrante cortical em ratos Wistar

1. Introdução

Serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor que está largamente distribuído no sistema nervoso central. Esta monoamina é importante para muitas ações, incluindo o sono, o apetite, memória, comportamento sexual, função neuroendócrina e humor (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Ela também interfere no comportamento alimentar, promovendo a saciedade e reduzindo o peso corporal (GUIMARÃES et al., 2006; VOIGT e FINK, 2015); e parece diminuir a excitabilidade cerebral (PARDO-PEÑA, MEDINA-CEJA E MORALES-VILLAGRÁN, 2014; TARLACI, 2009).

O inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), fluoxetina, é um antidepressivo que aumenta a disponibilidade da serotonina cerebral (QU et al., 2009). Por causa de alguns relatos de que o exercício físico também aumenta a serotonina cerebral (LAN et al., 2014; MEEUSEN et al., 1996), sugere-se que o mesmo possa ser uma estratégia menos dispendiosa para o mesmo resultado.

A relação entre a serotonina e excitabilidade cerebral tem sido relatada com outros ISRS (AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; GUEDES et al., 2002). O citalopram pode reduzir a ocorrência de oscilações de alta frequência espontâneas que ocorrem em crises epiléticas (PARDO-PEÑA, MEDINA-CEJA E MORALES-VILLAGRÁN, 2014). Escitalopram promove uma diminuição da frequência, duração e intensidade dos episódios de enxaqueca (TARLACI, 2009). Além disso, a serotonina exerce um efeito inibitório sobre a depressão alastrante cortical (DAC) (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013; GUEDES et al., 2002; READ e PARSONS, 2000). A DAC tem sido descrita como uma onda de propagação lenta decorrente da depressão da atividade elétrica cortical espontânea que ocorre com a estimulação química, eléctrica ou mecânica de um ponto de tecido cortical (LEÃO, 1944). A onda de DAC consiste na redução ("depressão") da atividade elétrica do tecido cerebral que se propaga ("espalhando") concêntricamente e de forma reversível (LEÃO, 1944). Simultaneamente com a depressão da atividade elétrica espontânea, uma mudança de potencial (SPC) de corrente contínua lenta (DC) aparece na região cortical em que a DAC é observada, e este sinal "tudo ou nada" marca claramente o início eo

fim do fenômeno (LEÃO, 1947). Assim, o SPC é amplamente usado para calcular a velocidade a que a DAC propaga através do tecido nervoso (GUEDES et al., 2004).

Nós previamente mostramos que a administração de fluoxetina durante o desenvolvimento prejudica a propagação DAC de forma dose-dependente. Ratos Wistar tratados com fluoxetina (10 mg/kg, sc) mostraram uma redução da velocidade de propagação de DAC. No entanto, uma dose de 20 mg/kg teve um efeito ainda mais forte (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). Além disso, o efeito do exercício físico sobre DAC também foi investigado. Ratos realizaram exercício físico em esteira durante fases iniciais de desenvolvimento, na idade adulta, ou durante a senescência. Em todas as idades, um efeito antagonista do exercício sobre DAC foi observado (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2011). Esses dados nos levaram a fazer os seguintes questionamentos: 1) O exercício físico pode potencializar o efeito de 10 mg/kg fluoxetina sobre DAC? 2) A administração de fluoxetina e exercício físico influenciam a propagação da DAC no adulto jovem? 3) O exercício físico e a administração de fluoxetina interagem e influenciam parâmetros corporais?

2. Métodos

2.1 Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar machos foram tratados de acordo com os "Princípios do Laboratório de Cuidados Animais" (Institutos Nacionais de Saúde, EUA) e com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (51 cm×35,5 cm×18,5 cm), mantidos em uma sala a $22 \pm 1^\circ$ C, ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 horas da manhã) e com livre acesso à água e ração para roedores de laboratório (Presence Nutrição Animal, São Paulo, Brasil). Aos 40-60 dias de vida, os animais foram distribuídos em um dos seguintes grupos: sedentários e tratados com veículo (controle água destilada; grupo somente água); exercitado e tratados com veículo (grupo somente exercício); sedentário e tratados com fluoxetina 10mg/kg/dia (grupo apenas fluoxetina); e exercitado e tratados com fluoxetina (grupo exercício + fluoxetina).

2.2 Administração de fluoxetina e protocolo de exercício em esteira

Os animais foram administrados orogastricamente ou com 10 mg/kg de cloridrato de fluoxetina (Medley®) ou um volume equivalente de água destilada. O volume total administrado em cada administração por gavagem foi de 1,0 mL/d. Na sequência a gavagem, ratos dos dois grupos de exercício realizaram esforço físico moderado em esteira rolante (modelo ET 2000, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil, 0° de inclinação) (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; GOMES-DA-SILVA et al., 2010). O período de exercício em esteira foi de três semanas, 30 min por dia, em cinco sessões semanais (uma sessão por dia). A velocidade da esteira de corrida foi fixado em 5 m/min durante a primeira semana; durante a segunda e terceira semanas, as velocidades foram aumentadas para 10 m/min e 15 m/min, respectivamente (MONTEIRO et al., 2011). Ratos dos grupos sedentários (grupos somente água e apenas fluoxetina) foram colocados na esteira no mesmo período que os animais exercitados, mas a esteira permaneceu desligada.

2.3 Parâmetros corporais

2.3.1 Ganho de peso

O ganho de peso foi calculado pela diferença entre os peso na idade de 60 dias e 40 dias de vida. O peso corporal foi mensurado, utilizando-se uma balança digital eletrônica, com capacidade de 1.010 g e sensibilidade de 0,5 g (modelo ADF 1000, Marte Científica e Instrumentação Industrial Ltda, Minas Gerais, Brasil).

2.3.2 Índice de Lee

Este índice foi calculado no início e no fim dos experimentos (ratos aos 40 e 60 dias de idade). Ele expressa a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e do comprimento do naso anal [$\sqrt[3]{\text{Peso (g)} / \text{NAL (cm)}}$] (NOVELLI et al., 2007).

2.3.3 Circunferências abdominal (CA) e torácics (CT)

Aos 40 e 60 dias cada animal foi contido em um ambiente tranquilo e sem ruído, e uma fita métrica foi colocada imediatamente anterior a pata traseira para obtenção da CA ou imediatamente atrás da pata dianteira para TC (NOVELLI et al., 2007). A razão de CA/CT foi calculado no mesmo período.

2.4 Registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC)

Nos quatro grupos a DAC foi gravada aos 61-81 dias de vida. Antes dos registros, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de 1000 mg / kg de uretana mais 40 mg/kg de cloralose (ambos da Sigma Co., EUA). Esta mistura foi utilizada pois no rato, ela fornece uma anestesia muito estável, que tem a duração de várias horas e não bloqueará a DAC (GORELOVA, KRIVÁNEK e BURES, 1987). Além disso, uma cânula traqueal foi inserida para melhorar a respiração. Para a medição, três orifícios foram feitos por trepanação alinhados na direção ântero-posterior e paralela à linha média no lado direito do crânio (2-4 mm de diâmetro). Um orifício foi posicionado no osso frontal e usado para aplicar o estímulo (KCl) para eliciar DAC. Os outros dois orifícios foram perfurados no (3-4 mm de diâmetro) no osso parietal e usado para registrar a onda de propagação da DAC. Durante a cirurgia e registro da DAC, os animais respiraram espontaneamente, e a temperatura retal foi monitorizada continuamente e mantida a $37\pm 1^\circ\text{C}$. A DAC foi provocada em intervalos de 20 min através da aplicação de uma bola de algodão (1-2 mm de diâmetro) embebida em solução de KCl 2% (cerca de 270 mM) no orifício feito anterior a região frontal por 1 min. A aplicação de KCl foi repetida cada 20 min durante o período total de 4h. As alterações de potenciais lentos que acompanham a DAC foram registados utilizando dois elétrodos de Ag/AgCl ágar-Ringer (um em cada orifício) contra um eletrodo comum de referência do mesmo tipo colocado sobre os ossos nasais. A velocidade de propagação da DAC foi baseada no tempo necessário para que uma onda de DAC percorra a distância entre os dois pontos de registro corticais. Este tempo foi medido utilizando o início da fase de ascensão do SPC negativo como o ponto inicial, como relatado anteriormente (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). No fim da sessão de gravação, os animais, enquanto ainda anestesiados, foram mortos pela introdução de uma agulha fina, inserida através da cisterna magna, provocando uma lesão na região da bulbar e parada cardio-respiratória.

2.5 Análise estatística

Parâmetros corporais e velocidade da DAC foram expressos em média \pm erro padrão da média. Diferenças intergrupos de parâmetros corporais foram comparadas, usando análise de variância de uma via (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Diferenças de propagação da DAC foram comparados empregando a ANOVA de duas vias, incluindo os fatores de tratamento gavagem (fluoxetina ou água) e condição de exercício

(exercido ou sedentário), seguido de um teste post-hoc (Holm-Sidak), quando indicado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Parâmetros corporais

Os animais tratados durante 21 dias com fluoxetina e submetidos a exercício físico apresentaram menor ($p < 0,05$) ganho de peso ($78,68 \pm 3,19$ g) que seus controles, ou seja, os grupos somente a fluoxetina ($93,34 \pm 4,77$ g) e somente exercício ($97,04 \pm 3,48$ g; **Figura 1**). Os grupos não diferiram significativamente com relação as medidas corporais (Índice de Lee, TC, AC) (**Tabela 1**).

Figura 1. Ganho de peso entre 40 e 60 dias. W, E, F, e FE indicam os grupos somente água ($n=8$), somente exercício ($n=10$), somente fluoxetina ($n=10$), e fluoxetina+exercício ($n=10$), respectivamente. Valores expressos como média \pm SEM. * e # denotam que o ganho de peso nos animais FE foi significativamente menor ($P < 0,05$) que nos grupos F e E, respectivamente (one-way ANOVA).

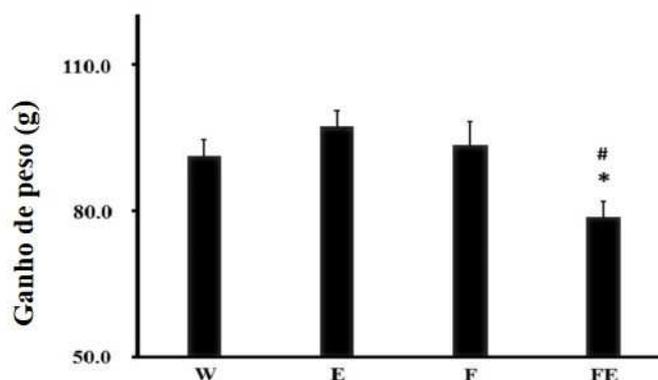


Tabela 1 Efeitos da administração de fluoxetina e exercício em esteira nos parâmetros corporais em ratos Wistar machos.

Parâmetros	40 dias de vida				60 dias de vida			
	W	E	F	FE	W	E	F	FE
Índice de Lee (n=11)	0,30±0,01	0,30±0,01	0,31±0,03	0,30±0,01	0,31±0,03	0,32±0,03	0,31±0,02	0,30±0,03
CT (n=12)	10,37±1,21	10,97±1,24	10,70±1,13	10,42±0,92	13,03±1,40	13,35±1,24	13,32±1,09	12,40±0,66
CA (n=12)	12,61±1,63	12,72±0,85	13,41±1,16	12,79±1,38	15,54±1,33	15,92±1,45	15,79±0,92	15,22±0,87
Razão CA/CT (n=11)	1,22±0,06	1,17±0,14	1,26±0,08	1,23±0,08	1,19±0,09	1,19±0,07	1,19±0,06	1,23±0,07

CT, circunferência torácica (cm); CA, circunferência abdominal (cm). W, E, F, e FE indicam os grupos somente água, somente exercício, somente fluoxetina, e fluoxetina+exercício, respectivamente. Os valores são expressos como média ± DP. Não houve significância estatística (one-way ANOVA).

3.2 Depressão Alastrante Cortical

Os registros eletrofisiológicos na superfície cortical de um rato Wistar em cada condição estudada (somente água, apenas fluoxetina, apenas exercício, fluoxetina + exercício) são apresentados na Figura 2. A mudança lenta de potencial nos registros DC denota a presença da DAC após estimulação com KCl. De um modo geral, a aplicação tópica de KCl a 2% durante 1 min em um ponto do córtex frontal, no hemisfério direito, provocou uma única onda de DAC propagada sem interrupção e pôde ser registada pelos dois elétrodos na superfície parietal do mesmo hemisfério. Dentro de alguns minutos após a DAC ter sido gravada, a mudança de potencial lenta gradualmente voltou ao padrão pré-DAC.

A ANOVA de duas vias sobre os valores de velocidade de propagação DAC mostrou que o exercício físico sozinho (F [3445] = 45,228; $p < 0,01$), fluoxetina sozinho (F [3445] = 18,564; $p < 0,01$), e exercício físico + fluoxetina (F [3445] = 8,878; $p < 0,01$) tiveram efeitos significativos sobre a propagação da DAC. As análises *post-hoc* revelaram que o tratamento apenas com fluoxetina (10 mg/kg/d) reduziu a velocidade de propagação da DAC ($p < 0,01$) em comparação com o veículo água. A média ± DP para o grupo apenas fluoxetina foi de 3,03±0,35 mm/min, contra 3,24±0,39 mm/min para os controles água. Da mesma forma, animais do grupo somente exercício tiveram menores valores de velocidade da DAC ($p < 0,01$) do que aqueles do grupo apenas água. A média ± DP para o grupo somente exercício foi 2,96±0,23 mm/min. A combinação de exercício físico e administração fluoxetina também resultou em redução da velocidade da DAC, como esperado (média ± DP, 2,92±0,22 mm/min). Em comparação com o grupo somente fluoxetina, o valor médio da DAC para fluoxetina + exercício foi

significativamente reduzida ($p < 0,01$); no entanto, era similar ao valor do grupo somente exercício ($p = 0,35$) (**Figura 3**).

Figura 2. Registos representativos da alteração lenta de potencial (P) da depressão alastrante cortical (DAC) provocado pelo KCl em quatro ratos com 61-81 dias de vida, como se segue: um rato do grupo de controle (somente água; W) e um de cada um dos três grupos experimentais [somente exercício (E), somente fluoxetina (F), e fluoxetina + exercício (FE)]. As barras verticais de 10 mV para P. A DAC foi induzida por KCl a 2% aplicada por via epidural durante 1 min, como indicado pelas barras horizontais sobre P1. A DAC foi registada por dois eletrodos corticais localizados posterior a área de estimulação (pontos 1 e 2), e as barras mais finas verticais delimitam o tempo gasto para um episódio de DAC propagar por eles. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registo.

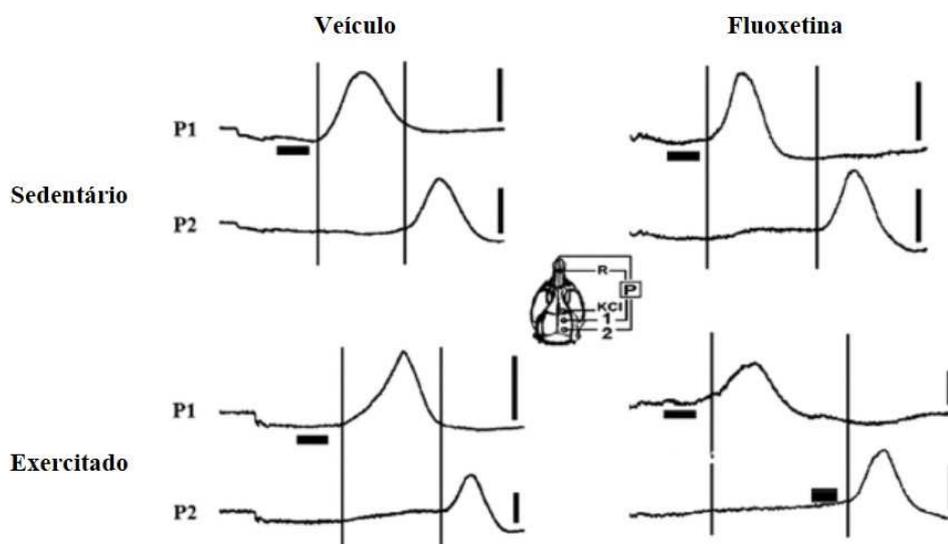
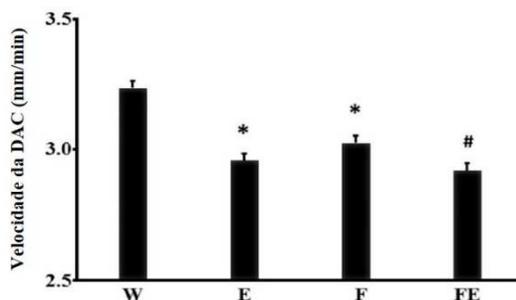


Figura 3. Velocidades de DAC em ratos adultos jovens tratados, por gavagem, durante 40-60 dias pós-natais com fluoxetina (F; 10 mg/kg/d) ou um volume equivalente de veículo (água destilada, W). Metade dos animais em W e F correram em uma esteira em um período definido de 40 a 60 dias de vida (grupos E e FE). O número de animais em cada grupo variou entre 9 e 10. Os valores são expressos como média \pm SEM. * Velocidades de DAC nos grupos E e F são significativamente menores ($p < 0,01$) do que no grupo controle (W). # indica velocidade de DAC em ratos FE é significativamente menor ($p < 0,01$) que no grupo F (two-way ANOVA plus Tukey's test).



4. Discussão

Os resultados deste estudo fornece a primeira evidência de que o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) em associação com o exercício físico em esteira exerce um efeito antagonista sobre o fenômeno relacionado com excitabilidade cerebral, a DAC. O exercício sozinho traz esses efeitos em concordância com estudos anteriores que mostram que o exercício físico pode antagonizar propagação da DAC (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2011). Esses estudos envolveram um protocolo similar de exercício físico em esteira, mas o exercício foi realizado com ratos em um período de vida anterior (15 a 35 dias de vida) a do trabalho atual. Em ratos, o período de lactação (1 a 21 dias de vida) inclui a janela de "intenso crescimento cerebral", que é considerada crítico e muito sensível às condições ambientais adversas (MORGANE et al., 1993). Nesses casos, o exercício físico realizado no período precoce da vida produziu um efeito de longa duração, uma vez que sua ação antagonista foi encontrada, mesmo na idade adulta, quando a atividade de esteira não era mais realizada.

O tratamento com fluoxetina durante o período de lactação também prejudica propagação da DAC; no entanto, o efeito de 10 mg/kg foi inferior a de 20 mg/kg, o qual teve o

mesmo efeito que a dose de 40 mg/kg (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). No presente estudo, ambos, exercício físico e o tratamento com fluoxetina, foram realizados durante o período juvenil com efeitos significativos, indicando que as influências ambientais podem influenciar outras fases da vida que não os primeiros períodos de desenvolvimento. Estes efeitos robustos sobre a DAC são intrigantes, pois a adolescência também representa um estágio de desenvolvimento importante, suscetível a vários impactos neurofisiológicos a partir de experiências ambientais (BOUTROS et al, 2015; GOMEZ et al., 2014).

O exercício físico melhora o fluxo sanguíneo cerebral regional (NISHIJIMA et al., 2012; VIBOOLVORAKUL e PATUMRAJ, 2014) e parece regular a angiogênese cerebral através do fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento semelhante à insulina, o que pode aumentar a tolerância do cérebro isquêmico (WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2011). Por outro lado, a DAC influencia o fluxo sanguíneo cerebral (SUN et al., 2011), e isquemia cerebral está fortemente relacionada com a DAC (FERRARI et al., 2015).

Além da angiogênese, a neurogênese tem sido proposto como um fenômeno de plasticidade estrutural promovida pela prática de exercício físico. Ferreira et al. (2011) mostrou um efeito positivo do exercício moderado em esteira de curto período sobre a plasticidade do hipocampo. Esse efeito foi independente dos processos de transcrição e da *upregulation* do fator neurotrófico derivado do cérebro e ocorreu mesmo na presença de níveis elevados de corticosterona. Sugere-se que este estímulo neurogênico tem efeitos positivos sobre o humor, aprendizado e memória em seres humanos e roedores (BECKMAN e SANTOS, 2013). O exercício físico também induz sinaptogênese (HÖTTING e RÖDER, 2013). Assim, um aumento do número de neurônios, bem como das conexões sinápticas plausivelmente pode aumentar a distância na comunicação célula-célula, que pode ser responsável pela redução da velocidade da DAC na condição exercitada.

O exercício físico moderado é um conhecido método de melhorar os sistemas glicolíticos e oxidante, e o exercício em esteira (30 m/min durante 30 min, 5 dias por semana durante um período de 3 semanas consecutivas) aumenta a glicólise cerebral em ratos e está associada com um aumento em níveis cerebrais dos transportadores de glicose 1 e 3 (KINNI et al., 2011). Assim, o exercício melhora a capacidade do cérebro de usar a glicose. Em adição a estes efeitos sobre o metabolismo cerebral, o exercício físico parece ser importante para proteger o tecido do cérebro de danos oxidativos (CECHETTI et al., 2011). Em um estudo com ratos, a corrida em esteira durante 12 semanas inibiu o estado oxidativo e aumentou a capacidade antioxidante no hipocampo após oclusão bilateral permanente das artérias carótidas

comuns (CECHETTI et al., 2011). Este resultado sugere que a maquinaria antioxidante do cérebro é ativada em resposta a geração excessiva de radicais livres. Estudos anteriores envolvendo neuroexcitabilidade mostraram que ambos, níveis elevados de glicose plasmáticos (XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991) e administração de antioxidante (ABADIE-GUEDES et al., 2012), estão associados com baixos valores de velocidade da DAC. Assim, especula-se que o exercício em esteira que os ratos realizaram neste trabalho pode ter promovido a melhoria na resposta metabólica e antioxidante, que pode ser responsável pelo efeito de desaceleração da velocidade de propagação da DAC.

O exercício físico estimula e aumenta a liberação de serotonina no cérebro; por exemplo, em um estudo, o exercício (12 m/min durante 1h) aumentou os níveis de serotonina extracelular de uma forma dependente do tempo no hipocampo de ratos em jejum (MEEUSEN et al., 1996). Uma explicação possível é que a lipólise induzida pelo exercício aumenta o triptofano livre no sangue, promovendo um aumento paralelo no triptofano do cérebro e, por sua vez, a síntese/metabolismo da serotonina. Em outro estudo, o exercício voluntário em roda de corrida durante 4 semanas aumentou os níveis de serotonina do hipocampo e do RNAm do receptor 5-HT_{1A} (WANG et al., 2013). Além disso, um efeito antagonista sobre a propagação da DAC a partir do aumento da disponibilidade de serotonina no cérebro foi demonstrada (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; GUEDES et al., 2002). Assim, este provável papel do exercício físico na ativação do sistema serotoninérgico pode explicar o seu efeito sobre a DAC. No entanto, é altamente provável que este não é o único mecanismo, pois o exercício em esteira por si teve um efeito mais pronunciado do que o tratamento somente com fluoxetina.

Além de fluoxetina, outras drogas serotoninérgicas que aumentam a atividade da serotonina no cérebro promovem o mesmo efeito antagonista sobre este fenômeno eletrofisiológico. Exemplos incluem a d-fenfluramina, um libertador de serotonina (CABRAL-FILHO, TRINDADE-FILHO e GUEDES, 1995); sumatriptan, um agonista de serotonina (READ e PEARSON, 2000); e um outro ISRS, o citalopram (GUEDES et al., 2002). Em contraste, a tianeptina, um potenciador da recaptação da serotonina, facilita a propagação da DAC (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013). Portanto, os resultados apresentados suportam a hipótese de modulação da DAC por processos dependentes de serotonina. Neste estudo, a fluoxetina é administrada oralmente; no entanto, a sua ação sobre a excitabilidade neuronal foi semelhante à identificada nos estudos acima utilizando outras vias de administração, incluindo ip, sc, e aplicação tópica. A via oral é a mais típica, no contexto clínico.

Para o melhor de nosso conhecimento, os presentes dados constituem o primeiro relato sobre o efeito do tratamento combinado da fluoxetina + exercício físico sobre a DAC em ratos

jovens. Um achado principal adicional foi que o exercício físico diminuiu mais a DAC que a fluoxetina, como também foi observado por Wen et al. (2014) em um outro paradigma experimental. Eles descobriram que os níveis de serotonina estavam mais elevados nos núcleos da rafe de animais exercitados em esteira que nos tratados com fluoxetina. Além disso, estes autores relataram que o exercício preveniu a superatividade mitocondrial no núcleo rafe em um modelo de depressão em ratos. Os resultados atuais nos permitem especular se o exercício físico pode substituir ou complementar a administração da droga serotoninérgica no tratamento de patologia relacionada com cérebro, tais como a depressão, na fase juvenil da vida.

Quanto aos dados de peso corporal, o grupo que realizou exercício físico e recebeu tratamento com fluoxetina apresentaram, aos 60 dias de vida, menor ganho de peso do que todos os outros grupos. No entanto, os grupos que realizaram somente exercício em esteira ou foram tratados apenas com fluoxetina não diferiram do grupo controle água. Da mesma forma, Li et al. (2014) mostraram que os animais exercitados em esteira durante 8 semanas não apresentaram mudanças significativas no peso corporal em comparação com o grupo sedentário. Além disso, Gollisch et al. (2009) não encontraram nenhuma alteração de peso em ratos exercitados em roda de corrida e sugeriram que a ingestão calórica significativamente maior, provavelmente compensava o maior gasto energético do exercício. Os resultados atuais também confirmam um estudo anterior do nosso grupo de não haver diferenças no peso corporal entre ratos jovens exercitados e sedentários (MONTEIRO et al., 2011).

Com relação aos efeitos da fluoxetina sobre o peso corporal, os nossos resultados estão de acordo com aqueles de Klomp et al. (2014), que não encontraram efeito do tratamento com fluoxetina sobre o ganho de peso em ratos adolescentes. A administração de fluoxetina parece reduzir o consumo de ração durante os primeiros dias de tratamento, atingindo um estado estacionário após a primeira semana (GAMARO et al., 2008). No entanto, a serotonina é um promotor de saciedade bem conhecida em seres humanos e animais experimentais (GUIMARÃES et al., 2006; LEIBOWITZ et al., 1990), o que poderia resultar em redução de peso corporal. Neste estudo, a redução no ganho de peso corporal pode ser observado apenas quando duas condições que aumentam a serotonina foram combinadas.

De um modo geral, os parâmetros corporais, tais como o índice de Lee, CT, e CA são usados para verificar efeitos adversos sobre o crescimento corporal em animais de laboratório (NOVELLI et al., 2007). Ao considerar os possíveis efeitos da serotonina sobre o peso corporal, decidimos analisar aqueles parâmetros e não foi encontrado diferenças entre os grupos para nenhum deles. A partir dessa constatação, infere-se que o tratamento com fluoxetina e/ou exercício físico não pareceu afetar significativamente o crescimento do corpo. Mais estudos são

necessários para melhor esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos no efeito da serotonina sobre estes parâmetros.

5. Conclusão

Com base nos resultados atuais, exercício em esteira por si só teve melhores efeitos do que fluoxetina sobre a excitabilidade neuronal. Além disso, a velocidade de propagação da DAC foi semelhante entre os grupos somente exercício e fluoxetina + exercício. Estes resultados destacam a importância do exercício físico como uma estratégia muito útil no tratamento de doenças importantes, tais como a depressão e a enxaqueca. Na verdade, o exercício físico já é prescrito como uma medida comportamental para aliviar os sintomas da depressão (COONEY et al., 2013), e estes resultados reforçam esta abordagem. Além disso, nem o exercício físico, nem o tratamento com fluoxetina sozinhos afetaram o peso corporal, indicando que estas manipulações não prejudicam o desenvolvimento físico que ocorre na fase juvenil da vida.

7.2 ARTIGO 2: Exercício físico e/ou fluoxetina atenua o efeito facilitador da exposição de uma dieta hiperlipídica sobre a depressão alastrante cortical na prole de ratos.

1. Introdução

O estado nutricional é um fator ambiental que influencia significativamente o crescimento e desenvolvimento dos animais (PEDRAZA e QUEIROZ, 2011). Esta influência começa em fases iniciais da vida, indiretamente através da mãe (VALLE et al., 2008). A desnutrição materna durante a gravidez e lactação pode interferir permanentemente no metabolismo dos descendentes (FALL, 2013; LECOULTRE e BRETON, 2015) e pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na idade adulta (AYRES et al., 2012.). A obesidade materna também influencia o desenvolvimento adequado dos circuitos neurais que controlam o apetite, favorecendo a hiperfagia na prole, a partir do desmame até a idade adulta (BRETON, 2013; REYNOLDS et al., 2015).

A programação do desenvolvimento não se restringe ao período de gestação. Manipulações nutricionais durante a lactação também parecem influenciar o fenótipo metabólico da prole, pois o período de lactação coincide com o período máximo de adipogênese em roedores (LECOULTRE e BRETON, 2015). Além disso, a ingestão materna durante a amamentação pode levar a alterações na composição do leite materno (TINOCO et al., 2007). Por exemplo, se a mãe apresenta uma elevada ingestão de gordura e proteína, o leite materno terá altas concentrações destes nutrientes, e por isso poderia induzir supernutrição na prole (FRANCO et al., 2012).

O exercício físico afeta a homeostase energética devido seus efeitos agudos e crônicos sobre a mobilização e utilização de gordura, ocorrendo em exercícios de intensidade leves a intensas (TROMBETTA, 2003). Experimentalmente, o exercício físico minimizou as alterações bioquímicas e corporais de ratos alimentados dieta com elevado teor de caloria e gorduras (ESTADELLA et al., 2004) e atenuou novo ganho de peso (HIGGINS et al., 2011). Além disso, muitos dos impactos negativos da obesidade materna pode ser melhorado pelo exercício de início tardio (BAHARI, CARUSO e MORRIS, 2013).

Tem sido proposto que o exercício físico melhora as funções do sistema nervoso (JACOTTE-SIMANCAS et al., 2015). Por exemplo, ele traz benefícios para a manutenção da integridade do cérebro, produz neurogênese, angiogênese e aumenta a densidade das conexões dendríticas (PYSH e WEISS, 1979; GAO et al, 2014; JACOTTE-SIMACAS et al, 2015). Estudos prévios realizados em nosso laboratório concluíram que o exercício em esteira exerceu um efeito antagonista sobre a excitabilidade cortical, acelerando a velocidade de propagação da

depressão alastrante cortical (DAC) no cérebro de ratos (MONTEIRO et al, 2011; MONTEIRO et al, 2015).

A DAC é uma redução, "depressão", da atividade elétrica do tecido cerebral que "se espalha" concentricamente e de forma reversível (em torno de 2 a 5 mm/min) a partir do ponto em que começou para o resto da população de neurônios (LEÃO, 1944; ENGELHARDT e GOMES, 2015). A DAC é acompanhada por uma mudança de potencial (SPC) de corrente lenta contínua (DC) na região cortical, que exprime claramente o início e o fim do fenômeno e é utilizado para calcular a taxa na qual a DAC se propaga através do tecido nervoso (GUEDES et al., 2004). Agentes químicos, físicos ou mecânicos podem desencadear a DAC (GUEDES et al., 2004).

Evidências indicam que o exercício físico ativa o sistema serotoninérgico (LAN et al., 2014). Este efeito pode estar envolvido na redução da excitabilidade cortical pelo exercício físico. As drogas que aumentam a disponibilidade de serotonina do cérebro, tais como citalopram e fluoxetina, diminuem a velocidade de propagação da DAC (GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). Além disso, um trabalho recente mostra que o exercício físico pode interagir com fluoxetina e reforçar o seu efeito antagonista sobre a DAC (MONTEIRO et al., 2015).

A obesidade pode ser relacionada com a alteração da atividade da serotonina no cérebro (PAPAZOGLU et al., 2015). Adicionalmente, a má nutrição no início da vida pode persistentemente afetar a capacidade de resposta do corpo a agentes farmacológicos, mesmo se a condição de nutricional seja recuperado (GUEDES et al., 1992; DE-VASCONCELOS et al., 2004). No presente trabalho, considerando todos estes estudos acima, nós hipotetizamos se os efeitos do exercício físico e/ou fluoxetina sobre a DAC podem ser modificados na prole adulta provenientes de fêmeas que receberam dieta hiperlipídica (dieta HF) no período de lactação.

Neste estudo, as seguintes questões foram abordadas: 1) Será que a ingestão materna de dieta HF durante a lactação modifica os parâmetros corporais e a propagação a DAC na prole adulta? 2) Será que os efeitos antagonísticos do exercício físico e/ou fluoxetina sobre a DAC ainda permanecem na prole adulta exposta a dieta HF durante a lactação? 3) Será que o exercício físico e/ou fluoxetina influenciam os parâmetros corporais em filhotes adultos previamente expostos a uma dieta HF?

2. Procedimentos Experimentais

2.1 Aprovação ética

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com os "Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório" (National Institutes of Health, EUA) e as normas da Comissão de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 Animais e dietas

Ratas fêmeas Wistar receberam durante a lactação (1-21 dias após o parto) ou dieta controle ou dieta hiperlipídica. A prole daquelas mães compuseram os grupos controle (C; n=15) e hiperlipídica (HF; n=40). A formulação das duas dietas experimentais foi baseada em AIN (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) e fabricado pela Rhoster Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil). Na dieta HF, 45,9% do teor energético foi derivado de lípidos (óleo de palma + soja) versus 16,7% (óleo de soja) na dieta controle. O respectivo valor calórico diferiu entre as dietas: 4,67 kcal/g na dieta HF contra 3,81 kcal/g na dieta C. A composição de ambas as dietas são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais controle (C) e hiperlipídica (HF) durante a lactação.

	Dieta Normocalórica/ normolipídica	Dieta Hipercalórica/ hiperlipídica
Energia (Kcal/g dieta seca)	3,81	4,67
Proteínas (% Kcal)	21,15	20,36
Carboidratos (% Kcal)	62,12	33,79
Lipídios (% Kcal)	16,63	45,85
Composição de ácidos graxos:		
Capróico (C6:0)	0,85	-
Caprílico (C8:0)	0,71	0,04
Cáprico (C10:0)	-	0,08
Láurico (C12:0)	0,28	0,25
Mirístico (C14:0)	0,85	0,97
Pentadecanóico (C15:0)	0,28	0,08
Palmítico (C16:0)	20,34	36,50
Palmitoleico (C16:1)	0,28	0,17
Esteárico (C18:0)	6,50	10,84
Margárico (C17:0)	-	0,17
Elaídico (C18:1n9t)	-	2,98
Oleico (C18:1n9c)	29,38	32,26
Linolelaídico (C18:2n6t)	-	0,42
Linoleico (C18:2n6c)	35,73	13,40
Alfa Linolenico LNA (C18:3n3)	2,68	0,88
Araquídico (C20:0)	0,56	0,42
Cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,28	0,13
Behenico (C22:0)	0,72	0,25
Tricosanóico (C23:0)	0,56	0,04
Lignocérico (C24:0)	-	0,12

Após o desmame, os filhotes machos de ambos os grupos receberam a dieta padrão de laboratório (Presença Nutrição Animal, São Paulo, Brasil). Os ratos foram mantidos em gaiolas de polietileno (51 cm x 35,5 cm x 18,5 centímetros), sob ciclo de luz/escuridão de 12-h (luzes acesas às 06:00), a 22±1° C e acesso a comida e água *ad libitum*.

2.3 Design experimental

Na idade de 40-60 dias, alguns animais C e HF foram submetidos a exercício moderado (E.; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012) em esteira (modelo ET 2000, o Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil, 0° de inclinação) durante 3 semanas, 5

sessões semanais (uma sessão de 30 minutos por dia). A velocidade da esteira foi ajustada durante a primeira, segunda e terceira semanas em 5 m/min, 10 m/min e 15 m/min, respectivamente, como descrito anteriormente (MONTEIRO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2015). O restante dos animais foram mantidos em condições sedentárias (S); isto é, eles também foram mantidos durante 30 minutos por dia na esteira, no entanto desligada.

A fim de verificar a ação da combinação de fluoxetina + exercício em animais oriundos de uma condição nutricional hiperlipídica durante o aleitamento, em metade dos animais HF foi administrada 10 mg/kg de cloridrato de fluoxetina orogastricamente (F; Medley), imediatamente antes de serem colocadas na esteira. Para minimizar os possíveis efeitos do procedimento de gavagem, nos ratos C e HF que não receberam a fluoxetina foi administrado volume equivalente de água destilada (W). Os animais foram então distribuídos em um dos seguintes grupos: C/SW (n=8), C/EW (n=7), HF/SW (n=10), HF/EW (n=11), HF/SF (n=9), HF/EF (n=10).

2.3 Parâmetros corporais

Para avaliar o efeito de uma dieta HF durante a lactação sobre o crescimento da prole, o peso corporal foi obtido nos dias 1, 7, 14, 21, 30, 40 e 60. Os pesos corporais foram obtidos por meio de uma balança com escala digital eletrônica, capacidade de 1.010 g e sensibilidade de 0,5 g (modelo ADF 1000, Marte Científica e Instrumentação industrial Ltda, Minas Gerais, Brasil).

Aos 40 e 60 dias de vida foram realizadas as seguintes medidas: Índice Lee, circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT) e razão CT/CA. O índice de Lee foi calculado pela raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) [$3\sqrt{\text{Peso (g)}/\text{NAL (cm)}}$] (NOVELLI et al., 2007; MONTEIRO et al., 2015). As CA e CT foram obtidas com uma fita métrica colocada imediatamente anterior as patas traseiras e imediatamente atrás das patas dianteiras, respectivamente (NOVELLI et al., 2007; MONTEIRO et al., 2015). O ganho de peso dos animais foi também avaliado pela diferença de peso entre 40 e 60 dias.

2.5 Registros eletrofisiológicos

Antes do registro da DAC, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de 1000 mg/kg de uretana e 40 mg/kg de cloralose (ambos da Sigma Co., EUA). Uma cânula traqueal foi inserida para melhorar a respiração dos animais. Três orifícios (2-4 mm de diâmetro) foram feitos no lado direito, alinhados na direção ântero-posterior do crânio,

paralelamente à linha mediana. O orifício no osso frontal foi usado para aplicar o estímulo (KCl) para eliciar a DAC. Os outros dois orifícios que foram feitos no osso parietal foram utilizados para registrar a onda de propagação da DAC. A DAC foi induzida em intervalos de 20 min, usando uma chumaco de algodão de 1 cm (1-2 mm de diâmetro) embebido em solução de KCl a 2% (aproximadamente 270 mM) aplicado no orifício da região frontal. A aplicação de KCl foi repetida cada 20 min durante um total de 4 h. Dois eletrodos Ag/AgCl agar-ringer (um em cada orifício) foram utilizados ligados a um eletrodo de referência comum do mesmo tipo colocado sobre o osso nasal para gravar as mudanças potenciais lentas (SPC) que acompanha a DAC. Durante a cirurgia e registro da DAC, os animais respiraram espontaneamente, e a temperatura retal foi monitorizada continuamente e mantida a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

A velocidade de propagação da DAC foi baseada no tempo necessário para que uma onda de DAC percorra a distância entre os dois pontos de registro corticais. Este tempo foi calculado usando o início da fase de subida da SPC negativa como ponto inicial, conforme relatado anteriormente (MONTEIRO et al., 2015). No fim da sessão de gravação, os animais, sob anestesia profunda, foram sacrificados por uma lesão na região da bulbar, feita com uma agulha afiada inserida através da cisterna magna, provocando prontamente parada cardio-respiratória.

2.6 Coleta de tecido

Os tecidos de gordura retroperitoneais e epididimais foram dissecados dos animais após o sacrifício. Estes tecidos foram pesados em uma balança digital eletrônica, com capacidade de 220 g e sensibilidade de 0,01 g (modelo AY220, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, Brasil).

2.7 Análise estatística

As diferenças no peso corporal, índice de Lee, CA e CT, razão CA/CT entre os animais HF e C foram analisadas utilizando o teste-t de Student. As mudanças nestes parâmetros após o tratamento com fluoxetina e exercício, bem como a velocidade da DAC entre os grupos, foram analisadas usando ANOVA one-way seguido do teste post-hoc (Holm-Sidak), quando indicado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

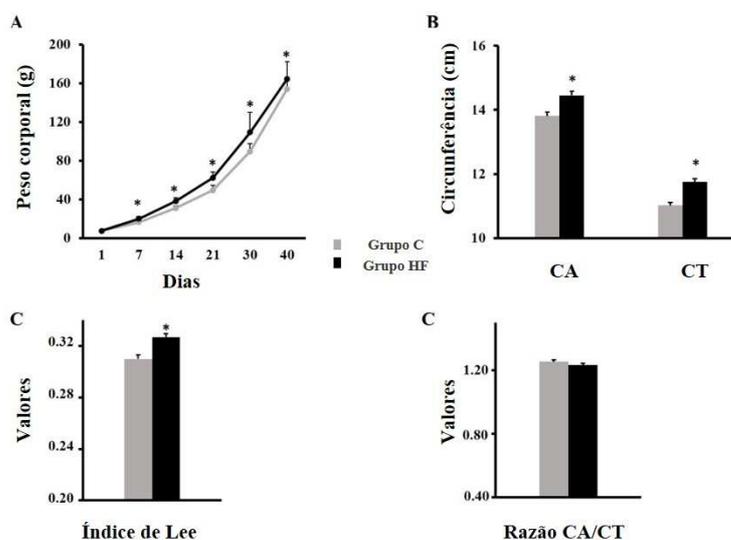
3. Resultados

3.1. Efeito da dieta materna hiperlipídica sob os parâmetros corporais da prole adulta

A prole exposta a dieta HF apresentou maior peso ($p < 0,05$) corporal a partir do 7º dia até o 40º dia de vida em comparação com a prole exposta a dieta C (**Figura 1A**). As médias \pm DP de pesos corporais da prole exposta a dieta HF, em gramas, foram $7,34 \pm 0,79$ (dia 1), $19,93 \pm 2,25$ (dia 7), $38,07 \pm 3,30$ (dia 14), $62,18 \pm 6,19$ (dia 21), $109,14 \pm 20,55$ (dia 30), $164,31 \pm 17,73$ (dia 40). A prole exposta a dieta C mostrou naquela mesma sequência de idade superior, média \pm SD de peso corporal em gramas $7,40 \pm 1,31$, $16,38 \pm 2,00$, $30,87 \pm 2,34$, $49,54 \pm 4,74$, $89,44 \pm 8,10$ e $154,12 \pm 12,30$.

No 40º dia, a prole exposta a dieta HF mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) na CT, CA e índice de Lee em comparação com a prole exposta a dieta C (**Figuras 1B e 1C**). A média \pm DP, em cm, dos valores na prole exposta dieta HF e C foram, respectivamente, CT = $11,75 \pm 0,62$ versus $11,02 \pm 0,38$; CA = $14,45 \pm 0,76$ versus $13,81 \pm 0,49$; Índice de Lee = $0,33 \pm 0,01$ versus $0,31 \pm 0,02$. A razão CA/CT foi de $1,23 \pm 0,07$ para o grupo HF e $1,25 \pm 0,05$ para grupo C, sugerindo uma distribuição de gordura corporal homogênea em ambas as condições nutricionais (**Figura 1D**).

Figura 1. A - Evolução corporal de ratos previamente amamentados por mães que receberam dieta controle (C) ou hiperlipídica (HF) durante a lactação. Aos 40 dias de vida as circunferências torácica e abdominal (CT e CA, respectivamente) (**B**), Índice de Lee (**C**) e razão CA/CT (**D**) foram medidos nos animais C e HF. O número de animais em cada grupo foi de $n=15$ (grupo C) e $n=40$ (grupo HF). Os valores são apresentados como média \pm SEM. * Indica diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos C e HF (teste-t).



3.2 Efeito do exercício e/ou fluoxetina sobre parâmetros corporais de filhotes adultos expostos a dieta materna hiperlipídica

A fluoxetina e/ou o exercício durante 21 dias não alterou significativamente o peso corporal ($p = 0,52$), nem o ganho de peso entre os dias 40 e 60 ($p = 0,656$) nos animais. No entanto, as circunferências abdominal e torácica permaneceram aumentadas em todos os animais da dieta HF materna (grupos HF/SW, HF/EW, HF/SF e HF/EF) em comparação com os animais C (grupos C/SW e C/EW; $p < 0,05$). O exercício sozinho reduziu significativamente a CA dos animais do grupo HF/EW em comparação com o grupo hiperlipídico-controle sedentário (grupo HF/SW). Não houve diferenças na razão CA/CT ($p=0,574$) e Índice de Lee ($p=0,113$). O tecido adiposo retroperitoneal diminuiu nos animais HF/SF em comparação com os outros cinco grupos do estudo (grupos HF/SW, HF/EW, HF/EF, C/SW e C/EW) e nos animais HF/EF em comparação com os animais do grupo HF/EW. Além disso, o tecido adiposo retroperitoneal aumentou o grupo HF/EW em comparação com o grupo HF/SW. Não houve diferenças no tecido de gordura epididimoal entre os grupos ($p = 0,091$; **Tabela 2**).

3.3 Efeito da fluoxetina e/ou exercício sobre a DAC em de filhotes adultos expostos a dieta materna hiperlipídica

A mudança lenta de potencial nos registros DC denota a presença da DAC após a estimulação com KCl, que são apresentados, de forma representativa, na **Figura 2A** em cada condição estudada: C/SW, C/EW, HF/SW, HF/EW, HF/SF e HF/EF. A aplicação tópica com KCl a 2% durante 1 min no orifício localizado no hemisfério direito do córtex frontal provocou uma única onda de DAC que se propagou sem interrupção e pôde ser gravada pelos dois eletrodos na superfície parietal do mesmo hemisfério. Dentro de alguns minutos após a DAC ser gravada, a mudança lenta de potencial gradualmente voltou ao padrão pré-DAC.

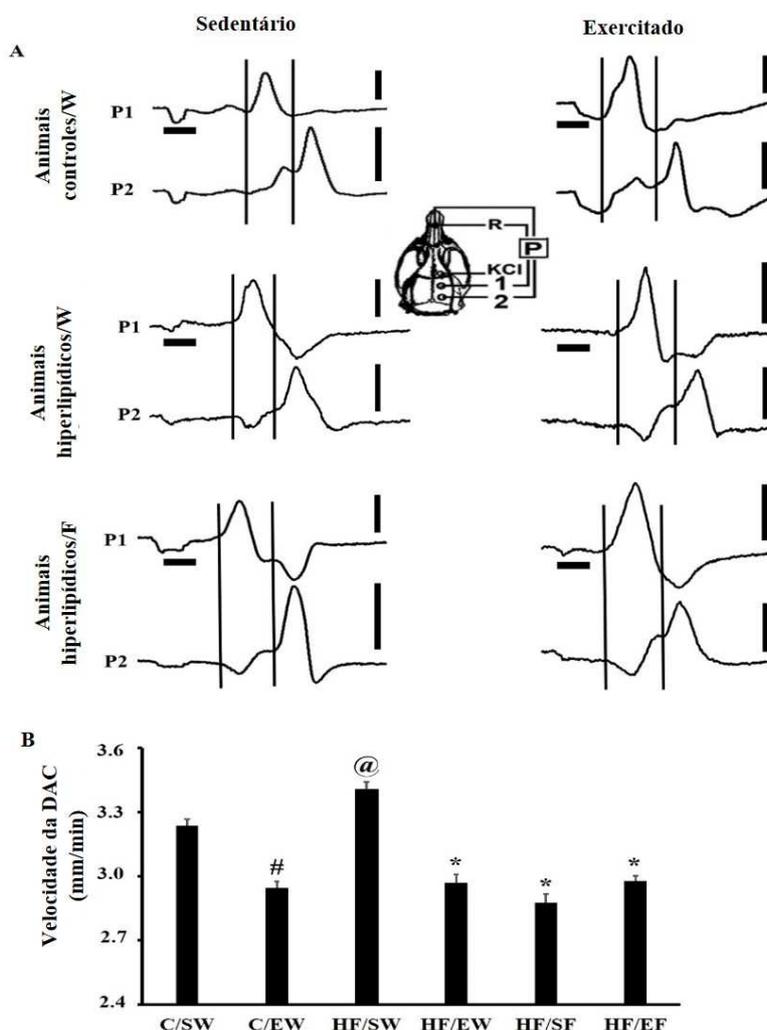
Na prole exposta a dieta HF, os valores da ANOVA duas vias mostraram que o exercício físico ($F [3.428] = 6,320$; $p < 0,001$), fluoxetina ($F [3.428] = 22,285$; $p < 0,001$), e exercício físico + fluoxetina ($F [3.428] = 24,238$; $P < 0,001$) tiveram efeitos principais significativos sobre a propagação da DAC. A análise post-hoc revelou uma diminuição significativa na velocidade da DAC no grupo HF/EW ($2,97 \pm 0,40$ mm/min), grupo HF/SF ($2,88 \pm 0,45$ mm/min) e grupo HF/EF ($2,98 \pm 0,27$ mm/min) em comparação com os animais HF-controles (grupo HF/SW; $3,40 \pm 0,36$ mm/min).

De forma semelhante, na prole exposta a dieta C, o exercício apresentou a velocidade da DAC menor em comparação com o seu controle sedentário. A média \pm SD para os grupos C/SW e C/EW foram $3,24\pm 0,25$ mm/min, e $2,94\pm 0,28$ mm/min, respectivamente. Houve um aumento significativo na velocidade da DAC entre os grupos HF/SW e C/SW ($p < 0,01$; **Figura 2B**)

Tabela 2. Efeito do exercício e/ou administração de fluoxetina sobre parâmetros corporais e gordura visceral em ratos Wistar. C e HF são animais controle e hiperlipídicos, respectivamente. SW = sedentário, EW = exercitado, SF = fluoxetina e EF = exercitado + fluoxetina. Os valores são expressos como média \pm DP. Os valores marcados com letras minúsculas diferem significativamente dos valores correspondentes dos grupos marcados com as mesmas letras na linha dos grupos experimentais. O número de ratos por grupo está entre parênteses (ANOVA).

Parâmetros	Grupos Experimentais					
	C/SW(a)	C/EW(b)	HF/SW(c)	HF/EW(d)	HF/SF(e)	HF/EF(f)
Peso corporal (g)	254,56 \pm 23,25 (8)	247,80 \pm 10,80 (7)	270,48 \pm 29,72 (10)	263,43 \pm 20,45 (11)	253,85 \pm 33,48 (9)	263,30 \pm 30,15 (10)
Ganho de peso 40 - 60 dias (g)	97,70 \pm 17,12 (8)	96,80 \pm 6,77 (7)	107,59 \pm 12,63 (10)	100,30 \pm 15,73 (11)	94,41 \pm 25,90 (9)	99,12 \pm 17,51 (10)
Circunferência torácica cm (CT)	12,90 \pm 0,355 (8)	12,86 \pm 0,522 (7)	14,37 \pm 1,073 ^{a,b} (10)	13,91 \pm 0,673 ^{a,b} (11)	14,12 \pm 0,900 ^{a,b} (9)	14,18 \pm 0,760 ^{a,b} (10)
Circunferência Abdominal cm (CT)	15,96 \pm 1,065 (8)	16,09 \pm 0,549 (7)	18,56 \pm 0,817 ^{a,b} (10)	17,36 \pm 0,867 ^{a,b,c} (11)	17,98 \pm 0,795 ^{a,b} (9)	18,09 \pm 0,936 ^{a,b} (10)
Razão CA/CT	1,24 \pm 0,030 (8)	1,25 \pm 0,031 (7)	1,30 \pm 0,026 (10)	1,25 \pm 0,010 (11)	1,28 \pm 0,030 (9)	1,28 \pm 0,024 (10)
Índice de Lee	0,31 \pm 0,011 (8)	0,31 \pm 0,020 (7)	0,33 \pm 0,022 (10)	0,33 \pm 0,022 (11)	0,34 \pm 0,022 (9)	0,33 \pm 0,023 (10)
Tecido de gordura epididimal (g)	2,49 \pm 0,24 (6)	2,39 \pm 0,53 (5)	2,79 \pm 0,26 (6)	2,84 \pm 0,33 (8)	2,47 \pm 0,35 (6)	2,66 \pm 0,24 (10)
Tecido de gordura retroperitoneal (g)	2,37 \pm 0,27 (6)	2,21 \pm 0,41 (5)	2,04 \pm 0,15 (5)	2,50 \pm 0,32 ^c (6)	1,63 \pm 0,22 ^{a,b,c,d,f} (5)	2,05 \pm 0,33 ^d (5)

Figura 2. A - A - Registos representativos da alteração lenta de potencial (P) da depressão alastrante cortical (DAC) elicitada pelo KCl em 6 ratos com 61-81 dias de idade, como segue: dois ratos controle - água, dois hiperlipídico - água e dois hiperlipídicos - fluoxetina. Em cada grupo, um registro foi de animal exercitado e outro de sedentário. As barras verticais indicam 10 mV para P. A DAC foi induzida por KCl a 2% aplicado por via epidural durante 1 min, como indicado pelas barras horizontais sobre o traço P1. A DAC foi gravada a partir de dois eletrodos corticais localizados posteriores à área de estimulação (em pontos 1 e 2) e as barras verticais finas indicam o tempo gasto para um episódio de DAC propagar entre eles. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre o osso nasal e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registo. **B** - Velocidade de propagação da DAC em ratos adultos previamente amamentados por mães que receberam dieta controle (C) ou dieta hiperlipídica (HF). Cada grupo foi subdividido em animais sedentários (S) e exercitados (E), durante os dias pós-natais 40-60. No mesmo período, os animais foram tratados, por gavagem, com veículo (água destilada, W) ou fluoxetina (F; 10 mg/kg/dia). O número de animais em cada grupo variou entre 7 e 10. Os valores são apresentados como média \pm SEM. O símbolo asterisco indica que os grupos E, F e EF diferem significativamente do controlo (SW) dentro da condição HF. O símbolo # denota diferença de E versus S, dentro da condição C. O símbolo @ indica diferenças entre HF e C em condição SW. ($p < 0,05$; ANOVA plus teste de Holm-Sidak).



4. Discussão

Os principais resultados deste estudo foram que a exposição a uma dieta HF apenas durante a lactação reforça a propagação da DAC no cérebro da prole adulta e aumenta as medidas corporais. Estes resultados reforçam evidência anterior de que em ratos as mudanças no consumo materno durante a lactação são capazes de alterar o estado nutricional e a função cerebral da descendência (SOARES et al., 2012). Na verdade, o período de lactação, que em ratos corresponde os três primeiros semanas de vida, é considerado muito crítico e sensível às condições ambientais adversas (MORGANE et al., 1993). O outro grande achado deste estudo foi que o exercício em esteira e/ou tratamento com fluoxetina tem efeito antagonista sobre as velocidades da DAC mesmo sob condição de uma dieta materna HF durante a lactação.

No que diz respeito as medidas corporais, os animais da dieta HF materna teve peso corporal, CA, CT e índice de Lee mais elevado do que os controles até os 40 dias de vida. A dieta HF utilizada no presente estudo continha uma quantidade maior de gordura e energia do que a dieta controle. As evidências indicam que, em roedores, o excesso nutricional materno devido ao elevado consumo de alimentos ricos em gorduras e/ou energia promove o desenvolvimento de obesidade na descendência (FRENCH et al., 2001; SPENCER, 2012). Além disso, ao considerar a exposição pré ou pós-natal para estes tipos de dietas, o período pós-natal (amamentação) foi mais crítico para determinar consequências metabólicas na descendência (SUN et al., 2012). Estudos sugerem que a dieta materna influencia a composição do leite materno (TINOCO et al., 2007, RICHARD et al., 2015), e que a dieta HF eleva as concentrações de proteínas, lactose e triglicéridos no leite. Consequentemente, uma dieta materna HF pode induzir hipernutrição na prole (HOWIE et al., 2009; FRANCO et al., 2012).

Alterações metabólicas devido à ingestão de dieta HF durante a fase perinatal pode envolver sistemas de leptina e insulina. Ambos os sistemas estão relacionados com mudanças corporais, tais como maior ganho de peso e adiposidade (HOWIE et al., 2009). Todas estas alterações podem ser encontradas mesmo na ausência de excesso de peso materno, indicando efeito específico da gordura saturada no metabolismo da descendência (FRANCO et al., 2012). Uma dieta HF durante a lactação também induz a resistência à insulina e a intolerância à glicose (VOGT et al., 2014), uma vez que a obesidade materna pode resultar numa regulação negativa do transportador de glicose (GLUT4) no músculo esquelético da prole (SIMAR et al., 2012). Em nosso estudo utilizamos uma dieta hiperlipídica saturada, o óleo de palma, que pode ter influenciado esses hormônios e aumentado as medições corporais na prole.

Aos 60 dias de vida não houve diferenças significativas de ganho de peso corporal e peso corporal nos animais HF dentro das quatro condições estudadas, quando comparados aos controles. Em outro modelo experimental de obesidade, ratos provenientes de ninhadas pequenas apresentaram um aumento de peso corporal até 21 dias, mas após 30 e 60 dias de vida, este efeito desapareceu (NERI et al., 2011). Em nosso estudo este aumento permaneceu até os 40 dias de vida.

O exercício físico não influenciou o peso corporal e ganho de peso corporal nos ratos expostos a dieta HF, semelhante aos resultados de estudo com animais controle (MONTEIRO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2015). Lee et al. (2005) sugeriram que o exercício aeróbico crônico pode aumentar a taxa total de músculo-gordura sem perda de peso. Além disso, o tratamento com fluoxetina não teve efeito sobre o peso corporal dos animais HF. A mesma constatação foi reportada para a fluvoxamina, outro inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS) em ratos adolescentes eutróficos (JONG et al., 2006). É possível que os efeitos sobre o peso corporal de ISRS e o apetite podem desaparecer durante o tratamento crônico (JONG et al 2006; CAMARO et al., 2008). O Índice de Lee, um preditor de sobrepeso que considera o peso corporal (NERY et al., 2011), não diferiu entre os grupos.

Outros preditores corporais, CA e CT, aumentaram em todos os quatro grupos HF comparados com os grupos controles. Sabe-se que a lactação coincide com o período máximo adipogênese em roedores (LECOULTRE e BRETON, 2015). Além disso, a ingestão de dieta materna durante a amamentação pode alterar a qualidade do leite em favor do alargamento dos adipócitos dos descendentes (LECOULTRE e BRETON, 2015). É importante mencionar que a CA foi reduzida no grupo HF/EW comparado ao grupo HF/SW. Isso demonstra a eficiência do exercício físico em melhorar a composição corporal, apesar de sua incapacidade de reduzir o peso corporal.

O exercício físico diminuiu a CA, mas aumentou a gordura retroperitoneal no grupo HF/EW. Pode ser especulado que um efeito compensatório do exercício físico sobre a ingestão calórica (GOLLISH et al., 2009; ZAMBON et al., 2009) associado com a lipogênese induzida por dieta HF (LECOULTRE e BRETON, 2015) promove o acúmulo de gordura abdominal. A gordura retroperitoneal é uma medida que pode representar a adiposidade central (ZAMBON et al., 2009). No entanto, quando a fluoxetina foi administrada em conjunto com o exercício, o valor absoluto de gordura retroperitoneal foi reduzida. A fluoxetina parece atuar diretamente sobre o tecido adiposo *in vitro*, diminuindo o acúmulo de gordura através da inibição da proliferação e diferenciação de células estaminais derivadas de tecido adiposo (SUN et al., 2015). Em animais geneticamente obesos, o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg i.p. durante

duas semanas) reduziu a gordura corporal total (CHURRUCA et al., 2004). Na verdade, a gordura retroperitoneal no grupo HF/SF foi, significativamente, a menor entre os grupos.

O tecido epididimal não foi alterado após o exercício e/ou administração de fluoxetina. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos adultos amamentados em pequenas ninhadas e submetidos ao exercício de natação (NERY et al., 2011). Estes autores sugerem que a sobrecarga do exercício ou, pelo menos, o maior volume de atividade teria mais efeito sobre este tecido. No que diz respeito efeito fluoxetina nesse tecido, Da Silva et al. (2015) mostraram que ratos que receberam injeções subcutâneas de fluoxetina a partir de 1º até 21º dias de vida apresentaram redução de tecido adiposo branco no epidídimo. A discrepância dos nossos resultados pode ser devido a diferenças metodológicas, uma vez que usamos a fluoxetina por via orogástrica em animais mais velhos (40 a 60 dias de vida).

Com relação aos efeitos relacionados com a nutrição sob a excitabilidade cerebral, a dieta HF acelera a velocidade da DAC (grupo HF/SW x grupo C/SW). De fato, tem sido sugerido que o consumo de uma dieta HF materna afeta significativamente o ambiente cerebral da descendência (SEGOVIA et al., 2015). Além disso, as modificações nos lipídios alimentares maternos têm sido associadas com efeitos negativos sobre a mielinização da via auditiva do tronco cerebral (SASTE et al., 2008). Por outro lado, o conteúdo de mielina está inversamente relacionado com a velocidade de propagação da DAC (MERKLER et al., 2009).

Soares et al. (2012) sugeriram que o tratamento com ácido linoleico conjugado realizado durante a lactação pode prejudicar a síntese de mielina na descendência e poderia estar envolvido na aceleração da DAC. A dieta HF utilizada em nosso estudo continha quantidades mais elevadas de ácido palmítico, esteárico e oleico que a dieta controle; e os proteolípideos presentes na mielina no sistema nervoso central do cérebro de rato parece conter ácidos graxos na sua ligação, principalmente os ácidos palmítico, oleico e esteárico (BIZZOZERO, SOTO e PASQUINI, 1984; BIZZOZERO e GOOD, 1991). É possível que o desequilíbrio na composição dos lipídios ingeridos durante o período de amamentação possa influenciar negativamente a mielinização e promover efeitos duradouros na eletrofisiologia do cérebro.

Freeman et al. (2014) relataram que uma dieta HF no período pós-natal está envolvida com danos no cérebro da prole, devido à inflamação. O estado obeso é caracterizado por uma inflamação sistêmica de baixo grau, principalmente como resultado de um aumento no tamanho dos adipócitos, bem como da atividade macrófágica existente e resistente a gordura (GIL et al., 2007). Em relação ao cérebro, a dieta HF pode resultar em elevada quantidade de TNF- α no hipocampo de ratos (SPAGNUOLO et al., 2015), e a lactação é crítica para o desenvolvimento do sistema imune, especialmente para o sistema imune adquirido (KELLY e COUNTTS, 2000).

A inflamação crônica de baixo grau, como resultado da ingestão de dieta HF materna, pode ser ativada em muitos órgãos da descendência, incluindo no cérebro (ZHOU e PAN, 2015). Sasaki et al. (2013) observaram que a descendência adulta exposta a dieta HF perinatal apresentou expressão aumentada dos receptores de corticosterona na amígdala e expressão pró-inflamatória e anti-inflamatória alterada em genes do hipocampo e amígdala conhecidos por serem regulados pelo receptor glucocorticóide. Além disso, a DAC parece estar envolvida na inflamação neurogênica intracraniana em torno dos vasos sanguíneos meníngeos na enxaqueca (CUI, KATAOKA e WATANABE, 2014). Assim, é possível especular que o efeito facilitador de uma dieta HF sobre a DAC pode estar associado a alterações impostas pela inflamação.

A dieta HF também está relacionada ao estresse oxidativo e alterações na vascularização cerebral (FREEMAN et al., 2014). Por exemplo, tem sido mostrado que uma dieta hiperlipidêmica altera a estrutura micro-vascular no córtex cerebral de hamster (CONSTANTINESCU, SAFCIUC e SIMA, 2011). No hipocampo de ratos, Spagnuolo et al. (2015) detectaram que uma dieta HF por longo período aumenta os níveis séricos de hemoglobina e diminuem os de haptoglobina, uma proteína que atua como um antioxidante através da ligação com a hemoglobina livre. Esses autores sugerem que as mudanças na vascularização/barreira hemato encefálica podem ser responsáveis pelo aumento observado nos níveis de hemoglobina cerebral (SPAGNUOLO et al., 2015).

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o excesso de espécies reativas de oxigênio aumenta a excitabilidade cortical (GUEDES e FRADE, 1993; ABADIE-GUEDES et al., 2008). Além disso, a desnutrição durante a gestação ou lactação diminui a densidade de vasos sanguíneos no córtex cerebral de filhotes de ratos e essa redução se mantém ao longo da vida (PEELING e SMART, 1994; BENNIS-TALEB et al., 1999). Ambas situações, estresse oxidativo e vascularização cerebral, podem influenciar a eletrofisiologia do cérebro (ABADIE-GUEDES et al., 2012; AYATA, 2013). Assim, diante do exposto acima, podemos especular que a dieta HF durante a lactação pode mudar a defesa oxidativa e o desenvolvimento vascular da descendência (animais HF/SW), aumentando a susceptibilidade a DAC.

Assim como é importante para identificar as ações de uma dieta HF sobre o corpo, é necessário propor maneiras de reverter seus efeitos prejudiciais. Em nosso estudo, o aumento da velocidade da DAC foi atenuada pelo exercício em esteira (animais HF/EW). Pesquisas anteriores em nosso laboratório mostraram um efeito antagonista do exercício físico na DAC sob condições nutricionais normais durante a lactação (MONTEIRO et al., 2015). Ou seja, parece que os efeitos do exercício físico ocorre independente do estado nutricional.

Curiosamente, ratos desnutridos durante a lactação também apresentam um aumento nas velocidades da DAC. No entanto, o exercício em esteira também desacelera a velocidade de propagação da DAC, mesmo em animais idosos (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Alguns estudos têm proposto que o consumo de dieta ocidental pode ativar vias consistentes que originam alterações vasculares semelhantes as do envelhecimento (DANTAS et al., 2014). Diante disso, estudos têm proposto que o exercício moderado (exercício de natação, 60 minutos/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas) pode atenuar os efeitos vasculares do envelhecimento através da regulação positiva do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), e reduzir significativamente o estresse oxidativo induzido pela idade (Viboolvorakul e Patumraj, 2014). Além disso, o exercício em esteira durante 3 semanas, 30 min/dia também aumentou o FCEV e a densidade de micro vasos dentro da vasculatura cerebral de ratos idosos (DING et al., 2006). Assim, é possível que uma dieta HF pode promover alterações vasculares no cérebro prole. Contudo, o exercício físico atenua putativamente este efeito por seu papel angiogênico no organismo, incluindo no córtex cerebral (HUANG et al., 2013).

Tem sido relatado que as alterações vasculares cerebrais estão envolvidas na patofisiologia da enxaqueca, incluindo as alterações vasculares induzidas pela obesidade (NOSEDA e BURSTEIN, 2013; IRBY et al., 2015). Por sua vez, o mecanismo da DAC parece estar implicado em desordens vasculares da enxaqueca (MCCOMAS e UPTON, 2015). Ao considerar que o exercício físico pode reduzir o fardo da enxaqueca (IRBY et al., 2015), é razoável que ele pode também influenciar a excitabilidade cerebral, retardando a propagação da DAC.

O exercício físico também melhora as mudanças vasculares cerebrais que ocorrem no acidente vascular cerebral isquêmico e este efeito envolve a ativação do sistema serotoninérgico. Lan et al. (2014) mostraram que a oclusão permanente da artéria cerebral média reduziu os níveis de serotonina. No entanto, após 16 dias de desempenho em roda de corrida, o receptor 5-HT_{1A} (5-HT_{1AR}) e os níveis de expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram regulados positivamente (LAN et al., 2014). Além disso, estudo prévio observou que exercício em esteira isoladamente ou em conjunto com a fluoxetina, um medicamento que aumenta a disponibilidade de serotonina no cérebro, diminuiu a velocidade da DAC (MONTEIRO et al., 2015). Nesse estudo, foi observado efeito da fluoxetina em condições de lactação favoráveis.

Estudos de DAC anteriores demonstraram que o estado nutricional precoce pode promover diferentes respostas eletrofisiológicas a algumas substâncias (GUEDES et al., 1992; COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001). Por exemplo, a desnutrição durante a lactação aumenta o

efeito da naloxona sobre a propagação da DAC nos cérebros de ratos adultos (GUEDES et al., 2013). Em contraste, o efeito da pilocarpina é reduzida em animais adultos que foram submetidos a desnutrição nas fases iniciais da vida (DE-VASCONCELOS et al., 2004). No entanto, outro estudo sugere que a indução de modificações do estado nutricional precoce sobre a DAC dependem do sistema cerebral em questão, uma vez que três drogas serotoninérgicas testadas, citalopram, fluoxetina e tianeptina, não tiveram seus efeitos alterados pela subnutrição anterior (GUEDES et al., 2002;. AMANCIO -DOS-SANTOS et al., 2006; AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2013).

Na verdade, o período de lactação constitui uma janela sensível para o desenvolvimento do sistema serotoninérgico (JURY et al., 2015) e este sistema de neurotransmissão afeta os mecanismos subjacentes da DAC (GUEDES et al., 2002; AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). Papazoglou et al. (2015) demonstraram que uma dieta HF prejudica a proliferação de células na área do cérebro que recebe intensa inervação serotoninérgica (giro dentado do hipocampo) e sugeriu que os mecanismos que ligam a obesidade a depressão envolvem este neurotransmissor. Assim, as intervenções que ativam o sistema serotoninérgico, como o exercício físico e o tratamento com fluoxetina, parece ser uma estratégia útil contra condições patológicas importantes, tais como a obesidade e a depressão.

5. Conclusão

Em conclusão, o presente estudo *in vivo* descreve os efeitos duradouros do exercício em esteira e tratamento fluoxetina sobre a DAC em filhotes de ratos expostos a uma dieta HF materna durante a lactação. Os resultados permitem-nos tirar duas conclusões. Primeiro, a propagação da DAC acelera em condições desfavoráveis de lactação. Em segundo lugar, o processo de hipernutrição precoce interage com as duas manipulações de início tardio (exercício e fluoxetina), acelerando a velocidade da DAC. Os dados destacam a relação entre a nutrição, exercício físico e fluoxetina sobre o fenômeno relacionado com excitabilidade do cerebral e parâmetros corporais.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ A hipernutrição precoce aumentou a neuroexcitabilidade cortical na prole na idade adulta, observada através de maiores velocidades de propagação da DAC que os animais controles;

✓ A fluoxetina e o exercício físico exercem efeitos antagônicos sobre a neuroexcitabilidade cortical nas duas condições nutricionais de lactação; pois nos animais padrão e hipernutridos ambas as manipulações reduziram as velocidades de propagação da DAC.

✓ O exercício físico reforçou o efeito da fluoxetina nos animais que recebem dieta padrão na lactação, no que se refere a excitabilidade cerebral. Efeito que não aconteceu nos animais hipernutridos.

✓ A hipernutrição na lactação alterou os padrões murinométricos da prole até a idade de 40 dias. Aos 60 dias, o exercício em esteira sozinho reduziu significativamente a circunferência abdominal nesses animais, mas o excesso de gordura abdominal e torácica ainda pode ser observado pelas medições das circunferências torácicas e abdominais.

✓ A combinação da fluoxetina e do exercício físico diminuiu significativamente o ganho de peso no período entre 40 e 60 dias de vida nos animais alimentados por dieta padrão no aleitamento. Nos animais hipernutridos durante a lactação, a fluoxetina reduziu, enquanto o exercício aumentou a quantidade do tecido adiposo retroperitoneal.

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES R. et al. Dose dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism, Clinic and Experimental Research**, v. 32, p. 1417-21, 2008.

ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R. C.; BEZERRA, R. S. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. **Alcoholism, Clinic and Experimental Research**, v. 36, n. 9, p. 1563-7, 2012.

ALZAMENDI, A. et al. Increased male offspring's risk of metabolic-neuroendocrine dysfunction and overweight after fructose-rich diet intake by the lactating mother. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4214-23, 2010.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**. v. 200, p.275-282, 2006.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v.706, p. 70-5, 2013.

ARIDA, R.M. et al. Physical training in developing rats does not influence the kindling development in the adult life. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 629–633, 2007.

AYATA, C. Spreading depression and neurovascular coupling. **Stroke**, v. 44, p.S87-9, 2013.

AYRES, C. et al. Intrauterine Growth Restriction and the Fetal Programming of the Hedonic Response to Sweet Taste in Newborn Infants. **International Journal of Pediatrics**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

BAHARI, H.; CARUSO, V.; MORRIS, M.J. Late-onset exercise in female rat offspring ameliorates the detrimental metabolic impact of maternal obesity. **Endocrinology**, v. 154, p. 3610-21, 2013.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M. et al. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 6, p. 452-7, 2012.

BAYOL, S. A; FARRINGTON, S. J; STICKLAND, N. C. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n 4, p.843-51, 2007.

BECKMAN, D., SANTOS, L., E. The Importance of Serotonin in Exercise-Induced Adult Neurogenesis: New Evidence from *Tph2*^{-/-} Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 36, p. 14283–14284, 2013.

BELLO, N. T.; LIANG, N. C. The use of serotonergic drugs to treat obesity – is there any hope? **Drug Design, Development and Therapy**, n. 10, n. 5, p. 95–109, 2011.

BENNIS-TALEB N. et al. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1613-9, 1999.

BERGER, M. et al. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. **Cephalalgia**, v. 28, p. 558-562, 2008.

BERUMEN, L. C. et al. Serotonin Receptors in Hippocampus. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 823493, 2012.

BEST, J.; NIJHOUT, H. F.; REED, M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. **Theoretical Biology & Medical Modelling**, v. 19, n. 7, p. 7-34, 2010.

BHAGWAGAR, Z. WHALE, R.; COWEN, P. J. State and trait abnormalities in serotonin function in major depression. **British Journal of Psychiatry**, v. 180, p.24-28, 2002.

BIZZOZERO, O. A.; GOOD, L. K. Rapid metabolism of fatty acids covalently bound to myelin proteolipid protein. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p.17092-8, 1991.

BIZZOZERO, O. A.; SOTO, E. F.; PASQUINI, J. M. Simultaneously entry of palmitic acid into proteolipid protein in different myelin subfractions of rat brain. **Neurochemistry International**, v. 6, p. 659-64, 1984.

BOUTROS, N. et al. Adolescent intermittent ethanol exposure is associated with increased risky choice and decreased dopaminergic and cholinergic neuron markers in adult rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 1-9, 2015.

BRETON, C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R19-31, 2013.

CABRAL-FILHO, J.E.; TRINDADE-FILHO, E.M.; GUEDES, R.C.A. Effect of D-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 28, n. 3, p. 347–350, 1995.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, J. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Reports**, v. 100, n. 2, p. 126-131, 1985.

CASPI, A. et al. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. **Science**, v. 297, p. 851–4, 2002.

CECHETTI, F. et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n.1, p. 90-6, 2012.

CHANGO, A.; POGRIBNY, I. P. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2748-70, 2015.

CHARNAY, Y.; LÉGER, L. Brain serotonergic circuitries. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 471–487, 2010.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; LÉVY, R. Developmental origins of health and disease in adults: role of maternal environment. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, v.40, n. 9, p. 517-9, 2012.

CHURRUCA, I. et al. Effects of fluoxetine administration on regional galanin expression in obese Zucker rat hypothalamus. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 171-5, 2004.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte.**, v. 10, n. 4, p. 319-324, 2004.

CIRANNA, L.; CATANIA, M. V. 5-HT7 receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.27, n. 8, p. 1-17, 2014.

CONSTANTINESCU, E.; SAFCIUC, F.; SIMA, A. V. A hyperlipidemic diet induces structural changes in cerebral blood vessels. **Current Neurovascular Research**, v. 8, p. 131-44, 2011.

COONEY, G.M. et al. Exercise for depression. **JAMA**, v. 311, n. 23, p. 2432-3, 2013.

COSTA-CRUZ, R. R.; GUEDES, R.C. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, n. 3, p. 177-80, 2001.

CRESCENZO, F. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for post-partum depression (PPD): A systematic review of randomized clinical trials. **Journal of Affective Disorders**, v. 152-154, p. 39-44, 2014.

CUI, Y.; KATAOKA, Y.; WATANABE, Y. Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 812-22, 2014.

DA SILVA, A, I. et al. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 47, n. 4, p.309-18, 2015.

DANTAS, A.P. et al. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. **Experimental Gerontology**, v. 55, p.1-11, 2014

DEBETTE, S. et al. Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 2, p. 136-144, 2010.

DE-VASCONCELOS, C. A. et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 163-70, 2004.

DING, Y. H. et al. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. **Current Neurovascular Research**, v. 3, n. 1, p.15-23, 2006.

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

DRISCOLL, I. et al. Midlife Obesity and Trajectories of Brain Volume Changes in Older Adults. **Human Brain Mapping**, v. 33, p. 2204–2210, 2012.

ENGELHARDT, E.; GOMES, M. M. Aristides Leão: a birth centennial homage with comments on his spreading depression. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 73, n. 6, p. 544-6, 2015.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-24, 2004.

FALL, C. H. D. Fetal Programming and the Risk of Noncommunicable Disease. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 80, Suppl 1, p.13-20, 2012.

FARMER, J. et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague–Dawley rats in vivo. **Neuroscience**, v. 124, p. 71–79, 2004.

FERNANDES, M. F. et al. Nutritional controls of food reward. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 37, n. 4, p.260-8, 2013.

FERNSTROM, J. D. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. **Physiological Reviews**, v. 63, p. 484-546, 1983.

FERRARI, M.D. et al. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 1, p. 65-80, 2015.

FERREIRA, A.F.B. et al. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. **Brain Research**, v. 1425, p. 111 – 122, 2011.

FIFKOVA, E. et al. Leão's spreading depression in the cerebellum of rat. **Experientia**, v.17, p. 572-573, 1961.

FRANCO, J.G. et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat 2 offspring at weaning. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5503-18, 2012.

FRAZÃO, M. F; MAIA, L. M. S. S; GUEDES, R. C. A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**; v. 447, n. 1, p. 26-30, 2008.

FREEMAN, L. R. et al. Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 241-51, 2014.

FRENCH, A. S.; STORY, M; JEFFERY, R. W. Environmental influences on eating and physical activity. **Annual Review of Public Health**; v. 22, p. 309-35, 2001.

GAGE, S. H.; MUNAFÒ, M. R.; DAVEY SMITH, G. Causal inference in developmental origins of health and disease (DOHaD) research. **Annual Review of Psychology**, v. 67, p.:567–85, 2016.

GAMARO, G.D. et al. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 3, p. 312-7, 2008.

GAO, Y. et al. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. **Brain Research**. v. 1585, p.83-90, 2014.

GERMANO, P. C. S. et al. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275-81, 2013.

GIL, A. et al. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. **Brain Journal of Nutrition**, v. 98, p. S121-6, 2007.

GOLLISCH, K. S. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n.2, p. E495-504, 2009.

GOMES DA SILVA, S. et al. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain & Development**, v. 32, n. 2, p. 137-42, 2010.

GOMEZ, F. et al. Short-term fluoxetine treatment induces neuroendocrine and behavioral anxiogenic-like responses in adolescent male rats. **Experimental Brain Research**, v. 17, n. 3, p. 1-13, 2014.

GORELOVA, N.A.; KRIVÁNEK, J.; BURES, J. Functional and metabolic correlates of long series of cortical spreading depression waves in rats. **Brain Research**, v. 404, n. 1-2, p. 379–81, 1987.

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

GREENWOOD, B.N.; FLESHNER, M. Exercise, stress resistance, and central serotonergic systems. **Exercise Sport Science Review**, v. 39, n. 3, p.140-9, 2011.

GUEDES, R. C.; FRADE, S. F. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 26, p.1241-4, 1993.

GUEDES, R. C. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 4, p.142-6, 2013.

GUEDES, R.C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODÓSIO, N. R. "GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats". In: Do Carmo, R.J (Ed.) Spreading Depression. Springer, Berlin, **Experimental Brain Research Series**, v. 23, p. 17-26, 1992.

GUEDES, R. C. A; ROCHA-DE-MELO, A. P; TEODÓSIO, N. R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.56, n. 1, 2004.

GUEDES, R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy; Ronald R Watson; Colin R Martin. (Org.). **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. 1 ed. London: Springer, v. 1, p. 2343-2355, 2011.

GUEDES, R.C.A. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience in: **Nutritional neuroscience**. In: LIEBERMAN, H; KANAREK, R; PRASAD, C (eds), "Nutritional Neuroscience: overview of an emerging field". New York: **CRC Press**; v. 3; 2005.

GUEDES, R.C. et al. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 115-23, 2002.

GUIMARÃES, C. et al. Tolerability and effectiveness of fluoxetine, metformin and sibutramine in reducing anthropometric and metabolic parameters in obese patients. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 6, p.1020-1025, 2006.

GUTIÉRREZ, A. et al. Effects of fluoxetine administration on neuropeptide y and orexins in obese Zucker rat hypothalamus. **Obesity Research**, v.10, n. 6, p. 532-40, 2002

HAMILTON, G.F.; RHODES, J.S. Chapter Sixteen – Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v.135, p. 381–406, 2015.

HIEMKE, C; HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v.85, p. 11-28, 2000.

HIGGINS, J. A. et al. Resistant starch and exercise independently attenuate weight regain on a high fat diet in a rat model of obesity. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, p. 49, 2011.

HORTON, E. S. Metabolic aspects of exercise and weight reduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.18, p. 10-8, 1985.

HÖTTING, K.; RÖDER, B. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. **Neuroscience and Biobehavior reviews**, v. 37, n. 9, p. 2243–225, 2013.

HOWIE, G. J. et al. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **Journal of Physiology**, v.587, n. 4, p. 905–915, 2009.

HUANG, C. X. et al. Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats. **Neuroscience**, v. 233, p.139-45, 2013.

IRBY, M. B. et al. Aerobic Exercise for Reducing Migraine Burden: Mechanisms, Markers, and Models of Change Processes. **Headache**, 2015 [Epub ahead of print].

JACOTTE-SIMANCAS, A. et al. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 10, p. 739-51, 2015.

JONG, T. R. et al. Effects of chronic treatment with fluvoxamine and paroxetine during adolescence on serotonin-related behavior in adult male rats. **European of Neuropsychopharmacology**, v.16, n. 1, p.39-48, 2006.

JURY, N. J. et al. Enhanced responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors during lactation. **PLoS One**, v. 10, p. e0117339, 2015.

KAMBEITZ, J. P.; HOWES, O. D. The serotonin transporter in depression: Meta-analysis of in vivo and post mortem findings and implications for understanding and treating depression. **Journal of Affect Disorders**, v. 186, p. 358-66, 2015.

KELLY, D.; COUTTS, A. G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **The Proceeding of the Nutrition Society**, v. 59, n. 2, p.177-85, 2000.

KESHEL, T. E.; COKER, R. H. Exercise Training and Insulin Resistance: A Current Review. **Journal of Obesity & Weight Loss Therapy**, Suppl 5, p.1-15, 2015.

KINNI, H. et al. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. **Brain Research**, v. 4, n. 1388, p. 48-55, 2011.

KLOMP, A. et al. Increased response to a 5-HT challenge after discontinuation of chronic serotonin uptake inhibition in the adult and adolescent rat brain. **PLoS One**, v. 9, e99873, 2014.

KNAEPEN, K. et al. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. **Sports Medicine**, v. 40, n. 9, p.765-801, 2010.

LAN, X. et al. Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. **Neurological Science**, v. 35, n. 5, p. 761-6, 2014.

LE, D. S. N. T. et al. Reanalysis of the Obesity-Related Attenuation in the Left Dorsolateral Prefrontal Cortex Response to a Satiating Meal Using Gyral Regions-of-Interest. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 667–673, 2009.

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

LEÃO, A.A.P. Further observation, on spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, n.10, p. 409-414, 1947.

LEÃO, A.A.P.; MARTINS-FERREIRA, H. Nota sobre a ocorrência da depressão alastrante no hipocampo e no corpo estriado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 30, p. I, 1958.

LECOUTRE, S.; BRETON, C. Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1-7, 2015.

LEE, S. et al. Exercise without weight loss is an effective strategy for obesity reduction in obese individuals with and without Type 2 diabetes. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 3, p. 1220–5, 2005.

LEIBOWITZ, S. F.; WEISS, G. F.; SUH, J. S. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 4, p. 735-42, 1990.

LI, G. et al. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. **Physiology Research**, v. 22, Epub ahead of print, 2014.

LIMA, D. S. C. et al. L-Glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v. 85, p. 241–247, 2009.

MACDARLE W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 6 ed, 2008.

MACGILLIVRAY, L. et al. The comparative effects of environmental enrichment with exercise and serotonin transporter blockade on serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Synapse**, v. 66, n. 5, p. 465-70, 2012.

MAIA, L. M. S. S. et al. L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v. 1072, n. 1, p. 19-25, 2006.

MANCINI, M; HALPERN, A. Pharmacological Treatment of Obesity. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, n. 2, p. 377-389, 2006.

MARCON, E. R; GUS, I; NEUMANN, C. R. Impact of a minimum program of supervised exercises in the cardiometabolic risk in patients with morbid obesity. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 5, p. 331-8, 2011.

MCCLURE, H. H. et al. Child and Adolescent Affective and Behavioral Distress and Elevated Adult Body Mass Index. **Child Psychiatry and Human Development**, v.43, n. 6, p. 837-54 2012.

MCCOMAS, A. J.; UPTON, A. R. Cortical spreading depression in migraine-time to reconsider? **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 73, n. 8, p. 714-21, 2015.

MEEUSEN, R. et al. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. **Brain Research**, v. 740, p. 245-252, 1996.

MENDES-DA-SILVA, R.F. et al. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155-160, 2014.

MERKLER, D. et al. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. **Annals of Neurology**, v.66, n. 3, p. 355-65, 2009.

MILIONI, F. et al. The effects of acute exercise on serum biomarkers in diabetics rats. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 20, n. 1, p. 32-35, 2014.

MONTE-GUEDES, C.K.R. et al. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, n. 3, p. 191-194, 2011.

MONTEIRO, H. M. C. et al. Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, n.5, p. 49-54, 2015.

MONTEIRO, H. M. C. et al. Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 3, p.112-8, 2011.

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

NASCIMENTO, L. F. et al. Omega-3 fatty acids induce neurogenesis of predominantly POMC-expressing cells in the hypothalamus. **Diabetes**, 2015. [Epub ahead of print].

NERY, C. et al. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, p. 49-55, 2011.

NIGHTINGALE, C. M. et al. Birthweight and risk markers for type 2 diabetes and cardiovascular disease in childhood: the Child Heart and Health Study in England (CHASE). **Diabetologia**, v.58, n. 3, p.474-84, 2015.

NISHIJIMA, T. et al. Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n.1, p. 197-203, 2012.

NORDQUIST, N.; ORELAND, L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders - a review. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v.115, n. 1, p. 2-10, 2010.

NOSEDA, R.; BURSTEIN, R. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. **Pain**, v. 154, p.44-53, 2013.

NOVELLI, E. L. B. et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International Journal of Cardiology**, v.124, n.1, p. 92-9, 2007.

OKEN, E. Maternal and Child Obesity: The Causal Link. **Obstetric Gynecology Clinical**, v. 36, p. 361-377, 2009.

OLIVIER, B. Serotonin: a never-ending story. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 2-18, 2015.

PAPAZOGLU, I. K. et al. Hippocampal GSK3 β as a molecular link between obesity and depression. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 363-74, 2015.

PARDO-PEÑA, K.; MEDINA-CEJA, L.; MORALES-VILLAGRÁN, A. Serotonin modulates fast ripple activity in rats with spontaneous recurrent seizures. **Brain Research**, v. 1583, p. 211-9, 2014.

PATTERSON, C. M. et al. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4270-9, 2010.

PEDRAZA, F. D.; QUEIROZ D. Micronutrientes no crescimento e desenvolvimento infantil. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 1, p.156-171, 2011.

PEELING, A. N.; SMART, J. L. Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 9, n. 1, p. 81-95, 1994.

PÓVOA, T. I. R. et al. Aerobic and resistance training, quality of life, functional capacity in hypertensive women. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 20, n. 1, p. 36-40, 2014.

PYSH, J.J.; WEISS, G. M. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. **Science**, v. 206, p. 230-232, 1979.

QU, Y. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, 469-73, 2009.

RADAK, Z. et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 1, p.17-23, 2001.

READ, S.J.; PARSONS, A.A. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? **Brain Research**, v. 870, n. 1-2, p. 44-53, 2000.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n.11, p.1939-51, 1993.

REGNAUX, J. P. et al. High-intensity versus low-intensity physical activity or exercise in people with hip or knee osteoarthritis. **Cochrane Database Systemic Review**, 2015.

REYNOLDS, C. et al. Early life nutrition and energy balance disorders in offspring in later life. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8090-111, 2015.

RHEE, K. E.; PHELAN, S.; MCCAFFERY, J. Early determinants of obesity: genetic, epigenetic, and in utero influences. **International Journal of Pediatrics**, v. 2012, p. 463850, 2012.

RICHARD, C. et al. The content of docosahexaenoic acid in the maternal diet differentially affects the immune response in lactating dams and suckled offspring. **European Journal of Nutrition**. [Epub ahead of print], 2015.

ROCHA-DE-MELO, A. P. et al. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, n. 3-4, p. 155-160, 2006.

SASAKI A. et al. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, v. 240, p.1-12, 2013.

SASTE, M. D. et al. Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. **The Journal of Nutrition**, v.128, n. 4, p.740-3, 1998.

SEGOVIA, S. A. et al. Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalises the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.26, n. 12, p. 1448-57, 2015.

SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. **Journal of Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 317-25, 2012.

SHARP, T.; COWEN, P. J. 5-HT and depression: is the glass half-full? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 45–51, 2011.

SIKORSKI, C. et al. The stigma of obesity in the general public and its implications for public health - a systematic review. **BMC Public Health**, v. 11, p. 661, 2011.

SIMAR, D. et al. Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. **Nutritional and Metabolism Cardiovascular Disease**, v. 22, n. 3, p. 269-76, 2012.

SINCLAIR, K. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, p. 19351–6, 2007.

SOARES, J. K. et al. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1820, n. 10, p.1490-5, 2012.

SOMJEN, G.G. et al. Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 70, p. 248-254, 1992.

SPAGNUOLO, M. S. et al. High fat diet and inflammation - modulation of haptoglobin level in rat brain. **Frontiers of Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 479, 2015.

SPENCER, S.J. Early life programming of obesity: the impact of the perinatal environment on the development of obesity and metabolic dysfunction in the offspring. **Current Diabetes Review**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2012.

STREIT, D. S.; FERREIRA-FILHO, C. R.; MARTINS-FERREIRA, H. Spreading Depression in Isolated Spinal Cord. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p. 887-890, 1995.

STUNKARD, A. J.; FAITH, M. S.; ALLISON, K. C. Depression and Obesity. **Biological Psychiatry**, v.54, n. 3, p. 330-337, 2003.

SUN, B. et al. Maternal high - fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. **Diabetes.diabetesjournals.org**, v.61, n. 11, p.2833-41, 2012.

SUN, B. K. et al. Fluoxetine decreases the proliferation and adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 7, p. 16655-68, 2015.

SUN, X. et al. Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. **Neuroimaging**, v. 57, n.3, p. 873-84, 2011.

TAIROVA, O.S.; DE LORENZE, D. R. S. The influence of exercise in the quality of life of postmenopausal women: a case-control study. *Revista Brasileira. Geriatria Gerontologia*, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 135-145, 2011.

TARLACI, S. Escitalopram and venlafaxine for the prophylaxis of migraine headache without mood disorders. **Clinical Neuropharmacology**, v.32, n.5, p. 254-8, 2009.

TEODORO, B. G. et al. The aerobic physical exercise intensity influence on the atherosclerotic process. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 16, n. 5, p. 382-7, 2010.

TINOCO, S. M. et al. The importance of essential fatty acids and the effect of trans fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 525-34, 2007.

TORRENTE, D. et al. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 87-90, 2014.

TORRES-LEAL, F. L. et al. Leucinen supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, p. 62, 2011.

TROMBETTA, I. C. Exercício físico e dieta hipocalórica para o paciente obeso: vantagens e desvantagens. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 10, p. 130-133, 2003.

VALLE, C. P.; DURCE, K.; FERREIRA, C. A. S. Conseqüências fetais da obesidade gestacional. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v. 32, n. 4, p. 537-541, 2008.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and Exercise: Past and Future Directions. **Neuromolecular Medicine**, v. 10, p. 128–140, 2008.

VAYNMAN, S. S. et al. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain Research**, v. 1070, n. 1, p. 124–130, 2006.

VIBOOLVORAKUL, S.; PATUMRAJ, S. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

VOGT, M. C. et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. **Cell**, v. 156, n. 3, p. 495-509, 2014.

VOIGT, J.P.; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behavioral Brain Research**, v. 277, p. 14-31, 2015.

WANG, J. et al. Effects of exercise on stress-induced changes of norepinephrine and serotonin in rat hippocampus. **Chinese Journal of Physiology**, v. 56, p. 245-252, 2013.

WANG, X. et al. Physical exercise training and neurovascular unit in ischemic stroke. **Neuroscience**, v. 271, p. 99-107, 2014.

WEN L. et al. Exercise prevents raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat depression model. **Physiology & Behavior**, v. 132, p. 57-65, 2014.

WONG, D. T; PERRY, K. W; BYMASTER, F. P. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews**, v. 4, n. 9, p. 764-774, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 08/11/2015.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R.C. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 24, p.1277-81, 1991.

ZAMBON L. et al. Effects of two different types of swimming exercise on adiposity and lipid profile in rats with exogenous obesity. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.22, p.707-715, 2009.

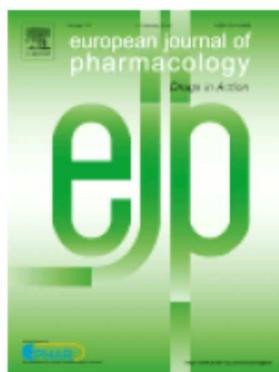
ZHANG, F.; WU, Y.; JIA, J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. **Neuroscience**, v. 177, p. 170-6, 2011.

ZHANG, L. et al. Rewiring of regenerated axons by combining treadmill training with semaphorin3A inhibition. **Molecular Brain**, v. 10, n. 7, p. 14, 2014.

ZHOU, D.; PAN, Y.X. Pathophysiological basis for compromised health beyond generations: role of maternal high-fat diet and low-grade chronic inflammation. **J Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 1-8, 2015.

APÊNDICE 1 - Artigo Original 1 publicado

Title: Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats.



ISSN: 0014-2999

Authors: Heloísa Mirelle Costa Monteiro^a, Nathália Lima Barreto-Silva^b, Gracyelle Elizabete dos Santos^b, Amanda de Santana Santos^b, Mariana Séfora Bezerra Sousa^a, Angela Amancio-dos-Santos^{b*}

Affiliations: ^aDepartamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, 50670-901, Recife-PE, Brazil (helo-mcm@hotmail.com)

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 50740-600, Recife-PE, Brazil
(angela.asantos@yahoo.com; angela.asantos@ufpe.br)

*Corresponding author: Telephone: + 55-81-2126-8530. Fax: + 55-81-2126-8976.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, S/N Cidade Universitária, 0740-600, Recife, PE-Brazil. E-mail: angela.asantos@yahoo.com; angela.asantos@ufpe.br



Neuropharmacology and analgesia

Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats



Heloísa Mirelle Costa Monteiro^a, Nathália Lima Barreto-Silva^b,
Gracyelle Elizabete dos Santos^b, Amanda de Santana Santos^b,
Mariana Séfora Bezerra Sousa^a, Ângela Amâncio-dos-Santos^{b,*}

^a Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, 50670-901 Recife-PE, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 50740-600 Recife-PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2015

Received in revised form

11 May 2015

Accepted 18 May 2015

Available online 21 May 2015

Keywords:

Body parameters

Brain excitability

Central nervous system

Treadmill

ABSTRACT

The antidepressant fluoxetine and physical exercise exert similar effects on the serotonergic system by increasing brain serotonin availability, and both show antagonistic action on cortical excitability. Here we provide the first assessment of the interaction of the two together on cortical spreading depression (CSD) in young adult rats. Wistar rats (40–60 days of life) received fluoxetine (10 mg/kg/d, orogastrically) or an equivalent volume of water. Half of the animals from each condition were assigned to perform physical exercise in a treadmill, and the other half formed the sedentary (non-treadmill) control groups. Body parameters (Lee index and thoracic and abdominal circumferences) and the velocity of CSD propagation were investigated. Fluoxetine+exercise animals had less weight gain (78.68 ± 3.19 g) than either the fluoxetine-only (93.34 ± 4.77 g) or exercise-only group (97.04 ± 3.48 g), but body parameters did not differ among them. The velocity of CSD propagation was reduced in the fluoxetine-only and exercise-only groups compared to sedentary water controls (3.24 ± 0.39 mm/min). For the fluoxetine+exercise group, CSD velocity values were significantly lower (2.92 ± 0.22 mm/min) than for fluoxetine only (3.03 ± 0.35 mm/min); however, they were similar to values for the exercise-only group (2.96 ± 0.23 mm/min). These findings confirm the similar effects of fluoxetine and exercise and suggest a greater effect of physical exercise in reducing brain excitability.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin, or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a neurotransmitter that is widely distributed in the central nervous system. This monoamine is important in many behaviors, including sleep, appetite, memory, sexual behavior, neuroendocrine function, and mood (Sghendo and Mifsud, 2012). It also interferes in food behavior, promoting satiety and reducing body weight ([Guimarães et al., 2006, Voigt and Fink, 2015]) and seems to decrease brain excitability ([Pardo-Peña et al., 2014, Tarlaci, 2009]).

The selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine is an antidepressant that increases brain serotonin availability (Qu et al., 2009). Because of some reports that physical exercise also increases brain serotonin (Lan et al., 2014; Meeusen et al., 1996), physical exercise could be suggested as a less expensive strategy

for the same result.

A relationship between serotonin and brain excitability has been reported with other SSRIs (Amâncio-dos-Santos et al., 2006; Guedes et al., 2002). Citalopram can reduce the occurrence of spontaneous high-frequency oscillations that occur in epileptic seizures (Pardo-Peña et al., 2014). Escitalopram promotes a decreased frequency, duration, and intensity of episodes of migraine (Tarlaci, 2009). Additionally, serotonin exerts an antagonistic effect on cortical spreading depression (CSD) ([Amâncio-dos-Santos et al., 2006, Amâncio-dos-Santos et al., 2013, Guedes et al., 2002, Read and Parsons, 2000]). CSD has been described as a slowly propagating wave of depression of spontaneous cortical electrical activity that occurs with chemical, electrical, or mechanical stimulation of one point of cortical tissue (Leão, 1944). The CSD wave consists of reducing (“depression”) of the electrical activity of brain tissue that spreads (“spreading”) concentrically and reversibly (Leão, 1944). Simultaneous with the depression of spontaneous electrical activity, a slow direct-current (DC) potential change (SPC) appears in the cortical region where the CSD is observed, and this “all or none” signal clearly marks the beginning and the end of the phenomenon (Leão, 1947). Thus, the SPC is

* Correspondence to: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, S/N Cidade Universitária, 50740-600 Recife, PE-Brazil. Fax: +55 81 2126 8976.

E-mail addresses: helo-mcm@hotmail.com (H. Mirelle Costa Monteiro), angela.asantos@yahoo.com, angela.asantos@ufpe.br (Â. Amâncio-dos-Santos).

widely used to calculate the velocity at which the CSD propagates through the nervous tissue (Guedes et al., 2004).

We previously showed that administration of fluoxetine during development dose-dependently impairs CSD propagation. Wistar rats treated with fluoxetine (10 mg/kg, s.c.) showed a reduction in CSD propagation velocity. However, a dose of 20 mg/kg had an even stronger effect (Amâncio-dos-Santos et al., 2006). Additionally, the effect of physical exercise on CSD was also investigated. Rats performed physical exercise on a treadmill during early phases of development, at adulthood, or during senescence. At all ages, an antagonistic effect of exercise on CSD was observed (Batista-de-Oliveira et al., 2012; Monteiro et al., 2011). These data led us to ask the following questions: (1) Can physical exercise potentiate the effect of 10 mg/kg fluoxetine on CSD? (2) Do fluoxetine administration and physical exercise influence CSD propagation in young adulthood? (3) Do physical exercise and fluoxetine administration interact and influence body parameters?

2. Methods

2.1. Animals and experimental groups

Male Wistar rats were handled in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, USA) and the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco. They were reared in polyethylene cages (51 cm × 35.5 cm × 18.5 cm) in a room maintained at 22 ± 1 °C with a 12-h light:dark cycle (lights on at 6:00 a. m.) and free access to water and rodent laboratory chow diet (Presence Nutrição Animal, São Paulo, Brazil). At 40–60 days of life, the animals were assigned to one of the following groups: sedentary and treated with vehicle (distilled water control; water-only group); exercised and treated with vehicle (exercised-only group); sedentary and treated with fluoxetine 10 mg/kg/d (fluoxetine-only group); and exercised and treated with fluoxetine (exercised + fluoxetine group).

2.2. Fluoxetine administration and the treadmill exercise protocol

Animals were administered orogastrically either 10 mg/kg fluoxetine hydrochloride (Medley®) or an equivalent volume of distilled water. The total volume administered in each gavage was 1.0 ml/d. Following gavage, rats in the two exercise groups were submitted to moderate exercise on a treadmill (model ET 2000, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brazil, 0° inclination) (Batista-de-Oliveira et al., 2012; Gomes da Silva et al., 2010). Periods of treadmill exercise lasted 3 weeks, 30 min per day, in 5 weekly sessions (one session per day). The treadmill running velocity was set at 5 m/min during the first week; during the second and third weeks, the velocity was increased to 10 m/min and 15 m/min, respectively (Monteiro et al., 2011). Rats from the sedentary groups (water-only and fluoxetine-only groups) were placed in the treadmill for the same period as the exercised animals, but the treadmill was turned off.

2.3. Body parameters

2.3.1. Weight gain

Weight gain was taken as the difference between weights at the age of 60 days and 40 days of life. Body weight measurements were made using a digital electronic scale, with 1010 g capacity and sensitivity of 0.5 g (ADF 1000 model, Marte Científica e Instrumentação Industrial Ltda, Minas Gerais, Brazil).

2.3.2. Lee index

This index was calculated at the beginning and end of the experiments (rats at 40 and 60 days old). It expresses the relationship between the cube root of body weight and the nose-to-anus length [$\sqrt[3]{\text{Weight (g)}/\text{NAL (cm)}}$] (Novelli et al., 2007).

2.3.3. Abdominal (AC) and thoracic circumference (TC)

At 40 and 60 days, each animal was contained in a quiet and noise-free environment, and a tape measure was placed immediately anterior to the forefoot to obtain AC or immediately behind the foreleg for TC (Novelli et al., 2007). The ratio of AC/TC was calculated in the same period.

2.4. Cortical spreading depression (CSD) recording

In the four groups, CSD was recorded at 61–81 days of life. Before recordings, the animals were intraperitoneally anesthetized with a mixture of 1000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA). This mixture was used because in the rat, it provides a very stable anesthesia that lasts for several hours and does not block CSD (Gorelova et al., 1987). Furthermore, a tracheal cannula was inserted to improve breathing. For the measurement, three trephine holes aligned in the anteroposterior direction and parallel to the midline were drilled on the right side of the skull (2–4 mm diameter). One hole was positioned on the frontal bone and used to apply the stimulus (KCl) to elicit CSD. The other two holes were drilled on the parietal bone (3–4 mm diameter) and used to record the propagating CSD wave. During surgery and CSD recording, animals breathed spontaneously, and rectal temperature was continuously monitored and maintained at 37 ± 1 °C. CSD was elicited at 20-min intervals by 1 min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked in 2% KCl solution (approximately 270 mM) to the anterior hole drilled in the frontal region. The KCl application was repeated every 20 min for a total of 4 h. The slow potential changes accompanying CSD were recorded using two Ag/AgCl agar-Ringer electrodes (one in each hole) against a common reference electrode of the same type placed on the nasal bones. The CSD velocity of propagation was based on the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical recording points. This time was measured using the beginning of the rising phase of the negative SPC as the initial point, as previously reported (Batista-de-Oliveira et al., 2012). At the end of the recording session, the animals, while still anesthetized, were killed by the introduction of a lesion in the bulbar region with a sharp needle, inserted through the cistern magna, promptly provoking cardio-respiratory arrest.

2.5. Statistical analysis

Body parameters and CSD velocity were expressed as mean ± standard error of the mean. Intergroup body parameter differences were compared by using a one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by the post-hoc Tukey test. CSD propagation differences were compared by employing a two-way ANOVA, including the factors of gavage treatment (fluoxetine or water) and exercise condition (exercised or sedentary) followed by a post-hoc (Holm–Sidak) test, when indicated. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Body parameters

The animals treated for 21 days with fluoxetine and submitted to physical exercise presented less ($P < 0.05$) weight gain

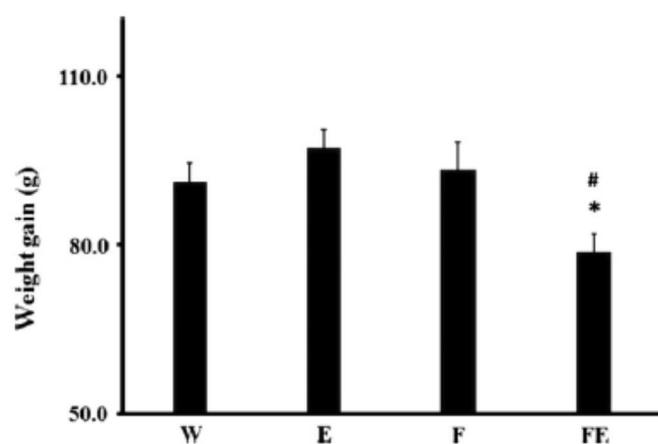


Fig. 1. Weight gain between 40 and 60 days. W, E, F, and FE indicate water-only ($n=8$), exercise-only ($n=10$), fluoxetine-only ($n=10$), and fluoxetine+exercise ($n=10$) groups, respectively. Values expressed as mean \pm SEM. * and # denote that weight gain in FE animals was significantly lower ($P<0.05$) than in the F and E groups, respectively (one-way ANOVA).

(78.68 ± 3.19 g) than their controls, i.e., the fluoxetine-only (93.34 ± 4.77 g) and exercise-only groups (97.04 ± 3.48 g; Fig. 1). The groups did not differ significantly for any body measurements (Lee index, TC, AC) (Table 1).

3.2. Cortical spreading depression

Electrophysiological recordings on the cortical surface of one Wistar rat from each studied condition (water only, fluoxetine only, exercise only, fluoxetine+exercise) are presented in Fig. 2. The slow potential change in the DC potential recordings denotes the presence of CSD after KCl stimulation. Generally, the topical application of 2% KCl for 1 min at one point of the frontal cortex in the right hemisphere elicited a single CSD wave that propagated without interruption and could be recorded by the two electrodes at the parietal surface of the same hemisphere. Within a few minutes after the CSD had been recorded, the slow potential change gradually returned to the pre-CSD pattern.

Two-way ANOVA of the CSD propagation velocity values showed that physical exercise alone ($F [3,445]=45.228$; $P<0.01$),

Table 1
Effects of fluoxetine administration and treadmill exercise on body parameters in male Wistar rats.

Parameters	Age 40 days				Age 60 days			
	W	E	F	FE	W	E	F	FE
Lee index ($n=11$)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03
TC ($n=12$)	10.37 ± 1.21	10.97 ± 1.24	10.70 ± 1.13	10.42 ± 0.92	13.03 ± 1.40	13.35 ± 1.24	13.32 ± 1.09	12.40 ± 0.66
AC ($n=12$)	12.61 ± 1.63	12.72 ± 0.85	13.41 ± 1.16	12.79 ± 1.38	15.54 ± 1.33	15.92 ± 1.45	15.79 ± 0.92	15.22 ± 0.87
AC/TC ratio ($n=11$)	1.22 ± 0.06	1.17 ± 0.14	1.26 ± 0.08	1.23 ± 0.08	1.19 ± 0.09	1.19 ± 0.07	1.19 ± 0.06	1.23 ± 0.07

TC, thoracic circumference (cm); AC, abdominal circumference (cm). W, E, F, and FE indicate water-only, exercise-only, fluoxetine-only, and exercise+fluoxetine groups, respectively. Values are expressed as mean \pm SD. There was no statistical significance (one-way ANOVA).

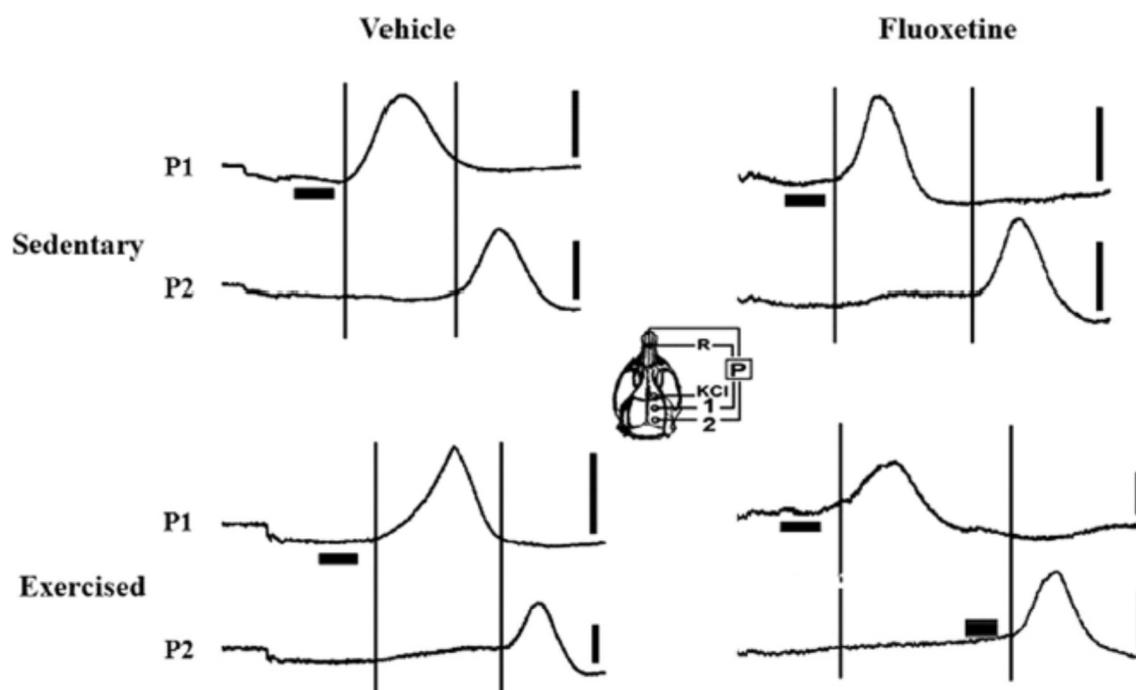


Fig. 2. Representative recordings of the slow potential change (P) of KCl-elicited cortical spreading depression (CSD) of four 61–81-day-old rats, as follows: one rat from the control group (water-only; W) and one from each of the three experimental groups [exercise-only (E), fluoxetine-only (F), and fluoxetine+exercise (FE)]. Vertical bars, 10 mV for P. CSD was elicited by 2% KCl applied epidurally for 1 min, as indicated by the horizontal bars over P1 traces. The CSD was recorded by the two cortical electrodes located posterior to the area of stimulation (at points 1 and 2), and the vertical thinner bars delimit the time spent for a CSD episode to propagate from them. A third electrode of the same type was placed on the nasal bones and served as a common reference (R) for the recording electrodes.

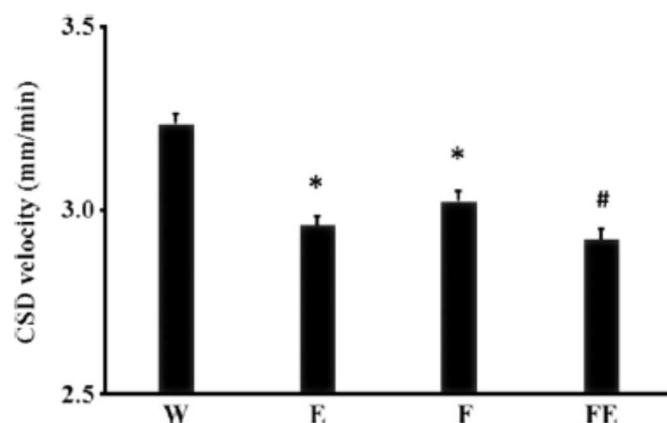


Fig. 3. CSD velocities in young adult rats treated, per gavage, during postnatal days 40–60 with fluoxetine (F; 10 mg/kg/d) or an equivalent volume of vehicle (distilled water, W). Half of the animals in W and F ran on a treadmill on a set schedule from 40 to 60 days of life (groups E and FE). The number of animals in each group varied between 9 and 10. Values are expressed as mean \pm SEM. *CSD velocities in the E and F groups that are significantly lower ($P < 0.01$) than in the control group (W). # denotes CSD velocities in FE rats that are significantly lower ($P < 0.01$) than in the F group (two-way ANOVA plus Tukey's test).

fluoxetine alone ($F [3,445]=18.564$; $P < 0.01$), and physical exercise + fluoxetine ($F [3,445]=8.878$; $P < 0.01$) had significant main effects on CSD propagation. Post-hoc analysis revealed that treatment with fluoxetine alone (10 mg/kg/d) reduced CSD propagation velocity ($P < 0.01$) in comparison to water vehicle. Mean \pm SD for the fluoxetine-only group was 3.03 ± 0.35 mm/min versus 3.24 ± 0.39 mm/min for the water controls. Similarly, animals in the exercise-only group had lower CSD velocity values ($P < 0.01$) than those in the water-only group. The mean \pm SD for the exercise-only group was 2.96 ± 0.23 mm/min. The combination of physical exercise and fluoxetine administration also resulted in reduced CSD velocity, as expected (mean \pm SD, 2.92 ± 0.22 mm/min). Compared to the fluoxetine-only group, the mean CSD value for fluoxetine + exercise was significantly reduced ($P < 0.01$); however, it was similar to the value for the exercise-only group ($P=0.35$) (Fig. 3).

4. Discussion

The results of this study provide the first evidence that fluoxetine treatment (10 mg/kg) in association with physical exercise on a treadmill exerts an antagonistic effect on the brain excitability-related phenomenon CSD. Exercise alone does so, as well, in agreement with previous studies showing that physical exercise can antagonize CSD propagation (Batista-de-Oliveira et al., 2012; Monteiro et al., 2011). Those studies involved a similar protocol of treadmill physical exercise, but the exercise was performed in rats in an earlier phase of life (15–35 days of life) than in the current work. In rats, lactation period (1–21 days of life) includes the “brain growth spurt” window, which is considered very critical and sensitive to adverse environmental conditions (Morgane et al., 1993). In those cases, physical exercise early in life produced a long-lasting effect because its antagonistic action was recorded even in adulthood, when the treadmill activity was no longer performed.

Fluoxetine treatment during the lactation period also impairs CSD propagation; however, the effect at 10 mg/kg was lower than at 20 mg/kg, which had the same effect as a 40 mg/kg dose (Amâncio-dos-Santos et al., 2006). In the present study, both physical exercise and fluoxetine treatment were carried out during the juvenile period, with significant effects, indicating that

environmental influences may play a role in phases of life other than the earliest developmental periods. These robust effects on CSD are intriguing because adolescence also represents an important developmental stage that is susceptible to several neurophysiological impacts from environmental experiences (Boutros et al., 2015; Gomez et al., 2014).

Physical exercise improves regional cerebral blood flow (Nishijima et al., 2012; Viboolvorakul and Patumraj, 2014) and seems to regulate cerebral angiogenesis through vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor, which can increase brain ischemic tolerance (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2011). On the other hand, CSD influences cerebral blood flow (Sun et al., 2011), and brain ischemia is strongly related to CSD (Ferrari et al., 2015).

In addition to angiogenesis, neurogenesis has been proposed as a structural plasticity phenomenon promoted by practicing physical exercise. Ferreira et al. (2011) showed a positive effect of short-term, moderate treadmill exercise on hippocampal plasticity. That effect was independent of transcriptional processes and of brain-derived neurotrophic factor upregulation and occurred even in the presence of increased corticosterone levels. This neurogenic stimulus is suggested to have positive effects on mood, learning, and memory in both humans and rodents (Beckman and Santos, 2013). Physical exercise also induces synaptogenesis (Hötting and Röder, 2013). Altogether, an increase in the number of neurons as well as of synaptic connections plausibly might augment the distance in cell–cell communication, which could be responsible for reducing CSD velocity in the exercised condition.

Moderate physical exercise is a known method of enhancing the glycolytic and oxidative systems, and treadmill exercise (30 m/min for 30 min, 5 days a week for a consecutive 3-week period) enhances cerebral glycolysis in rats and is associated with an increase in brain levels of the glucose transporters 1 and 3 (Kinni et al., 2011). Thus, exercise improves the brain's ability to use glucose. In addition to these effects on cerebral metabolism, physical exercise appears to be important to protect brain tissue from oxidative damage (Cechetti et al., 2012). In one study in rats, treadmill running for 12 weeks inhibited the oxidative state and increased antioxidant capacity in the hippocampus after permanent bilateral occlusion of the common carotid arteries (Cechetti et al., 2012). This outcome suggests that the brain's antioxidant machinery is activated in response to excessive generation of free radicals. Previous studies involving neuroexcitability showed that both high plasma glucose levels (Ximenes-da-Silva and Guedes, 1991) and antioxidant administration (Abadie-Guedes et al., 2012) are associated with low CSD velocity values. Thus, we speculate that the treadmill exercise that the rats performed in this work may have promoted improvement in the metabolic and antioxidant response, which could be responsible for the decelerating effect on CSD propagation velocity.

Physical exercise stimulates and increases serotonin release in the brain; for example, in one study, exercise (12 m/min for 1 h) increased extracellular serotonin levels in a time-dependent manner in the hippocampus of fasted rats (Meeusen et al., 1996). One possible explanation is that exercise-induced lipolysis increases free tryptophan in the blood, promoting a parallel augmentation in brain tryptophan and, in turn, serotonin synthesis/metabolism. In another study, voluntary wheel running for 4 weeks increased hippocampal levels of serotonin and the mRNA of receptor 5-HT_{1A} (Wang et al., 2013). Moreover, an antagonistic effect on CSD propagation of increasing brain serotonin availability has been demonstrated ([Amâncio-dos-Santos et al., 2006; Guedes et al., 2002]). Thus, this probable role of physical exercise in activating the serotonergic system could explain its effect on CSD. However, it is highly likely that it is not the only mechanism because treadmill exercise *per se* had a more pronounced effect than

fluoxetine treatment only.

In addition to fluoxetine, other serotonergic drugs that increase serotonin activity in the brain promote the same antagonistic effect on the electrophysiological phenomenon. Examples include *D*-fenfluramine, a serotonin releaser (Cabral-Filho et al., 1995); sumatriptan, a serotonin agonist (Read and Pearsons, 2000); and another SSRI, citalopram (Guedes et al., 2002). In contrast, tianeptine, a serotonin reuptake enhancer, facilitates CSD propagation (Amâncio-dos-Santos et al., 2013). Therefore, the present results support the hypothesis of CSD modulation by serotonin-dependent processes. In this study, fluoxetine was administered orally; however, its action on neural excitability was similar to that identified in the above studies using other administration routes, including i.p., s.c., and topical application. The oral route is the most typical in the clinical context.

To the best of our knowledge, the present data constitute the first report of an effect of combined fluoxetine treatment + physical exercise on CSD in juvenile rats. An additional main finding was that physical exercise decreased CSD more than fluoxetine did, as also observed by Wen et al. (2014) in another experimental paradigm. They found that serotonin levels were elevated in the raphe nuclei of treadmill-exercised animals more than in the fluoxetine-treated ones. Moreover, these authors reported that exercise prevented raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat depression model. The current findings allow us to speculate about whether physical exercise could replace or complement serotonergic drug administration in the treatment of brain-related pathology, such as depression, in the juvenile phase of life.

Concerning body weight data, the group that performed physical exercise and received fluoxetine treatment presented at 60 days of life with less weight gain than all other groups. However, the groups performing only treadmill exercise or having fluoxetine-only treatment did not differ from the water control. Similarly, Li et al. (2014) showed that animals exercised on a treadmill for 8 weeks did not present significant changes in body weight compared to the sedentary group. Additionally, Gollisch et al. (2009) found no weight alteration in rats engaging in exercise on wheels and suggested that a significantly higher caloric intake probably compensated for the higher energy expenditure from the exercise. The current results also confirm a previous study from our group of no difference in body weight between exercised and sedentary young rats (Monteiro et al., 2011).

Regarding fluoxetine effects on body weight, our findings are in agreement with those of Klomp et al. (2014) of no effect of fluoxetine treatment on weight gain in adolescent rats. Fluoxetine administration seems to reduce lab chow consumption during the first days of treatment, reaching a steady state after the first week (Gamaro et al., 2008). However, serotonin is a well-known satiety promoter in both humans and experimental animals ([Guimarães et al., 2006, Leibowitz et al., 1990]), which could result in body weight reduction. In this study, the reduction in body weight gain could be seen only when two serotonin-enhancing conditions were combined.

Generally, body parameters such as the Lee index, TC, and AC are used to verify adverse effects on body growth in laboratory animals (Novelli et al., 2007). In considering the possible serotonin effects on body weight, we decided to analyze those parameters here and found no differences among groups for any of them. From this finding, we infer that fluoxetine treatment and/or physical exercise did not appear to significantly affect body growth. Further studies are necessary to better clarify the possible mechanisms involved in the effect of serotonin on these endpoints.

5. Conclusion

Based on the current results, treadmill exercise by itself had

greater effects than fluoxetine on neuronal excitability. In addition, the velocity of CSD propagation was similar between exercised and fluoxetine + exercise groups. These results highlight the value of physical exercise as a putatively useful strategy in the treatment of important diseases, such as depression and migraine. In fact, physical exercise is already prescribed as a behavioral measure to alleviate the symptoms of depression (Cooney et al., 2013), and these results reinforce this approach. Moreover, neither physical exercise nor fluoxetine treatment alone affected body weight, indicating that these manipulations did not impair the physical development that occurs in the juvenile phase of life.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq (Edital MCT/CNPq 14/2010 – no. 477456/2010-3), FACEPE (APQ-0378-2.07/06), and PROPESQ/UFPE for financial support.

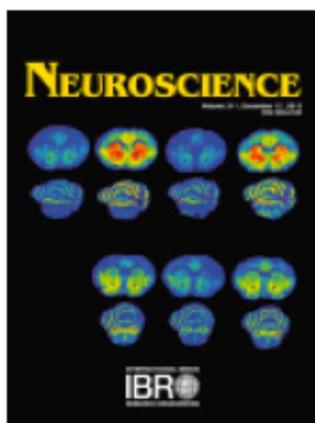
References

- Abadie-Guedes, R., Guedes, R.C., Bezerra, R.S., 2012. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 1563–1567.
- Amâncio-dos-Santos, A., Maia, L.M., Germano, P.C., Negrão, Y.D., Guedes, R.C., 2013. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-mal-nourished adult rats. *Eur. J. Pharmacol.* 706, 70–75.
- Amâncio-dos-Santos, A., Pinheiro, P.C.F., Lima, D.S.C., Ozias, M.G., Oliveira, M.B.O., Guimarães, N.X., Guedes, R.C.A., 2006. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experim. Neurol.* 200, 275–282.
- Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A.C., Mendes-da-Silva, R.F., Guedes, R.C.A., 2012. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. *Experim. Gerontol.* 47, 452–457.
- Beckman, D., Santos, L.E., 2013. The importance of serotonin in exercise-induced adult neurogenesis: new evidence from Tph2^{-/-} mice. *J. Neurosci.* 33, 14283–14284.
- Boutros, N., Semenova, S., Liu, W., Crews, F.T., Markou, A., 2015. Adolescent intermittent ethanol exposure is associated with increased risky choice and decreased dopaminergic and cholinergic neuron markers in adult rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, 1–9.
- Cabral-Filho, J.E., Trindade-Filho, E.M., Guedes, R.C.A., 1995. Effect of *D*-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 347–350.
- Cechetti, F., Worm, P.V., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Sanches, E., Ben, J., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2012. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 90–96.
- Cooney, G.M., Dwan, K., Greig, C.A., Lawlor, D.A., Rimer, J., Waugh, F.R., McMurdo, M., Mead, G.E., 2013. Exercise for depression. *Cochr. Datab. Syst. Rev.* 12, 1–160.
- Ferrari, M.D., Klever, R.R., Terwindt, G.M., Ayata, C., Van Den Maagdenberg, A.M., 2015. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet. Neurol.* 14, 65–80.
- Ferreira, A.F.B., Real, C.C., Rodrigues, A.C., Alves, A.S., Britto, L.R.G., 2011. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. *Brain Res.* 1425, 111–122.
- Gamaro, G.D., Prediger, M.E., Lopes, J., Bassani, M.G., Dalmaz, C., 2008. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 312–317.
- Gollisch, K.S.C., Brandae, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., 2009. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, e495–e504.
- Gomes da Silva, S., Doná, F., Da Silva Fernandes, M.J., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., 2010. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. *Brain. Dev.* 32, 137–142.
- Gomez, F., Venero, C., Viveros, M.P., García-García, L., 2014. Short-term fluoxetine treatment induces neuroendocrine and behavioral anxiogenic-like responses in adolescent male rats. *Exp. Brain Res.* 17, 1–13.
- Gorelova, N.A., Krivánek, J., Bures, J., 1987. Functional and metabolic correlates of

- long series of cortical spreading depression waves in rats. *Brain Res.* 404, 379–381.
- Guedes, R.C., Amâncio-dos-Santos, A., Manhães-de-Castro, R., Costa-Cruz, R.R., 2002. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr. Neurosci.* 5, 115–123.
- Guedes, R.C.A., Rocha-de-Melo, A.P., Teodósio, N.R., 2004. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. *Cienc. Cult.* 56, 32–35.
- Guimarães, C., Pereira, L.R., Lucif Júnior, N., Cesarino, E.J., De Almeida, C.A., De Carvalho, D., Queiroz, R.H., 2006. Tolerability and effectiveness of fluoxetine, metformin and sibutramine in reducing anthropometric and metabolic parameters in obese patients. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 50, 1020–1025.
- Hötting, K., Röder, B., 2013. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neurosci. Biobehav.* 37, 2243–2257.
- Kinni, H., Guo, M., Ding, J.Y., Konakondla, S., Dornbos, D., Tran, R., Guthikonda, M., Ding, Y., 2011. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. *Brain Res.* 4, 48–55.
- Klomp, A., Hamelink, R., Feenstra, M., Denys, D., Reneman, L., 2014. Increased response to a 5-HT challenge after discontinuation of chronic serotonin uptake inhibition in the adult and adolescent rat brain. *PLoS One* 9, e99873.
- Lan, X., Zhang, M., Yang, W., Zheng, Z., Wu, Y., Zeng, Q., Liu, S., Liu, K., Li, G., 2014. Effect of treadmill exercise on 5-HT_{2A} receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuro. Sci.* 35, 761–766.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359–390.
- Leão, A.A.P., 1947. Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 10, 409–414.
- Leibowitz, S.F., Weiss, G.F., Suh, J.S., 1990. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 735–742.
- Li, G., Liu, J.Y., Zhang, H.X., Li, Q., Zhang, S.W., 2014. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol. Res.*, 22, Epub ahead of print.
- Meeusen, R., Thorré, K., Chaouloff, F., Sarre, S., De Meirleir, K., Ebinger, G., Michotte, Y., 1996. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res.* 740, 245–252.
- Monteiro, H.M.C., Silva, D.L., França, J.P.B.D., Maia, L.M.S., Angelim, M.K.C., Amâncio-dos-Santos, A., Guedes, R.C.A., 2011. Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. *Nutr. Neurosci.* 14, 112–118.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Galler, J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
- Nishijima, T., Okamoto, M., Matsui, T., Kita, I., Soya, H., 2012. Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J. Appl. Physiol.* 112, 197–203.
- Novelli, E.L., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A., Cicogna, A.C., Novelli Filho, J.L., 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* 41, 111–119.
- Pardo-Peña, K., Medina-Ceja, L., Morales-Villagrán, A., 2014. Serotonin modulates fast ripple activity in rats with spontaneous recurrent seizures. *Brain Res.* 1583, 211–219.
- Qu, Y., Aluisio, L., Lord, B., Boggs, J., Hoey, K., Mazur, C., Lovenberg, T., 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 469–473.
- Read, S.J., Parsons, A.A., 2000. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? *Brain Res.* 870, 44–53.
- Sghendo, L., Mifsud, J., 2012. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 317–325.
- Sun, X., Wang, Y., Chen, S., Luo, W., Li, P., Luo, Q., 2011. Simultaneous monitoring of intracellular pH changes and hemodynamic response during cortical spreading depression by fluorescence-corrected multimodal optical imaging. *Neuroimage* 57, 873–884.
- Tarlaci, S., 2009. Escitalopram and venlafaxine for the prophylaxis of migraine headache without mood disorders. *Clin. Neuropharmacol.* 32, 254–258.
- Viboolvorakul, S., Patumraj, S., 2014. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed. Res. Int.* 2014, 1–13.
- Voigt, J.P., Fink, H., 2015. Serotonin controlling feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* 277, 14–31.
- Wang, J., Chen, X., Zhang, N., Ma, Q., 2013. Effects of exercise on stress-induced changes of norepinephrine and serotonin in rat hippocampus. *Chin. J. Physiol.* 56, 245–252.
- Wang, X., Zhang, M., Feng, R., Li, W.B., Ren, S.Q., Zhang, J., Zhang, F., 2014. Physical exercise training and neurovascular unit in ischemic stroke. *Neuroscience* 271, 99–107.
- Wen, L., Jin, Y., Li, L., Sun, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, Y., Svenningsson, P., 2014. Exercise prevents raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat depression model. *Physiol. Behav.* 132, 57–65.
- Ximenes-da-Silva, A., Guedes, R.C., 1991. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 1277–1281.
- Zhang, F., Wu, Y., Jia, J., 2011. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neuroscience* 177, 170–176.

APÊNDICE 2 - Artigo Original 2 enviado para revista

Title: Physical exercise and/or fluoxetine attenuate the facilitator effect of high fat diet exposure on cortical spreading depression in rat offspring.



ISSN: 0306-4522

Authors:

Heloísa Mirelle Costa Monteiro^a, Débora Carneiro de Mendonça^b, Mariana Séfora Bezerra Sousa^a, Angela Amancio-dos-Santos^{b*}

Affiliations:

^aDepartamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, 50670-901, Recife-PE, Brazil (helo-mcm@hotmail.com)

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 50740-600, Recife-PE, Brazil

(angela.asantos@yahoo.com; angela.asantos@ufpe.br)

***Corresponding author:** Telephone: + 55-81-2126-8530. Fax: + 55-81-2126-8976.

Address: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, S/N Cidade

Universitária, 50740-600, Recife, PE-Brazil. e-mail:

angela.asantos@yahoo.com; angela.asantos@ufpe.br

ABBREVIATIONS:

5-HT, 5-hydroxytryptamine, serotonin; 5-HT_{1A}R, 5-HT receptor- 1A; AC, abdominal circumference; AIN, American Institute of Nutrition; BDNF, brain derived neurotrophic factor; C, control; CSD, Cortical Spreading Depression; DC, direct-current; E, exercised; F, fluoxetine hydrochloride; GLUT4, glucose transporter-4; HF, high fat; KCl, potassium chloride; NAL, nose-to-anus length; RET, retroperitoneal fat tissue; S, sedentary; SPC, slow potential changes; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; TC, thoracic circumference; TNF- α , tumor necrosis factor-alfa; VEGF, vascular endothelial growth factor; W, water.

ABSTRACT

Nutritional status during lactation can influence body metabolism and brain function even in later stages of life. Additionally, physical exercise and fluoxetine have antagonistic effects on the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). This investigation studied whether physical exercise and fluoxetine administration in the adult phase of life could modulate CSD features in rats offspring exposed to high fat (HF) diet during lactation. Wistar male rats suckled by dams fed either control (C) or HF diet *ad libitum*. At weaning, the pups received standard laboratory chow. At 40-60 days of life, half of the animals were treadmill exercised (group E); the other half remained sedentary (group S). Moreover, animals E and S received either fluoxetine (10mg/kg /day, orogastrically) or vehicle (water; groups F and W, respectively). At 40 days of life, rats from the maternal HF diet presented higher body weight, abdominal and thoracic circumferences (AC and TC, respectively) and Lee Index. At 60 days of life, AC and TC remained increased in HF animals. Fluoxetine treatment decreased the weight of the retroperitoneal fat tissue (RET) in the groups HF/SF and HF/EF. Physical exercise decreased AC, but increased the weight of the RET in the animals HF/EW. The HF diet increased the CSD velocity (mean \pm SD; mm/min) from 3.24 \pm 0.25 in the rats C/SW to 3.40 \pm 0.36 in the HF/SW ones. The treadmill exercise decelerated it in both groups C/EW and HF/EW, with CSD velocity 2.94 \pm 0.28 and 2.97 \pm 0.40, respectively. Fluoxetine alone or together with exercise, also decreased CSD propagation, with CSD velocity 2.88 \pm 0.45 and 2.98 \pm 0.27 in the groups HF/SF and HF/EF, respectively. Results indicate that the effects of physical exercise and/or fluoxetine on CSD did not altered by previous overnutrition. They reinforce that malnutrition during lactation period modifies cortical electrophysiology even when the high fat condition no longer exists.

KEY WORDS: body parameters; cortical spreading depression; lactation; hyperlipidic diet; treadmill.

1.0 INTRODUCTION

Nutritional status is an environmental factor that influences significantly the growth and development of the animals (Pedraza and Queiroz, 2011). This influence starts at tender stage of life, indirectly through the mother (Valle et al., 2008). Maternal malnutrition during pregnancy and lactation can permanently interfere with the metabolism of the descendants (Fall, 2013; Lecoutre and Breton, 2015) and may contribute to the development of obesity, diabetes and cardiovascular disease in adulthood (Ayres et al., 2012). Maternal obesity also influences the appropriate development of the neural circuits controlling appetite, favoring offspring hyperphagia, from weaning to adulthood (Breton, 2013; Reynolds et al., 2015).

Developmental programming is not restricted to the gestational period. Nutritional manipulations during lactation also seem to influence the metabolic phenotype of offspring (Lecoutre and Breton, 2015). The lactation period coincides with the maximum adipogenesis period in rodents. Furthermore, mother intake during lactation can lead to alterations in breast milk composition (Tinoco et al., 2007). For instance, if mother presents a high intake of fat and protein, her breast milk will have high concentrations of these nutrients, and so this could induce overnutrition in the offspring (Franco et al., 2012)

Physical exercise affects energy homeostasis due to its acute and chronic effects on the mobilization and utilization of fat; this effect happens from low to severe intensity of the exercise (Trombetta, 2003). Experimentally, physical exercise has been shown to minimize the changes of biochemical and body patterns of rats fed high calorie and high fat diet (Estadella et al., 2004) and attenuate new weight gain (Higgins et al., 2011). Additionally, many of the negative impacts of maternal obesity presents an improvement by late-onset exercise (Bahari et al., 2013).

There is been proposed that physical exercise improves nervous system functions (Jacotte-Simancas et al., 2015). For example, it brings benefits to maintain brain integrity, produces neurogenesis, angiogenesis and increases the density of dendritic connections

(Pysh and Weiss, 1979; Gao et al., 2014; Jacotte-Simacas et al., 2015). Previous studies from our laboratory have concluded that treadmill exercises exerted an antagonist effect on cortical neuroexcitability, desaccelerating the propagation of Cortical Spreading Depression (CSD) in rat brain (Monteiro et al., 2011; Monteiro et al., 2015).

CSD is a reduction, "depression", of the electrical activity of the brain tissue that "spreads" concentrically and reversibly (with the order rate 2 to 5 mm/min) from the point where it started to the rest of the population of neurons (Leão, 1944; Engelhardt and Gomes, 2015). CSD is accompanied by a slow direct-current (DC) potential change (SPC) in the cortical region, which expresses clearly the beginning and the end of the phenomenon and it is used to calculate the rate at which CSD propagates through the nervous tissue (Guedes et al., 2004). Chemical, physical or mechanical agents can triggered CSD (Guedes et al., 2004).

Evidence indicates that physical exercise activates the serotonergic system (Lan et al., 2014). This could be involved in the effect of physical exercise on reducing cortical excitability. Drugs that increase brain availability of serotonin, such as citalopram and fluoxetine, decrease the CSD velocity of propagation (Guedes et al., 2002; Amâncio-dos – Santos et al., 2006). Furthermore, a recent work shows that physical exercise can interact with fluoxetine and reinforce its antagonistic effect on CSD (Monteiro et al., 2015).

Obesity can be related to alteration in brain serotonin activity (Papazoglou et al., 2015). Additionally, malnutrition early in life can persistently affect body responsiveness to pharmacological agents, even if the nutrition condition is recovered (Guedes et al., 1992; De-Vasconcelos et al., 2004). In the present work, taking into account all of these studies, we hypothesize whether physical exercise and/or fluoxetine effects on CSD can be modified in the adult offspring of dams receiving high fat (HF) diet during the lactation period.

In this study, the following questions were addressed: 1) Does a maternal intake of HF diet during lactation modify body parameters and CSD propagation in adult offspring? 2) Do the antagonistic effects of physical exercise and/or fluoxetine on CSD still remain in

the adult offspring with HF diet-exposition during lactation? 3) Does physical exercise and/or fluoxetine influence the body parameters in adult offspring previously exposed to a HF diet?

2.0 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 Ethical approval

All experiments were carried out in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, USA) and the norms of the Ethics Committee for Animal Research of Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 Animals and diets

Wistar rat dams received during lactation (0-21 days after delivery) either a control diet or a high-fat diet. Offspring from those mothers composed the Control (C; n=15) and High-fat (HF; n=40) groups. The formulation of both experimental diets was based on AIN (Reeves, et al., 1993) and manufactured by Rhoister Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brazil). In the HF diet, 45.9% of the energy content was derived from lipids (palm + soybean oil) versus 16.7% (soybean oil) in the control diet. The respective caloric value differed between diets: 4.67 kcal/g in the HF diet versus 3.81 kcal/g in the control. The composition of both diets is presented in Table 1.

After weaning, male offspring from both groups received the standard Lab chow diet (Presence Nutrição Animal, São Paulo, Brazil). The rats were kept in polyethylene cages (51 cm×35.5 cm×18.5 cm), under a 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) at 22±1 °C and *ad libitum* access to food and water.

Table 1 Composition of the experimental control (C) and the high-fat (HF) diets in lactation period.

	C diet	HF diet
Energy content (Kcal/g dry diet)	3.81	4.67
Proteins (% Kcal)	21.15	20.36
Carbohydrates (% Kcal)	62.12	33.79
Lipids (% Kcal)	16.63	45.85
Fatty acid composition (%):		
Caproic (C6:0)	0.85	-
Caprylic (C8:0)	0.71	0.04
Capric (C10:0)	-	0.08
Lauric (C12:0)	0.28	0.25
Myristic (C14:0)	0.85	0.97
Pentadecylic (C15:0)	0.28	0.08
Palmitic (C16:0)	20.34	36.50
Palmitoleic (C16:1)	0.28	0.17
Stearic (C18:0)	6.50	10.84
Margaric (C17:0)	-	0.17
Elaidic (C18:1n9t)	-	2.98
Oleic (C18:1n9c)	29.38	32.26
Linolelaidic (C18:2n6t)	-	0.42
Linoleic (C18:2n6c)	35.73	13.40
Alfa Linolenic (C18:3n3)	2.68	0.88
Arachidic (C20:0)	0.56	0.42
Cis-11-Eicosenoic (C20:1n9)	0.28	0.13
Behenic (C22:0)	0.72	0.25
Tricosylic (C23:0)	0.56	0.04
Lignoceric (C24:0)	-	0.12

2.3 Experimental design

At the age of 40-60 days, some the C and HF animals were submitted to moderate exercise (E; Batista-de-Oliveira et al., 2012) on a treadmill (model ET 2000, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brazil, 0° inclination) for 3 weeks, 5 weekly

sessions (one session of 30 min per day). Treadmill velocity was set during the first, second and third weeks at 5 m/min, 10 m/min and 15 m/min, respectively, as previously described (Monteiro et al., 2011; Monteiro et al., 2015). The remaining animals were maintained in sedentary (S) conditions; i.e., they were also kept during 30 min per day on the treadmill, but it was turned off.

In order to verify the action of the combination of fluoxetine + exercise in animals from high fat diet conditions during lactation, half of the HF rats were administered orogastrically with 10 mg/kg fluoxetine hydrochloride (F; Medley), immediately before they were placed on the treadmill. To minimize possible effects of gavage procedure, rats C and HF not receiving fluoxetine were administered with an equivalent volume of distilled water (W). The animals were then assigned to one of the following groups: C/SW (n=8), C/EW (n=7), HF/SW (n=10), HF/EW (n=11), HF/SF (n=9), HF/EF (n=10).

2.4 Body parameters

To evaluate the effect of a HF diet during lactation on the offspring's growth, body weight was obtained on days 1, 7, 14, 21, 30, 40 and 60. Body weights were obtained by using a digital electronic scale, with 1010 g capacity and sensitivity of 0.5 g (ADF 1000 model, Marte Científica e Instrumentação Industrial Ltda, Minas Gerais, Brazil).

At 40 and 60 days of life the following measures were performed: Lee Index, abdominal circumference (AC), thoracic circumference (TC) and AC/TC ratio. Lee index was calculated by the cube root of body weight (g) / nose-to-anus length (cm) [$\sqrt[3]{\text{Weight (g) / NAL (cm)}}$] (Novelli et al., 2007; Monteiro et al., 2015). The AC and TC were obtained with a tape measure placed immediately anterior to the forefoot and immediately behind the foreleg, respectively (Novelli et al., 2007; Monteiro et al., 2015). Weight gain of the animals was also evaluated by the difference in weight on the 40th and the 60th days.

2.5 Electrophysiological recordings

Before CSD recordings, the animals were intraperitoneally anesthetized with a mixture of 1000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA). A tracheal cannula was inserted to improve breathing. Three trephine holes (2-4 mm diameter) were drilled on the right side of the skull, aligned in an anteroposterior direction, parallel to the midline. The hole in the frontal bone was used to apply the stimulus (KCl) to elicit CSD. The other two holes that were drilled in the parietal bone were used to record the propagating CSD wave. CSD was elicited at 20-min intervals by using a 1-min cotton ball (1-2 mm in diameter) soaked in 2% KCl solution (approximately 270 mM) to apply to the anterior hole drilled in the frontal region. The KCl application was repeated every 20 min for a total of 4 h. Two Ag/AgCl agar-Ringer electrodes (one in each hole) were used attached to a common reference electrode of the same type placed on the nasal bones to record the slow potential changes (SPC) accompanying CSD. During surgery and CSD recording, animals breathed spontaneously, and rectal temperature was continuously monitored and maintained at $37\pm 1^\circ\text{C}$.

CSD velocity of propagation was based on the time required for a CSD wave to travel the distance between the two cortical recording points. This time was calculated by using the beginning of the rising phase of the negative SPC as the initial point, as previously reported (Monteiro et al., 2015). At the end of the recording session, the animals, under deep anesthesia, were sacrificed by a lesion in the bulbar region, made with a sharp needle inserted through the cistern magna, promptly provoking cardio-respiratory arrest.

2.6 Tissue collection

Epididymis and retroperitoneal fat tissues were dissected from the animals after sacrifice. These tissues were weighed on a digital electronic scale, with 220 g capacity and sensitivity of 0.01 g (AY220 model, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, Brazil).

2.7 Statistical analysis

The differences in body weight, Lee Index, AC and TC circumferences, ratio AC/TC between the animals HF and C were analyzed using Student's t-test. The changes in these parameters after fluoxetine treatment and exercise performance, as well as CSD velocity between groups, were analyzed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc (Holm–Sidak) test, where indicated. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3.0 RESULTS

3.1. Effect of maternal high fat diet on body parameters in adult offspring

The HF diet-exposed offspring presented higher ($p < 0.05$) body weight from the 7th day until the 40th day of life compared with C diet-exposed offspring (**Figure 1A**). The mean \pm SD body weights of the HF diet-exposed offspring, in grams, were 7.34 ± 0.79 (day 1), 19.93 ± 2.25 (day 7), 38.07 ± 3.30 (day 14), 62.18 ± 6.19 (day 21), 109.14 ± 20.55 (day 30), 164.31 ± 17.73 (day 40). C diet-exposed offspring showed in that same sequence of age above, mean \pm SD body weight in grams of 7.40 ± 1.31 , 16.38 ± 2.00 , 30.87 ± 2.34 , 49.54 ± 4.74 , 89.44 ± 8.10 and 154.12 ± 12.30 .

On the 40th day, the HF diet-exposed offspring showed a significant ($p < 0.05$) increase in TC, AC and Lee index compared to C diet-exposed offspring (**Figure 1B and 1C**). The mean \pm SD, in cm, of the values in the HF diet and C diet offspring, respectively, were, TC = 11.75 ± 0.62 versus 11.02 ± 0.38 ; AC = 14.45 ± 0.76 versus 13.81 ± 0.49 ; Lee Index = 0.33 ± 0.01 versus 0.31 ± 0.02 . The CA/CT ratio was 1.23 ± 0.07 for HF diet group and 1.25 ± 0.05 for C diet group, which suggests that the distribution of body fat was homogeneous under both previous nutritional conditions (**Figure 1D**).

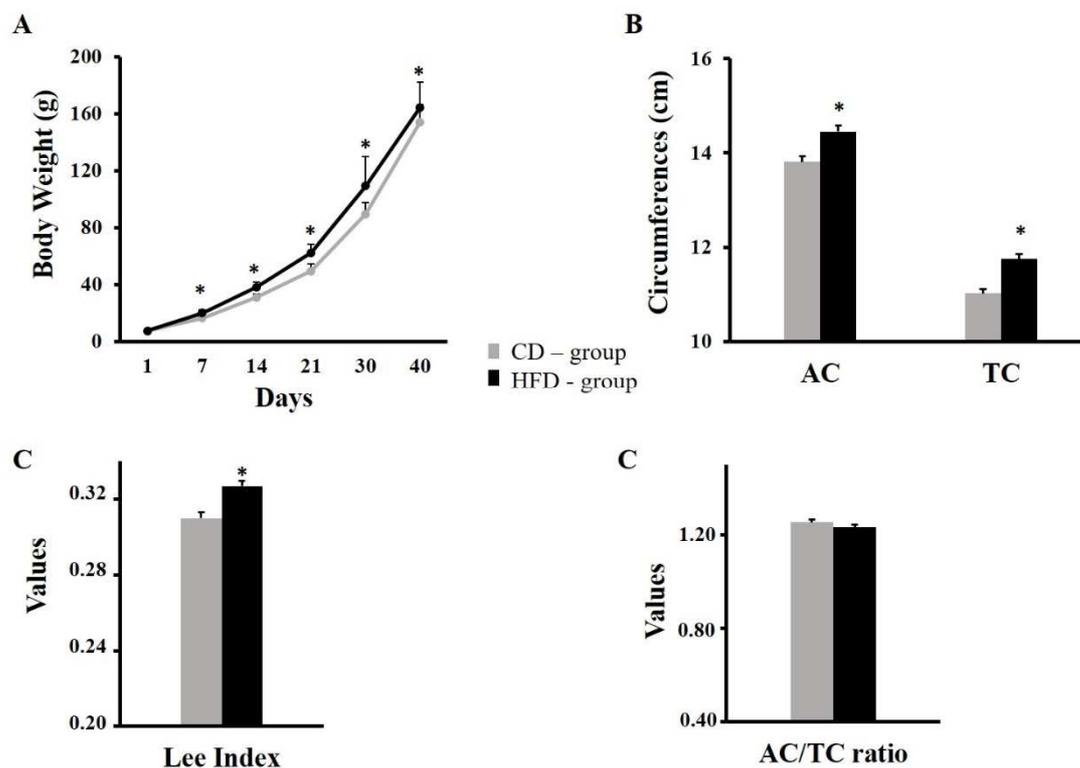


Figure 1. A- Body evolution of rats previously suckled by mothers that received control (C) or high fat (HF) diet during lactation. At 40 days of life thoracic and abdominal circumferences (TC and AC, respectively) (B), Lee Index (C) and AC/TC ratio (D) were measured in animals C and HF. The number of animals in each group was n=15 (group C) and n=40 (group HF). Values presented as mean \pm SEM. *indicates differences ($P < 0.05$) between the groups C and HF (*t*-test).

3.2 Effect of exercise or/and fluoxetine on body parameters in adult offspring from maternal high fat diet

The fluoxetine and/or exercise during 21 days did not significantly alter body weight ($p = 0.52$) nor weight gain between days 40 and 60 ($p = 0.656$) in the animals. However, abdominal and thoracic circumferences remained increased in all animals from the maternal HF diet (groups HF/SW, HF/EW, HF/SF and HF/EF) compared to the animals C (groups C/SW and C/EW; $p < 0.05$). Exercise alone significantly reduced the AC of animals in the

HF/EW group, compared to the sedentary control (group HF/SW). There were no differences in the AC/CT ratio ($P=0.574$) and Lee Index ($p=0.113$). Retroperitoneal fat tissue was decreased in the HF/SF animals compared to those in the other five groups (HF/SW, HF/EW, HF/EF, C/SW and C/EW groups) and in the HF/EF animals compared to those in the HF/EW group. Furthermore, the retroperitoneal fat tissue was increased in the group HF/EW compared to the group HF/SW. There were no differences in the epididymis fat tissues among the groups ($p=0.091$; **Table 2**).

3.3 Effect of fluoxetine or/and exercise on cortical spreading depression in adult offspring from maternal high fat diet

The slow potential change in the DC potential recordings denotes the presence of CSD after KCl stimulation, which are presented, representatively, in **Figure 2A** in each studied conditions: C/SW, C/EW, HF/SW, HF/EW, HF/SF and HF/EF. The topical application of 2% KCl for 1 min at one point of the right hemisphere of the frontal cortex elicited a single CSD wave that propagated without interruption and could be recorded by the two electrodes at the parietal surface of the same hemisphere. Within a few minutes after the CSD had been recorded, the slow potential change gradually returned to the pre-CSD pattern.

On the HF diet-exposed offspring, two-way ANOVA of the values of CSD propagation velocity showed that physical exercise ($F [3.428] = 6.320$; $P<0.001$), fluoxetine ($F [3.428] = 22.285$; $P<0.001$), and physical exercise+fluoxetine ($F [3.428] = 24.238$; $P<0.001$) had significant main effects on CSD propagation. Post-hoc analysis revealed a significant decrease in CSD velocity in the group HF/EW (2.97 ± 0.40 mm/min), group HF/SF (2.88 ± 0.45 mm/min) and group HF/EF (2.98 ± 0.27 mm/min) compared to the HF-control animals (HF/SW group; 3.40 ± 0.36 mm/min).

Similarly, the C diet-exposed offspring, exercise presented a lower CSD velocity compared with its sedentary control. The mean \pm SD for the groups C/SW and C/EW were 3.24 \pm 0.25 mm/min and 2.94 \pm 0.28 mm/min, respectively. There was a significant increase in CSD velocity between the groups HF/SW and C/SW ($p<0.01$; **Figure 2B**)

Table 2. Effect of exercise and/or fluoxetine administration on body parameters and visceral fat in Wistar rats. C and HF are Control and High Fat animals, respectively. SW = sedentary, EW = exercised, SF = Fluoxetine and EF = exercised+fluoxetine. Values are expressed as mean \pm SD. Values marked with lower-case letters differ significantly from the corresponding values of the groups marked with the same letters in experimental groups' row. The number of rats per group is in parentheses (ANOVA).

Parameters	Experimental groups					
	C/SW(a)	C/EW(b)	HF/SW(c)	HF/EW(d)	HF/SF(e)	HF/EF(f)
Body Weight (g)	254.56 \pm 23.25 (8)	247.80 \pm 10.80 (7)	270.48 \pm 29.72 (10)	263.43 \pm 20.45 (11)	253.85 \pm 33.48 (9)	263.30 \pm 30.15 (10)
Weight gain 40 - 60 days (g)	97.70 \pm 17.12 (8)	96.80 \pm 6.77 (7)	107.59 \pm 12.63 (10)	100.30 \pm 15.73 (11)	94.41 \pm 25.90 (9)	99.12 \pm 17.51 (10)
Thoracic circumference cm (TC)	12.90 \pm 0.355 (8)	12.86 \pm 0.522 (7)	14.37 \pm 1.073 ^{ab} (10)	13.91 \pm 0.673 ^{a,b} (11)	14.12 \pm 0.900 ^{ab} (9)	14.18 \pm 0.760 ^{a,b} (10)
Abdominal circumference cm (AC)	15.96 \pm 1.065 (8)	16.09 \pm 0.549 (7)	18.56 \pm 0.817 ^{ab} (10)	17.36 \pm 0.867 ^{a,b,c} (11)	17.98 \pm 0.795 ^{a,b} (9)	18.09 \pm 0.936 ^{a,b} (10)
AC/TC ratio	1.24 \pm 0.030 (8)	1.25 \pm 0.031 (7)	1.30 \pm 0.026 (10)	1.25 \pm 0.010 (11)	1.28 \pm 0.030 (9)	1.28 \pm 0.024 (10)
Lee Index	0.31 \pm 0.011 (8)	0.31 \pm 0.020 (7)	0.33 \pm 0.022 (10)	0.33 \pm 0.022 (11)	0.34 \pm 0.022 (9)	0.33 \pm 0.023 (10)
Epididymis fat tissue (g)	2.49 \pm 0.24 (6)	2.39 \pm 0.53 (5)	2.79 \pm 0.26 (6)	2.84 \pm 0.33 (8)	2.47 \pm 0.35 (6)	2.66 \pm 0.24 (10)
Retroperitoneal fat tissue (g)	2.37 \pm 0.27 (6)	2.21 \pm 0.41 (5)	2.04 \pm 0.15 (5)	2.50 \pm 0.32 ^c (6)	1.63 \pm 0.22 ^{a,b,c,d,f} (5)	2.05 \pm 0.33 ^d (5)

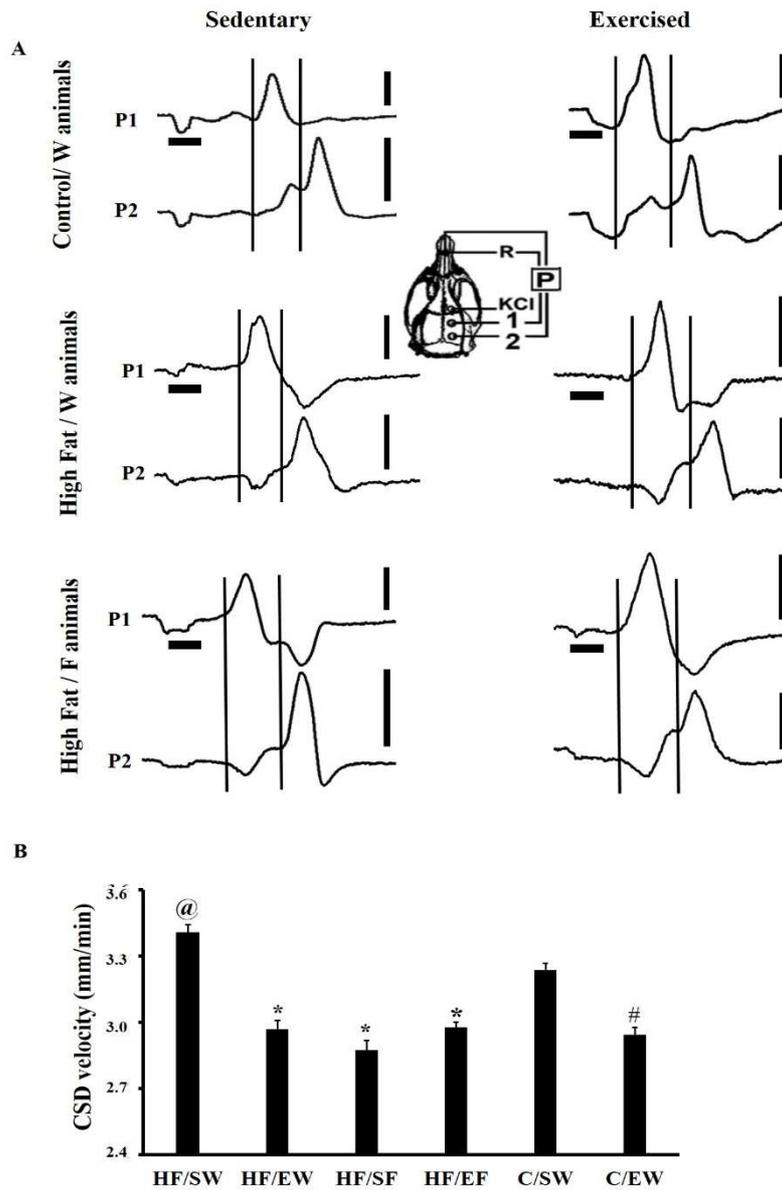


Figure 2. A - Representative recordings of the slow potential change (P) of KCl-elicited cortical spreading depression (CSD) in 6 rats at 61-81 days of age, as follows: two control–water, two high fat–water and two high fat–fluoxetine rats. In each group, one recording was from exercised and one from sedentary rats. The vertical bars indicate 10 mV for P. CSD was elicited by 2% KCl applied epidurally for 1 min, as indicated by the horizontal bars over P1 traces. CSD was recorded by the two cortical electrodes located posterior to the area of stimulation (at points 1 and 2) and the vertical thinner bars indicate the time spent for a CSD episode to propagate from them. A third electrode of the same type was placed on the nasal bones and served as a common reference (R) for the recording electrodes. **B** - CSD velocity

of propagation in adult rats previously suckled by mothers that received control (C) or high fat (HF) diet. Each group was subdivided into sedentary (S) and exercised (E) animals, during postnatal days 40–60. In the same period, animals were treated, per gavage, with vehicle (distilled water, W) or fluoxetine (F; 10 mg/kg/day). The number of animals in each group ranged between 7 and 10. Values are presented as mean \pm SEM. The asterisks symbol indicates that the groups E, F and EF differ significantly from the control (SW) within the HF condition. The symbol # denotes E versus S difference, within the C condition. The symbol @ indicates differences between HF and C within SW condition. ($P < 0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

4.0 DISCUSSION

The main outcomes from this study were that exposition to an HF diet only during lactation enhanced CSD propagation in the brain adult offspring and increased body measurements. These outcomes reinforce previous evidence, indicating that changes in maternal consumption during lactation are able to alter nutritional status and brain function of the progeny in rats (Soares et al., 2012). In fact, the lactation period, which in rats corresponds to the three firsts week of life, is considered very critical and sensitive to adverse environmental conditions (Morgane et al., 1993). The other major finding of this study was that the treadmill exercise or/and fluoxetine treatment have an antagonistic effect on CSD velocities, even under the condition of a HF maternal diet during lactation. However, these environmental and pharmacological conditions did not alter body parameters significantly.

Concerning body measurements, animals from maternal HF diet had body weight, AC, TC and a Lee Index higher than the controls up to 40 days of life. The HF diet used in the present study contained a higher amount of fat and energy than the control diet. Evidence

indicates that, in rodents, maternal nutritional excess, by a high consumption of foods rich in fats and/or energy, promotes obesity in the development of offspring (French et al., 2001; Spencer, 2012). Furthermore, by considering pre- or postnatal exposure to these types of diets, the postnatal (breastfeeding) period was more critical in determining metabolic consequences in the offspring (Sun et al., 2012). Studies have suggested that maternal diet influences the composition of breast milk, (Tinoco et al., 2007, Richard et al., 2015), and so HF diet leads to high concentrations of protein, lactose and triglycerides in this milk. Consequently, a HF maternal diet can induce offspring overnutrition (Howie et al., 2009; Franco et al., 2012).

Metabolic alterations due to HF diet intake during perinatal phase may involve leptin and insulin systems. Both systems are related to body changes, such as greater weight gain and adiposity (Howie et al., 2009). All of these can be found even in the absence of maternal overweight, indicating specific effect of saturated fat in the metabolism of offspring (Franco et al., 2012). A HF diet during lactation also induces insulin resistance and glucose intolerance (Vogt et al, 2014), since maternal obesity can result in a downregulation of the glucose transporter (GLUT4) in skeletal muscle in the offspring (Simar et al, 2012). In our study, we used a diet rich in saturated fat, palm oil, which may have influenced those hormones and increased the corporal measurements in offspring.

At 60 days of life, there were no significant body weight and body weight gain differences in HF animals under the four conditions studied, compared with the controls. In another experimental model of obesity, rats from small litters presented an increase in body weight up to 21 days, but after 30 and 60 days of life, this effect disappeared (Nery et al., 2011). In our study, this increase continued until 40 days of life.

Physical exercise did not influence body weight, nor body weight gain, in the HF-exposed rats, similar to what had been seen in the control animals (Monteiro et al., 2011; Monteiro et al., 2015). Lee et al. (2005) suggested that chronic aerobic exercise can increase

the total muscle-to-fat ratio without weight loss. Additionally, fluoxetine treatment did not have a body weight effect on the HF animals. The same finding was reported for fluvoxamine, another selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) in well-nourished adolescent rats (Jong et al., 2006). It is possible that SSRI effects on body weight and appetite may disappear during chronic treatment (Jong et al. 2006; Gamaro et al., 2008). The Lee Index, an overweight predictor (Nery et al., 2011) that considers the body weight, did not differ among the groups.

The other body predictors, AC and TC, increased in all four HF groups compared to the C ones. It is known that lactation coincides with the maximum adipogenesis period in rodents. Besides, maternal diet intake during suckling may change milk quality in favor of an enlargement in the adipocytes of offspring (Lecoutre and Breton, 2015). It is important to mention that AC was reduced in the HF/EW group in comparison to the group HF/SW. This demonstrates the efficiency of physical exercise in ameliorating body composition, despite its failure to reduce weight measures.

Physical exercise decreased AC, but increased retroperitoneal fat in the HF/EW group. It could be speculated that a compensatory effect of physical exercise on caloric intake (Gollish et al., 2009; Zambon et al., 2009) in association with HF diet-induced lipogenesis (Lecoutre and Breton, 2015) promotes accumulation of abdominal fat. Retroperitoneal fat is a measure that can represent central adiposity (Zambon et al., 2009). However, when fluoxetine was administered together with exercise, the absolute value of retroperitoneal fat reduced. Fluoxetine appears to act directly on adipose tissue *in vitro* decreasing fat accumulation by inhibiting the proliferation and differentiation of stem cells derived from adipose tissue (Sun et al., 2015). In genetically-obese animals, fluoxetine treatment (10 mg/kg i.p. for two weeks) reduced the total body fat (Churruca et al., 2004). In fact, retroperitoneal fat in the group HF/SF was, significantly, the lowest between the groups.

Epididymis tissue was not altered after exercise and/or fluoxetine administration. Similar result was found in adult mice suckling in small litters and submitted to swimming exercise (Nery et al., 2011). This suggests that the overload of the exercise or, at least, the higher volume of activity would have more effect on this tissue. Concerning fluoxetine effect in this tissue, Da Silva et al. (2015) showed that rats receiving subcutaneous fluoxetine injections from 1 to 21 days of life presented a reduction in the white adipose tissue of the epididymis. The discrepancy between our results and theirs may be due to methodological differences, since we use fluoxetine by orogastric administration in older animals (40 to 60 days of life).

Regarding nutrition-related effects on brain excitability, the HF diet accelerates CSD velocity (group HF/SW x group C/SW). In fact, it has been suggested that maternal consumption of a HF diet significantly affects the cerebral environment of the offspring (Segovia et al., 2015). Furthermore, modifications in maternal dietary lipids have been associated with negative effects on myelination of the auditory brainstem pathway (Saste et al., 2008). On the other hand, myelin content is inversely associated to CSD propagation velocity (Merkler et al., 2009).

Soares et al. (2012) suggested that conjugated linoleic acid treatment performed during lactation may impair myelin synthesis in the progeny, and this would be causally involved in CSD acceleration. The HF diet used in our study contained higher amounts of palmitic, stearic and oleic acid than the control diet. The proteolipid present in myelin in the central nervous system of the rat brain seems to contain bound fatty acids, mainly palmitic, oleic, and stearic acids (Bizzozero and Pasquini, 1984; Bizzozero and Good, 1991). It is possible that fat imbalance during the suckling period may influence myelination negatively and so promote long-lasting brain electrophysiological effects.

Freeman et al. (2014) reported that a HF diet in the post-natal period is involved with damage to the brain of the offspring due to inflammation. The obese state is characterized by

a low-grade systemic inflammation, mainly as a result of an increase in adipocyte size, as well as fat resident- and recruited-macrophage activity (Gil et al., 2007). Regarding the brain, the HF diet can result in high amount of TNF- α in rat hippocampus (Spagnuolo et al., 2015), and the lactation is critical for immune system development, especially for the acquired immune system (Kelly and Countts, 2000).

Chronic low-grade inflammation as a result of maternal HF diet intake can be activated in many organs of the offspring, including the brain (Zhou and Pan, 2015). Sasaki et al., (2013) observed that adult offspring exposed to perinatal HF diet show increased expression of corticosterone receptors in the amygdala and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory expression in the hippocampus and amygdala in genes known to be regulated by the glucocorticoid receptor. In addition, it seems CSD is involved in intracranial neurogenic inflammation around the meningeal blood vessels in migraine (Cui et al., 2014). Thus, it is possible to speculate that the facilitator effect of a HF diet on CSD may be associated with changes imposed by inflammation.

The HF diet is also related to oxidative stress and changes in cerebral vascularization (Freeman et al., 2014). As an example, the diet has been shown to alter micro-vascular structure in a hamster's cerebral cortex (Constantinescu et al., 2011). On the rat's hippocampus, Spagnuolo et al. (2015) detected that a long term HF diet increased serum levels of hemoglobin and decreased haptoglobin, a protein which acts as an antioxidant by binding free hemoglobin. These authors suggest that changes in the vascularization/blood-brain barrier integrity might be responsible for the increase observed in cerebral hemoglobin levels (Spagnuolo et al., 2015).

On the other hands, some reports have demonstrated that an excess of reactive oxygen species increases cortical excitability (Guedes and Frade, 1993; Abadie-Guedes et al., 2008). Additionally, malnutrition during pregnancy or lactation decreases the blood vessel density of brain cortex of rat offspring, which remains throughout life (Peeling and

Smart, 1994; Bennis-Taleb et al., 1999). Both oxidative stress and brain vascularization can influence brain electrophysiology (Abadie-Guedes et al., 2012; Ayata, 2013). All of the above allow us to speculate that HF during lactation can change the oxidative defense and the vascular development of offspring (HF/SW animals), increasing CSD susceptibility.

As well as it is important to identify the actions of a HF diet on the body, it is necessary to propose ways to reverse its detrimental effects. On our study, the increase in CSD velocity was counteracted by treadmill exercise (HF/EW animals). Previous research in our laboratory showed an antagonistic effect of physical exercise on CSD under standard nutrition conditions during lactation (Monteiro et al., 2015). It seems that physical exercise effect is independent of nutritional status.

Interestingly, undernourished rats during lactation also present an increase in CSD velocities. However, the treadmill exercise similarly deaccelerated CSD propagation, even in elderly animals (Batista-de-Oliveira et al., 2012). Some studies have proposed that western diet consumption may activate pathways consistent with vascular aging changes (Dantas et al., 2014). Given this, studies have proposed that moderate exercise (swimming exercise, 60 minutes/day and 5 days/week for 8 weeks) may attenuate the vascular aging effects by upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF), and significantly reduce age-induced oxidative stress (Viboolvorakul and Patumraj, 2014). Furthermore, treadmill exercise for 3 weeks, 30 min/day also increased VEGF and the density of micro vessels within the cerebral vasculature of elderly rats (Ding et al., 2006). Thus, it is possible that a HF diet may promote vascular changes in the offspring brain. However, physical exercise putatively attenuates this effect by its angiogenic role on the organism, including the cortical brain (Huang et al., 2013).

It has been reported that cerebral vascular alterations are involved in migraine pathophysiology (Nosedá and Burstein, 2013; Irby et al., 2015), including vessel changes by obesity. In its turn, the CSD mechanism seems to be implicated in migraine vascular

disorders (McComas and Upton, 2015). By considering that physical exercise may reduce the burden of migraine (Irby et al., 2015), it is reasonable that it may also influence brain excitability, slowing down CSD propagation.

Physical exercise also ameliorates the brain vascular changes that occur with ischemic stroke. This effect involves an activation of the serotonergic system. Lan et al. (2014) showed that permanent occlusion of the middle cerebral artery reduced levels of serotonin. However, after 16 days of treadmill performance, the receptor 5-HT_{1A} (5-HT_{1AR}) expression levels and the brain derived neurotrophic factor (BDNF) were upregulated. Furthermore, prior study observed that treadmill exercise alone or together with fluoxetine, a drug that augments the serotonin brain availability, decreased CSD velocities (Monteiro et al., 2015). In that study, fluoxetine effect was observed under favorable lactation conditions.

Previous CSD studies have demonstrated that early-nutritional status may promote different electrophysiological responses to some substances (Guedes et al., 1992; Costa-Cruz and Guedes, 2001). For example, undernutrition during lactation enhances the effect of naloxone on CSD propagation in the brains of adult rats (Guedes et al., 2013); in contrast, the effect of pilocarpine is reduced in adult animals that underwent malnutrition in the early stages of life (De-Vasconcelos et al., 2004). However, another study suggests that early nutrition-induced CSD modifications depend on the brain system in question, since three serotonergic tested drugs, citalopram, fluoxetine and tianeptine, did not have their effects altered by previous undernourishment (Guedes et al., 2002; Amancio-dos-Santos et al., 2006; Amancio-dos-Santos et al., 2013).

In fact, the lactation period constitutes a sensitive window for development of serotonergic system (Jury et al., 2015) and this neurotransmission system affects the underlying mechanisms of CSD (Guedes et al., 2002; Amancio-dos-Santos et al., 2006). Papazoglou et al. (2015) demonstrated that a HF diet impairs cell proliferation in the brain

area that receives intense serotonergic innervations (dentate gyrus of the hippocampus) and suggested that the mechanisms linking obesity to depression involve this neurotransmitter. Thus, interventions that activate the serotonergic system, such as physical exercise and fluoxetine treatment, seem to be a useful strategy against important pathological conditions, such as obesity and depression.

5.0 CONCLUSION

In conclusion, the present *in vivo* study describes novel and long lasting effects of treadmill exercise and fluoxetine treatment on CSD in rat offspring exposed to a maternal HF diet during lactation. The results allow us to draw two conclusions. First, CSD propagation accelerates under unfavorable conditions of lactation. Second, the early overnutrition process interacts with the two late-onset manipulations (exercise and fluoxetine), deaccelerating the CSD velocities. The data highlight the relationship between nutrition, physical exercise and fluoxetine on the excitability-related phenomenon in the brain and on body parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq (Edital MCT/CNPq 14/2010 – No. 477456/2010-3), FACEPE (APQ-0378-2.07/06; APQ-0484-2.07/15) and PROPESQ/UFPE (23076.048111/2014-22) for financial support. The English text of this paper was revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

CONFLICT OF INTEREST:

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Abadie-Guedes R, Santos SD, Cahú TB, Guedes RC, Bezerra RS (2008), Dose dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 32:1417-21.
- Abadie-Guedes R, Guedes RC, Bezerra RS (2012), The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. *Alcohol Clin Exp Res.* 36:1563-7.
- Amâncio-dos-Santos A, Pinheiro PC, Lima DS, Ozias MG, Batista-de-Oliveira M, Guimarães NX, Guedes RC (2006), Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp Neurol.* 200:275-82.
- Amâncio-dos-Santos A, Maia LM, Germano PC, Negrão YD, Guedes RC (2013), Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Eur J Pharmacol.* 706:70-5.
- Ayata C (2013), Spreading depression and neurovascular coupling. *Stroke.* 44:S87-9.
- Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP (2012), Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr.* 2012:657379.

- Bahari H, Caruso V, Morris MJ (2013), Late-onset exercise in female rat offspring ameliorates the detrimental metabolic impact of maternal obesity. *Endocrinology*. 154:3610-21.
- Batista-de-Oliveira M, Lopes AA, Mendes-da-Silva RF, Guedes RC (2012), Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. *Exp Gerontol*. 47:452-7.
- Bennis-Taleb N, Remacle C, Hoet JJ, Reusens B (1999), A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr*. 129:1613-9.
- Bizzozero OA, Good LK (1991), Rapid metabolism of fatty acids covalently bound to myelin proteolipid protein. *J Biol Chem*. 266:17092-8.
- Bizzozero OA, Soto EF, Pasquini JM (1984), Simultaneously entry of palmitic acid into proteolipid protein in different myelin subfractions of rat brain. *Neurochem Int*. 6:659-64.
- Breton C (2013), The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol*. 216:R19-31.
- Churrua I, Portillo MP, Gutiérrez A, Casis L, Macarulla MT, Zarate J, Echevarría E (2004), Effects of fluoxetine administration on regional galanin expression in obese Zucker rat hypothalamus. *Nutr Neurosci*. 7:171-5.

Constantinescu E, Safciuc F, Sima AV (2011), A hyperlipidemic diet induces structural changes in cerebral blood vessels. *Curr Neurovasc Res.* 8:131-44.

Costa-Cruz RR, Guedes RC (2001), Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neurosci Lett.* 303:177-80.

Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y (2014), Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. *Neurosci Bull.* 30:812-22.

Da Silva AI, Braz GR, Pedroza AA, Nascimento L, Freitas CM, Ferreira DJ, Manhães de Castro R, Lagranha CJ (2015), Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. *J Bioenerg Biomembr.* 47:309-18.

Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, Jiménez-Altayó F (2014), Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. *Exp Gerontol.* 55:1-11.

De-Vasconcelos CA, De Oliveira JA, De Oliveira Costat LA, Guedes RC (2004), Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. *Nutr Neurosci.* 7:163-70.

Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y (2006), Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res.* 3:15-23.

Engelhardt E, Gomes MM (2015), Aristides Leão: a birth centennial homage with comments on his spreading depression. *Arq Neuropsiquiatr.* 73:544-6.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM (2004), Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 20:218-24.

Fall CH (2013), Fetal programming and the risk of noncommunicable disease. *Indian J Pediatr.* 80:S13-20.

Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calviño C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG, Trevenzoli IH (2012), Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J Physiol.* 590:5503-18.

Freeman LR, Haley-Zitlin V, Rosenberger DS, Granholm AC (2014), Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. *Nutr Neurosci.* 17:241-51.

French SA, Story M, Jeffery RW (2001), Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health.* 22:309-35.

- Gamaro GD, Prediger ME, Lopes J, Bassani MG, Dalmaz C (2008), Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 90:312-7.
- Gao Y, Zhao Y, Pan J, Yang L, Huang T, Feng X, Li C, Liang S, Zhou D, Liu C, Tu F, Tao C, Chen X (2014), Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res.* 1585:83-90.
- Gil A, María Aguilera C, Gil-Campos M, Cañete R (2007), Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr.* 98:S121-6.
- Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ (2009), Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E495-504.
- Guedes RC, Frade SF (1993), Effect of ethanol on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res.* 26:1241-4.
- Guedes RCA, Cabral-Filho JE, Teodósio NR (1992), "GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats". In: Do Carmo, R.J (Ed.) *Spreading Depression.* Springer, Berlin, *Exp Brain Res Series.* 23: 17-26.
- Guedes RC, Amâncio-Dos-Santos A, Manhães-De-Castro R, Costa-Cruz RR (2002), Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr Neurosci.* 5:115-23.

Guedes RCA, Rocha-de-Melo AP, Teodósio NR (2004), Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. *Ciência e Cultura*. 1-4.

Guedes RC, Rocha-de-Melo AP, de Lima KR, de Albuquerque Jda M, Francisco Eda S (2013), Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. *Nutr Neurosci*. 16:142-6.

Higgins JA, Jackman MR, Brown IL, Johnson GC, Steig A, Wyatt HR, Hill JO, Maclean PS (2011), Resistant starch and exercise independently attenuate weight regain on a high fat diet in a rat model of obesity. *Nutr Metab (Lond)*. 8:49-64.

Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH (2009), Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*. 587::905-15.

Huang CX, Qiu X, Wang S, Wu H, Xia L, Li C, Gao Y, Zhang L, Xiu Y, Chao F, Tang Y (2013), Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats. *Neuroscience*. 233:139-45.

Irby MB, Bond DS, Lipton RB, Nicklas B, Houle TT, Penzien DB (2015), Aerobic Exercise for Reducing Migraine Burden: Mechanisms, Markers, and Models of Change Processes. *Headache*. [Epub ahead of print]

Jacotte-Simancas A, Costa-Miserachs D, Coll-Andreu M, Torras-Garcia M, Borlongan CV, Portell-Cortés I (2015), Effects of voluntary physical exercise, citicolina, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 32:739-51.

Jong TR, Snaphaan LJ, Pattij T, Veening JG, Waldinger MD, Cools AR, Olivier B (2006), Effects of chronic treatment with fluvoxamine and paroxetine during adolescence on serotonin-related behavior in adult male rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16:39-48.

Jury NJ, McCormick BA, Horseman ND, Benoit SC, Gregerson KA (2015), Enhanced responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors during lactation. *PLoS One.* 10:e0117339.

Kelly D, Coutts AG (2000), Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc.* 59:177-85.

Lan X, Zhang M, Yang W, Zheng Z, Wu Y, Zeng Q, Liu S, Liu K, Li G (2014), Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT_{1A} receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci.* 35:761-6.

Leão AAP (1944), Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 6: 359-390.

Lecoutre S, Breton C (2015), Maternal nutritional manipulations program adipose tissue dysfunction in offspring. *Front Physiol.* 6:158-65.

Lee S, Kuk JL, Davidson LE, Hudson R, Kilpatrick K, Graham TE, Ross R (2005), Exercise without weight loss is an effective strategy for obesity reduction in obese individuals with and without Type 2 diabetes. *J Appl Physiol.* 99:1220–5.

McComas AJ, Upton AR (2015), Cortical spreading depression in migraine-time to reconsider? *Arq Neuropsiquiatr.* 73:714-21.

Merkler D, Klinker F, Jürgens T, Glaser R, Paulus W, Brinkmann BG, Sereda MW, Stadelmann-Nessler C, Guedes RC, Brück W, Liebetanz D (2009), Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann Neurol.* 66:355-65.

Monteiro HM, Silva DL, França JP, Maia LM, Angelim MK, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RC (2011), Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. *Nutr Neurosci.* 14:112-8.

Monteiro HMC, Barreto-Silva NL, Dos Santos GE, Santos AS, Séfora MBS, Amâncio-Dos-Santos A (2015), Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 762:49-54.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993), Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.

Nery C, Pinheiro, IL, Muniz GS, Vasconcelos DAA, Franca SP, Nascimento E, (2011), Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. *Rev Bras Med Esporte.* 17: 49-55.

Nosedá R, Burstein R (2013), Migraine pathophysiology: anatomy of the trigemino vascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain*. 154:S44-53.

Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL (2007), Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 41:111-9.

Papazoglou IK, Jean A, Gertler A, Taouis M, Vacher CM (2015), Hippocampal GSK3 β as a Molecular Link Between Obesity and Depression. *Mol Neurobiol*. 52:363-74.

Pedraza DF, Queiroz D (2011), Micronutrientes no crescimento e desenvolvimento infantil. *Rev Brasil Cresc e Desenvolv Hum*. 156-171.

Peeling AN, Smart JL (1994), Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. *Metab Brain Dis*. 9:81-95.

Pysh JJ, Weiss GM (1979), Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science*. 206:230-2.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993), AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 123:1939-51.

Reynolds CM, Gray C, Li M, Segovia SA, Vickers MH (2015). Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients*. 7:8090-111.

Richard C, Lewis ED, Goruk S, Field CJ (2015), The content of docosahexaenoic acid in the maternal diet differentially affects the immune response in lactating dams and suckled offspring. *Eur J Nutr*. [Epub ahead of print].

Sasaki A, de Vega WC, St-Cyr S, Pan P, McGowan PO (2013), Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience*. 240:1-12.

Saste MD, Carver JD, Stockard JE, Benford VJ, Chen LT, Phelps CP (1998), Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. *J Nutr*. 128:740-3.

Segovia SA, Vickers MH, Zhang XD, Gray C, Reynolds CM (2015), Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalises the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring. *J Nutr Biochem*.26:1448-57.

Simar D, Chen H, Lambert K, Mercier J, Morris MJ (2012), Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.22:269-76.

Soares JK, Rocha-de-Melo AP, Medeiros MC, Queiroga RC, Bomfim MA, de Souza AF, Nascimento AL, Guedes RC (2012), Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. *Biochim Biophys Acta*. 1820:1490-5.

Spagnuolo MS, Mollica MP, Maresca B, Cavaliere G, Cefaliello C, Trinchese G, Scudiero R, Crispino M, Cigliano L (2015), High Fat Diet and Inflammation - Modulation of Haptoglobin Level in Rat Brain. *Front Cell Neurosci.* 9:479.

Spencer SJ (2012), Early life programming of obesity: the impact of the perinatal environment on the development of obesity and metabolic dysfunction in the offspring. *Curr Diabetes Rev.* 8:55-68.

Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL (2012), Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes.* 61:2833-41.

Sun BK, KIM JH, CHOI JS, HWANG SJ, SUNG JH, (2015), Fluoxetine decreases the proliferation and adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Int J Mol Sci.* 16: 16655-68.

Tinoco SM, Sichieri R, Moura AS, Santos Fda S, Carmo Md (2007), The importance of essential fatty acids and the effect of trans fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. *Cad Saude Publica.* 23:525-34.

Trombetta IC (2003), Exercício físico e dieta hipocalórica para o paciente obeso: vantagens e desvantagens. *Rev Bras de Hipert* 10: 130-133.

Valle CP, Durce K, Ferreira CAS (2008), Conseqüências fetais da obesidade gestacional. *O Mundo da Saúde.* 32:537-541.

Viboolvorakul S, Patumraj S (2014), Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed Res Int.* 2014:230791.

Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, Neupert S, Nicholls HT, Mauer J, Hausen AC, Predel R, Kloppenburg P, Horvath TL, Brüning JC (2014), Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell.* 156:495-509.

Zambon L, Duarte FO, Freitas LF, Scarmagnani FRR, Dâmaso A, Duarte ACGO, Senefi Fiorese M (2009), Effects of two different types of swimming exercise on adiposity and lipid profile in rats with exogenous obesity *Rev. Nutr., Campinas.* 22:707-715

Zhou D, Pan YX (2015), Pathophysiological basis for compromised health beyond generations: role of maternal high-fat diet and low-grade chronic inflammation. *J Nutr Biochem.* 26:1-8.

ANEXO 1 – Autorização comitê de Ética

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, 17 de julho de 2012.

Ofício nº 453/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Angela Amancio dos Santos**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017493/2012-81

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, **“Repercussões do exercício físico e da Fluoxentina sobre o Sistema nervoso: Análise da depressão alastrante cortical em ratos precocemente hipernutridos”**.

Concluímos 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-UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Número de animais previsto no protocolo: 80 ratos; Peso: Fêmeas 250-300g e machos 6-250g; Idade: fêmeas 90 a 120 dias e machos desde o nascimento até 61-81 dias.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

ANEXO 02 - Comprovante de submissão do artigo 2

On Wednesday, January 27, 2016 12:30 PM, "Neuroscience, Editorial"
<ees.nsc.0.36e949.84b27394@eesmail.elsevier.com> wrote:

Physical exercise and/or fluoxetine attenuate the facilitator effect of high fat diet exposure on cortical spreading depression in rat offspring
Research Paper
Corresponding Author: Prof. Angela Amancio-dos-Santos

Dear Dr. Amancio-dos-Santos,

Your submission entitled "Physical exercise and/or fluoxetine attenuate the facilitator effect of high fat diet exposure on cortical spreading depression in rat offspring" has been received for consideration in Neuroscience.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to EES for Neuroscience (<http://ees.elsevier.com/nsc/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Please be aware that Neuroscience offers the 3D visualization viewer for the neuroimaging data embedded in published online articles. Hence, we would like to encourage you to upload the neuroimaging data (in NIfTI format) as supplementary material with your manuscript to our online submission system during the article revision stage. More information can be found at:<http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>

Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Stephen G. Lisberger, Chief Editor
Etienne Hirsch, Associate Editor
Neuroscience

Neuroscience, Editorial Office

Elsevier

E-mail: neuroscience@journal-office.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.