

LAÍS ALVES RIBEIRO COSTA

**Ingestão alimentar excessiva e óleo de cártamo influenciam
ansiedade, memória e eletrofisiologia cerebral em ratos jovens**

RECIFE/PE

2016

LAÍS ALVES RIBEIRO COSTA

**Ingestão alimentar excessiva e óleo de cártamo influenciam
ansiedade, memória e eletrofisiologia cerebral em ratos jovens**

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

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

RECIFE – PE

2016

Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C837i

Costa, Laís Alves Ribeiro.

Ingestão alimentar excessiva e óleo de cártamo influenciam ansiedade, memória e eletrofisiologia cerebral em ratos jovens / Laís Alves Ribeiro Costa. – 2016.

90 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Manuela Batista-de-Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hipernutrição. 2. Óleo de açafrão. 3. Período crítico. 4. Sistema nervoso. I. Batista-de-Oliveira, Manuela (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-122)

LAÍS ALVES RIBEIRO COSTA

Ingestão alimentar excessiva e óleo de cártamo influenciam ansiedade, memória e eletrofisiologia cerebral em ratos jovens

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

Aprovada em 02 de março de 2016

Banca examinadora:

Profª. Ana Paula Rocha de Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Cláudia J. Lagranha
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Luciana Maria Silva de Seixas Maia
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE – PE

2016

**Dedico esse trabalho a Deus e a meus pais, que me estenderam a mão por toda a
caminhada até aqui e assim será para sempre.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado essa conquista e estar ao meu lado em todos os momentos. “Porque a Deus nenhuma coisa é impossível” (Lc 1:37).

A Nossa Senhora por ter me protegido com o seu manto sagrado e ter me dado seu colo em todas as noites/dias.

Aos meus queridos e amados pais, *Luiz e Rose*, pelo amor, apoio, paciência, e principalmente, por serem meus amigos.

Aos meus irmãos, *Victor e Felipe*, por estarem ao meu lado e me ensinarem tanto a ser uma pessoa melhor.

Aos meus avós, *Ribeiro e Rosa* (paternos), pelo amor, pela compreensão da minha ausência em alguns almoços dos finais de semana e *Neide* (materna) por sempre me amar e cuidar de mim desde pequena.

Ao meu tio *Serginho*, pela amizade, conselhos e pela preocupação de me ver sempre bem.

Ao meu querido noivo/amigo, *Rodrigo*, pelo amor, paciência, cuidado, atenção e por ser canal de Deus e de Maria em minha vida e assim sempre será, em nossa futura família.

Aos meus sogros, *Rodrigo e Tânia*, por serem amigos e cuidar tão bem de mim. E ao meu cunhado, *Ítalo*, pelas orações, que são os mais belos presentes que um amigo pode receber.

À minha orientadora, professora *Manuella Batista*, por me orientar e com seu entusiasmo, sempre me incentivar na pesquisa e na ciência.

Ao professor *Rubem Guedes*, pela infraestrutura permitida (LAFINNT) para a realização do projeto e pela amizade desde a graduação, sempre me dando uma palavra de Deus.

Aos professores, *Cláudia Lagranha, Mariana Fernandes, Juliana Késsia, Eduardo Lira* e todos das suas equipes pela colaboração para a realização deste projeto.

Ao grupo do LAFINNT, professor *Ricardo, Larissa, Suênia, Regina, Elian, Nora*, pela ajuda e ensinamentos durante todo o trabalho dentro do laboratório.

Às minhas amigas que a vida me proporcionou e eu tive o privilégio de tê-las sempre por perto, *Andrea, Raíssa, Adélia, Tiago, Marcela, Hayane, Amanda e Priscilla*.

Às minhas amigas que veio como presente do mestrado por toda a vida, *Stella e Patrícia*. Obrigada pelo companheirismo, pelas alegrias e preocupações divididas.

À minha amiga e professora, Viviane Lansky, com a simplicidade e o amor de um coração semelhante ao de Jesus.

As queridas colegas Rose e Andréia, pela ajuda e ensinamentos nos experimentos. Com elas aprendi a importância em ajudar o próximo.

Aos nossos colegas, alunos da iniciação científica, Keyla, Rai e Roberta, pelo auxílio nas atividades experimentais.

Ao meu grupo querido, Ágape, meu ministério querido DOA e o ministério tão amado por mim, Mãe peregrina, que sempre estavam dispostos para a oração e pelo ombro amigo de Deus em minha vida. Assim, também agradeço ao grupo dos Ministros da Eucaristia pelo presente tão maravilhoso de fazer parte desse grupo e ficar mais próxima de Jesus.

Ao programa da PPGN e a Capes pela colaboração e apoio durante esses dois anos de pesquisa.

Ao veterinário do departamento de Nutrição, Dr. Edeones França, pelo cuidado e criação dos animais e dedicação a sua profissão.

A todos que direta e indiretamente me ajudou para a concretização desse trabalho.

RESUMO

O excesso de peso representa um dos grandes problemas da sociedade. A alimentação saudável, incluindo o consumo dos ácidos graxos insaturados, exerce fator crucial na prevenção e tratamento das doenças ocasionadas pela obesidade, incluindo aquelas que acometem o sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi investigar, em ratos jovens, efeitos da ingestão alimentar excessiva associada a suplementação com óleo de cártamo sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e eletrofisiológicos. Ratos *Wistar* foram divididos em grupos referentes ao estado nutricional, com ninhadas contendo 03 ou 09 animais, e subdivididos quanto à suplementação com óleo de cártamo ou veículo no período do 7º ao 30º dia de vida por via oral. Após o período de suplementação, dados da murinometria, comportamento referente à ansiedade e memória episódica e registro eletrofisiológico foram coletados. Os resultados indicam que ratos criados em ninhadas com tamanho reduzido apresentaram aumento peso corporal, circunferência abdominal e torácica, comprimento corporal, índice de massa corporal e peso do fígado, quando os dados foram comparados com os respectivos controles. Os ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva apresentaram maior ansiedade e redução da velocidade da depressão alastrante cortical (DAC). Por outro lado, o óleo de cártamo, independente do estado nutricional, apresentou maior velocidade de propagação da DAC. Além disso, todos os animais deste estudo foram bem sucedidos na tarefa de reconhecimento de objetos, com preferência em explorar o novo objeto. Os resultados sugerem que o estado nutricional na fase inicial da vida pode acarretar em prejuízos metabólicos, comportamentais e na excitabilidade cortical. Em contrapartida, o óleo de cártamo parece reverter o efeito do excesso alimentar sobre sistema nervoso.

Palavras-chave: Hipernutrição. Óleo de açafrão. Período crítico. Sistema nervoso.

ABSTRACT

Overweight represent one of the major problems of society. Healthy eating, including consumption of unsaturated fatty acids, exerts a crucial factor in the prevention and treatment of diseases caused by obesity, including those that affect the central nervous system. The objective of this study was to investigate in young rats, effects of excessive food intake associated with safflower oil supplementation on metabolic, behavioral and electrophysiological parameters. *Wistar* rats were divided in groups with related to nutritional states, with litters containing 03 or 09 pups, and subdivided either as orally supplemented with safflower oil or vehicle in the period from 7th to 30th day of life. After this supplementation period, murinometric data, anxiety-like behavior, episodic memory, and electrophysiological recordings were collected. The results indicate that rats raised in reduces litter size presented increased body weight, thoracic and abdominal circumference, body length, body mass index and liver weight when the data was compared with the respective controls. Rats subjected to excessive food intake showed enhanced anxiety-like behavior and reduced velocity of the cortical spreading depression (CSD). Moreover, animals supplemented with safflower oil, regardless of nutritional state, showed higher speed of propagation of CSD. Furthermore, all animals in this study were successful in the object recognition task, with preference in exploring the new object. The results suggest that the nutritional state in early life can lead to metabolic, behavioral and cortical excitability impairment. On the other hand, safflower oil can appears to reverse the effect of the excess food nervous system.

Keywords: Overnutrition. Safflower oil. Critical period. Nervous system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.0	Cronograma Experimental.....	26
 RESULTADOS		
Figura 2.0	Esquema com eletrodos utilizados para estímulo e registro da DAC.....	30
Figura 3.0	Evolução ponderal.....	33
Figura 4.0	Índices de discriminação da atividade comportamental nos testes de reconhecimento de objeto.....	35
Figura 5.0 (A)	Gravações das variações lenta de voltagem (VLV) da DAC.....	36
Figura 5.0 (B)	Velocidade de propagação da DAC.....	37
Tabela 1	Dados Murinométricos.....	33
Tabela 2 (A) e (B)	Teste Comportamentais de LCE e TCA.....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis	12
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças	12
OMS	Organização Mundial da Saúde	12
IAE	Ingestão Alimentar Excessiva	14
SN	Sistema Nervoso	15
AGIs	Ácidos Graxos Insaturados	16
MUFA	Monoinsaturados	16
PUFA	Poli-insaturados	16
SNC	Sistema Nervoso Central	17
DGLA	Ácido dihomô- γ -linolênico	18
COX	Cicloxygenase	18
LOX	Lipo-oxigenase	18
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	19
LCE	Labirinto em Cruz Elevado	20
TCA	Teste de campo aberto	20
TRO	Teste de reconhecimento de objetos	20
DAC	Depressão alastrante cortical	20
VLV	Variação lenta de Voltagem	21
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	25
CC	Comprimento Corporal	26
IMC	Índice de Massa Corporal	26
CT	Circunferência Torácica	27
CA	Circunferência Abdominal	27
KCl	Cloreto de Potássio	30
EPM	Erro Padrão da Média	31
ANOVA	Análise da Variância	31

Grupos Experimentais

O	Overnourished – Animais submetidos à alimentação excessiva	25
N	Nourished – Animais nutridos	25
SF	Safflower Oil - Óleo de Cártamo	25
V	Veículo	25

SUMÁRIO

1. Apresentação.....	12
2. Revisão da Literatura.....	14
3. Hipótese	23
4. Objetivo Geral.....	24
4.1 Objetivos específicos.....	24
5. Materiais e Métodos.....	25
5.1 Delineamento do projeto.....	25
5.2 Determinações ponderais.....	26
5.2.1 Evolução ponderal.....	26
5.2.2 Avaliação murinométrica.....	26
5.3 Análise comportamental.....	27
5.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)	27
5.3.2 Teste de Campo Aberto (TCA).....	28
5.3.3 Teste de reconhecimento de objetos (TRO).....	28
5.4. Registro eletrofisiológico.....	29
6. Análise estatística.....	31
7. Resultados.....	32
8. Discussão.....	38
9. Considerações Finais.....	44
Referências.....	45
Apêndice (A).....	52
Anexo (A).....	72
Anexo (B).....	90

1. APRESENTAÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica de causa multifatorial que se desenvolve através da predisposição genética e estilo de vida, incluindo maus hábitos alimentares e falta de atividade física (ZHANG et al., 2010; RICE; CORWIN, 2002). A alta prevalência da obesidade na população tem sido considerada um problema de saúde pública, sendo incluída no grupo das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), especialmente devido as suas consequências negativas (CHOPRA; GALBRAITH; HILL, 2002).

O perfil nutricional da sociedade se torna cada vez mais preocupante. Evidências apresentadas pelo centro de saúde pública nos Estados Unidos, Centers for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças – CDC), caracterizam a gravidade desta mudança (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – FISCAL YEAR*, 2013). Estes dados do CDC revelam que a obesidade é responsável por cerca de 300.000 mortes por ano e este processo saúde-doença está associado com 147 bilhões de dólares em gastos com tratamentos. Em paralelo, no Brasil, dados apresentados pelo Ministério da Saúde mostram que os gastos anuais com o tratamento de doenças associadas à obesidade chegam a 488 milhões de reais. Para complementar as estratégias de combate a essas tendências, em 2013, foi criada a Linha de cuidados prioritários do sobrepeso e da obesidade no Sistema Único de Saúde (SUS), com o objetivo de intervir na mudança do estilo de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) data que, dentro dos próximos anos, as DCNT vão se tornar as principais causas globais de morbidade e mortalidade. O papel da dieta na etiologia das DCNT está bem estabelecido, com mudanças em relação aos alimentos com altos níveis de gordura saturada, ou seja, a transição nutricional está cada vez mais evidente em países de baixa ou média renda, com redução do gasto energético e aparecimento da obesidade e suas consequências maléficas (CHOPRA; GALBRAITH; DARNTON-HILL, 2002).

Padrões alimentares pouco saudáveis estão envolvidos tanto com a obesidade como com os distúrbios psiquiátricos, que por sua vez, estão associados à prevalência do aparecimento de doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos e doenças que afetam o sistema imunológico (LOPRESTI; DRUMMOND, 2013). Devido a sua importância, os ácidos graxos essenciais na dieta medianam funções e estruturas cerebrais desde a infância até a senescênciia (YEHUDA et al., 2005). O ácido linolênico e o ácido linoleico são ácidos graxos

essenciais que não são sintetizados pelo organismo de mamíferos e, por conseguinte, devem ser obtidos de forma extrínseca, a partir da alimentação. Eles exercem papel na prevenção das disfunções no desenvolvimento do sistema nervoso central e atraso no crescimento (SOARES et al., 2013). Além disso, alguns estudos comprovam a eficácia do uso a curto prazo dos ácidos graxos insaturados do tipo linoleico na prevenção e tratamento do excesso de peso, com atenuação da ingestão alimentar, o que sugere um potencial na saciedade (RICE; CORWIN, 2002).

O *Carthamus tinctorius* L. é uma planta encontrada na China e as partes medicinais são encontradas em suas sementes e flores. Das sementes é extraído um óleo composto principalmente do ácido graxo linoleico na sua composição, que tem sido utilizado para fins terapêuticos com ação no excesso de peso e suas consequências maléficas, e efeitos protetores no aumento do fluxo sanguíneo, atividade antibacteriana, inibição da agregação plaquetária, ação anti-inflamatória e câncer. Além disso, o cártamo pode ser utilizado também no tratamento de várias doenças ginecológicas, osteoporose, doenças cardiovasculares e cerebrais (ASGARY et al., 2012; WU et al., 2013; GAO, et al., 2015).

Vale ressaltar que a fase inicial da vida é considerada um período crítico de desenvolvimento, nos quais processos fisiológicos ocorrem com maior intensidade e, em casos de diferentes condições nutricionais, poderá contribuir para prejuízos no sistema nervoso, bem como nas respostas comportamentais. Durante a última fase da vida fetal e o período de amamentação, o cérebro passa por um crescimento acelerado, por isso, os nutrientes essenciais, tais como os ácidos graxos insaturados, são considerados muito importantes (SMART et al., 1973; SOARES et al., 2013).

Desta maneira, este estudo apresenta abordagens para uma melhor compreensão na avaliação, em ratos jovens, dos efeitos da associação entre o excesso de peso condicionado pelo número de filhotes na ninhada com a suplementação do óleo de cártamo sobre os parâmetros murinométricos, comportamentais, bem como na avaliação da ansiedade e da memória, através de testes como o labirinto em cruz elevado, teste do campo aberto e o teste de reconhecimento de objeto e atividade elétrica cortical através do fenômeno conhecido como depressão alastrante cortical.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INGESTÃO ALIMENTAR EXCESSIVA DURANTE O PERÍODO CRÍTICO DA LACTAÇÃO

A obesidade representa um grande problema de saúde pública e está continuamente crescendo nos países ocidentais. Para os países desenvolvidos e em desenvolvimento, o excesso de peso foi listado como o quinto fator de risco de mortalidade mais grave (CHOPRA; GALBRAITH; DARNTON-HILL, 2002). Em muitos estudos, foram investigados os principais fatores que ocasionam o aparecimento de complicações na saúde provocadas pela obesidade (COELHO et al., 2011). Além de fatores genéticos, a ingestão alimentar excessiva é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de excesso de peso durante a vida (PLAGEMANN et al., 1998).

De fato, a obesidade tem crescido independente do estágio de desenvolvimento do país. Desde que as complicações de saúde causadas pelo excesso de peso e obesidade foram demonstradas, muitos estudos têm se preocupado em realizar pesquisas para identificar os principais fatores que contribuem para seu desenvolvimento. Fatores ambientais, como a nutrição pós-natal, parecem ser um dos fatores envolvidos no aparecimento desse problema que cresce de forma exponencial (LI; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 2002; COELHO et al, 2011; MNAFGUI et al., 2015).

A obesidade está diretamente relacionada à quantidade, qualidade e funcionamento do tecido adiposo (BASTIEN et al., 2014). Através da característica termogênica, o tecido adiposo marrom é considerado uma das principais estruturas envolvidas na regulação do peso corporal nos roedores (XIAO et al., 2007). Esses aspectos são fatores cruciais à repercussão do excesso de peso sobre a homeostase orgânica. De fato, a maneira como o lipídeo dietético será utilizado pelo tecido adiposo irá determinar: (1) se haverá homeostase (obeso metabolicamente saudável) ou (2) o estado entre grau de inflamação, resistência à insulina e complicações cardiovasculares (BASTIEN et al., 2014). Além disso, a obesidade é frequentemente relacionada à depressão e outros transtornos psiquiátricos, devido às dietas pouco saudáveis com excesso de calorias, muitas vezes associadas ao sedentarismo (LOPRESTI et al., 2013).

Além disso, os animais com a ingestão alimentar excessiva (IAE), provocada pela redução no tamanho da ninhada no período perinatal, apresentam alterações no neuropeptídeo

Y nos núcleos do hipotálamo responsáveis pela regulação do peso e ingestão alimentar (LI; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 2002). Essas alterações no início da vida podem ser ocasionadas pelas estruturas hipotalâmicas não estarem completamente formada (NERY et al., 2011). Nesse contexto, o excesso alimentar decorrente da diminuição no número de animais na ninhada, provoca aumento do peso corporal associado à modulação com a adiposidade (XIAO et al., 2007).

Os efeitos deletérios provenientes das condições de lactação inadequada, provocada pelo excesso alimentar introduzido no início da vida, podem influenciar no processo de desenvolvimento, ocasionando alterações metabólicas e estruturais no sistema nervoso (SN) em desenvolvimento, que podem persistir até a idade adulta em um processo irreversível (BATISTA-DE OLIVEIRA et al., 2012).

Estudos sugerem alterações hormonais ao investigar a ingestão alimentar excessiva no início da vida, com o aparecimento de hiperinsulinemia e aumento da leptina. Esses hormônios possuem influência sobre o crescimento, formação sináptica e homeostase na regulação do peso corporal. Além disso, o excesso de peso pode provocar outras alterações como hiperfagia, acarretando no aumento do peso corporal, deposição de gordura e aumento da pressão arterial (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2004; PLAGEMANN, 2005).

As fases iniciais da vida representam um “período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso” ou “período de crescimento rápido do cérebro”. No homem, esse período compreende o terceiro trimestre gestacional e segue até os primeiros dois a quatro anos de vida, enquanto que no rato, o mamífero mais usado para estudos experimentais sobre o tema, esse período equivale às três primeiras semanas de vida pós-natal, coincidindo com o período de aleitamento (MORGANE et al., 1993). Nos roedores, o ambiente pós-natal possui consequências fisiológicas e comportamentais em longo prazo (PLAGEMANN et al., 1999). Condições diferentes de lactação induzem alterações metabólicas com consequências permanentes no estado nutricional do animal (LI; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 2002 VIANA et al., 2013).

No período perinatal, os efeitos sobre a estrutura e função cerebral podem se tornar duradouros e os processos fisiológicos, tais como hiperplasia, hipertrofia, mielinização e migração neuronal ocorrem com velocidade máxima em comparação com outras fases da vida (BATISTA-DE OLIVEIRA et al., 2012). Nesse período, ocorre um rápido desenvolvimento e o cérebro se torna mais vulnerável às demandas do ambiente, como as nutricionais (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1993; ROCHA-DE-MELO et al., 2004; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Por isso, a nutrição adequada durante a fase inicial da vida é um fato

essencial para assegurar o desenvolvimento do cérebro (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Além disso, a alimentação excessiva no período crítico pode provocar alterações nos sistemas hormonais com hiperleptinemia, hiperinsulinemia, níveis elevados de triglicerídeos e resistência à insulina (PLAGEMANN et al., 1999). Esses hormônios possuem grande influência sobre o crescimento, conexões sinápticas e sistema homeostático (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2004).

A nutrição prejudicada pode influenciar mecanismos reguladores do desenvolvimento, produzindo alterações estruturais e metabólicas no SN em formação (GRANTHAM-MCGREGOR, 1990; MORGANE et al., 1993; GUEDES, 2005). Investigações sobre as mudanças estruturais no cérebro confirmam que os indivíduos com sobrepeso e obesidade possuem menor tamanho do hipocampo em comparação com indivíduos eutróficos (LOPRESTI e DRUMMOND, 2013).

Além de afetar o desenvolvimento do SN, a obesidade pode atuar como fator predisponente de consequências negativas, com o aparecimento de DCNT, como doenças cardiovasculares, diabetes, acidente vascular cerebral, hipertensão, além de depressão, ansiedade, dor crônica, alguns tipos de câncer, dentre outras (CHOPRA; GALBRAITH; DARNTON-HILL, 2002; AGBORSANGAYA et al., 2013).

2.2 IMPLICAÇÕES DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS n-6 PRESENTES NO ÓLEO DE CÁRTAMO

Os ácidos graxos insaturados (AGIs) são divididos em monoinsaturados (MUFA, *monounsaturated*) e poli-insaturados (PUFA, *polyunsaturated*). MUFA contém uma ligação dupla e possui como principal constituinte o ácido graxo insaturado do tipo oleico, também conhecido como ômega-9, e pode ser encontrado em óleo de canola e azeite de oliva. PUFA contém mais de uma dupla ligação e pode ser dividido em PUFA ômega-3 e PUFA ômega-6 (DIZIEZAK, 1989; HIRATSUKA et al., 2009).

AGIs são considerados gorduras essenciais e possuem papel importante na participação das funções, estruturas e organização dos tecidos desde a infância até senescênciia (YEHUDA et al., 2005; ZHANG et al., 2010; COELHO et al., 2011). Estudos em animais demonstraram que o tipo de gordura na dieta é um fator crítico no desenvolvimento. Além disso, a gordura dietética ingerida é o elemento determinante no depósito de gordura. O consumo de AGIs está inversamente relacionado às complicações ocasionadas pelo excesso

de peso com característica termogênica (COELHO et al., 2011), além de agir na prevenção da ocorrência de distúrbios causados pelo mau funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (WU et al., 2004; BORBA et al., 2010).

O balanço de ácidos graxos essenciais na dieta, n-6 (ácido linoleico, 18:2) e n-3 (ácido linolênico, 18:3), afeta as cadeias acil de fosfolipídeos da membrana do SNC de mamíferos (BAZAN, 1990). O ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) e o ácido araquidônico (20:4 n-6) são os principais ácidos graxos na membrana celular em regiões encefálicas e em células da retina e são sintetizados através de processos metabólicos a partir dos ácidos graxos essenciais (ALESSANDRI et al., 2004). O balanço entre o conteúdo desses ácidos graxos é importante para função celular, fluidez da membrana e expressão de genes, além de contribuir para o funcionamento do sistema imunológico (YEHUDA et al., 2005; BORBA et al., 2010).

O consumo balanceado desses AGIs ao longo da vida é um dos princípios básicos à função dos diferentes sistemas orgânicos, tanto em nível periférico quanto central. Além dos fatores descritos anteriormente, é importante mencionar que Associação Americana do Coração (*American Heart Association*) recomenda o consumo de uma dieta equilibrada, com baixo teor de lipídios, colesterol e ácidos graxos saturados como hábitos alimentares saudáveis inerentes à redução da incidência e prevalência de doenças associadas ao funcionamento do sistema cardiovascular (HARRIS et al., 2009). Com relação à ingestão adequada de AGIs do total de calorias ingerido diariamente, recomenda-se um consumo de 5 a 10% com alimentos-fonte de ômega-6. Esse consumo é suficiente para a prevenção do aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (HARRIS et al., 2009).

O *Carthamus tinctorius* L. é comumente conhecido como cártamo, originado do Sul da Ásia e pertencente a família *Asteraceae*. Das flores do cártamo é extraído um pigmento vermelho/laranja utilizado para colorir alimentos ou tecidos. Em contrapartida, das suas sementes é extraído um óleo rico em ácido graxo essencial, com alto valor nutricional e terapêutico e possui em grande parte da sua composição ácido graxo linoleico (YEUNG et al., 2011; ASGARPANAH; KAZEMIVASH, 2013).

O cártamo é proveniente das culturas herbáceas que prosperam em climas quentes e secos e possui utilidade em inúmeros problemas de saúde, como bronquite, reumatismo, dor e inchaço associado com trauma, hipertensão e câncer, além de ter ação anticoagulante e inibição da agregação plaquetária (ASGARPANAH; KAZEMIVASH, 2013). Além disso, as flores do *Carthamus tinctorius* L. são consideradas materiais medicinais importantes em problemas cardíacos, cerebrovascular e doenças ginecológicas (ASGARPANAH;

KAZEMIVASH, 2013). Na Coréia, o cártamo tem sido utilizado como uma alternativa terapêutica para promover a formação óssea e redução de trombose (CHO et al., 2004).

A composição dos ácidos graxos é a característica mais importante na qualidade dos óleos. A adequação de um óleo vegetal para as aplicações nutricionais, industriais ou farmacêuticas é determinada pela composição dos ácidos graxos, o que depende das espécies de plantas (YEILAGHI et al., 2012). A análise das sementes do cártamo demonstrou um óleo nutritivo com uma composição de ácido linoleico (63%-72%), ácido oleico (16%-25%) e ácido linolênico (1%-6%) (ASGARPANAH; KAZEMIVASH, 2013).

Após o consumo, o metabolismo dos AGIs pertencentes à família do ômega 6 se inicia com a ação de sucessivas dessaturases e elongases, formando produtos como ácido dihomogamma-linolênico (DGLA) que, por sua vez, é convertido em ácido araquidônico e pode ser encontrado em óleos vegetais, tais como soja, cártamo e milho (HARRIS et al., 2009; CZERNICHOW et al., 2010). Em estudos realizados com animais, todas as enzimas necessárias para a síntese do produto final do ácido linoleico estão presentes no fígado, cérebro e na retina (INNIS, 2000).

O funcionamento do sistema imunológico pode ser influenciado por vários fatores, incluindo o consumo dietético de nutrientes essenciais, como os ácidos graxos poliinsaturados (MIGUELEZ et al., 2006). O ácido araquidônico, produto metabólico dos ácidos graxos insaturados da família ômega-6, presente em grande quantidade no óleo de cártamo, é o principal precursor de eicosanoides, através das enzimas ciclooxygenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX), formadoras de fatores pró-inflamatórios, incluindo prostaglandina, tromboxanos e leucotrienos. Sua deficiência pode levar a retardar no crescimento, comprometer a função imunológica e o SNC. Por outro lado, o excesso destes compostos pode implicar em disfunções fisiológicas, como câncer, trombose e doenças inflamatórias (YOSHIDA et al., 1996; LI et al., 2013).

2.3 REPERCUSSÕES DO EXCESSO DE PESO E CONSUMO DE “AGIS” SOBRE ASPECTOS METABÓLICOS E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS

Dados epidemiológicos confirmam uma alteração no perfil nutricional mundial, especialmente em crianças e adolescentes, caracterizada por um declínio progressivo da prevalência de desnutrição e uma rápida elevação de sobrepeso/obesidade (OKEN et al., 2003; BATISTA-FILHO; RISSIN, 2003). Devido a mudança no estado nutricional, a

influência da IAE sobre o crescimento e desenvolvimento do SN começa a gerar grande interesse de estudo.

Além de possuir efeitos no excesso de peso e suas consequências maléficas, os ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva no período crítico de desenvolvimento pela redução no número de animais na ninhada, podem diferir no comportamento emocional relacionado ao estresse (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2004).

A obesidade está associada a desordens cerebrais, com um declínio cognitivo manifestado com o aparecimento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, porém os mecanismos dessa relação permanecem desconhecidos (BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015). Além disso, estudos vêm identificando a obesidade infantil como um fator de risco para doenças psicológicas, tais como déficit de atenção e hiperatividade, impulsividade, depressão e ansiedade, além da relação negativa da obesidade com o desempenho nos testes de função e atenção (KACZMARCZYK et al., 2013). Vários processos têm sido propostos entre a interação do declínio cognitivo e a má alimentação, incluindo o estresse oxidativo, inflamação, redução dos fatores neutróficos, como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e insensibilidade à insulina (KACZMARCZYK et al., 2013; BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015).

O BDNF desempenha um papel importante na sobrevivência, manutenção e crescimento das células cerebrais e é expresso no hipocampo, no hipotálamo e córtex cerebral (BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015). Além disso, o BDNF desempenha um papel importante na expressão do gene da memória, regulação da homeostase energética e da ingestão alimentar (BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015). A nutrição inadequada pode provocar uma redução na expressão desse fator neurotrófico, correlacionando déficits na memória (BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015).

A ingestão alimentar excessiva pode ter efeitos duradouros e esse estresse crônico evoca alterações estruturais, fisiológicas e moleculares no cérebro, afetando a aprendizagem e memória (TROFIMIUK; BRASZKO, 2013). Indivíduos obesos tendem a mostrar déficits sobre os testes que são associados com a execução da função, como a flexibilidade cognitiva (COPPIN et al., 2014). Já em roedores, há uma consistência na associação da obesidade com os déficits da memória, quando o excesso de peso pode desfavorecer o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (COPPIN et al., 2014).

Por outro lado, os AGIs desempenham um papel crítico na funcionalidade do cérebro, particularmente na função da membrana neuronal e sua incorporação nas membranas das células nervosas do cérebro e da retina é um dos processos de desenvolvimento perinatal que

contribui para a maturação do SNC, cujo desequilíbrio pode provocar problemas comportamentais e fisiológicos (HIRATSUKA et al., 2009; VIANA et al., 2013; BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015). Apesar de poucos estudos existentes sobre a relação dos ácidos graxos poli-insaturados n-6 com o peso corporal, o efeito da gordura pode desempenhar papel crucial na termogênese, regulação do balanço energético e capacidade de diferenciação nas células adiposas, agindo na obesidade (TAKEUCHI et al., 1995; CZERNICHOW et al., 2010).

De modo geral, os ácidos graxos essenciais melhoram a aprendizagem e a memória, e a deficiência pode afetar o desenvolvimento e comportamento sensorial e motor em roedores, além de prejudicar o processo de mielinização que pode provocar déficits sensoriais, como visão, audição, paladar e olfato, bem como provocar atraso no crescimento em neurônios do hipocampo (YEHUDA et al., 2005; BORBA et al., 2010). Em estudos com a pétala do cárтamo, observou-se uma correlação com a regulação de alguns neurotransmissores essenciais para a cognição, emoção, proteção contra lesões neuronais, podendo agir na depressão e na ansiedade, como a dopamina e serotonina (QAZI; KHAN; RIZWANI, 2015).

Vários modelos experimentais aplicados em ratos e camundongos podem ser utilizados para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade. Na investigação comportamental, o labirinto em cruz elevado (LCE) é considerado um teste padrão ouro para analisar a ansiedade do animal. O teste consiste em avaliar a exploração do animal em um labirinto em forma de cruz, elevado ao solo, com dois braços abertos e dois braços fechados. Além do LCE, outros modelos comportamentais são utilizados para avaliar os parâmetros específicos da ansiedade do animal, como o teste de campo aberto (TCA) (PIRES et al., 2012). De outra forma, o desempenho comportamental pode ser avaliado através da memória pela avaliação do teste de reconhecimento de objetos (TRO), por meio da identidade ou localização do objeto, com base na curiosidade natural dos roedores em preferirem explorar o que é novidade (AKKERMANN et al., 2012).

2.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A compreensão da função e desenvolvimento cerebral sobre uma variedade de condições, isto é, a relação de uma manipulação experimental e a excitabilidade neuronal, pode ser estudada através do fenômeno conhecido como depressão alastrante cortical (DAC).

A DAC é caracterizada por uma redução espontânea da atividade elétrica cerebral e foi descrita pela primeira vez como uma “onda” de propagação lenta de depressão da atividade elétrica cortical espontânea, com velocidade de 2 a 5mm/min (LEÃO, 1944). A atividade elétrica cortical é recuperada 10 a 15 minutos após a estimulação. Esse fenômeno é totalmente reversível e pode ser induzida por estimulação química, mecânica ou elétrica (BORBA et al., 2010; BATISTA-DE OLIVEIRA et al., 2012). Em regra, a propagação da onda de depressão ocorre simultaneamente a uma variação lenta de voltagem (VLV) e alastrase concentricamente a partir do ponto estimulado, atingindo regiões corticais gradualmente mais distantes, enquanto a área originalmente deprimida começa a se recuperar (LEÃO, 1944; GUEDES, 2005).

Os transtornos de ansiedade e outras comorbidades psiquiátricas são conhecidos no agravamento da enxaqueca. A base para a relação entre a ansiedade e enxaqueca não é conhecida, porém, sabe-se que a ansiedade aumenta a excitabilidade cerebral e pode, portanto, em teoria, aumentar a susceptibilidade da DAC (BOGDANOV et al., 2013).

A DAC tem sido estudada *in vivo* em várias espécies de animais sob várias condições experimentais (GORJI, 2001; LIMA, 2009). Além disso, a depressão alastrante pode ser afetada por várias condições, incluindo os aspectos nutricionais e farmacológicos (BORBA et al., 2010). Sob condições normais, o tecido cortical apresenta um grau de resistência à propagação da DAC. Manipulações experimentais podem aumentar ou diminuir tal resistência, resultando em velocidades de propagação inferiores ou superiores (AMANCIO DOS SANTOS et al., 2013). A suscetibilidade do cérebro para a DAC pode ser facilmente determinada pela velocidade de propagação ao longo do tecido cortical (BATISTA DE OLIVEIRA et al., 2012).

Utilizando várias técnicas de desnutrição, estudos demonstraram que os ratos adultos que sofreram desnutrição no início da vida foram mais suscetíveis ao fenômeno da DAC (GUEDES, 1984; FRANCISCO; GUEDES, 2015). A deficiência de um ou mais nutrientes na dieta podem, sem dúvida, interromper a bioquímica e organização morfológica do cérebro, e esta é geralmente seguida por repercussões sobre a sua função. Além disso, os efeitos das alterações alimentares podem resultar em consequências prejudiciais dependendo da intensidade e duração em que ocorrem (MORGANE et al., 1978, GUEDES, 2005). Apesar de poucos achados, outras condições encontradas sobre os efeitos da IAE introduzida no início da vida podem afetar a estrutura e função do cérebro (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). As alterações na excitabilidade cortical demonstram que a DAC em ratos com condições de

lactação de 12 ou 6 animais por ninhada, desenvolvem modificações na estrutura do cérebro que são dependentes do estado nutricional (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

Em estudos com a investigação das diferentes condições de lactação, observou-se que os animais submetidos à ingestão alimentar excessiva, ou seja, os filhotes em ninhada reduzida, apresentaram maior resistência, julgados pela propagação das velocidades da DAC (ROCHA DE MELO, 2006). Dados supracitados sugerem que as alterações nutricionais que ocorrem no início da vida produzem efeitos de longa duração sobre a susceptibilidade cortical para a DAC (ROCHA DE MELO, 2006).

A importância da incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados nas membranas das células nervosas, função e estrutura do sistema nervoso já está bem esclarecida. Em contrapartida, apesar de não existir evidências relacionadas com a excitabilidade cerebral e o consumo do óleo de cártamo, há estudo que avaliou a deficiência dos ácidos graxos essenciais no sistema nervoso, observando uma melhor compreensão da relação entre essa privação nutricional com a atividade cerebral a partir do prejuízo ocasionado pela resistência na velocidade da propagação da DAC (BORBA et al., 2010).

Além desses achados, em outro estudo foi verificado que os ácidos graxos poli-insaturados e seus metabólitos podem diminuir a excitabilidade neuronal através de canais de modulação (VREUGDENHIL et al., 1996). Esses dados são compatíveis com a ideia de que o consumo alimentar dos AGIs pode prevenir problemas associados ao sistema nervoso, como epilepsia, uma vez que esses nutrientes essenciais possuem a capacidade de atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica e, consequentemente, reduzir a excitabilidade neuronal (BORBA et al., 2010).

Diante da problemática, o presente estudo possui como aspectos de entender as associações entre a mudança do estado nutricional e a suplementação de ácidos graxos essenciais no ínicio da vida através de dados metabólicos, comportamentais através da ansiedade e a memória. Além desses parâmetros, o trabalho avalia a atividade eletrofisiológica estudada através da DAC, que é um indicador interessante para estudos sobre os aspectos nutricionais, avaliando o funcionamento e desenvolvimento do cérebro (GUEDES, 2005).

3. HIPÓTESE

- A suplementação com o óleo de cártamo influencia parâmetros murinométricos, se contrapondo às repercussões da ingestão alimentar excessiva.
- O consumo de ácido graxo insaturado presente no óleo de cártamo, associados ou não à ingestão alimentar excessiva, implica na redução da ansiedade avaliada pelo teste de labirinto em cruz elevado e teste de campo aberto; além da melhora no desempenho da memória episódica de animais, durante a realização de teste para reconhecimento de objetos.
- Suplementação com óleo de cártamo, independente do estado nutricional precoce, aumenta o grau de excitabilidade cortical, a julgar pela aceleração da velocidade de propagação da depressão alastrante cortical.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar, em ratos jovens submetidos a ingestão alimentar excessiva ou não, efeitos da suplementação com óleo de cártamo no início da vida, sobre aspectos murinométricos, ansiedade, memória e excitabilidade cerebral.

4.1 Objetivos específicos

- Monitorar o peso corporal durante o período de experimentação;
- Investigar se a ingestão alimentar excessiva associado ao consumo da suplementação com óleo de cártamo possui influência sobre os parâmetros murinométricos através do comprimento corporal, índice de massa corporal (IMC), índice de *Lee* e a relação entre a circunferência abdominal e circunferência torácica (CA/CT);
- Avaliar o efeito da ingestão alimentar excessiva associada à suplementação com óleo de cártamo, sobre a ansiedade através do comportamento do animal no labirinto em cruz elevado (LCE), do teste de campo aberto (TCA) e da memória mediante as análises pelo teste de reconhecimento de objetos (TRO);
- Analisar efeitos do excesso alimentar através da diminuição do número de filhotes por ninhada e/ou da suplementação com óleo de cártamo, sobre a velocidade de propagação da depressão alastrante cortical (DAC);

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do projeto

Os procedimentos experimentais estão de acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e seguem as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Após análise do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (processo nº 23076.035498-2014-57), foram utilizados ratos jovens machos da linhagem *Wistar*, da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Inicialmente, ratos fêmeas *Wistar* com 120-150 dias de vida, pesando 250 ± 50 g foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. As fêmeas foram monitoradas diariamente para detectar o dia 0 da gestação através de tampões vaginais. Após a gestação, ratos neonatos foram distribuídos aleatoriamente, 24 horas após o parto, em ninhadas de 3 (Submetidos à ingestão alimentar excessiva - O) ou 9 (Nutridos - N) filhotes por mãe. Esses filhotes foram separados em dois grupos experimentais, conforme demonstrado a seguir no cronograma experimental representado na Figura 1. O período de suplementação ocorreu entre os 7 e os 30 dias de vida, através da via oral (gavagem) com óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V).

Os dados metodológicos para análise dos perfis de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de cártamo foram realizados na Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, através da colaboração com a equipe liderada por professora Juliana Késsia, apresentados no Anexo A.

A suplementação do grupo experimental realizada com óleo de cártamo foi realizada de acordo com o requerimento de ômega-6 de 50-100mg/dia referente à fase de crescimento de ratos machos (GREENBERG et al. 1950), na dose de 0,005-0,01ml do óleo de cártamo, estabelecendo um consumo de cerca de 3% das necessidades diárias. O volume da solução com óleo de cártamo (da marca Nature®, PB, Brasil), água e cremophor 0,009% (Sigma®) ou solução veículo foi administrado diariamente com 0,1ml na primeira semana de suplementação e 0,2ml/dia nas semanas seguintes.

Durante todo o período de experimentação, os ratos foram alimentados com a dieta de manutenção do biotério com 23% de proteína (“Presence”, Purina do Brasil Ltd., Paulinia, São Paulo, Brasil). A partir do 30º ao 45º dia de vida, foram avaliados os efeitos da

suplementação com óleo de cártamo, associados à ingestão alimentar excessiva ou não, sobre respostas comportamentais, murinometria e eletrofisiologia cortical.

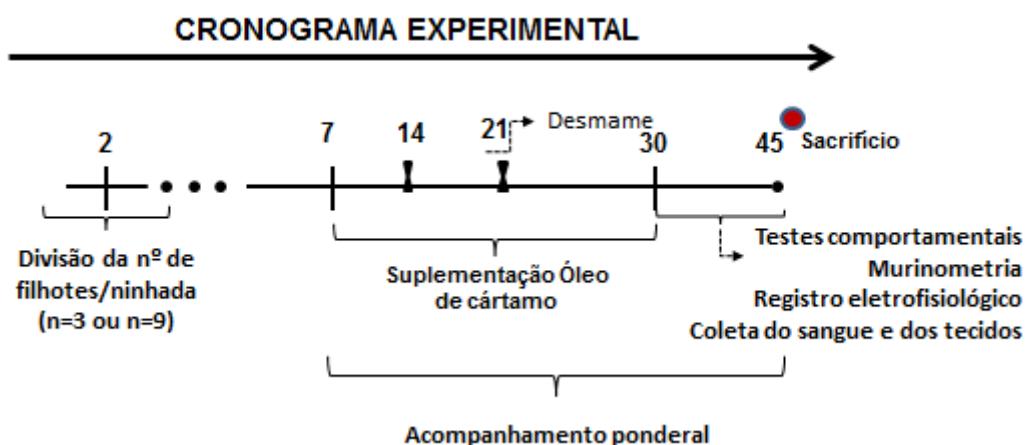


Figura 1.0 Cronograma Experimental. Sequência de experimentos realizados com animais jovens da linhagem *Wistar*. A partir do segundo dia de vida, os animais foram divididos conforme a condição de lactação (nutridos ou submetidos à ingestão alimentar excessiva). No sétimo dia, foi realizada uma nova divisão de acordo com a suplementação (óleo de cártamo ou solução veículo). Após o tratamento da suplementação, foram coletados os dados referentes a murinometria, comportamento e registro eletrofisiológico.

5.2 Determinações Ponderais

5.2.1 Evolução Ponderal

A elaboração do peso corporal foi obtida aos 7, 14, 21, 30 e 45 dias de vida. Os pesos corporais foram comparados entre o grupo nutrido e o grupo submetido à ingestão alimentar excessiva (N e ON) com suplementação de óleo de cártamo ou solução veículo (SF e V). Os animais foram pesados em uma balança digital semi-analítica (Marte®, Minas Gerais, Brasil).

5.2.2 Avaliação Murinométrica

A murinometria foi realizada no dia do registro eletrofisiológico. Após a aplicação da anestesia, os animais tiveram o comprimento corporal (CC) aferido (ponta do focinho até o ânus, utilizando fita métrica), para análise dos parâmetros murinométricos conforme descrito a seguir:

Índice de Massa Corpórea (IMC): peso corporal (g)/ comprimento² (cm²) (NOVELLI *et al.*, 2007).

O índice de *Lee*, calculado pela raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento do focinho-ânus (cm) (NOVELLI et al., 2007).

A circunferência abdominal (CA) e torácica (CT) dos animais foram aferidas utilizando fita métrica (cm) e relacionadas na razão CA/CT (cm) (NOVELLI et al., 2007).

5.3 Análise Comportamental

5.3.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Após 24 horas do término da suplementação, os testes comportamentais iniciaram com o teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O teste consistiu em colocar o animal em um labirinto em forma de cruz, elevado do solo (55cm acima do chão), formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos (cada um medindo 49 cm de comprimento e 10 cm de largura). A área central que ligava os braços da plataforma media 10 x 10 cm.

Foram analisados os seguintes parâmetros: frequência de entradas e o tempo gasto no braço aberto e na área central, distância total percorrida e tempo de imobilidade. O animal explora os dois tipos de braço, porém entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW; FILE, 1986).

O procedimento foi realizado entre as 7:00–9:00h, e foi utilizado animais a partir do 31º dia de vida. No dia do experimento, os animais foram colocados na sala experimental, individualmente, em gaiola apropriada e permaneceram 5 minutos antes do início do teste, para adaptação ao novo ambiente.

O animal foi cuidadosamente colocado no centro do aparato com o focinho voltado para um dos braços fechados onde foi permitida a exploração livre por 5 minutos e posteriormente, a análise comportamental foi realizada decorrente ao tempo em que o animal gastou explorando o labirinto. A entrada do animal no braço aberto ou fechado foi considerada quando as quatro patas entraram no compartimento. A cada animal testado, o labirinto foi limpo com álcool a 70%, com um intervalo de 5 minutos.

5.3.2 Teste de Campo Aberto (TCA)

Após 48 horas da realização do LCE, todos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. O aparato consistiu em uma arena circular (campo aberto) de cerca de 1 metro de diâmetro, localizada em um ambiente com iluminação reduzida. Por vez, cada animal foi colocado, por 5 minutos na arena, para exploração ao ambiente, permitindo a análise da ansiedade pelo tempo gasto e o número de entradas na área central, a distância percorrida, número de linhas cruzadas, tempo de imobilidade, % tempo imóvel e % tempo na área central. O teste foi validado segundo PLATEL, 1982.

5.3.3 Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO)

No dia posterior ao teste de campo aberto, os animais foram submetidos ao teste para identificação de objetos com base na sua identidade e localização na arena circular.

Em cada uma dessas duas tarefas, os animais, em uma primeira sessão, exploraram por 5 minutos o ambiente. Numa segunda sessão, após 50 minutos, foi avaliado o reconhecimento das características de forma e localização espacial dos objetos. O teste consistiu em avaliar se, nessa segunda sessão, diante de dois objetos, um conhecido (da sessão anterior – com características “familiar”) e outro com características de “novidade” (seja na forma ou na localização), o animal reconheceria o novo objeto, através do maior tempo de exploração neste.

Entre as sessões, os objetos e a arena foram limpos adequadamente com álcool a 70% para eliminar pistas olfativas que possam influenciar o teste seguinte.

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

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

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

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

Todos os testes comportamentais foram filmados com uma câmara de vídeo instalada no teto da sala e em seguida todos os vídeos foram analisados através do software *ANY-maze Video Tracking System version 4.99m*.

5.4 Registro Eletrofisiológico

O registro eletrofisiológico foi realizado com os animais com 45 dias de idade anestesiados com uma solução de uretana 10% + cloralose 0,4%, à dose de 1000 mg/kg de 100g/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intra-peritoneal (ambos da Sigma Co., EUA). O animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável (mantidos a uma temperatura de $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Em seguida, a cabeça do animal foi fixada a base de um aparelho estereotáxico. Por meio de trepanação, foram feitos três orifícios, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada, alinhados paralelamente à linha média no hemisfério direito, sendo dois trepanados na região parietal para o registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC) e um na região frontal para a estimulação química, como demonstrado na figura 2.

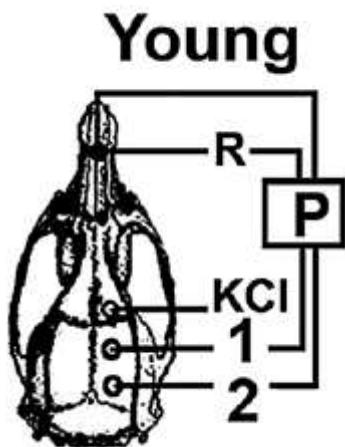


Figura 2.0: Esquema com eletrodos utilizados para estímulo e registro da DAC no hemisfério direito. O primeiro orifício trepanado na região frontal é o ponto para a indução da DAC através do estímulo com KCl (2%, durante 01 minuto). As posições 1 e 2 representam os orifícios trepanados na região parietal para o registro da DAC. O ponto marcado com “R” representa o local de posicionamento do eletrodo que serve de referência comum aos demais eletrodos para registro da DAC. Por fim, o (P) indica o polígrafo utilizado para tradução do registro obtido através dos eletrodos.

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

A excitabilidade cerebral foi analisada através da velocidade média de propagação do fenômeno e essa velocidade foi calculada com base na distância entre os eletrodos de registro e no tempo gasto que a onda da DAC percorreu esta distância.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm EPM para dados murinométricos e comportamentais e média \pm DP para dados da eletrofisiologia. Todos os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O teste estatístico foi escolhido mediante a análise no teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). A ANOVA de duas vias, seguida de “post hoc” (Tukey) ou teste t não pareado foi utilizada para a distribuição paramétrica, na análise intergrupo referente aos dados murinométricos, testes para avaliação da ansiedade (LCE e TCA) e registro eletrofisiológico. Para a avaliação das diferenças significativa intra-grupo referente aos dados comportamentais de reconhecimento de objeto, os índices de discriminação foram analisados através do teste t pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Dados Murinométricos

A ANOVA de duas vias foi realizada com o estado nutricional (nutridos e animais submetidos à ingestão alimentar excessiva) e suplementação (cártamo e veículo) para cada variável referente aos dados murinométricos (peso corporal, comprimento corporal, índice de massa corporal, índice de *Lee*, relação da circunferência abdominal e circunferência torácica e as razões teciduais do coração e fígado em relação ao peso corporal), representado na tabela 1, além da análise na evolução do peso corporal entre o 7º ao 45º dias de vida, representado na figura 3.0. Houve um efeito significativo no estado nutricional (ANOVA de duas vias, $p<0,05$), quando os animais submetidos à ingestão alimentar excessiva suplementados com solução veículo obtiveram maior valores dos pesos corporais em todas as semanas analisadas, bem como em alguns aspectos murinométricos, como CA, CT, CC e IMC. Por outro lado, a suplementação com óleo de cártamo não influenciou no peso corporal pós-natal e nos dados murinométricos. Com relação a razão tecidual, houve apenas uma diferença significativa no peso do fígado nos animais O/V *versus* N/V ($p<0,05$).

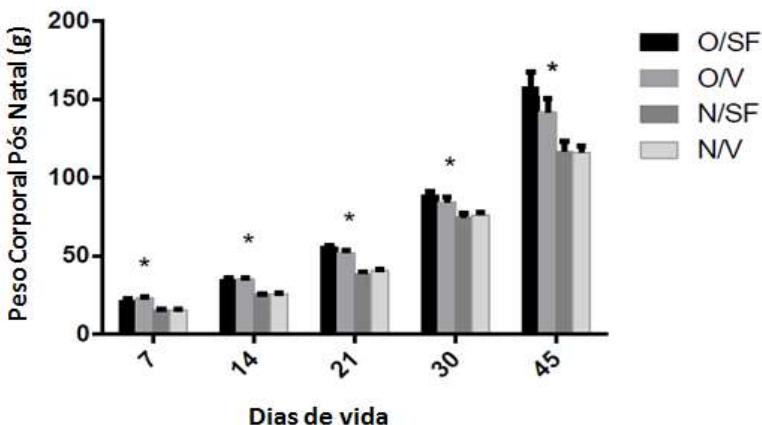


Figura 3.0: Os pesos corporais pós-natais são apresentados em média±EPM. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente com três ou nove filhotes para alteração do estado nutricional em animais submetidos à ingestão alimentar excessiva (O) e animais nutridos (N). Ao 7º dia de vida, os animais foram subdivididos conforme a suplementação: Óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V). Para identificar as diferenças entre os pesos avaliados nas cinco semanas (7º ao 45º dia de vida), foi realizada a ANOVA de duas vias. O efeito do estado nutricional induziu um efeito significativo dos 7 aos 45 dias quando os animais foram submetidos à ingestão alimentar excessiva quando comparados com os animais nutridos, suplementados com a solução veículo ($p<0,05$) indicada pelo (*).

Tabela 1.0 Os dados murinométricos foram analisados por ANOVA de duas vias e são apresentados em média±EPM. Com dois dias de idade, os ratos foram distribuídos aleatoriamente com três ou nove filhotes para alteração do estado nutricional em animais submetidos à ingestão alimentar excessiva (O) e animais nutridos (N). Ao 7º dia de vida, os animais são subdivididos conforme a suplementação: Óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V).

Grupo	Dados Murinométricos								
	Experimental	PC	CA	CT	CC	IMC	IL	CA/CT	PCo/PC
(n)									
N/SF (n=8)	116.78±6.28	11.68±0.22	9.61±0.20	16.89±0.45	0.39±0.02	0.29±0.007	1.22±0.06	0.58±0,03	1,55±0,09
N/V (n=8)	120.24±4.33*	12.11±0.23*	9.94±0.24*	16.56±0.35*	0.42±0.01*	0.30±0.006	1.21±0.02	0.67±0,04	1,49±0,05*
O/SF (n=8)	157.67±9.94	13.5±0.28	10.75±0.35	17.94±0.29	0.48±0.03	0.29±0.006	1.28±0.02	0.60±0,02	1,48±0,05
O/V (n=8)	138.40±7.45*	13.33±0.34*	10.83±0.31*	17.64±0.33*	0.51±0.03*	0.30±0.007	1.21±0.04	0.68±0,02	1,82±0,11*

N –ratos nutridos; O – ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva; SF – suplementação de óleo de cártamo; V – veículo; PC – peso corporal; CA – circunferência abdominal; CT – circunferência torácica; CC – comprimento corporal; IMC – índice de massa corporal; IL – índice de Lee; PCo – peso do coração; PF – peso do fígado.

Os valores com diferenças significativas são marcadas com asterisco (*).

7.2 Análise Comportamental

7.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (TCA)

O efeito da associação entre a ingestão alimentar excessiva e a administração da suplementação com óleo de cártamo sobre comportamento de ansiedade no desempenho dos animais em face dos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto foram apresentados na tabela 2.0. No teste de labirinto em cruz elevado, a suplementação com óleo de cártamo

potencializa o efeito do excesso alimentar, sugerindo agravamento de comportamento da ansiedade causado pela associação supracitada a julgar pela diminuição significativa na frequência de entradas do animal no braço aberto e na área central ($O/SF 4,75 \pm 0,37$; $13,5 \pm 1,5$ versus $N/SF 9,25 \pm 1,16$; $21,3 \pm 2,3$ - $p<0,05$, ANOVA de duas vias, seguida do teste “post hoc” (Tukey). Por outro lado, no teste de campo aberto os grupos experimentais não apresentaram nenhuma diferença significativa dentre os parâmetros analisados.

Tabela 2.0 Atividade comportamental em (A) Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e (B) Teste de Campo aberto (TCA) de ratos jovens amamentados em ninhadas de 3 ou 9 animais (O e N , respectivamente) e suplementados com óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V). Para identificar as diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos experimentais foi realizada a ANOVA de duas vias e os valores na tabela representam médias \pm EPM de 6 a 8 animais por grupo. As letras ao lado dos valores indicam diferença significativa entre os

Teste	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	N&SF	N&V	O&SF	O&V
Comportamental				
(A) Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)				
Distância Percorrida (m)	10,1±0,8	9,7±0,5	8,3±1,3	10,7±0,8
Tempo de imobilidade (s)	81,1±13,2	83,7±7,1	120,3±11,2	79,6±10,0
Nº de entradas no braço aberto	9,25±1,16*	8,0±1,65	4,75±0,37*	7,50±0,60
Tempo de exploração no braço aberto (s)	27,1±2,7	32,5±6,3	20,2±5,9	25,4±2,4
Nº de entradas na área central	21,3±2,3*	19,6±2,4	13,5±1,5*	19,1±1,1
Tempo na área central (s)	57,9±7,9	62,7±9,7	45,0±7,6	62,6±5,8
	N&SF	N&V	O&SF	O&V
(B) Teste de Campo Aberto (TCA)				
Distância Percorrida (m)	20,1±1,0	22,3±1,5	17,9±1,6	21,9±1,4
Tempo de imobilidade (s)	52,1±5,6	47,5±5,9	72,6±14,1	42,1±6,6
%TEMPO IMÓVEL	17,3±1,8	15,8±1,9	24,2±4,7	14,0±2,2
Nº de linhas cruzadas	85,6±5,6	98,6±11,1	76,5±6,4	78,1±4,9
Nº de entradas na área central	5,5±1,1	10,3±2,8	5,0±0,85	3,6±0,5
Tempo de exploração na área central (s)	21,0±4,2	21,5±6,5	15,6±2,2	10,2±1,7
%TEMPO na área central	7,0±1,42	7,1±2,1	5,2±0,7	3,4±0,5

7.2.2 Teste de Reconhecimento de Objeto

O desempenho da memória dos animais jovens submetidos ou não à ingestão alimentar excessiva com suplementados com óleo de cártamo ou solução veículo foi analisado através dos índices de discriminação nos testes referente ao reconhecimento na localização e na

identidade do objeto, dados apresentados na figura 4.0. Na análise intragrupo (teste t pareado), o teste de reconhecimento do posicionamento do objeto indica que os animais de todos os grupos experimentais preservaram a memória, distinguindo o objeto novo do objeto antigo com o índice de discriminação acima de 60% no objeto deslocado em comparação com o objeto estacionário (O/SF , $61,4 \pm 4,3\%$; $38,6 \pm 4,3\%$, $p < 0,05$; N/SF , $64,6 \pm 4,9\%$; $35,4 \pm 4,9\%$, $p < 0,05$; O/V , $66,3 \pm 6,1\%$; $33,7 \pm 6,1\%$, $p < 0,05$ e N/V , $64,6 \pm 5,8\%$; $35,4 \pm 5,8\%$, $p < 0,05$). Com relação ao teste de reconhecimento referente ao formato do objeto, todos os animais também mantiveram sua memória preservada, com a exploração maior no objeto novo em detrimento do objeto familiar (O/SF , $76,0 \pm 3,9\%$; $24,0 \pm 3,9\%$, $p < 0,001$; N/SF , $69,2 \pm 3,3\%$; $30,8 \pm 3,3\%$, $p < 0,001$; O/V , $75,8 \pm 2,5\%$; $24,2 \pm 2,5\%$, $p < 0,001$ e N/V , $77,1 \pm 2,7\%$; $22,9 \pm 2,7\%$, $p < 0,001$). Por outro lado, a análise intergrupo não demonstrou efeito significativo do estado nutricional ou da suplementação com o óleo de cártamo dentre os parâmetros estudados (ANOVA de duas vias, $p > 0,05$, seguida do teste “post hoc” Tukey).

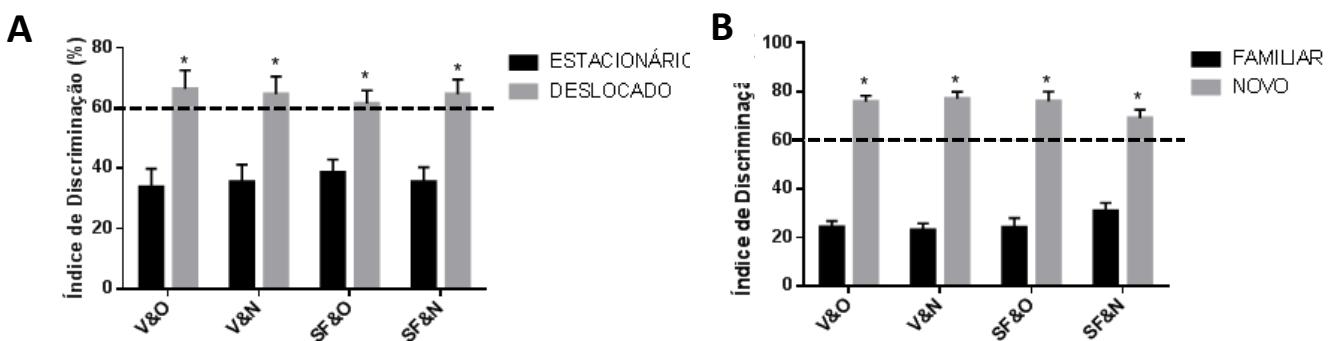


Figura 4.0 Índices de discriminação da atividade comportamental nos testes de reconhecimento referente a (A) localização e ao (B) formato do objeto em ratos jovens amamentados em ninhadas de 3 ou 9 animais (O e N , respectivamente) e suplementados com óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V). Os valores na tabela representam médias \pm EPM de 7 a 11 animais por grupo. A linha ponteada demarca o índice de discriminação acima de 60% no reconhecimento da localização e da identidade do objeto. O asterisco indica diferença significativa no reconhecimento ao objeto deslocado ou novo em comparação com o objeto estacionário ou familiar ($p < 0,05$; Teste t pareado).

O registro eletrofisiológico foi feito com o objetivo de avaliar a excitabilidade cortical através da velocidade na propagação da DAC após a estimulação química com KCl a 2% por um minuto na região frontal do córtex no hemisfério direito.

Após a análise estatística intergrupo, independente da suplementação, a condição da lactação indicou um efeito da ingestão alimentar excessiva com a diminuição significativa quando comparado com os respectivos controles nutridos (em ninhada com nove animais -

$p<0,001$ ANOVA de duas vias, seguida do teste “post hoc” Tukey), apresentado na figura 5.0 (B). Em ninhada com três animais por mãe houve maior resistência, sugerindo uma menor velocidade (velocidades médias \pm DP em mm/min) de $2,95 \pm 0,08$ (O/SF) e $3,46 \pm 0,05$ (N/SF) para os animais suplementados com óleo de cártamo e $2,74 \pm 0,04$ (O/V) e $3,06 \pm 0,08$ (N/V) na suplementação com a solução veículo. Além disso, os resultados supracitados são complementados com os efeitos desenvolvidos no tratamento da suplementação (O&SF $2,95 \pm 0,08$; O&V $2,74 \pm 0,04$; N&SF $3,46 \pm 0,05$; N&V $3,06 \pm 0,08$), com a análise de variância apresentando um aumento significativo nos animais suplementados com a solução contendo o óleo de cártamo comparado com os animais suplementados com solução veículo, independente da manipulação nas condições de lactação ($p<0,001$ ANOVA de duas vias, seguida do teste “post hoc” Tukey).

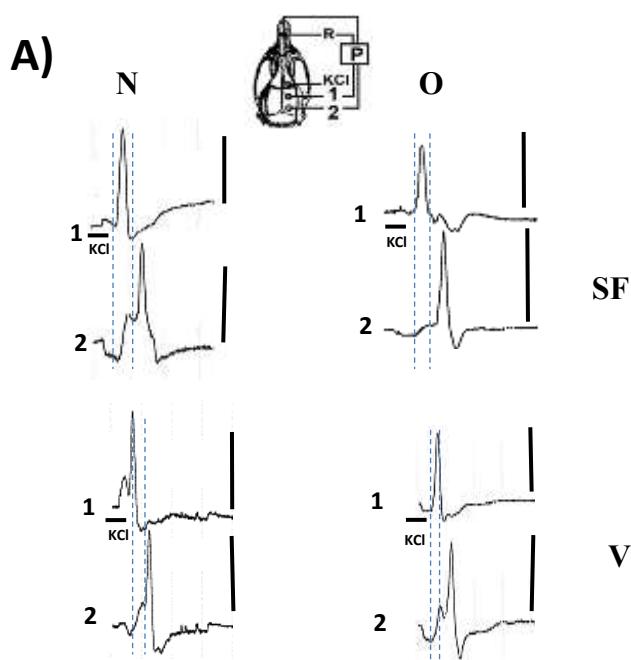


Figura 5.0 (A) Gravações das variações lenta de voltagem (VLV) durante a DAC registradas em dois pontos cortical (1 e 2) em quatro animais jovens; a esquerda representa VLV de animais nutridos (N) e a direita de animais submetidos à ingestão alimentar excessiva (O), suplementados com óleo de cártamo (SF) ou solução veículo (V); As barras verticais correspondem a 10 mV (alteração negativa de voltagem). Na DAC foi realizada o estímulo químico no cortéx frontal com KCl a 2% durante 1 minuto, como indicado pelas barras horizontais. As linhas tracejadas verticais indicam a latência para uma onda da DAC atravessar a distância entre os eletrodos.

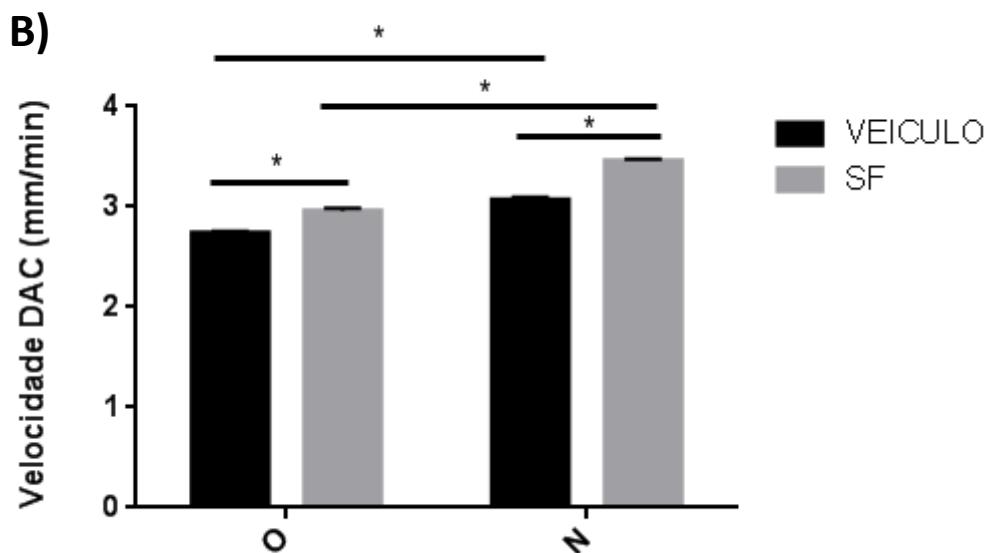


Figura 5.0: (B) Velocidade de propagação na DAC (em mm/min) em ratos jovens submetidos à alteração na condição de lactação com ingestão alimentar excessiva (O) ou nutridos (N), suplementados com óleo de cártamo (SF) ou com solução veículo (V). Os dados são apresentados em média ± DP após ANOVA de duas vias, com 6 a 8 animais por grupo. * Indica diferença significativa entre os grupos experimentais ($p<0,001$). A linha maior compara a relação intergrupo quanto ao efeito da ingestão alimentar excessiva entre os grupos da solução veículo e do óleo de cártamo (O&V com N&V e O&SF com N&SF) e a linha menor aponta a diferença significativa no efeito da suplementação com o óleo de cártamo (O&SF com O&V e N&SF com N&V).

Além dos resultados supracitados, outros dados referente aos aspectos murinométricos associado ao estresse oxidativo e o perfil lipídico sanguíneo são apresentados no Apêndice A em artigo submetido à *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, intitulado em "Carthamus tinctorius supplementation during critical period of development: study on heart and liver of overnourished rats", com a colaboração de equipes lideradas pelas professoras Cláudia Lagranha e Mariana Fernandes da Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão - e com a equipe do professor Eduardo Lira, da Universidade Federal de Pernambuco, pelo departamento de Fisiologia e Farmacologia.

8. DISCUSSÃO

Os resultados apresentam nitidamente que a modificação com a diminuição no tamanho da ninhada de filhotes por mãe provoca alterações nos parâmetros murinométricos avaliados por meio do aumento do peso corporal em todas as semanas mensuradas, da circunferência abdominal, da circunferência torácica, do índice de massa corporal, do comprimento corporal e do peso do fígado relacionado ao peso do corpo aos 45 dias de vida.

Outro critério avaliado neste estudo foi o momento em que essa ingestão alimentar excessiva foi instalada. A alimentação em excesso no período perinatal é um fator de risco para o desenvolvimento do excesso de peso em fases tardias (PLAGEMANN et al., 1998). Considera-se que o aumento do peso em todas as semanas analisadas podem ter maior repercussão quando é inserido na fase crítica (PLAGEMANN et al., 1998). Em modelos animais com ratos criados em ninhadas pequenas, durante período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, podem induzir hiperfagia e, consequentemente, excesso de peso, com alterações na regulação do peso corporal e da ingestão alimentar (PLAGEMANN et al., 1998). Isto sugere que a nutrição neonatal, o estado hormonal e o metabolismo alteram o desenvolvimento das regiões neuronais responsáveis pela regulação do peso corporal (PLAGEMANN et al., 1998; LI; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 2002).

Apesar do consumo do óleo de cártamo não ter influenciado significativamente os parâmetros murinométricos, quando este consumo foi associado à ingestão alimentar excessiva, houve uma reversão do efeito da IAE sobre tais parâmetros analisados pelo presente estudo. Isto propõe uma tentativa de que uma gordura de boa qualidade possa promover uma melhora nos prejuízos ocasionados pelo excesso da alimentação, confirmando o efeito termogênico apresentado em estudos anteriores (COELHO et al., 2011). Em pesquisas com animais demonstram que o teor da gordura da dieta é um dos pontos determinantes para a adiposidade corporal (PAERATAKUL; POPKIN; BRAY, 2004). A qualidade da gordura na dieta se torna um fator ainda mais importante que a quantidade ingerida (ZHANG et al., 2010; COELHO et al., 2011). Assim, os ácidos graxos poli-insaturados são considerados gordura essencial e são necessários para a manutenção da saúde ideal, mas não podem ser sintetizados pelo organismo e, por isso, devem ser obtidos através da dieta por fontes como os óleos vegetais, como o óleo de cártamo (CHANG; KE; CHEN, 2009).

Além disso, outros estudos apontam também a eficácia dos ácidos graxos poli-insaturados sobre o efeito termogênico quando comparados com a ingestão de ácidos graxos saturados (TAKEUCHI et al., 1995). Enquanto a gordura saturada desempenha papel negativo na composição corporal, os ácidos graxos insaturados exercem efeito oposto, com diminuição do gasto energético, redução da absorção dos lipídios e aumento do catabolismo (COELHO et al., 2011).

O cártamo é comumente utilizado na medicina tradicional chinesa e além de agir na melhora do peso corporal, promove uma melhora na circulação sanguínea, na redução da pressão arterial e auxilia no metabolismo lipídico. Em estudo realizado comparando o uso do óleo de cártamo com a dieta rica em gordura saturada, os ratos alimentados com uma boa fonte de gordura não apresentaram obesidade e nem desordens metabólicas, o que diferiu entre os grupos experimentais (ZHANG et al., 2010). De acordo com esses resultados, Takeuchi et al (1995) demonstraram que o óleo de cártamo, em dietas isoenergéticas por quatro meses proporcionou um menor acúmulo de gordura corporal quando comparado com o uso da gordura saturada. Com bases nos resultados do presente resultados e com o apoio dos estudos mencionados, sugere-se que o óleo de cártamo poderia agir na prevenção e no tratamento da obesidade e suas consequências maléficas.

O aumento do peso do fígado em relação ao peso corporal nos animais submetidos à ingestão alimentar excessiva suplementados com a solução veículo pode ser esclarecido similarmente com o estudo que identificou comprometimento do peso do cérebro em animais adultos submetidos previamente a condições desfavoráveis de lactação com 12 animais por ninhada, sugerindo prejuízos permanentes (MAIA et al., 2006). Estes achados indicam que o mecanismo envolvido nas alterações adquiridas durante o desenvolvimento pode desempenhar mudanças na função cerebral com consequências ao longo da vida, com persistência na modificação da regulação do peso corporal e metabolismo, podendo refletir alterações do peso dos órgãos mais vitais, com a probabilidade de alterar suas funções (PLAGEMANN et al., 1999).

Têm sido formuladas várias teorias que demonstram fortemente a associação da vulnerabilidade à doença quando as alterações ocorrem no início da vida. Nesse período, o sistema nervoso é mais vulnerável às agressões externas, como a desnutrição ou alimentação excessiva (DOBBING, 1968; PLAGEMANN et al., 1999). Em estudos com animais, as manipulações ocorridas no período crítico da vida podem levar a alterações persistentes. Esses paradigmas visam estudar as consequências que interferem no desenvolvimento fisiológico do início da vida (SINGH-TAYLOR et al., 2015).

Em animais suplementados com o óleo de cártamo, observou-se maior ansiedade nos ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva comparado com os respectivos controles nutridos, ao interpretar dados obtidos através do labirinto em cruz elevado, avaliado pela diminuição no número de entradas no braço aberto e, também, pela diminuição no número de entradas na área central. No entanto, nos animais submetidos à ingestão alimentar excessiva, apesar de não existir diferença significativa nos parâmetros avaliados no teste, é notório o mesmo comportamento nos animais suplementados com óleo de cártamo comparado com os animais suplementados com solução veículo. Isso pode indicar um efeito potencializador do óleo de cártamo quando o animal altera o seu estado nutricional. Curiosamente, outros estudos obtiveram achados contraditórios a esses resultados. Qazi, Khan e Rizwani (2015) observaram que o cártamo revelou ação ansiolítica significativa, com efeitos similares ao de compostos com ação antidepressiva, através do nado forçado com redução significativa no tempo de imobilidade e pelo teste de labirinto em cruz elevado com mais tempo gasto nos braços abertos e maior número de entrada nos mesmos.

Por outro lado, no teste de campo aberto não houve características de ansiedade entre os grupos experimentais do presente trabalho, tornando semelhante aos dados encontrados em estudo realizado por Hiratsuka et al (2009), no qual não houve diferença significativa também entre os grupos. Em outro estudo, observou-se que não houve diferença na aprendizagem, emocionalidade e na atividade exploratória, constatado pela locomoção dos animais, utilizando também o campo aberto e o labirinto em cruz elevado, com o uso de outra fonte de ácido graxo poli-insaturado (RACHETTI et al., 2013).

Além disso, em alguns estudos foram observados que a obesidade tem sido associada com o comprometimento da execução da memória com redução no comportamento exploratório. A relação do índice de massa corporal, aprendizado e memória foi demonstrado que, no grupo com excesso de peso, a memória foi prejudicada (COPPIN et al., 2014). Dados em humanos e em animais sugerem que o aprendizado e a memória são afetados pelo consumo em dieta rica em gordura saturada e em açúcar simples (COPPIN et al., 2014). A evidência foi confirmada através da investigação entre a associação negativa entre o alto consumo de gordura e açúcar refinado e o desempenho na memória (FRANCIS; STEVENSON, 2011; KACZMARCZYK et al., 2013). Distintivamente aos achados do presente estudo, ao comparar a relação intragrupo, através do índice de discriminação, revelaram que a memória foi preservada em todos os grupos, independente do estado nutricional e da suplementação administrada, alcançando o reconhecimento do novo objeto quanto a sua forma e localização.

Adicionalmente, a ingestão excessiva reproduzida pelas experiências distintas de lactação pode provocar o ganho de peso, alterações comportamentais e induzir alterações neurais e modificações na função cerebral (GUEDES, 2011). Na eletrofisiologia, estudada através do fenômeno da DAC, os efeitos na maturação e no desenvolvimento da função cerebral podem ser moduladas pelo estado nutricional, principalmente durante o período crítico. Por exemplo, a melhoria do estado nutricional pode reduzir a velocidade de propagação da DAC, enquanto a deficiência de proteína pela dieta, conhecida como dieta básica regional pode tornar a velocidade mais rápida, ou seja, os animais desnutridos se tornam mais suscetíveis à depressão alastrante cortical (ANDRADE, GUEDES; TEODOSIO, 1990; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997). Essa alteração ocasionada pela modificação do estado nutricional pode ser verificada no presente estudo através da maior resistência e menor velocidade de propagação da DAC nos animais submetidos à ingestão alimentar excessiva, independente da suplementação administrada. Isto aponta que o desequilíbrio na quantidade de leite disponível para todos os filhotes é inversamente proporcional ao tamanho da ninhada e isso pode desempenhar alterações importantes no aspecto eletrofisiológico e assim permanecer nas fases futuras (ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

Diante do contexto, outros estudos comprovam os resultados supracitados. Em estudos avaliando os efeitos da alimentação excessiva reproduzida através da diminuição do número de filhotes da ninhada, verificou-se que essa alteração na lactação pode afetar as características do fenômeno relacionado com a excitabilidade com menor velocidade de propagação da DAC (ROCHA-DE-MELO et al., 2006; FRAZÃO, et al., 2008). Enquanto várias interações podem retardar a DAC, as condições desfavoráveis de lactação podem acelerar (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Esses mesmos dados foram confirmados em Guedes (2011), quando observou uma menor velocidade de propagação nos animais desnutridos.

No entanto, a quantidade de células gliais pode influenciar e modular essas diferenças ocasionadas pelo estado nutricional na DAC. Assim, os animais submetidos à desnutrição apresentam redução no número de células gliais, além de interferir nos processos fisiológicos do sistema nervoso central como neurogênese, migração e diferenciação celular, o que poderia explicar a maior susceptibilidade na velocidade de propagação (MORGANE et al., 1978, 1993; GARDNER-MEDWIN, 1981), e contrariamente ocorre no que foi observado no presente estudo com relação a submissão da ingestão alimentar excessiva, o que sugere uma menor velocidade de propagação da DAC, e consequentemente, alteração também nas

funções cerebrais. Estes efeitos na DAC devido à condição de lactação apresentada podem ser de grande interesse para o estudo devido à possibilidade do impacto duradouro ou até irreversível.

Além disso, a modificação do estado nutricional pode influenciar os processos de desenvolvimento cerebral, como a mielinização (MORGANE et al., 1993). Os insultos, provocados pela desnutrição, instalados no período crítico de desenvolvimento, podem desenvolver alterações no crescimento do cérebro, podendo prejudicar os passos sequenciais para a formação da mielina (MORGANE et al., 1993). Em estudos anteriores, observou-se alteração no tamanho e peso do cérebro com teor reduzido de mielina em animais desnutridos pelo aumento do número de filhotes na ninhada (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

Por outro lado, há achados com uma associação entre comportamentos associados à ansiedade e o grau de excitabilidade cortical. Nessas pesquisas, encontra-se uma relação direta entre tais aspectos, ou seja, quanto maior o grau de ansiedade, maior a susceptibilidade ao fenômeno da DAC (BOGDANOV et al., 2013). Os dados obtidos neste estudo comprovam essa afirmação através da suplementação com o óleo de cártamo. De fato, o óleo quando administrado nos animais submetidos à ingestão alimentar excessiva promoveu características ansiogênicas observadas no LCE concomitante ao aumento da velocidade de propagação da DAC.

No que refere ao uso dos ácidos graxos poli-insaturados, a suplementação com óleo de cártamo parece agir na tentativa de minimizar a resistência ocasionada pelo excesso de peso. Apesar da inexistência de estudos na literatura sobre o uso do óleo de cártamo associado com a eletrofisiologia, há evidências que comprovam após avaliar a função cerebral em ratos submetidos à deficiência do consumo de ácidos graxos insaturados. Em BORBA et al., (2010), embora as dietas fossem equilibradas em todos os nutrientes, a dieta que possuía deficiência de ácidos graxos essenciais promoveu uma redução na velocidade de propagação da DAC. Assim, a suplementação com ácidos graxos insaturados age de forma contrária a deficiência dos mesmos, com ação de maneira satisfatória para a função cerebral e até na tentativa de reverter os distúrbios ocasionados pelo excesso de peso.

Nesse contexto, os ácidos graxos insaturados são componentes importantes na estrutura do cérebro e podem ser encontrados em dois componentes estruturais, como membrana neuronal e a bainha de mielina (YEHUDA et al., 2005). Por sua vez, a mielina possui importância nas funções cerebrais e alterações na sua estrutura podem provocar prejuízos no sistema nervoso (YEHUDA et al., 2005). Não há estudos que comparam a suplementação de ácidos graxos insaturados e a mielina, porém sabe-se que em roedores, a

deficiência desses aspectos nutricionais podem acarretar danos no desenvolvimento, além de prejudicar o processo de mielinização que pode afetar os níveis sensoriais, como visão, audição, paladar e olfato, e com deficiência similar nas funções cognitivas (YEHUDA et al., 2005).

De fato, as alterações ocorridas dependentes das condições de lactação já estão bem esclarecidas. Complementarmente, as modificações ocasionadas pelo estado nutricional através do método de diminuição no tamanho da ninhada vão além do metabolismo, possuindo ação sobre as alterações no comportamento e função cerebral (DAVIDOWA PLAGEMANN, 2004). Por outro lado, além de atuar sobre os benefícios metabólicos, os ácidos graxos essenciais apoiam sua utilidade na cognição, comportamento e humor, bem como, na compreensão no desenvolvimento da atividade cerebral através das alterações na excitabilidade cortical associadas com estruturas dependentes desse tipo de gordura (BORBA et al., 2010; CHANG; KE; CHEN, 2009).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados mencionados, pode-se concluir que a alteração do estado nutricional através da diminuição do tamanho no número de filhotes pode promover alterações que comprometem o metabolismo, a ansiedade e a memória episódica, além de modificar a função cerebral. Vale ressaltar que todas essas alterações possuem importância maior devido à fase em que as condições de lactação foram inseridas, já que o início da vida é considerado um período crítico para o desenvolvimento do organismo. Adicionalmente, no decorrer do trabalho, houve interação entre grupos de pesquisas para complementar ao presente estudo sobre o impacto na abordagem experimental. O estudo possui caráter pioneiro com atenção maior sobre a utilização de alternativas terapêuticas para a promoção, prevenção e tratamento do excesso de peso. No entanto, é de fundamental importância uma maior análise quanto ao uso e o período em que essas medidas devem ser utilizadas para um melhor efeito em nível metabólico, comportamental e eletrofisiológico.

REFERÊNCIAS

- AGBORSANGAYA, C. B.; NGWAKONGNWI, E.; LAHTINEN, M.; COOKE, T.; JOHNSON, J. A. Multimorbidity prevalence in the general population: the role of obesity in chronic disease clustering. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1161, 2013.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302(2-3), p. 141-145, 2001.
- AKKERMAN, S. PRICKAERTS, J., STEINBUSCH, H. W. M., BLOKLAND, A. Object recognition testing: statistical considerations. **Behavioral Brain Research**, v. 232 (2), p. 317-22, 2012.
- ALESSANDRI, J. M.; GUESNET, P.; VANCASSEL, S.; ASTORG, P.; DENIS, I.; LANGELIER, B.; AID, S.; POUMES-BALLIHAUT, C.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; LAVIALLE, M. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. **Reprod Nutr Dev.**, v. 44(6), p.509-38, 2004.
- ANDRADE, A. F.; GUEDES, R. C.; TEODOSIO, N. R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. **Braz JMed Biol Res.**, v. 23, p. 889–893, 1990.
- ASGARPANAH, J.; KAZEMIVASH, N. Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Properties of Carthamus tinctorius L. **Chin J Integr Med**, v.19(2), p. 153-159, 2013.
- ASGARY, S.; RAHIMI, P.; MAHZOUNI, P.; MADANI, H.; Antidiabetic effect of hydroalcoholic extract of Carthamus tinctorius L. in alloxan-induced diabetic rats. **J Res Med Sci.**, v. 17, p. 386 – 392, 2012
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; GUEDES, R. C. G. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 452–457, 2012.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Transição Nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19(Sup. 1), p. S181-S191, 2003.
- BASTIEN, M.; POIRIER, P.; LEMIEUX, I.; DESPRÉS, J. P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 56, p. 369-381, 2014.
- BAZAN, N. G. Supply of n-3 polyunsaturated fatty acids and their significance in the central nervous system. **Nutrition and the Brain**, v. 8, p. 1-24, 1990.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Diet-Induced Cognitive deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. **Nutrients**, v. 7, p. 6719-6738, 2015.

BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; PEREIRA DA SILVA, R.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 3, 2010.

BOGDANOV, V. B.; BOGDANOVA, O. V.; KOULCHITSKY, S. V.; CHAUVEL, V.; MULTON, S.; MAKARCHUK, M. Y.; BRENNAN, K. C.; RENSHAW, P. F.; SCHÖENEN, J. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 90-93, 2013.

BRAY G. A.; PAERATAKUL S.; POPKIN B. M. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. **Physiol Behav**, v. 83, p. 549–555, 2004.

COELHO, D. F.; PEREIRA-LANCHÁ, L. O.; CHAVES, D. S.; DIWAN, D.; FERRAZ, R.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; POORTMANS, J. R.; LANCHÁ JUNIOR, A. H. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. **Braz J Med Biol Res**, v.44(10), p. 966-972, 2011.

Fiscal Year - CONGRESSIONAL JUSTIFICATION, 2013, Estados Unidos. Department of health and human services, Centers for Disease Control and Prevention, Estados Unidos, 2013.

CHANG, C. Y.; KE, D. S.; CHEN, J. Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta Neural Taiwan**, v. 18, p. 231-241, 2009.

CHOPRA, M., GALBRAITH, S., HILL, I. D. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80 (12), p. 952-958, 2002.

CZERNICHOW, A.; THOMAS, D.; BRUCKERT, E. *n*-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 788–796, 2010.

COPPIN, G.; NOLAN-POUPART, S.; JONES-GOTMAN, M.; SMALL, D. M. Working memory and reward association learning impairments in obesity. **Neuropsychologia**, v. 65, p. 146–155, 2014.

DAVIDOWA, H., PLAGEMANN, A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. **Neuroscience Letters**, v. 371, p. 64-68, 2004.

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

DIZIEZAK, J. Fats, oils, fat substitutes. **Food Technol.** Chicago, v. 43, p. 66-74, 1989.

- DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: lipids, malnutrition & the developing brain. **Applied Neurochemistry**, p. 287-316, 1968.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.
- FRANCIS, H. M.; STEVENSON, R. J. Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. **Behav.Neurosci.**, v. 125(6), p. 943-955, 2011.
- FRANCISCO, E. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v. 47, n. 11, p. 2437-2445, 2015
- 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. **Neurosci. Lett.**, v. 447, p. 26-30, 2008.
- GAO, L. N.; CUI, Y. L.; FAN, G. W.; WANG, Y. F. Protective effect of Salvia miltiorrhiza and Carthamus tinctorius extract against lipopolysaccharide-induced liver injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, p. 9079 – 9092, 2015.
- GARDNER-MEDWIN, A. R. Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. **J Exp Biol.**, v. 95, p. 111-27, 1981.
- GRANTHAM-MCGREGOR, S. M. Malnutrition, Mental function, and Development. **The Malnourished Child Nestlé Nutrition Workshop Series**, v. 19, p. 197-212, 1990.
- GREENBERG, S. M.; CALBERT, E. E., SAVAGE, H. J., DEUEL, JR. The effect of fat level of the diet on general nutrition. **Journal Nutrion**, v. 41, p. 473-486, 1950.
- GUEDES, R. C. A.; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression Brazilian Journal of Medical and Biological Research 25, 393-397, 1992.
- GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. In: Preedy, Victor R., Watson, Ronald R., Martin, Colin R. (Eds.), **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. Springer, Berlin, p. 2343–2355, 2011.
- GUEDES R. C. A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: "Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field, Liebermann, H., Kanarek, T. and Prasad, C (eds.), CRC Press, New York. **Nutrition, Brain and Behavior Series**, v. 3, cap. 4, p. 39-54, 2005.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HARRIS, W. S.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.; KRIS-ETHERTON, P.; RUDEL, L. L.; APPEL, L. J.; ENGLER, M. M.; ENGLER, M. B.; SACKS, F. Omega-6 Fatty Acids and Risk

for Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. **Circulation: Journal of the American Heart Association**, 2009.

HIRATSUKA, S.; KOIZUMI, K.; OOBA, T.; YOKOGOSHI, H. Effects of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on the learning ability and fatty acid composition of the brain. **J. Nutr Sci Vitaminol.**, v. 55, p. 374-380, 2009.

INNIS, S. M., OWENS, S. P. Dietary Fatty Acid Composition in Pregnancy Alters Neurite Membrane Fatty Acids and Dopamine in Newborn Rat Brain. **Nutritional Neurosciences**, 2000.

KACZMARCZYK, M. M.; MACHAJ, A. S.; CHIU, G. S.; LAWSON, M. A.; GAINES, S. J.; YORK, J. M.; MELING, D. D.; MARTIN, S. A.; KWAKWA, K. A.; NEWMAN, A. F.; WOODS, J. A.; KELLEY, K. W.; WANG, Y.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p. 1553-1564, 2013.

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

LI, Y., PLAGEMANN, A., DAVIDOWA, H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. **Neuroscience Letters**, v. 330, p. 33-36, 2002.

LOPRESTI, A. L.; DRUMMOND, P. D. Obesity and psychiatric disorders: Commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 45, p. 92-99, 2013.

MAIA, L. M.; FRAZÃO, M. F.; SOUZA, T. K. M.; SILVA, M. B.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; PICANCO-DINIZ C. W.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R. C. A. L-Arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v. 1072, p. 19–25, 2006.

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

MIGUELEZ, M., ANISMAN, H., WEBER, J. M., MERALI, Z. Effects of acute or chronic omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid treatment on behavioral, neuroendocrine and cytokine changes elicited by exogenous interleukin-1 β challenge. **Journal of Neuroimmunology**, v. 181, p. 19-28, 2006.

Diponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude>. Acesso em: 19 março/2013.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

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

MORGANE P.J., MILLER M., KEMPER T., STERN W., FORBES W., HALL R., BRONZINO J. D., KISSANE J., HAWRYLWICZ E., RESNICK O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Rev Behavioral Neuroscience**, v. 2, p. 137–230, 1978.

NERY, C. S.; PINHEIRO, I. L.; MUNIZ, G. S.; VASCONCELOS, D. A. A.; FRANÇA, S. P.; NASCIMENTO, E. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. **Revista Brasileira Med Esporte**, v. 17, p. 49-55, 2011.

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

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

OKEN, E.; GILLMAN, M. W. Fetal Origins of Obesity. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, 2003.

PIRES, G. N., TUFIK, S., ANDERSEN, M. L. Relationship between sleep deprivation and anxiety – experimental research perspective. **Einstein**, v 10 (4), p. 519-523, 2012.

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

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

PLAGEMANN, A.; RAKE, A.; HARDER, T., MELCHIOR, K.; ROHDE, W.; DORNER, G. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Neuroscience Letters**, v. 258, p. 13–16, 1998.

PLAGEMANN A.; HARDER T.; RAKE A.; VOITS M.; FINK H.; ROHDE W.; DORNER, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**, v. 836, p. 146–55, 1999.

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

RACHETTI, A. L. F.; ARIDA, R. M.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. A.; FERNADES-SANTOS, L.; FRUSSA-FILHO, R.; GOMES DA SILVA, S.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M.

Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 283-289, 2013.

RICE, H.B.; CORWIN, RL.L. Food intake in rats is unaffected by the profile of dietary essential fatty acids. **Physiology & Behavior**, v. 75, p. 611-619, 2002.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-669, 1997.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; DINIZ, C. W. P.; BORBA, J. M. C.; SANTOS-MONTEIRO, J.; GUEDES, R. C. A. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. **Nutr. Neurosci.** v. 7, p. 207–216, 2004.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, J. B.; BARROS, A. B; GUEDES, R. C. A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutr. Neurosci.** v. 9, p. 155-160, 2006.

SINGH-TAYLOR A.; KOROSI A.; MOLET J.; GUNN B. G.; BARAM T. Z. Synaptic rewiring of stress-sensitive neurons by early-life experience: A mechanism for resilience? **Neurobiology of Stress** 1, p.109-115, 2015.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 28, p. 85-95, 1971.

SOARES, J.K.B.; MELO, ROCHA-DE-MELO, A. P.; MEDEIROS, M.C.; QUEIROGA, R.C.R.E.; BOMFIM, M.A.D.; SANTIAGO, E.C.A.; GUEDES, R.C.A. Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: An elevated plus maze analysis. **Neuroscience Letters**, v. 552, p. 25– 29, 2013.

TROFIMIUK, E.; BRASZKO, J. J. Concomitant docosahexaenoic acid administration ameliorates stress-induced cognitive impairment in rats. **Physiology & Behavior**, v. 118, p. 171–177, 2013.

VIANA, L. C.; LIMA, C. M.; OLIVEIRA, M. A.; BORGES, R. P.; CARDOSO, T. T.; ALMEIDA, I. N. F.; DINIZ, D. G.; BENTO-TORRES, J.; PEREIRA, A.; BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; SILVA, R. F. M.; ABADIE-GUEDES, R.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; LIMA, D. S. C.; VASCONCELOS, P. F. C.; CUNNINGHAM, C.; GUEDES, R. C. A.; PICANÇO-DINIZ, C. W. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280–296, 2013.

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

WU,S.; YUE, Y.; TIAN, H.; LI, Z.; LI, X.; HE, W.; DING, H. Carthamus red from *Carthamus tinctorius* L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl₄-induced liver damage in rats via the Nrf2 pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 148, p. 570 – 578, 2013.

XIAO, Q. X.; WILLIAMS, S. M.; GRAYSON, B. E.; GLAVAS, M. M.; COWLEY, M. A.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, v. 148 (9), p. 4150-4159, 2007.

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

YEILAGHI, H., ARZANI, A., GHADERIAN, M., FOTOVAT, R., FEIZI, M., POURDAD, S. S. Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Food Chemistry*, v. 130, p. 618-625, 2012.

YOSHIDA, S. H., SIU, J. GRIFFEY, S. M. GERMAN, J. B., GERSHWIN, M. E. Dietary Juniper-is uirginensis seed oil decreased pentobarbital-associated mortalities among DBA/1 mice treated with collagen-adjuvant emulsions. *Journal Lipid Mediators Cell Signalling*, v. 13, p. 283-293, 1996.

ZHANG, Z.; LI, Q.; LIU, F.; SUN, Y.; ZHANG, J. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPAR α , Orexin, and Ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin*, v. 42, p. 202, 2010.

APÊNDICE

A - Artigo original submetido à “Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism”

Carthamus tinctorius supplementation during critical period of development: study on heart and liver of overnourished rats

Laís Alves Ribeiro Costaa; Patrícia Fortes Cavalcanti de Macêdoa; Janatar Stella Vasconcelos de Meloa; Cristiane de Moura Freitasb; Aiany Cibelle Simoes Alvesb; Humberto de Moura Barbosa; Eduardo Carvalho Lira c; Mariana Pinheiro Fernandesb; Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby*; Claudia J. Lagranhab*

aDepartment of Nutrition / CCS. Federal University of Pernambuco. *Campus* of Recife. Recife – PE, Brazil.

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

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

*These authors contributed equally to this work.

Mailing addresses:

Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby

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

E-mail: batistadeoliveiram@gmail.com

Claudia J. Lagranha

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

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: lagranha@hotmail.com

Keywords: *Carthamus tinctorius* oil; Oxidative status; Lipid Profile; Heart; Liver
Summary statement

Pregnant women frequent use of herbal medicine products believing that they are natural and free of risks, however some studies have been conducted suggesting that maternal exposure to *Carthamus tinctorius* may induce deleterious effect. Our manuscript was conducted to evaluate whether early intervention with *Carthamus tinctorius* could in fact modulates redox status in key organs either in normal- and overweight rats, since there is a common believe that supplementary diet with this oil decreases body weight.

Nevertheless our manuscript brings a different idea.

Abstract

Carthamus tinctorius (also known as safflower) has been used to treat several diseases, including arteriosclerosis and cardiomyopathy. Overnutrition during early post-natal life can affect newborns increasing the risk of developing obesity and metabolic syndrome. Here we investigated the impact of safflower oil supplementation during critical period of development on lipid profile and oxidant status in overnourished rats. From 7 up to 30 days old, overnourished (O) or nourished (N) rats were randomly assigned into two additional groups for supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). Murinometric data and weights were examined. Serum was collected for measuring glucose, cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. Heart and Liver oxidative status were measured. Overnutrition induce a significantly increase in body weights and increased values of abdominal circumference, thoracic circumference, body length and Body mass index. However, safflower supplementation did not attenuate the overnutrition effect. Additionally, overnutrition increases glucose, triglycerides and very low-density lipid, again safflower supplementation did not attenuate the effects of overnutrition. Related to oxidative status, in overnourished rats we did not observed any alteration either in heart or liver, however safflower supplementation modulates antioxidant defense in either tissue. The present study reveals that nutritional manipulation during the developmental period induces detrimental effect on metabolism that can be associated with redox impairment.

1.0 Introduction

Carthamus tinctorius L. also known as safflower, was found in China believed over 2,500 year ago (Zhao et al., 2009). It has been used as food condiment, natural dyes and an herbal medicine in several oriental countries (Zhao et al., 2009). In Traditional Chinese Medicine (TCM), *Carthamus tinctorius* has been used to treat several diseases, such as inflammation, stroke, arteriosclerosis, cardiomyopathy, among others diseases (He, 1991, Fan et al., 2009, Zhao et al., 2009, Li et al., 2013, Bao et al., 2015, Tien et al., 2010).

According to previous paper, biological properties attributed to *Carthamus tinctorius* are due to the several compounds isolated from the water extract, which may include flavonoids, alkaloids, carboxylic acids, steroids and polysaccharides (Sato et al., 1985, Kim et al., 1992, Kazuma et al., 2000, Lee et al., 2002, Roh et al., 2004, Wang et al., 2014). Clinical and experimental evidence show cardioprotective effects for *Carthamus tinctorius* (Upadya et al., 2015, Koyama et al., 2009). Study conducted in normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with hydroxysafflor yellow A (HSYA), the main chemical component of safflower yellow pigment, showed that HSYA reduced blood pressure and heart rate (Nie et al., 2012). Wei et al. (Wei et al., 2005) verified that HSYA might provide neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant action. In addition to the effects as antioxidant, recently a clinical application of *Carthamus tinctorius* showed that in human can inhibit the lowdensity lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels (Upadya et al., 2015). Previously, Koyama et al. (Koyama et al., 2009) had shown in mice that *Carthamus tinctorius* had the ability to inhibit the oxidized LDL formation mainly due to the strong antioxidant activity presented in the *Carthamus tinctorius* extract.

Corroborating with these finds, Bao et al. [5] showed that in mice treated with high fat diet and with low-doses of the *Carthamus tinctorius* extract (0.1mg/day) the total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were significantly decreased, with lower atherogenic index (AI) value indicating a lower atherosclerosis incidence. In addition, middle-dose (0.5mg/day) and high-dose (1.0 mg/day) of *Carthamus tinctorius* extract, showed that TC, LDL-C, and triglyceride levels of hyperlipidemic mice were significantly reduced, while high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level was increased. The authors concluded that, *Carthamus tinctorius* extract can significantly reduce the levels of serum TC, TG, LDL-C, and AI of high- fat diet adult mice, significantly improving lipid metabolism, lowering blood lipids, and preventing atherosclerosis (Bao et al., 2015). Study also conducted

in rats showed that 90 days of HSYA treatment at a dose of 180 mg/Kg induces a slight nephrotoxicity (Liu et al., 2004).

The early postnatal life is considered a critical window of development (Smart et al., 1974, Bei et al., 2015). Besides the deleterious effects caused by an imbalanced intake during the offspring development, overnutrition during early post-natal life can also affect newborns in an undesirably manner – increasing the risk of developing obesity and metabolic syndrome (Ji et al., 2014, Bei et al., 2015). *Carthamus tinctorius* supplementation at early age is not clinical irrelevant since has been shown that maternal exposure to some herbal plants could result in adverse outcomes on the survival and health of the neonates (Eisenberg et al., 1998, Ernst, 2002b, Ernst, 2002a). Therefore, the present study had two aim, one investigate whether the supplementation with safflower oil during a critical period of development, such as the suckling period, can affect the body development and oxidant status, and two investigate whether the supplementation with safflower oil during a critical period of development in overnourished rats, can ameliorates the body development and oxidant status.

2.0 Materials and methods

2.1 Animals and housing conditions

The experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Pernambuco (approval protocol no. 23 076 035498/2014-57), which comply with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Animals were raised from birth until the day of the experiment in a room with a temperature of $23\pm1^{\circ}\text{C}$ and a 12/12h light/dark cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm), with free access to water and food – a commercial laboratory chow diet (Purina do Brazil Ltd., Paulinia, São Paulo, Brazil) with 23% protein. After weaning, all pups were housed in groups of 3–4 per polypropylene cage ($51\times35.5\times18.5$ cm).

2.2 Overnutrition and safflower supplementation

Female *Wistar* rats with 120-150 days of life and weighing 250 ± 50 g were mated in the proportion of two female to one male. Females were monitored on a daily basis for the presence of vaginal sperm plugs and once the plug was detected (considered gestational day 0), the female was removed and housed in individual cages with free access to food and water. After gestation, the pregnant rats delivered 7–12 pups per litter. The pups from 4 to 6 litters were first joined in a big pool. At the second day after birth, litters were standardized to

have either three or nine pups in order to change the nutritional state performing the two experimental groups: overnourished (O, n=17) or nourished (N, n=18), respectively. From 7 up to 30 days old, rats from both experimental groups (O or N) were randomly assigned between rats that received supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). The supplementation with safflower oil (Nature®, Paraíba, Brazil) represented 3% of the daily dietary intake of omega 6. To perform the placebo group, rats received a vehicle solution with distilled water and Cremophor 0.009% (Sigma®), which was used to dissolve the safflower oil. Either the SF or V groups received one daily dose of safflower oil or vehicle, respectively administered via gavage during the experimental period.

2.3 Postnatal body weight, murinometric data, heart, and liver weight

At postnatal days 7, 14, 21, 30 and 45, the body weight (BW) was evaluated to test whether the safflower supplementation or overnutrition would influence it. Therefore, the rats were weighted in a semi-analytical digital electronic scale (Marte®, Minas Gerais State, Brazil) and their weights were compared to the respective controls.

The heart weight (HW), liver weight (LW), Body weight (BW), body length (BL, muzzle-to-anus length), abdominal circumference (AC, immediately anterior to the forefoot), and thoracic circumference (TC, immediately behind the foreleg) were determined in all rats, as described previously (Novelli et al., 2007, da Silva Pedroza et al., 2015). The BW, BL, AC and TC were used to determine the following anthropometric index: Body mass index (BMI) = body weight (g)/body length² (cm²) and Lee index = cube root of body weight (g)/muzzle-to-anus length (cm) and AC/TC ratio.

2.4 Blood analysis

Fasted (12–14 h) rats had blood collected from the tail to measure glucose levels with a glucometer (G-Tech Free System No Code Accumed-Glicomed, Brazil). Animals were then anesthetized with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (both from Sigma Co., USA), and blood samples were obtained by cardiac puncture and collected immediately in separate tubes. Approximately 4 ml of blood was placed in a 10ml tube and gently inverted for 30 s. After 20min, the sample was centrifuged at 8000 rpm for 10 min. The serum was frozen at -15 °C until assayed for content of lipids. The lipid panel analysis was used as an initial broad medical screening tool for abnormalities in lipids. The levels of total serum cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG) were measured by available commercial kits (Labtest®, Lagoa Santa, MG). The serum levels of very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) were calculated using the Friedwald

formula ($VLDL = TG/5$). Atherogenic index (AI), the most used parameters to evaluate cardiovascular risk, was determined by equation: $[\log (\text{triglycerides/HDL-cholesterol})]$ (Dobiasova and Frohlich, 2001, Jurgonski et al., 2012).

2.5 Drugs and reagents

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

2.6 Heart and Liver preparations for biochemical analysis

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

2.7 Oxidative Stress Biomarkers

2.7.1 Evaluation of Malondialdehyde production

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

2.7.2 Evaluation of Carbonyls content

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer (Reznick and Packer, 1994). With samples on ice, 30% (w/v) TCA was added to the samples (0.3 mg/ml heart and liver homogenates) and then centrifuged for 14 min at 4000 RPM. The pellet was suspended in 10mM 2,4dinitrophenylhydrazine and immediately

incubated in a dark room for 1h shake each 15min. Then the samples were washed and centrifuged three times in ethylacetate buffer and then the final pellet was suspended in 6M guanidine hydrochloride, incubated for 30 min at 37°C and the absorbance read at 370nm.

2.7.3 Total and protein-bound sulphydryl group content

This assay was performed according to Aksenov and Markesbery (Aksenov and Markesbery, 2001). Homogenates (0.5 mg/ml heart and 0.45 mg/ml liver) were used to the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiol groups, generating a yellow-stained compound TNB whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. The sulphydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated as mmol/mg protein.

2.7.4 Superoxide dismutase assay

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

2.7.5 Catalase assay

Catalase (CAT) activity was measured according to the method described by Aebi (Aebi, 1984). The principle of the assay is based on the determination of the rate constant (k) of H₂O₂ decomposition, which in our conditions of temperature and pH was defined as 4.6 x10⁷. The assay content was compound by 50 mM-phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM H₂O₂ and samples (0.3 mg/ml heart and 0.08 mg/ml liver homogenates). The rate constant of the enzyme was determined by measuring change in absorbance (at 240 nm) per minute over a 4 minutes period at 20°C and the CAT activity was expressed as U/mg protein.

2.7.6 Glutathione S-transferases activity

Glutathione S Transferase (GST) is an antioxidant enzyme involved in the detoxification of a wide range of toxic agents including peroxide and alkylating agents present in the tissues. The activity of GST was measured by the method described by Habig (Habig et al., 1974).

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

2.8 Statistical analysis

All data were plotted and the statistical analysis performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Two-way ANOVA with nutritional state (nourished, overnourished) and supplementation (safflower, vehicle) were conducted on each variable tested (body, heart and liver weight, murinometric data, blood glycaemia, lipid profile, atherogenic index, heart oxidative stress and liver oxidative stress). The post-hoc tests were recommended based on the results of the tests of normality (Kolmogorov-Smirnov test). Data with only two values for one interesting nominal variable, such as overnutrition (O/V versus N/V) or safflower oil (N/SF versus N/V), were analyzed under subgroups using unpaired-t-test. Differences were considered statistically significant when $p<0.05$.

3.0 Results

3.1 Postnatal body weight, murinometric data, and tissue ratios

Two-way ANOVA with nutritional state (nourished, overnourished) and supplementation (safflower, vehicle) were conducted on each variable (postnatal body weight, body mass index (BMI), Lee index, AC/TC ratio, and tissue ratios). There was a significant effect of nutritional state, from 7 up to 45 days-old, when overnourished rats were compared to nourished rats (two-way ANOVA, $p<0.05$). Overnutrition per se (O/V versus N/V, unpaired t test, $p<0.05$) did induce a significantly effect as judged by the higher postnatal body weights (figure 1), and increased values of AC, TC, BL and BMI (Table 1). On the other hand, the supplementation with safflower oil did not influence neither the postnatal body weight (SF versus V, unpaired t test, $p>0.05$) (figure 1), nor the murinometric data (AC, TC, BL, BMI, Lee Index and AC/TC ratio, Table 1). Related to tissue ratio, only in liver ratio that we observe significant difference between O/V versus N/V (unpaired t test, $p<0.05$, Table 1).

3.2 Blood glycaemia, lipid profile and atherogenic index

There was a significant increase of the fasting glycemia levels in the overnourished rats (O/SF and O/V) as compared to their respective nourished controls (N/SF and N/V, $p<0.05$, ANOVA two-way). Therefore, two-way ANOVA showed that both factors (nutrition and

supplementation) induced significant differences for the values of blood glycaemia. In addition, safflower oil (N/SF versus N/V, unpaired t test, $p<0.05$) induced a significant increase of the fasting glycaemia levels, TG and VLDL. Similar results were observed in regards of overnutrition (O/V versus N/V, unpaired t test, $p<0.05$) also increased glycaemia levels, TG and VLDL. Neither supplementation, nor nutritional state significantly changed TC, HDL and atherogenic index (two-way ANOVA, $p>0.05$, Table 2).

3.3 Safflower oil and oxidative stress

We observed that safflower oil during critical period of development in heart induce a significant increase in lipid peroxidation (N/V: 67.6 ± 8.0 ; N/SF: 207.7 ± 47.4 nM/mg protein; $p<0.05$) and no difference in overnourished group (N/V: 67.6 ± 8.0 ; O/V: 57.6 ± 15.8 nM/mg protein). However no additional difference was observed in carbonyls levels (N/V: 3.5 ± 0.34 vs N/SF: 3.0 ± 0.31 μ M/mg protein; N/V: 3.5 ± 0.34 vs O/V: 3.2 ± 0.31 μ M/mg protein) or in total thiol content (N/V: 19.3 ± 1.3 vs N/SF: 21.1 ± 0.5 mM/mg protein; N/V: 19.3 ± 1.3 vs O/V: 21.7 ± 1.2 mM/mg protein). Related to the enzymatic antioxidant defense we observe significant increase induced by safflower supplementation (SOD activity N/V: 4.7 ± 0.4 vs N/SF: 7.0 ± 0.9 U/mg protein, $p<0.05$; CAT activity N/V: 2.9 ± 0.2 vs N/SF: 4.2 ± 0.5 U/mg protein, $p<0.05$ and GST activity N/V: 0.9 ± 0.1 vs N/SF: 1.5 ± 0.2 U/mg protein, $p<0.01$). However, when we compare nourished vs overnourished we did not observe significant difference in any enzymatic analysis (SOD activity N/V: 4.7 ± 0.4 vs O/V: 5.2 ± 0.5 U/mg protein; CAT activity N/V: 2.9 ± 0.2 vs O/V: 3.4 ± 0.3 U/mg protein and GST activity N/V: 0.9 ± 0.1 vs O/V: 1.0 ± 0.1 U/mg protein, figure 2D-F). Moreover, in overnourished the GST activity was increased in supplemented group (GST activity O/V: 1.05 ± 0.07 vs O/SF: 1.49 ± 0.04 U/mg protein, $p<0.05$, figure 2F)

Related to liver oxidative stress, we also observed that safflower oil increase in lipid peroxidation in nourished group (N/V: 17.3 ± 4.9 ; N/SF: 40.8 ± 5.2 nM/mg protein; $p<0.01$) and no difference in overnourished group (N/V: 17.3 ± 4.9 vs O/V: 17.0 ± 4.8 nM/mg protein). No additional difference was observed in carbonyls levels (N/V: 3.6 ± 0.5 vs N/SF: 4.1 ± 0.3 μ M/mg protein; N/V: 3.6 ± 0.5 vs O/V: 5.1 ± 1.1 μ M/mg protein) or in total thiol content (N/V: 11.3 ± 0.63 vs N/SF: 9.2 ± 0.86 μ M/mg protein; N/V: 11.3 ± 0.63 vs O/V: 10.2 ± 1.4 μ M/mg protein, figure 3). Differently that we observed in heart, the enzymatic antioxidant defense did not changed, SOD activity N/V: 5.8 ± 0.6 vs N/SF: 5.06 ± 0.8 U/mg protein; CAT activity N/V: 27.2 ± 3.8 vs N/SF: 49.0 ± 12.2 U/mg protein; GST activity N/V: 55.7 ± 2.3 vs N/SF: 59.6 ± 2.1 U/mg protein. However, when we compare nourished vs

overnourished we observe significant increase only in SOD activity N/V: 5.9 ± 0.6 vs O/V: 9.5 ± 1.3 U/mg protein, $p < 0.05$; CAT activity N/V: 27.2 ± 3.8 vs O/V: 28.2 ± 6.3 U/mg protein and GST activity N/V: 55.7 ± 2.3 vs O/V: 57.1 ± 9.2 U/mg protein, figure 3).

4.0 Discussion

To the best of our knowledge, these are the first findings related to supplementation with safflower oil and overnutrition – during a life critical window (lactation) – on murinometric parameters, blood profile, atherogenic index, heart and liver oxidative status. The present data show that safflower oil consumption during suckling period in nourished rats modulates blood parameter and increased antioxidant defense in heart with no changes in liver. In addition our data demonstrate that overnutrition during this critical period of development modulates negatively murinometric and blood parameters, with no changes in oxidative status in heart and liver. When we analyze overnourished rat supplemented with safflower oil we did not observe improvement in any analyzed parameter.

Our study has a important clinical relevance, since previous data showed that users of herbal medicine products including *Carthamus tinctorius* are predominantly female(Eisenberg et al., 1998) and authors suggest that pregnant women frequent use of herbal medicine products believing that they are “natural and therefore free of risks” (Ernst, 2002b, Ernst, 2002a). However, previous studies reported an association between maternal exposure to *Carthamus tinctorius* extract and congenital malformations in their offsprings, demonstrating that *Carthamus tinctorius* can cross human placenta and it's can be present in breast milk that could induce effect on developing fetuses and newborns (Nobakht et al., 2000, Louei Monfared and Salati, 2012); thus the evaluation of how *Carthamus tinctorius* supplementation during critical window, can affect body composition, blood lipids and oxidative status could add another piece in the studies related to *Carthamus tinctorius* supplementation at critical period of development.

Experimental data shows that a high safflower diet can alter adiposity and result in effective amelioration of diet-induced obesity (Zhang et al., 2010). Additionally, previous data demonstrate beneficial effects for the consumption of safflower as safflower yellow presenting hypolipidemic effects on hyperlipidemic mice (Bao et al., 2015) and cardioprotective effects for safflower oil (Upadya et al., 2015); however in our hand the consumption of safflower did not improve lipid profile in a significant manner neither decrease body weight. These contradicting data could be because of the period that safflower was consumed, since in our model we offer the safflower oil during the developmental period

and other studies were conducted in adult rats. Therefore, the present data alert to the relevance of understanding better the timing for the supplementation of LC-PUFA as safflower oil, among other types of oil. In fact, peanut products, sunflower, and safflower oils fed to mother rats, guinea pig, rhesus monkeys, and baboons induce predictable changes in tissue polyunsaturated fatty acid composition that are abnormal in free-living and mammals (Brenna, 2011).

Additionally, our data shown that only in heart safflower supplementation modulates enzymatic defense; however these enzymatic modulation it wasn't effective enough to fight against oxidative damage as demonstrated by the increase in lipid peroxidation. According to Zhu et al. [40] and Wang et al. [41] the pigments present in *Carthamus tinctorius* would have the ability to improve antioxidant activity and ameliorates of cardio-cerebrovascular diseases (Zhu et al., 2003, Wang et al., 2007). Wang et al. [42] verified that hydroxysafflor yellow A of *C. tinctorius* attenuated hepatic fibrosis induced by oxidative stress in adult rats(Wang et al., 2013). Was surprised to us that the positive effect observed by others research wasn't present in our study. We believed that because of the period that the supplementation was offered, both heart and liver metabolism has higher and the positive effects induced by safflower supplementation could be washed-up due to the time window between supplementation and the evaluation period.

Recently a study in rats fed with high fat diet enriched with safflower demonstrated an increase in oxidative stress biomarker in plasma, liver and in mitochondria from liver associated with an increase in peroxidability index and steatosis (Crescenzo et al., 2015). The author suggest that the major factor to the increased oxidative stress either in blood or in tissue is the significant increase in polyunsaturated fatty acid content, since polyunsaturated fatty acids are more prone to be oxidized by ROS. In addition, the author suggest that the increased hepatic steatosis observed in long-term effected in rats fed with high fat diet enriched with safflower could be due to the increased lipid storage specially in *n*6/*n*3 ratio; concluding that diets containing elevated amounts of polyunsaturated fats could represent a predisposing factor for the development of liver steatosis and associated liver disease. Corroborating, Choi et al. [44] demonstrated that α -terpineol, a monoterpenoid component of *C. tinctorius*, predisposes hepatic steatosis by induces fat liver due activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)-sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) pathway (Choi et al., 2013).

In conclusion, this study provides new evidence that nutritional manipulation during the developmental period induce detrimental effect that can be associated with redox impairment.

Taken together, our data suggest that the adult predisposition to develop disease is induced by early age with an important contribution of oxidative stress.

5.0 Acknowledgement

The authors are thankful to CAPES, CNPQ and FACEPE that provided scholarships.

6.0 Competing interests

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

7.0 Author Contributions

LARC, PFCM, JSVM handle the animals during the entire experimental period, conducted gavage, collected samples; CMF conducted the analysis of heart oxidative stress; ACSA conducted the analysis of liver oxidative stress; HMB and ECL performed the blood analysis and the evaluation of atherogenic index; MPF analyzed data, performed statistical analysis, help wrote the paper; MBOH and CJL designed research, analyzed data, performed statistical analysis, wrote the paper, and had primary responsibility for final content. All authors declare no conflict of interest and have approved the final manuscript.

8.0 Funding information

FACEPE (Foundation for the Support of Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ-0765-4.05/10; APQ-1026-4.09/12) and CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development MCTI/CNPq/Universal 2014-444500/2014- 6).

9.0 References

- AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-6.
- AKSENOV, M. Y. & MARKESBERY, W. R. 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302, 141-5.
- BAO, L. D., WANG, Y., REN, X. H., MA, R. L., LV, H. J. & AGULA, B. 2015. Hypolipidemic effect of safflower yellow and primary mechanism analysis. *Genet Mol Res*, 14, 6270-8.
- BEI, F., JIA, J., JIA, Y. Q., SUN, J. H., LIANG, F., YU, Z. Y. & CAI, W. 2015. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis*, 14, 96.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRENNAN, J. T. 2011. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Matern Child Nutr*, 7 Suppl 2, 59-79.
- CHOI, Y. J., SIM, W. C., CHOI, H. K., LEE, S. H. & LEE, B. H. 2013. alpha-Terpineol induces fatty liver in mice mediated by the AMP-activated kinase and sterol response element binding protein pathway. *Food Chem Toxicol*, 55, 129-36.
- CRESCENZO, R., BIANCO, F., MAZZOLI, A., GIACCO, A., CANCELLIERE, R., DI FABIO, G., ZARRELLI, A., LIVERINI, G. & IOSSA, S. 2015. Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. *Nutrients*, 7, 9475-91.
- DA SILVA PEDROZA, A. A., LOPES, A., MENDES DA SILVA, R. F., BRAZ, G. R., NASCIMENTO, L. P., FERREIRA, D. S., DOS SANTOS, A. A., BATISTA-DE-OLIVEIRA-HORNSBY, M. & LAGRANHA, C. J. 2015. Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? *Life Sci*, 137, 133-41.
- DOBIAISOVA, M. & FROHLICH, J. 2001. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoBlipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem*, 34, 583-8.
- DRAPER, H. H., SQUIRES, E. J., MAHMOODI, H., WU, J., AGARWAL, S. & HADLEY, M. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*, 15, 353-63.
- EISENBERG, D. M., DAVIS, R. B., ETTNER, S. L., APPEL, S., WILKEY, S., VAN ROMPAY, M. & KESSLER, R. C. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA*, 280, 1569-75.

- ERNST, E. 2002a. Herbal medicinal products during pregnancy: are they safe? *BJOG*, 109, 227-35.
- ERNST, E. 2002b. Herbal medicinal products during pregnancy? *Phytomedicine*, 9, 352-4.
- FAN, L., ZHAO, H. Y., XU, M., ZHOU, L., GUO, H., HAN, J., WANG, B. R. & GUO, D. A. 2009. Qualitative evaluation and quantitative determination of 10 major active components in *Carthamus tinctorius* L. by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. *J Chromatogr A*, 1216, 2063-70.
- HABIG, W. H., PABST, M. J., FLEISCHNER, G., GATMAITAN, Z., ARIAS, I. M. & JAKOBY, W. B. 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 3879-82.
- HE, G. F. 1991. Resources of medicinal plants in China. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 2, 9-12.
- JI, C., DAI, Y., JIANG, W., LIU, J., HOU, M., WANG, J., BUREN, J. & LI, X. 2014. Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats. *J Nutr Biochem*, 25, 1108-16.
- JURGONSKI, A., JUSKIEWICZ, J., ZDUNCZYK, Z. & KROL, B. 2012. Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. *Nutrition*, 28, 300-6.
- KAZUMA, K., TAKAHASHI, T., SATO, K., TAKEUCHI, H., MATSUMOTO, T. & OKUNO, T. 2000. Quinocachalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 1588-99.
- KIM, M. N., SCAO-BOGAERT, F. L. & PARIS, M. 1992. Flavonoids from *Carthamus tinctorius* Flowers. *Planta Med*, 58, 285-6.
- KOYAMA, N., SUZUKI, K., FURUKAWA, Y., ARISAKA, H., SEKI, T., KURIBAYASHI, K., ISHII, K., SUKEGAWA, E. & TAKAHASHI, M. 2009. Effects of safflower seed extract supplementation on oxidation and cardiovascular risk markers in healthy human volunteers. *Br J Nutr*, 101, 568-75.
- LEE, J. Y., CHANG, E. J., KIM, H. J., PARK, J. H. & CHOI, S. W. 2002. Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch Pharm Res*, 25, 313-9.
- LI, L., YANG, Y., HOU, X., GU, D., HANG, B., ABDULLA, R., WU, G., XIN, X. & AISA, H. A. 2013. Bioassay-guided separation and purification of water-soluble antioxidants from *Carthamus tinctorius* L. by combination of chromatographic techniques. *Separation and Purification Technology*, 104, 200-207.
- LIU, Z., LI, C., LI, M., LI, D. & LIU, K. 2004. The subchronic toxicity of hydroxysafflor yellow A of 90 days repeatedly intraperitoneal injections in rats. *Toxicology*, 203, 139-43.

- LOUEI MONFARED, A. & SALATI, A. P. 2012. The effects of *Carthamus tinctorius* L. on placental histomorphology and survival of the neonates in mice. *Avicenna J Phytomed*, 2, 146-52.
- MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247, 3170-5.
- NASCIMENTO, L., FREITAS, C. M., SILVA-FILHO, R., LEITE, A. C., SILVA, A. B., DA SILVA, A. I., FERREIRA, D. S., PEDROZA, A. A., MAIA, M. B., FERNANDES, M. P. & LAGRANHA, C. 2014. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, 39, 880-7.
- NIE, P. H., ZHANG, L., ZHANG, W. H., RONG, W. F. & ZHI, J. M. 2012. The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function. *J Ethnopharmacol*, 139, 746-50.
- NOBAKHT, M., FATTABI, M., HOORMAND, M., MILANIAN, I., RAHBAR, N. & MAHMOUDIAN, M. 2000. A study on the teratogenic and cytotoxic effects of safflower extract. *J Ethnopharmacol*, 73, 453-9.
- 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, 111-9.
- REZNICK, A. Z. & PACKER, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233, 357-63.
- ROH, J. S., HAN, J. Y., KIM, J. H. & HWANG, J. K. 2004. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol Pharm Bull*, 27, 1976-8.
- SATO, H., KAWAGISHI, H., NISHIMURA, T., YONEYAMA, S., YOSHIMOTO, Y., SAKAMURA, S., FURUSAKI, A., KATSURAGI, S. & MATSUMOTO, T. 1985. Serotoberine, a Novel Phenolic Amide from Safflower Seeds (*Carthamus tinctorius* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 2969-2974.
- SMART, J. L., ADLARD, B. P. & DOBBING, J. 1974. Further studies of body growth and brain development in "small-for-dates" rats. *Biol Neonate*, 25, 135-50.
- TIEN, Y. C., LIN, J. Y., LAI, C. H., KUO, C. H., LIN, W. Y., TSAI, C. H., TSAI, F. J., CHENG, Y. C., PENG, W. H. & HUANG, C. Y. 2010. *Carthamus tinctorius* L. prevents LPS-induced TNFalpha signaling activation and cell apoptosis through JNK1/2-NFkappaB pathway inhibition in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Ethnopharmacol*, 130, 505-13.
- UPADYA, H., DEVARAJU, C. J. & JOSHI, S. R. 2015. Anti-inflammatory properties of blended edible oil with synergistic antioxidants. *Indian J Endocrinol Metab*, 19, 511-9.
- WANG, C., ZHANG, D., LI, G., LIU, J., TIAN, J., FU, F. & LIU, K. 2007. Neuroprotective effects of safflor yellow B on brain ischemic injury. *Exp Brain Res*, 177, 533-9.

- WANG, C. Y., LIU, Q., HUANG, Q. X., LIU, J. T., HE, Y. H., LU, J. J. & BAI, X. Y. 2013. Activation of PPARgamma is required for hydroxysafflor yellow A of *Carthamus tinctorius* to attenuate hepatic fibrosis induced by oxidative stress. *Phytomedicine*, 20, 592-9.
- WANG, Y., CHEN, P., TANG, C., LI, Y. & ZHANG, H. 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J Ethnopharmacol*, 151, 944-50.
- WEI, X., LIU, H., SUN, X., FU, F., ZHANG, X., WANG, J., AN, J. & DING, H. 2005. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action. *Neurosci Lett*, 386, 58-62.
- ZHANG, Z., LI, Q., LIU, F., SUN, Y. & ZHANG, J. 2010. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPARalpha, orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42, 202-8.
- ZHAO, G., ZHENG, X. W., GAI, Y., CHU, W. J., QIN, G. W. & GUO, L. H. 2009. Safflower extracts functionally regulate monoamine transporters. *J Ethnopharmacol*, 124, 116-24.
- ZHU, H., WANG, Z., MA, C., TIAN, J., FU, F., LI, C., GUO, D., ROEDER, E. & LIU, K. 2003. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: in vivo and in vitro studies. *Planta Med*, 69, 429-33.

10.0 Legends

Table 1: Murinometric evaluations. Rats with two days-old were randomly distributed in either three, or nine pups to change the nutritional state to overnourished or nourished animals, respectively. From 7 up to 30 days old, O or N rats were randomly assigned to receive supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). The murinometric data are presented as mean±SEM.

Table 2: Blood profile. Blood glycaemia, lipid profile and atherogenic index from animals that were randomly assigned in either three, or nine pups at two days of life, performing the overnourished or nourished experimental groups, respectively. The supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V) was carried out from 7 up to 30 days old. Data are presented as mean±SEM.

Figure 1.0 Postnatal body weights are presented in mean±SEM. Rats with two days-old were randomly distributed in either three, or nine pups to change the nutritional state to overnourished or nourished animals, respectively. From 7 up to 30 days old, (O) or (N) rats were randomly assigned to receive supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). Two-way ANOVA was performed to identify differences of nutrition (over, nourished) and supplementation (safflower, vehicle). Nutrition did induce a significant effect, from 7 up to 45 days-old, when overnourished rats were compared to nourished rats (two-way ANOVA, $p<0.05$). **Overnutrition** per se (O/V versus N/V, unpaired t test, $p<0.05$) did induce a significantly effect as marked by the (*) on the higher postnatal body weights.

Figure 2.0 Oxidative stress biomarkers in heart. Rats with two days-old were randomly distributed in either three, or nine pups to change the nutritional state to overnourished or nourished animals, respectively. From 7 up to 30 days old, (O) or (N) rats were randomly assigned to receive supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). Two-way ANOVA was performed to identify differences of nutrition (over, nourished) and supplementation (safflower, vehicle). *Indicates differences using two-way ANOVA, $p<0.05$; #Indicates differences using Student-t test, $p<0.05$. Data are presented as mean±SEM. A) Malondialdehyde-MDA concentration; B) Carbonyls content; C) Total sulphydryl content; D) Superoxide dismutase activity; E) Catalase activity; F) Glutathione-S-transferase activity.

Figure 3.0 Oxidative stress biomarkers in liver. Rats with two days-old were randomly distributed in either three, or nine pups to change the nutritional state to overnourished or nourished animals, respectively. From 7 up to 30 days old, (O) or (N) rats were randomly assigned to receive supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). Two-way ANOVA was performed to identify differences of nutrition (over, nourished) and supplementation (safflower, vehicle). *Indicates differences using two-way ANOVA, p<0.05; #Indicates differences using Student-t test, p<0.05. Data are presented as mean±SEM. A) Malondialdehyde-MDA concentration; B) Carbonyls content; C) Total sulphydryl content; D) Superoxide dismutase activity; E) Catalase activity; F) Glutathione-S-transferase activity.

Figures and Tables

Table 1.0 Rats with two days-old were randomly distributed in either three, or nine pups to change the nutritional state to overnourished or nourished animals, respectively. From 7 up to 30 days old, O or N rats were randomly assigned to receive supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V). The murinometric data are presented as mean±SEM.

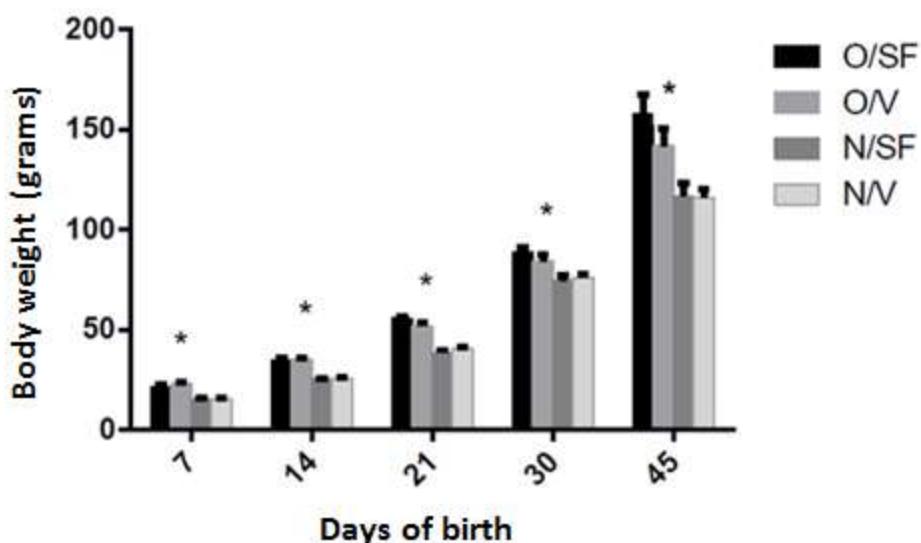
Experimental	Murinometric data									
	Group (n)	BW	AC	TC	BL	BMI	LI	AC/TC	HW/BW	LW/BW
N/V (n=8)		120.24±4.33 ^a	12.11±0.23 ^a	9.94±0.24 ^a	16.56±0.35 ^a	0.42±0.01 ^a	0.30±0.006	1.21±0.02	0.67±0.04	1.49±0.05 ^a
N/ SF (n=8)		116.78±6.28	11.68±0.22	9.61±0.20	16.89±0.45	0.39±0.02	0.29±0.007	1.22±0.006	0.58±0.03	1.55±0.09
O/V (n=8)		138.40±7.45 ^b	13.33±0.34 ^b	10.83±0.31 ^b	17.64±0.33 ^b	0.51±0.03 ^b	0.30±0.007	1.21±0.04	0.68±0.02	1.82±0.11 ^b
O/SF (n=8)		157.67±9.94	13.5±0.28	10.75±0.35	17.94±0.29	0.48±0.03	0.29±0.006	1.28±0.02	0.60±0.02	1.48±0.05

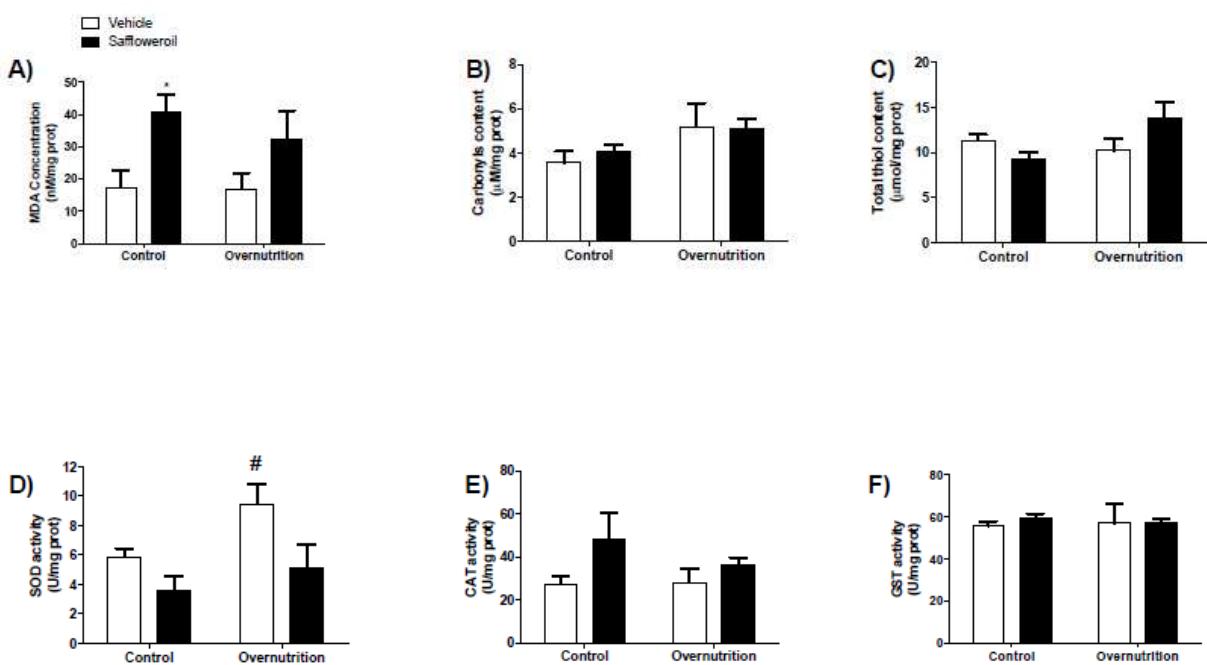
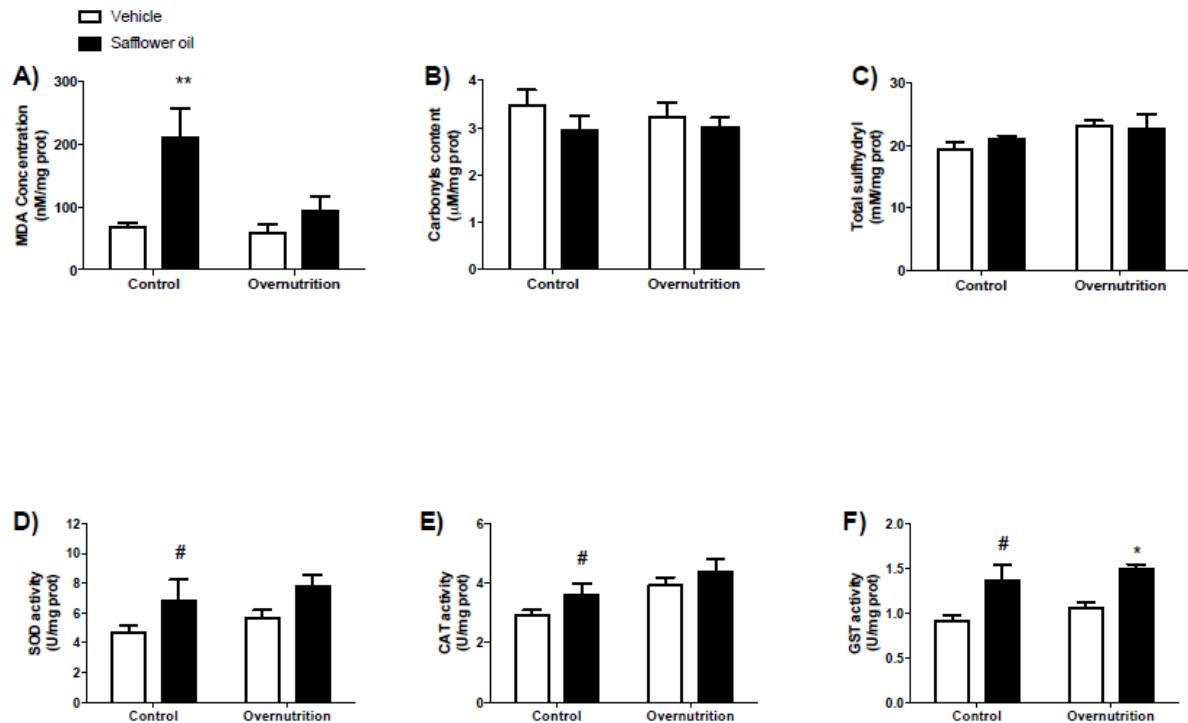
Legend: N – nourished rats; O – overnourished rats; SF – safflower oil supplementation; V – vehicle; BW – body weight; AC – abdominal circumference; TC – thoracic circumference; BL – body length; BMI – body mass index; LI – Lee index. Values from different groups that are marked with the same letters were significantly different.

Table 2.0 Blood glycaemia, lipid profile and atherogenic index from animals that were randomly assigned in either three, or nine pups at two days of life, performing the overnourished or nourished experimental groups, respectively. The supplementation with safflower oil (SF) or vehicle (V) was carried out from 7 up to 30 days old. Data are presented as mean \pm SEM.

Group (n)	Blood data					
	FG (mg/dl)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	AI (arbitrary unit)
	93.67 \pm 3.59 ^{b,c}	96.51 \pm 4.76	34.37 \pm 1.50 ^{a,b}	6.87 \pm 0.30 ^{a,b}	34.70 \pm 2.80	1.01 \pm 0.02
N/V (n=8)	93.67 \pm 3.59 ^{b,c}	96.51 \pm 4.76	34.37 \pm 1.50 ^{a,b}	6.87 \pm 0.30 ^{a,b}	34.70 \pm 2.80	1.01 \pm 0.02
N/SF (n=8)	85.00 \pm 0.68 ^{a,c}	99.27 \pm 7.89	62.89 \pm 7.30 ^a	12.58 \pm 1.46 ^a	42.13 \pm 3.16	1.12 \pm 0.04
O/V (n=8)	121.86 \pm 7.24 ^b	81.55 \pm 4.07	50.42 \pm 7.46 ^b	10.08 \pm 1.49 ^b	40.62 \pm 1.08	1.07 \pm 0.05
O/SF (n=8)	119.83 \pm 7.19 ^a	99.07 \pm 5.93	63.94 \pm 3.88	12.79 \pm 0.78	42.65 \pm 2.33	1.11 \pm 0.04

Legend: N – nourished rats; O – overnourished rats; SF – safflower oil supplementation; V – vehicle; FG – fasting glycaemia; TC – total cholesterol; TG – triglyceride; VLDL – very low density lipid; HDL – high density lipid and AI – atherogenic index. Values from different groups that are marked with the same letters were significantly different.





ANEXO

A - Artigo original submetido à “Nutrition”

Dear Dr. Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Nutrition

Corresponding Author: JULIANA KESSIA SOARES

Co-Authors: Camila C Santos, PhD; Marilia F Tavares-de-Melo, Ms; Mikaelle A Souza, Ms; Manuela S Gomes, Graduation; Adriana E Silva, Graduation; Renata C Rangel, Graduation; Glauber R Braz, Ms; Andresson A Pedroza, Graduation; Lais A Costa, Ms; Manuella Batista-de-Oliveira-Hornsby3, PhD; Claudia J Lagranha, PhD;

Title: Maternal safflower oil consumption alters reflex maturation, memory and hippocampal oxidative stress in the offspring rats treated during pregnancy and lactation

Thank you,

Nutrition.

Maternal safflower oil consumption alters reflex maturation, memory and hippocampal oxidative stress in the offspring rats treated during pregnancy and lactation

Camila Carolina de Menezes Patrício Santos¹; Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo¹; Mikaelle Albuquerque de Souza¹, Manuela Simony Cunha Gomes¹, Adriana Eleuterio da Silva¹, Renata da Costa Rangel¹, Glauber Rudá F. Braz², Anderson Apolônio Pedroza², Laís Alves Ribeiro Costa³, Manuella Batista-deOliveira-Hornsby^{3†}, Claudia J. Lagranha,^{3†}, Juliana Késsia Barbosa Soares^{1†*}

¹Department of Nutrition, Federal University of Campina Grande, Cuité, CG, Brazil;

²Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, CAV-Federal University of Pernambuco, Brazil.

³Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

†These authors contributed equally to this work

*corresponding author

ABSTRACT

The maternal intake of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can interfere with the development of the offspring nervous system, and the safflower oil is a PUFA source. This research aimed to evaluate the influence of maternal consumption of safflower oil on reflex maturation, memory and offspring hippocampal oxidative stress. Two groups were formed: control group (C), whose mothers received a standard diet, and Safflower group (SF), whose mothers received a normolipidic diet with safflower oil as lipid source. Treatment was given from the 14th day of gestation and throughout lactation. To evaluate newborn development, the reflex ontogeny indicators between the 1st and the 21st days of life were evaluated; to assess memory, from the 42th day of life on these animals were examined on open field habituation and novel object recognition test. Following behavioral analysis, the animals were anesthetized and decapitated. Hippocampi were rapidly dissected. In the hippocampal tissues, we evaluated the levels of malondialdehyde [1], superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S transferase (GST) and reduced glutathione (GSH). SF offspring showed delayed maturation of reflexes and improvement of novel object recognition in short- and long-term ($p < 0.05$). Safflower oil decreases lipid peroxidation evaluated by MDA levels ($p < 0.001$) and increases antioxidant defenses as showed by SOD, CAT, GST and GSH levels ($p < 0.05$). Maternal intake of safflower oil could: (1) change neonate reflex parameters, (2) promote improvement of cognitive development in adolescence (3) improve antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in hippocampus.

Keywords: Safflower oil. Pregnancy and lactation. Brain Development. Antioxidant

1. INTRODUCTION

The importance of lipids in human nutrition and development has been recognized over the years. Fatty acids comprise the structures of cell membranes, have a role on energetic and metabolic reserve functions, and form hormones and bile salts [2].

Within the variety of lipids, there are those for which the body has biosynthesis capacity, but there are others for which it does not. The ones that are not synthetized by the body are classified as essential fatty acids: linolenic acid and linoleic acid of the omega 3 and omega 6 families, respectively. Studies show that its consumption is beneficial to human health, since

they act preventing cardiovascular diseases, colon cancer, immune disorders, besides favoring brain and retina development [3].

During rat gestation period, there is an intense process of tissue formation and large organic transformations. Thus, the ingestion of different types of lipids by the mother can influence the development of the nervous system of the offspring, because the brain is the organ that has the second highest concentration of lipids only different than the adipose tissue [4].

At this stage there is also the formation of hippocampal structures, which are related to memory and learning. Molecular events in the hippocampus can influence memory storage involving the activation of signaling cascades, implying the involvement of glutamatergic synapses, essential for long-term potentiation, which is considered a model of cellular and molecular basis of memory [5]. Damage during the formation of the hippocampus is related to physiological and/or anatomical modifications of the structure, which lead to permanent deficits in learning and behavior [6]. The mechanism related to impaired cognitive functions is complex and still not clear, oxidative stress likely plays an important role in the antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in hippocampal environment.

During this period there is also the beginning of myelination, with accelerated increase of saturated, unsaturated, and long chain polyunsaturated fatty acids in brain tissue [7, 8]. The developing brain captures docosahexaenoic acid from blood stream and breast milk. Thus, an appropriate maternal consumption of food that is a source of long chain polyunsaturated fatty acids is essential for the fetal and neonatal development [2]. Scientific evidence has shown that dietary lipids offered in the critical stage of development can change the sequence of the nervous system ontogenesis, whether it is a saturated fatty acid [9], polyunsaturated fatty acid [10] or a dietary source of different types of fatty acids [11].

Safflower oil stands out as a source of essential fatty acids. *Carthamus tinctorius* L. (safflower) is a plant of Asteraceae family presenting approximately nineteen species of *Carthamus* genus, which are widespread in Asia and the Mediterranean regions [12]. Safflower is extensively cultivated in many countries and, from the seeds, one of the most common vegetable oils rich in linoleic acid [13] is obtained. This oil was used in order to prevent cancer [14], as a food antioxidant [15], as an antihypertensive [16]; and in diabetic rats it produced a hypoglycemic effect [17]. However, there is still little research investigating the impact of the consumption of this fatty acid on a developing organism.

Thus, the aim of the present study is to investigate whether the safflower oil [17], when offered to female rats during pregnancy and lactation, can interfere with the reflex and cognitive development of the offspring. Therefore, we analyzed which would be the

consequences on reflex maturation of infants, and the impact on memory and on the antioxidant defenses in hippocampal environment during adolescence for this offspring.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS

Eight adult primiparous females from Wistar lineage, from the Vivarium of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco, weighing $250 \pm 50\text{g}$ (mean \pm standard deviation), were used for obtaining the neonates. After mating and pregnancy diagnosis, made by vaginal smear [18], the females were transferred to maternity cages and maintained in standard conditions of temperature $22^\circ\text{C} \pm 1$, humidity of 65%, and in a light/dark cycle for 12 hours, receiving food and water ad libitum. On the day of birth, the offspring was standardized in six pups per offspring, with only males being used in the research. This study was submitted to the Animal Ethics Committee of the Biotechnology Center at the Federal University of Paraíba, and was approved under certificate No. 0407/13.

2.2 DIET

The animals received diets made according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN-93G) for pregnant and lactating rats [19]. In both diets, we used the content of 7% fat, only differing in lipid source. According to their respective diets, two groups were formed: Control (C) receiving soybean oil as dietary lipid source, and Safflower (SF), the lipid source of which was safflower oil; the diets were offered from the 14th day of gestation and during lactation. The brand of Safflower oil used was Nature®. The chemical composition of the diets is shown in Table 1.

PLEASE INSERT TABLE 1 ABOUT HERE

2.3 PROFILE OF FATTY ACID OF OILS USED IN THE DIETS

The fatty acid profile of the oils used in the diets offered to animals was analyzed. The oil lipid extract was obtained using the [20] method and performed according to the methodology described by [21]. The identification and quantification of fatty acid esters was carried out by gas chromatography (VARIAN 430-GC, California, USA), coupled with a flame ionization detector (FID), fused silica capillary column (CP WAX 52 CB, VARIAN) with dimensions of 60m x 0.25mm and 0.25 μm film thickness. Helium was used as carrier gas (flow rate of 1

ml/min). The initial oven temperature was 100°C, with programming for achieving 240°C, adding 2.5°C per minute, for 20 minutes. The injector and detector temperatures were maintained at 250°C and 260°C respectively. The chromatograms were recorded on Galaxie Chromatography Data System software. The fatty acids were identified by comparison of retention times of the methyl esters of the samples with standards Supelco ME19-Kit (Fatty Acid Methyl Esters C6-C22). The results of the fatty acids were quantified by normalization of methyl esters areas and expressed in area percentage (Table 2).

PLEASE INSERT TABLE 2 ABOUT HERE

2.4 MATERNAL FOOD INTAKE

The control of maternal food intake was performed weekly (7, 14 and 21 days) with the help of a semi-analytical Balmax scale (model: ELP - 25).

2.5 EVALUATION OF THE INDICATORS OF NEONATE REFLEX DEVELOPMENT

2.5.1. Reflex maturation

The reflex responses were analyzed daily between 12am-2pm, from the 1st to the 21st postnatal day. The response was considered consolidated when the expected reflex reaction was repeated for three consecutive days, with the 1st day of appearance or disappearance being considered the day of consolidation. The maximum observation time considered was one of 10 seconds. The researched reflexes followed the experimental model established by [22] for the rat. The following reflections were evaluated:

- a) Palmar Grasp (PG) - using a metal rod approximately 5 cm long by 1mm diameter, a light percussion is made on the palm of the right and left front paw of each animal. In response, rapid flexion of the toes ensues. With newborn development, this response disappears.
- b) Righting Reflex (RR) - The rat was placed supine on a flat, smooth surface. In response, we observed a return to the prone position. The response was considered positive when the animal took the prone position, supported on all fours.

- c) Vibrissae Plasing (VP) - The pup was suspended by the tail, so that its whiskers lightly touched the edge of a flat surface. In response, the animal put the two front feet on the table and performed gait movements, associated with trunk extension.
- d) Cliff Avoidance (CA) - The animal was placed on a flat and high surface (table), with its front paws on the edge of the table so that it detected the cliff. In response, the animal moved to one side and walked in the opposite direction of the edge, featuring Cliff Avoidance.
- e) Negative Geotaxis (NG) - The animal was placed in the center of a ramp measuring 34 x 24 cm, coated with non-slip paper (crepe paper), with an approximate inclination of 45°, with the head at the bottom of the ramp. In response, the animal turned the body at an angle of 180°, positioning the head upwards.
- f) Free Fall Righting (FFR) - The animal was held on four legs, with the back facing down, at a height of 30 cm, and was dropped in free fall on a synthetic foam bed (30 x 12 cm). In response, the animal recovers the position during free fall, falling on the surface supported on all fours.
- g) Auditory Startle (AS) - The animal was subjected to an intense, sudden sound stimulus produced by a metal drum stick on a metal container (6 cm diameter x 1.5 cm high) at a distance of approximately 10 cm from the head. In response, there is a retraction of the anterior and posterior legs, with rapid and involuntarily immobilization of the animal body.

2.6. EVALUATION OF MEMORY IN ADOLESCENCE

2.6.1 Open-field habituation test

When they reached adolescence (42 days), the animals were tested in the open field device consisting of a circular arena (1m in diameter) closed by white walls (50 cm high), divided into 17 fields. Each animal was placed individually in the center of the device for 10 min for ambulation observation. After seven days the procedure was repeated. The device was sanitized with a solution of 10% alcohol after each behavior session. The sessions were recorded with a video camera installed on the ceiling. The procedure was validated by [23].

2.6.2 Object recognition test

The object recognition test was performed 3 days after the open field habituation test, using the same open field arena.

This test consists of 4 steps: habituation to the experimental arena, training session, test session and retest session. During habituation, the animals freely explored the arena for 5 minutes in the absence of any specific stimulus. In the training session, animals were placed in the arena containing two different objects (A1 and A2) for free exploration for 10 minutes, for the animal to recognize and identify A1 object as familiar. After 180 minutes, the test session took place, to evaluate short-term memory, in which the animals were placed in the arena containing two objects, A1 (familiar object) and A3 (novel object), to explore freely for 5 minutes. After seven days, the animals were subjected to retest, in order to assess the long-term memory. The animals were placed in the arena to freely exploit A1 (familiar object) and A4 (novel object) objects. The exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or front legs [24].

The objects and equipment were cleaned with 10% alcohol after each animal exposure to the arena. The objects used were suitable for pets. The sessions were filmed with a video camera installed on the ceiling. After behavioral analysis, animals were anesthetized and decapitated. The brains were carefully removed, rinsed in ice-cold saline, dried on filter paper and hippocampi were rapidly dissected.

2. 7 OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS

2.7.1 Evaluation of Malondialdehyde production

A total of 0.2 µg/ml hippocampus homogenate was used to measure malondialdehyde production [1] following reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 100 °C according to the method of Draper. In the TBA test reaction, malondialdehyde [1] or MDA-like substances react to produce a pink pigment with a maximum absorption at 535 nm. The reaction was developed by the sequential addition to the sample of 30% trichloroacetic acid and Tris-HCl (3mM) followed by thorough mixing and centrifugation at 2 500 g for 10 min. Supernatant was transferred to another tube and 0.8% TBA (v/v) was added before mixing and boiling for

30 min. After cooling, the absorbance of the organic phase was read at 535nm in a spectrophotometer. Results were expressed as nmol per mg of protein [26].

2.7.2 Superoxide dismutase assay

The determination of total superoxide dismutase enzyme activity (t-SOD) was performed according to the method of Misra and Fridovich[27]. Supernatants (0.1 mg) collected from homogenized hearts following centrifugation were incubated with 880 µL sodium carbonate (0.05%, pH 10.2, 0.1 mM EDTA) at 37°C before development of the reaction by the addition of 30 mM epinephrine (in 0.05% acetic acid) and determined by measuring the kinetic of the inhibition of adrenaline auto-oxidation at 480 nm expressed at U/mg protein.

2.7.3 Catalase assay

Catalase (CAT) activity was measured according to the method described by Aebi [28]. The principle of the assay is based on the determination of the rate constant (k) of H₂O₂ decomposition, which in our conditions of temperature and pH was defined as 4.6 x10⁷. The rate constant of the enzyme was determined by measuring change in absorbance (at 240 nm) per minute over a 4 minute period and the CAT activity was expressed as U/mg protein.

2.7.4 Glutathione S-transferases activity

Glutathione S Transferase (GST) is an antioxidant enzyme involved in the detoxification of a wide range of toxic agents including peroxide and alkylating agents present in the brain. The activity of GST was measured by the method described by Habig et al. (1974). The principle of the assay is based on the determination through absorbance spectroscopy of the conjugation of 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione (GSH). Absorbance is measured at 340nm. One unit of enzyme conjugates 10.0 nmol of CDNB with reduced glutathione per minute.

2.7.5 Reduced Glutathione (GSH) levels

Three hundred µg of protein was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 5 mM-EDTA and incubated with o-Phthaldialdehyde (OPT) at room temperature for 15 min. Fluorescence intensity measured at 420 nm and excitation at 350 nm. To determine the levels of GSH in each sample, a standard GSH curve was prepared with known concentrations (0.25-10 nM) also incubated with OPT [29].

2.8 DRUGS AND REAGENTS

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

2.9. STATISTICAL ANALYSIS Results are expressed as mean \pm S.E.M. Student t-test was performed to assess significant differences between the groups. Data were considered as statistically significant for $p < 0.05$. All data were plotted and the statistical analysis performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTS

3.1 MATERNAL FOOD INTAKE

Regarding feed intake during pregnancy, when C group was confronted with SF group, they respectively presented: 7th day (97.33 ± 11.01 x 97 ± 15.09), 14th day (122 ± 14.42 x 113.05 ± 1.91) and 21th day (105.33 ± 35.23 x 90.5 ± 16.11) showing that there was no statistical difference between the groups.

Regarding feed intake during lactation, there was also no difference between the groups, where C group compared to SF group respectively

presented: 7th day (156.67 ± 47.59 x 123.5 ± 27.66), 14th day (234.67 ± 15.01 x 179.25 ± 34.65), 21st day (291.33 ± 44.73 x 262 ± 61.60).

3.2. EVALUATION OF INDICATORS OF NEONATE REFLEX DEVELOPMENT

3.2.1. REFLEX ONTOGENY

Regarding the ontogenesis of reflex responses we could note that the results between the groups were similar as to the disappearance of palmar grasp and appearance of other reflexes, such as righting reflex, cliff avoidance, negative geotaxis, free fall righting and auditory startle. However, the SF group had delayed Vibrissae placing [10 (9-11)] compared with C group [7.5 (5-10)] ($p < 0.05$) (Table 3).

3.3. MEMORY ASSESSMENT

3.3.1. Open Field Habituation test

The analysis of total ambulation did not allow the identification of significant differences between C group (75.17 ± 12.75) and SF group (80.17 ± 8.132), during the 1st and 2nd exposures (Figure 1).

3.3.2. Object recognition test

Regarding short-term memory (180 minutes after training), animals from SF group explored the novel object more than the familiar object (C group: familiar object: 4.636 ± 1.114 s; novel object: 6.727 ± 1.794 s; SF group: familiar object: 4.333 ± 1.218 s, novel object: 9.714 ± 2.302 s * $p < 0.05$) (Figure 2).

A similar result was observed in the retest session, which evaluates the long-term memory (7 days afterwards), where animals from SF group significantly explored the novel object when compared with the familiar object

(C group: familiar object: 4.167 ± 0.8149 s; novel object: 5.250 ± 1.045 s, SF group: familiar object: 4.733 ± 1.102 s; novel object: 8.000 ± 1.016 s * $p < 0.05$) (Figure 3).

3.4 OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS

We observed that safflower oil decreases lipid peroxidation as judged by malondialdehyde [1] levels (Ct: 1.75 ± 0.09 nmol/mg prot, n=4; SF: 0.56 ± 0.05 nmol/mg prot, n=4, $p < 0.001$). Safflower oil induces this significant decrease in MDA levels by influencing the main antioxidant defense (i.e SOD, CAT, GST and GSH levels). The SF group showed enhanced antioxidant defenses. SOD activity: C: 72.8 ± 12.5 U/mg prot, n=4; SF: 122.1 ± 8.08 U/mg prot, n=4, $p < 0.05$; CAT activity: C: 0.62 ± 0.17 U/mg prot, n=4; SF: 1.25 ± 0.19 U/mg prot, n=4, $p < 0.05$; GST activity: C: 25.6 ± 3.37 U/mg prot, n=5; SF: 40.1 ± 3.53 U/mg prot, n=5, $p < 0.01$ and GSH levels: C: 0.37 ± 0.03 nM, n=4; SF: 0.46 ± 0.01 nM, n=5, $p < 0.05$. Data suggest that the dietetic source of safflower oil improves antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in hippocampus (Figure 4).

4.0 DISCUSSION

The addition of safflower oil to maternal diet during pregnancy and lactation has been able to slow the reflex ontogeny of newborns, improve memory, reduce lipid peroxidation and optimize antioxidant defenses at hippocampal level of adolescent rats. The data showed that the experimental diet resulted in a delay in the development of cliff avoidance reflex by the whiskers. In the postnatal period, the cerebellum reaches its peak of development through events such as: proliferation of neuronal cells and glia, synapses and myelination [30]. The reflex ontogeny involves the maturation of the visual, auditory and motor systems [31]. As lipids make up the plasma membranes and myelin, dietary changes to this macronutrient can compromise the functionality of these structures inducing delay of this maturation. Results that are opposed to the findings in this study were observed when rats were treated during gestation and lactation with vegetable hydrogenated fat, with no change being observed in this reflex maturation [32]. On the other hand, when in this same period, the animals received a diet containing goat milk fat, a source of various types of lipids, this parameter was accelerated [11]. These findings show that both the quantity and quality of lipids taken by the mother interfere in this process.

The open field habituation test is a form of non-associative learning. With repeated exposure to the same environment, decreased locomotion is considered a memory index [24]. In this research, there was no habituation (decreased locomotor activity) of the SF group, with the two exposures being compared to open field. A similar result was found by [1] who treated animals with high concentrations of PUFA and found no significant change in locomotor activity between the groups. However, [24] showed that fish oil supplementation enhanced behavioral habituation, indicating memory facilitation. Noteworthy, in this study there was no feeding supplementation or administration of a hyperlipidic diet, the diet was normolipidic, only lipid quality was changed.

Memory acquisition is a process involving molecular events, such as activation of a signaling cascade of several neurotransmitters, including glutamate [33] and acetylcholine [34]. Initially, memory is stored in the hippocampus and, after a few weeks, is consolidated in the cerebral cortex [5]. The working memory is mainly processed by the prefrontal cortex, involving visual-spatial/location processing, with the task of identifying an object [35].

The object recognition test evaluates the animals' declarative memory in the short- and long-term [24, 36]. The SF group displayed a good performance on short and long-term novel

object recognition task, compared to C group. Safflower oil has significant levels of linoleic acid, the precursor of arachidonic acid. This fatty acid is in the membranes and is important for the formation of the retina neuronal and vascular system, and is associated with the development of these structures during the pre- and post-natal [37] period. This fact may have aided in the cognitive performance of the animals of SF group. A similar effect was obtained by [24] when animals were supplemented with fish oil from the prenatal period to old age, and data demonstrated that the animals took more time interacting with the novel object when compared to the control group, both at short and long-term, as well as in the present study.

The evidences show that increased oxidative stress in the hippocampus is strongly related to the impairment of memory function [38, 39] we evaluated the antioxidant capacity of the maternal intake of safflower oil on offspring hippocampus.

Besides the effects observed on cognitive performance and memory, data shows that the SF group presented a decreased lipid peroxidation and an improvement in antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in the hippocampus. Evidence show that increased oxidative stress in the hippocampus is strongly related to the impairment of memory function[9,10]. To the best of our knowledge, the present findings are the first to demonstrate that safflower dietetic intake can induce long-term beneficial effects on memory and cognitive function by reducing oxidative stress in the hippocampus.

Acknowledgements

The authors are thankful to FACEPE (Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ 1026.4-09/12) to provide funds to acquisition of the reagents used in this work and for the scholarship to GRFB. We also thanks to CNPq and CAPES for the scholarship to AAP and LARC, respectively.

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Table 1. Centesimal composition of experimental diets

Table 2. Fatty acid profile of diets

Table 3. Ontogeny of reflex responses of newborn rats from mothers submitted to the intake of control feed with content of 7% soybean oil and experimental feed with content of 7% safflower oil, from the 14th day of gestation and during lactation.

Figure 1. Total locomotion during the 1st and 2nd exposures to the open-field (A) and Total time exploration of novel or familiar objects during test (B) and retest sessions (C). The values are expressed as mean \pm SEM (T Student t - * p <0.05).

References

1. Venna, V.R., et al., PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. 34(2): p. 199-211.
2. Valenzuela, A.N., SK, Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importânciam en el desarollo del sistema nervioso y visual. . *Revista Chilena de Pediatría*, 2003. 74(2): p. 9.
3. Valenzuela, A. and M.S. Nieto, [Docosahexaenoic acid (DHA) in fetal development and in infant nutrition]. *Rev Med Chil*, 2001. 129(10): p. 1203-11.
4. Salvati, S., et al., Diet, lipids and brain development. *Dev Neurosci*, 2000. 22(5-6): p. 481-7.
5. Lisman, J., H. Schulman, and H. Cline, The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(3): p. 175-90.
6. Morgane, P.J.M., D.J.; Galler, J.R. , Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2002. 26: p. 12.
7. Morgane, P.J.M., M.; Kempler, T.; Stern, W.; Forbes W.; Hal R.; Bronzino, J.; Kissane J. , Prenatal malnutrition and development of the brain. . *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 1993. 17(1): p. 27.
8. Salvati, S., et al., Dietary prenatal lipids affect myelin gene expression in postnatal undernourished rats. *Nutr Neurosci*, 2002. 5(4): p. 243-50.
9. Paixão, A.D.O.T., A. S.; Dantas, A. C.; Barreto, I. S. S.; Vieira Filho, L. D.; Medeiros, M. C.; Teodosio, N. R.; Guedes, R. C. A. , Impact of two early malnutrition models on renal and neural functions in rats., in *Malnutrition in the 21st Century* Editor, L.W. Vesler, Editor. 2007. p. 239-263.
10. Santillan, M.E., et al., Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different omega-6:omega-3 ratios in mice. *Nutrition*, 2010. 26(4): p. 423-31.
11. Soares, J.K., et al., Acceleration of reflex maturation and physical development in suckling rats: effects of a maternal diet containing lipids from goat milk. *Nutr Neurosci*, 2014. 17(1): p. 1-6.
12. Suleimanov, T.A., Phenolic compounds from *Carthamus tinctorius*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2004. 40(1): p. 3.
13. Cho, S.H., et al., Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed high-cholesterol diets. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2004. 50(1): p. 32-7.
14. Izuru, A.Y., T; TETSUYA, W.; SACHIKO, A.; KENSUKE, M.; TAKAO, K.; KAZUO, N. , Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF-κB via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. . *International Immunopharmacology*, 2002. 2(8): p. 8.
15. Zhang, H.L., et al., Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1997. 45(12): p. 1910-4.
16. Liu, F.W., Y.; Yang, X. Z.; Li, F. G.; Hu, J.; Cheng, R. F, Hypotensive effects of safflower yellow in

spontaneously hypertensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin II level. *Acta pharmaceutica Sinica*, 1992. 27(10): p. 3. 17. Asgary, S., et al., Antidiabetic effect of hydroalcoholic extract of *Carthamus tinctorius* L. in alloxan-induced diabetic rats. *J Res Med Sci*, 2012. 17(4): p. 386-92. 18. Marcondes, F.K.B., F. J.; Tanno, A. P. , Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 2002. 62(4): p. 6. 19. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, 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. *J Nutr*, 1993. 123(11): p. 1939-51. 20. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957. 226(1): p. 497-509. 21. Hartman, L. and R.C. Lago, Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract*, 1973. 22(6): p. 475-6 passim. 22. Smart, J.L. and J. Dobbing, Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*, 1971. 28(1): p. 85-95. 23. Platel, A.P., R.D. , Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. . *Psychopharmacology*, 1982. 78: p. 7. 24. Rachetti, A.L., et al., Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behav Brain Res*, 2013. 237: p. 283-9. 25. Draper, H.H., et al., A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*, 1993. 15(4): p. 353-63. 26. Nascimento, L., et al., The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: Role of mitochondria and oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2014. 27. Misra, H.P. and I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972. 247(10): p. 3170-5. 28. Aebi, H., Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984. 105: p. 121-6. 29. Hissin, P.J. and R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, 1976. 74(1): p. 214-26. 30. Altman, J.B., S.A., Development of the cerebellar system. . Relation to its evolution, structure and functions. 1997, New York. 783. 31. Smart, J.L. and J. Dobbing, Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*, 1971. 33(2): p. 303-14. 32. Borba, J.M.C.S., M.S.P.; Rocha-de-Melo, A.P. , Lipids, Nutrition and Development. *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. 2011. 95.

33. Bach, S.A., et al., Dietary omega-3 deficiency reduces BDNF content and activation NMDA receptor and Fyn in dorsal hippocampus: implications on persistence of longterm memory in rats. Nutr Neurosci, 2014. 17(4): p. 186-92. 34. Popovic, N.C.-B., M.; Popovic, M., Post-Training Scopolamine Treatment Induced Maladaptive Behavior in Open Field Habituation Task in Rats. Plos One, 2014. 9(6): p. 4. 35. Faw, B., Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. Conscious Cogn, 2003. 12(1): p. 83-139. 36. Karasawa, J., K. Hashimoto, and S. Chaki, D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. Behav Brain Res, 2008. 186(1): p. 78-83. 37. Muskiet F.A.J.; Goor, S.A.V.K., R.S.; Velzing-Aarts, F.V.; Smit, E.N.; Bouwstra, H.; DijckBrouwer, J.D.A.; Boersma, E.R.; Hadders-Algra, M., Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. . Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2006. 75: p. 9. 38. Wang, Z.Q., et al., A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. J Pharmacol Exp Ther, 2004. 309(3): p. 869-78. 39. Ibi, M., et al., Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. J Neurosci, 2008. 28(38): p. 9486-94.

Table 1 - Composition of control and experimental diets.

Ingredients (g/kg)	Diets	
	Control	Safflower
Cornstarch	540,0	540,0
Casein	190,0	190,0
Soybean Oil	70,0	0,0
Safflower Oil	0,0	70,0
Fiber	50,0	50,0
Mineral Mix	35,0	35,0
Vitamin Mix	10,0	10,0
L-Metionin	3,0	3,0
Choline Bitartrate	2,5	2,5
Tert-butylhydroquinone	0,014	0,014
Total Calories (Kcal)	3562,0	3562,0

Table 2. Fatty acid percent composition of the diets

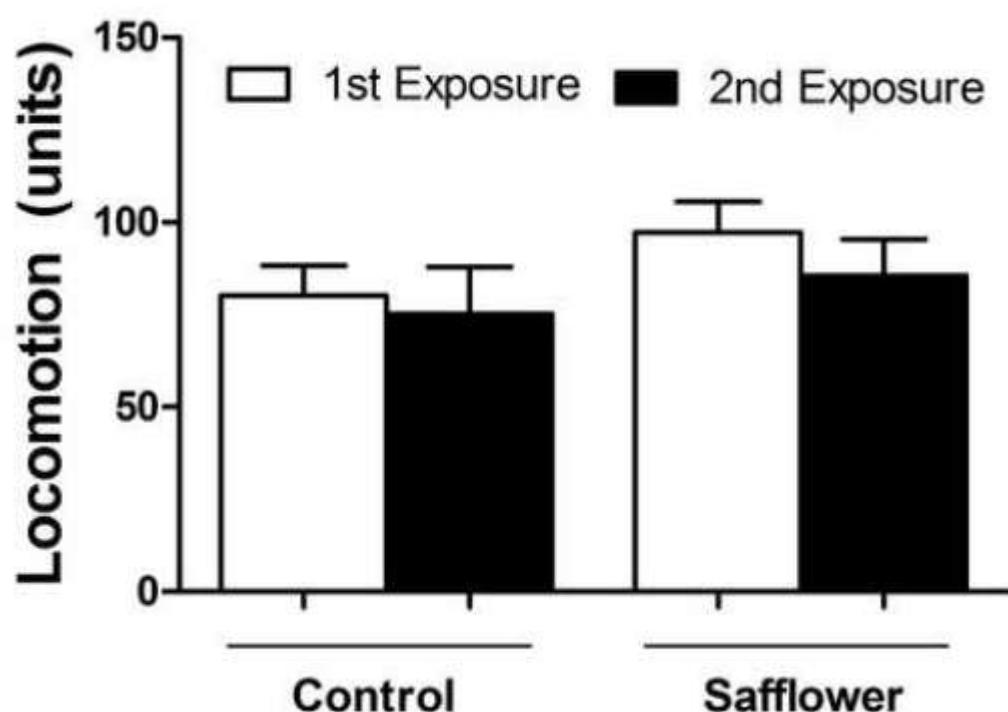
Fatty acid	Soybean Oil	Safflower Oil
C14:0	0.42	0.08
C15:0	-	0.02
C16:0	17.10	8.91
C17:0	0.34	-
C18:0	5.93	3.95
C18:1(n9)	28.53	29.06
C18:2(n6)	42.56	50.86
C18:3(n6)	1.89	0.25
C19:0	-	3.76
C20:0	0.00	0.69
C20:1(n9)	2.18	0.80
C22:0	0.53	0.56
C20:1(n9)	-	0.80
C22:6(n6)	-	0.22
Others	0.52	0.04
Total (%)	100	100

Values are means of triplicate measurements.

Table 3 - Reflex ontogeny responses from neonatal rats that mothers consuming diet with 7% of soybean oil and experimental diet content 7% of safflower oil, from the 14th day of gestation and during lactation.

Reflex Maturation	Groups	
	Control (n=12)	Safflower (n=8)
Palmar Grasp	5 (4-6)	5 (3-6)
Righting Reflex	4.5 (2-7)	4 (2-7)
Cliff Avoidance	7.5 (5-10)	10 (9-11)*
Vibrissa Placing	7 (4-10)	8 (6-10)
Negative Geotaxis	15 (11-19)	18 (12-19)
Free-Fall Righting	14 (11-17)	15 (13-17)
Auditory Startle	13.5 (11-16)	13 (11-13)

* $p < 0.05$ versus Control; The data are shown as median (minimum and maximum) values.



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



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 21 de janeiro de 2015.

Ofício nº 01/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.ª Manuella Batista de Oliveira Hornsby
Departamento de Nutrição - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.035498/2014-57

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, **"Ingestão alimentar excessiva influencia os efeitos da suplementação com óleo de cártamo?"**

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 da UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 7 a 45 dias; Peso: 15 a 150g; Sexo: machos; Nº total de animais: 40.

Atenciosamente,

[Assinatura]
Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPF 1801584

CCB: Integrar para desenvolver