

**PATRÍCIA FORTES CAVALCANTI DE MACÊDO**

EXERCÍCIO EM ESTEIRA PROMOVE AÇÃO ANSIOLÍTICA E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A EXCITABILIDADE  
CEREBRAL EM RATOS *WISTAR* ADULTOS

**RECIFE/PE**

**2016**

**PATRÍCIA FORTES CAVALCANTI DE MACÊDO**

**EXERCÍCIO EM ESTEIRA PROMOVE AÇÃO ANSIOLÍTICA E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A EXCITABILIDADE  
CEREBRAL EM RATOS *WISTAR* ADULTOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby.

**RECIFE/PE**

**2016**

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

M141e      Macêdo, Patrícia Fortes Cavalcanti de.  
Exercício em esteira promove ação ansiolítica e sua associação com  
óleo de peixe reduz a excitabilidade cerebral em ratos *Wistar* adultos /  
Patrícia Fortes Cavalcanti de Macêdo.– 2016.  
80 f.: il.; tab.; 30 cm.

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

1. Lipídios. 2. Exercício. 3. Sistema nervoso. 4. Metabolismo. I.  
Hornsby, Manuella Batista-de-Oliveira (Orientadora). II. Título.

612.3      CDD (23.ed.)                      UFPE (CCS2016-220)

PATRÍCIA FORTES CAVALCANTI DE MACÊDO

EXERCÍCIO EM ESTEIRA PROMOVE AÇÃO ANSIOLÍTICA E  
SUA ASSOCIAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE REDUZ A  
EXCITABILIDADE CEREBRAL EM RATOS *WISTAR* ADULTOS

**Dissertação aprovada em 04 de março de 2016**

**Banca examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Belmira Lara Silveira Andrade da Costa  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angélica da Silva Tenório  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

---

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

**RECIFE**

**2016**

**Dedico a todos os envolvidos com a pesquisa que tornaram possível a realização deste trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço a minha mãe Benigna, ao meu pai Arnaldo, aos meus irmãos Lucas e Gabriel e a minha avó Benigna pelo apoio incondicional e por serem minhas fontes de inspiração para o meu crescimento profissional.**

**A minha Orientadora Profa. Dra. Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby pela oportunidade de aprendizado e lições sobre a experiência de ensino e pesquisa.**

**As minhas amigas e companheiras de mestrado Laís e Stella, por TODAS as madrugadas e dias intermináveis de laboratório, pelos almoços compartilhados, pela troca de conhecimento e pela paciência e amizade sincera todos os dias e, principalmente, nos dias de exaustão. Elas, sem dúvida, tornaram esse desafio mais leve.**

**A equipe do LAFINNT, pelo espaço físico e disposição em a ajudar, Professor Dr. Ricardo Guedes, Rose, Larissa, Elian, Nora, Mari, Suênia e Regina. E em especial ao Professor Dr. Rubem Guedes, sempre muito sábio e solícito, com um espírito de cooperação admirável.**

**A professora Dra. Claudia Lagranha e Dr. Eduardo Lira pelas colaborações. Em especial a aluna Cris e aos alunos Humberto e Ivan pela gentileza e disponibilidade.**

**Ao médico veterinário Edeones França pelo cuidado e preocupação com o bem estar dos animais e pelos ensinamentos sobre o biotério.**

**Aos alunos de iniciação científica Keyla, Rai e Roberta pelo auxílio nas etapas experimentais.**

**A todas as amigas, amigos e demais familiares pelos momentos de confraternização e apoio.**

“Many practical questions regarding the design of diets to specifically improve brain function, such as type, frequency and amount of nutrients that constitute healthy brain food, remain to be answered, but we are beginning to uncover the basic principles that are involved in the actions of foods on the brain” (FERNANDO GÓMEZ-PINILLA)

## RESUMO

As doenças crônicas e mentais ameaçam à saúde dos indivíduos. As estimativas do *Global Burden of Disease Project* sugerem que nos continentes americanos os distúrbios mentais correspondam a cerca de 30,7% dos anos perdidos por incapacidade. Duas estratégias terapêuticas complementares têm tido atenção da comunidade científica que são o uso de óleo de peixe e o exercício físico. Evidências demonstram efeitos benéficos destes recursos no metabolismo, cognição e ansiedade. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos adultos, os efeitos da associação entre a suplementação com óleo de peixe e exercício físico forçado sobre glicemia de jejum, perfil lipídico plasmático, triglicerídeos, memória episódica, ansiedade e eletrofisiologia cortical. Foram utilizados 45 ratos da linhagem *Wistar*, do biotério da UFPE, divididos em 2 grupos: Óleo de Peixe (OP) ou Veículo (V) e subdivididos em Exercitados (Ex) ou controle Sedentário (S). Após o desmame, os animais foram alimentados com a dieta de manutenção do biotério *PRESENCE* e a partir dos 90 aos 120 dias de vida tanto os animais do grupo Ex, quanto os S foram suplementados por gavagem com OP ou V. A partir dos 120 dias de vida realizaram-se coletas de dados murinométricos, glicemia, soro, respostas comportamentais e eletrofisiologia cortical. Foram avaliados 4 grupos experimentais contendo de 10-13 animais cada. Os resultados indicam que a suplementação com OP e o Ex forçado em esteira não alteraram parâmetros murinométricos e metabólicos dos animais. Mas que o Ex reduziu o comportamento ansioso e a excitabilidade cerebral, e que a dosagem de OP se mostrou um limiar para mudanças comportamentais e eletrofisiológicas no grupo suplementado, potencializando o efeito do Ex. Neste contexto, pode-se sugerir que a redução na excitabilidade cerebral ocasionada pelo exercício e potencializada pelo OP pode ser um mecanismo pelo qual essa associação pode ser benéfica para saúde neural.

Palavras-chave: Lipídios. Exercício. Sistema nervoso. Metabolismo.



## **ABSTRACT**

Chronic and mental diseases threaten the health of individuals. Scientific community have had attention for two complementary modalities: fish oil and exercise. Evidence has shown beneficial effects on metabolism, cognition and anxiety. The aim of this study was to evaluate, in adult rats, the effects of the association between supplementation with fish oil and forced exercise on fasting plasma glucose, plasma lipid profile, triglycerides, episodic memory, anxiety and cortical electrophysiology. 45 Wistar rats were used, they were divided into 2 groups: Fish Oil (FO) or vehicle (V) and divided into exercised (Ex) or Sedentary control (S). After weaning, animals were fed in PRESENCE maintenance diets. From 90 to 120 days of life both Ex and S animals were orally supplemented with V or OP. From the 120 days of age the blood glucose, murinometric parameters, serum samples, behavioral responses and cortical electrophysiology were recorded. 4 experimental groups were evaluated containing 10-13 animals each. The results indicate that supplementation with FO and forced treadmill Ex does not change murinometric and metabolic parameters of the animals, however, as Ex reduced anxious behavior and brain excitability, and that the dose OP showed a threshold for behavioral and electrophysiological changes in the supplemented group, potentiating the effect of Ex. In this context, it may be suggested that the reduction in the brain excitability caused by exercise and boosted by the FO can be a mechanism by which this association may be beneficial for neural health.

**Keywords:** Lipids. Exercise. Nervous system. Metabolism.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Parâmetros para o treinamento físico.....	28
------------------------------------------------------------	----

## RESULTADOS

<b>TABELA 1.</b> (A) Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e (B) Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA) de ratos adultos.....	38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1A.</b>	Divisão dos grupos experimentais .....	27
<b>FIGURA 1B.</b>	Sequência cronológica de eventos experimentais.....	27
<b>RESULTADOS</b>		
<b>FIGURA 1.</b>	Peso corporal de animais adultos.....	35
<b>FIGURA 2.</b>	(A) Índice de Massa Corporal (IMC) e (B) Razão circunferência abdominal/ circunferência torácica (CA/CT) de ratos adultos.....	36
<b>FIGURA 3.</b>	Glicemia plasmática (A), perfil lipídico (B-D), triglicerídeos (E) e índice aterogênico (F) de ratos adultos.....	37
<b>FIGURA 4.</b>	Testes de identidade do objeto (A) e reconhecimento espacial (B) representados pelo percentual do índice de discriminação dos animais adultos.....	39
<b>FIGURA 5.</b>	(A) figura do crânio de roedor adaptada de Francisco e Guedes (2015) e as variações de lenta voltagem (VLV) registradas nos pontos 1 e 2 em quatro animais adultos; (B) Velocidade de propagação da DAC (mm/s) em animais adultos.....	40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AEC</b>	Atividade elétrica cortical
<b>AGPI</b>	Ácidos graxos poliinsaturados
<b>AGPICL</b>	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
<b>ANOVA</b>	Análise da Variância
<b>AKT</b>	Proteína quinase B ( <i>Protein Kinase B</i> )
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro ( <i>Brain-derived neurotrophic fator</i> )
<b>CAMKII</b>	Cinase dependente de calmodulina tipo II ( <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II</i> )
<b>CS</b>	Citrato sintetase
<b>CREB</b>	Proteína ligante de resposta ao AMPc ( <i>cAMP response elemento-binding</i> )
<b>DAC</b>	Depressão alastrante cortical
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenóico
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>EPA</b>	Ácido docosapentaenóico
<b>HDL</b>	Proteína de alta densidade ( <i>High density lipoprotein</i> )
<b>Ex</b>	Exercício
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>KCL</b>	Cloreto de Potássio
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevada
<b>LDL</b>	(Proteína de baixa densidade ( <i>Low density lipoprotein</i> ))
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>NMDA</b>	N-Metil- D-Aspartato
<b>NR2B</b>	Receptor 2B do N-Metil D-Aspartato ( <i>NMDA recptor 2B</i> )
<b>OFT</b>	Teste de Campo Aberto ( <i>Open Field Test</i> )
<b>OP</b>	Óleo de peixe
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>STX 3</b>	Sintaxina 3
<b>TRO</b>	Teste de reconhecimento de objetos
<b>TCA</b>	Teste de adaptação ao campo aberto
<b>V</b>	Veículo
<b>VET</b>	Valor energético total
<b>VLV</b>	Variação de lenta voltagem
<b>VO<sub>2</sub></b>	Volume de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b>	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
<b>2.1</b>	Repercussões dos ácidos graxos n-3 e do exercício físico em indicadores metabólicos	16
<b>2.2</b>	Efeitos dos ácidos graxos n-3 no comportamento ansioso e memória	19
<b>2.3</b>	Implicações dos ácidos graxos n-3 e do exercício na eletrofisiologia cerebral	22
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	24
	<b>OBJETIVO GERAL</b>	24
<b>3.1</b>	<b>Objetivo específico</b>	25
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b>	25
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	26
<b>5.1</b>	<b>Delineamento experimental</b>	26
<b>5.2</b>	<b>Procedimentos gerais para o treinamento físico</b>	28
<b>5.3</b>	<b>Determinações ponderais</b>	28
<b>5.3.1</b>	<i>Evolução ponderal</i>	28
<b>5.3.2</b>	<i>Avaliação murinométrica</i>	29
<b>5.4</b>	<b>Análise comportamental</b>	29
<b>5.4.1</b>	<i>Labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	29
<b>5.4.2</b>	<i>Open Field Test (OFT)</i>	30
<b>5.4.3</b>	<i>Tarefa de reconhecimento de objetos (TRO)</i>	30
<b>5.5</b>	<b>Registro eletrofisiológico</b>	32
<b>5.6</b>	<b>Perfil lipídico plasmático</b>	33
<b>5.6.1</b>	<i>Análises bioquímicas</i>	33
<b>5.6.2</b>	<i>Dosagens das frações lipídicas</i>	33
<b>6.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	34
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	35
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	51
<b>9.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	47
	<b>REFERÊNCIAS</b>	48
	<b>APÊNDICES</b>	61
	<b>APÊNDICE A</b> – artigo submetido “Applied Physiology, Nutrition and Metabolism”	61
	<b>ANEXO A</b> – Folha de aprovação da CEUA do CCS/UFPE	82

## 1. APRESENTAÇÃO

Os países em todo mundo têm enfrentado o desafio do envelhecimento populacional associado ao rápido aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis. Além disto, um novo panorama torna-se importante neste cenário, que são as consequências sanitárias e sociais das doenças mentais, bem como sua ameaça para a saúde dos indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). As estimativas do *Global Burden of Disease Project* (WHO, 2014) sugerem que nos continentes americanos os distúrbios mentais sejam responsáveis por cerca de 30,7% dos anos perdidos por incapacidade.

A WHO dispôs que uma solução potencial para o problema poderá se dá por meio do reconhecimento dos pontos em comum entre doenças mentais e outras doenças crônicas, como as cardiovasculares, não só por compartilharem determinantes e consequências, mas também estratégias de cuidados à saúde para sua prevenção e manejo (WHO, 2014)

Nesse contexto, duas estratégias associadas ao estilo de vida têm sido alvo de pesquisas científicas tanto para manutenção da saúde cardiovascular quanto para o adequado funcionamento cerebral, que são o consumo de fontes de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) do tipo ômega 3 (n-3) e a prática regular de exercício físico moderado (KRAUSS et al. 2000; CHYTROVA et al. 2010; GOMEZ-PINILLA & TYAGI 2013; MAEHRE et al. 2015).

A utilização de AGPI n-3, como os presentes no óleo de peixe (OP), e/ou o exercício físico moderado em pesquisas experimentais se mostram importantes para redução de fatores de risco cardiovasculares (HARRIS; BULCHANDANI, 2006; HILL et al., 2007; CARO et al., 2013) e apresentam implicações sobre funcionamento cerebral como redução do comportamento ansioso (FONTANI et al., 2005; STONEHOUSE et al., 2013), melhores performances em testes de memória (O'CALLAGHAN; OHLE; KELLY, 2007; MELLO et al., 2008; COSTA et al., 2012) e influência na excitabilidade cerebral (SAUGSTAD, 2006; MUSTO; GJORSTRUP; BAZAN, 2011; YANGA et al., 2012).

No entanto, apesar de evidências na área de pesquisa, ainda não existe consenso sobre a duração e dose necessária para garantia de efeitos benéficos sobre metabolismo e comportamento, especificamente na fase adulta, onde a busca por suplementação e estratégias para prevenção de doenças associadas ao envelhecimento é maior, ou ainda, a implicação destes componentes quando vistos de forma associada, e não apenas isoladamente, uma vez que é clara a importância de ambos nos processos fisiológicos que envolvem a saúde metabólica e do sistema nervoso central (SNC).

Baseado nisto, a pergunta condutora do trabalho foi: a suplementação com OP associada ao exercício físico moderado em esteira diminuirá valores médios de indicadores fisiológicos relacionados a risco cardiovascular (medidas murinométricas, glicemia de jejum, perfil lipídico com melhora do comportamento ansioso, do desempenho em testes de memória, e eletrofisiologia cerebral de ratos *Wistar* adultos? A partir dessa pergunta chave e embasamento literário, desenvolveu-se a hipótese que a associação da suplementação com OP ao exercício físico moderado em esteira na vida adulta de ratos *Wistar* otimizará parâmetros associados à saúde metabólica e neural, de forma que melhorará valores médios dos parâmetros murinométricos, glicemia, perfil lipídico plasmático e triglicerídeos; diminuirá indicadores ansiogênicos com aumento na frequência de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) e na área central do teste de campo aberto (TCA); otimizará desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos (TRO), a julgar por maiores índices de discriminação para o reconhecimento do “novo” em detrimento do “familiar”; e diminuirá a excitabilidade cerebral observada pela diminuição na velocidade da depressão alastrante cortical (DAC).

Adicionalmente, é importante acrescentar que a escolha do modelo experimental com uso de roedores parte do pressuposto que estes representam com similaridade as respostas fisiológicas a diferentes tratamentos sobre murinometria, metabolismo glicêmico e lipídico (HARRIS, 1997; NOVELLI et al., 2007) entre ratos e humanos. Da mesma forma, os testes de LCE, TCA E TRO têm sido usados para estudar efeitos de tratamentos sobre comportamento ansioso (PELLOW et al., 1985; PRUT; BELZUNG, 2003) e aspectos da memória episódica (ENNACEUR; DELACOUR, 1988) de ratos que refletem com similaridade aquelas manifestadas por humanos. Já o uso da DAC para investigação experimental fornece uma maneira de estudar aspectos nutricionais e do desenvolvimento da eletrofisiologia cerebral e tem sido utilizado para avaliar a excitabilidade cerebral (GUEDES, 2005).

O presente estudo além de contribuir para o conhecimento sobre a magnitude do uso de AGPI n-3, tendo como fonte o OP, e exercício físico moderado em esteira sob parâmetros metabólicos e comportamentais, pode ainda, possivelmente, apresentar uma alternativa preventiva e/ou terapêutica prática e de baixo custo no manejo tanto de doenças cardiovasculares, quanto aquelas que afetam SNC. Esse fator é importante para a saúde pública, tendo em vista o impacto social e econômico destas enfermidades.

Portanto, a partir das evidências dos efeitos do AGPI n-3 e do exercício físico moderado na diminuição de fatores de risco cardiovascular, bem como no adequado funcionamento do SNC, a proposta do estudo é avaliar os efeitos da associação entre exercício físico forçado e

suplementação com OP sobre murinometria, glicemia de jejum, perfil lipídico sanguíneo, ansiedade, memória episódica e aspectos eletrofisiológicos corticais em ratos adultos.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 REPERCUSSÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 E DO EXERCÍCIO FÍSICO EM INDICADORES METABÓLICOS

Os ácidos graxos são descritos, de uma maneira geral, como compostos insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São lipídios com funções metabólicas essenciais e importância estrutural. Apresentam-se principalmente por triésteres de ácidos graxos unidos por uma molécula básica de glicerol (triacilgliceróis). Dentre as funções dos lipídios dietéticos no organismo pode-se considerar a importância como constituinte metabólico de maior capacidade calórica, a participação como veículos para vitaminas lipossolúveis e como componentes estruturais de outros hormônios e dos sais biliares (ROS et al., 2015).

A partir da ingestão dietética é possível se obter todos os ácidos graxos, desde saturados, insaturados, trans, de cadeia média, longa e muito longa. No entanto, apenas os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 não são sintetizados endogenamente pela incapacidade, em diversos animais e nos humanos, de inserir duplas ligações nos carbonos 3-4 e 6-7, por não possuírem a enzima delta-15-dessaturase, o que os tornam essenciais (CALDER; YAQOOB, 2009).

A classificação estrutural dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) se relaciona a posição da primeira dupla ligação de sua cadeia carbônica a contar a partir do grupamento metil e sua nomenclatura denota ao número de carbonos da cadeia, número de ligações duplas e posição da primeira ligação dupla relativa ao grupamento metil (MARTIN et al., 2006).

A ingestão dietética dos ácidos graxos ômega 3 e 6 de maior disponibilidade no meio ambiente e de menor cadeia carbônica, alfa linolênico (ALA, 18:3,n-3) e linoléico (LA, 18:2,n-6), respectivamente, garante que animais e humanos obtenham as propriedades biológicas dos lipídios poliinsaturados e sejam capazes de sintetizar seus compostos ativos de maior cadeia carbônica como o ácido araquidônico (20:4,n-6), os ácidos docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (CALDER, 2013).

O óleo de peixe (OP) é composto principalmente de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL) do tipo ômega 3 (n-3). O óleo é obtido a partir da carne do peixe ou do fígado de peixes magros. Os principais ácidos graxos n-3 presentes nesse composto são o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os quais compreendem cerca de 30% da composição dos óleos. Assim, 1g de cápsula de OP pode fornecer em média 0,3g de EPA e

DHA (CALDER, 2012). O *American Institute of Nutrition* recomenda que dietas experimentais de roedores adultos sejam formuladas com cerca de 40g de óleo de soja/kg de dieta para atingir as necessidades de ômega 6 e ômega 3 estipuladas para roedores em fase de manutenção (cerca de 12g e 6g por kg de dieta, respectivamente) (REEVES, 1997). LEE et al. (1989) propôs que a razão ômega 6/ômega 3 de valor igual a 5 é um ponto de grande influência na composição de lipídios dos tecidos e produção de mediadores inflamatórios como os eicosanóides dos ratos.

Altas razões entre consumo de ômega 6/ômega 3 são consideradas fator promotor para o desenvolvimento de diversas doenças associadas ao estilo de vida (SIMOPOULOU, 2011). Enquanto em tempos históricos, a razão entre esses dois ácidos graxos era em torno de 1:1, em países ocidentais essa relação chega a variar de 38-51:1 (PATTERSON et al., 2012).

Isso acontece porque o desequilíbrio nessa relação ocasiona uma maior produção de derivados dos ácidos graxos ômega 6, como as protraglandinas (PG) E2 e leucotrienos (LT) B4 sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA), que são mediadores inflamatórios e pro trombóticos mais potentes do que os produtos derivados do ômega 3 (PGE3 e LTB5, sintetizados a partir do EPA) (SIMOPOULOS, 2016).

O interesse entre a ingestão de AGPI e o desenvolvimento de doenças associadas ao estilo de vida vêm crescendo expressivamente desde publicação sobre o alto consumo de fontes de n-3 marinhas e o baixo risco de mortalidade por doenças cardiovasculares em esquimós da Groelândia (KROMHOUT; BOSSCHIETER; COULANDER, 1985).

Dentre os fatores responsáveis pela cardioproteção promovidos pelos AGPI n-3 estão a diminuição de triglicerídeos plasmáticos e remanescentes de lipoproteínas, melhoria da função endotelial e diminuição de respostas inflamatórias (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003).

A *American Heart Association* (AHA) propõe como estratégias para redução do risco por doenças cardiovasculares (DCV) a manutenção do peso, do perfil lipídico plasmático, a prática de atividade física e obtenção de hábitos alimentares saudáveis; como o consumo de peixe em pelo menos dois dias da semana (KRAUSS et al., 2000).

Associam-se ainda ao risco de desenvolvimento de DCV medidas como circunferência da cintura elevada e glicemia de jejum alterada, as quais fazem parte dos critérios para classificação da síndrome metabólica. Esse distúrbio está associado à deposição de gordura central e resistência à insulina que elevam o risco de mortalidade por distúrbio cardiovascular em cerca de 2,5 vezes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Muitos indivíduos recorrem à suplementação de fontes de ômega 3, como o OP, tanto para obtenção dos benefícios cardioprotetores, quanto para suprir ingestão alimentar deficiente.

No entanto, o efeito benéfico para populações saudáveis pode ser questionado a depender da dosagem e das formas de consumo de ômega 3 utilizadas (LAIDLAW; COCKERLINE; ROWE, 2014).

Ao utilizar o modelo animal para analisar alterações da composição corporal, NOVELLI et al. (2007) observaram que a circunferência da cintura, o índice de massa corporal (IMC) e a quantidade de gordura corporal são alterados em consequência do aumento da ingestão alimentar. Da mesma forma, HARRIS (1997) concluiu que apesar do metabolismo de ratos priorizar o transporte de colesterol pela partícula de HDL, e não de LDL, os animais exibem respostas similares nas concentrações de triglicerídeos após suplementação com óleo de peixe àquelas apresentadas por humanos.

Dentre os mecanismos responsáveis pelas alterações na composição corporal com o uso de n-3, COUET et al. (1997) demonstraram que doses diárias de 1.8g de n-3 durante 3 semanas aumentaram a oxidação de lipídios e com consequente redução na adiposidade em humanos.

As ações sobre os triglicerídeos plasmáticos são mais estabelecidas e três mecanismos gerais são usados para explicar porque AGPI n-3 podem reduzir a síntese de triglicerídeos: 1) redução da disponibilidade dos substratos (secundário ao aumento na beta-oxidação, diminuição da entrada e síntese hepática de ácidos graxos livres); 2) aumento da síntese de fosfolipídios ou 3) diminuição da atividade de enzimas que participam da síntese de triglicerídeos (diacilglicerol aciltransferase ou fosfato fosfolipídases) (HARRIS; BULCHANDANI, 2006)

No entanto, estudos com roedores demonstraram que a suplementação com doses de 0,8ml/kg de óleo de peixe foi capaz de otimizar a defesa antioxidante sem interferir em medidas corporais e perfil lipídico quando administrados por cerca de 13 semanas (Lluís et al. 2013; , Dasilva et al. 2015).

O exercício físico também é um meio essencial de se manter a saúde física e cardiovascular. Para indivíduos sedentários, a *American Heart Association* (2000) recomenda caminhada intermitente de 30 a 45 minutos por dia para prevenção do aparecimento de doenças cardiovasculares. E em indivíduos saudáveis, a prática regular de exercício físico aeróbico moderado se associou à diminuição da insulina, peso, IMC e melhora no perfil lipídico plasmático (CARO et al., 2013).

GOUTIANOS et al. (2015) demonstraram que ratos expostos a protocolo de exercício agudo por 7 dias até exaustão refletiram adequadamente respostas na bioquímica sanguínea semelhantes às exibidas por humanos sob exercício de mesma duração e intensidade. Roedores e humanos apresentaram diminuição na glicemia, colesterol total e triglicerídeos. Porém, o

exercício aeróbico a 80% da capacidade limiar de lactato com frequência de 5 vezes semanais durante 60 dias em ratos *Wistar* adultos se mostrou ser efetivo na redução do peso sem alterar o perfil lipídico plasmático (BOTEZELLI et al., 2011).

Os efeitos da associação entre esses fatores também têm sido pouco explorados em pesquisas experimentais. Em humanos, a administração de 6g de OP associada a prática de 45 minutos/3 vezes por semana de exercício físico a 75% do  $VO_2$  em voluntários com sobrepeso reduziu a quantidade total de gordura; e isoladamente, a suplementação com OP diminuiu níveis de triglicerídeos e aumentou HDL, enquanto o exercício melhorou a complacência arterial (HILL et al., 2007).

## **2.2 EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 E DO EXERCÍCIO NO COMPORTAMENTO ANSIOSO E MEMÓRIA**

O cérebro é altamente enriquecido com AGPI n-3 e seus derivados, os quais apresentam importante papel na morfogênese cerebral desde a idade fetal até a idade adulta (GHARAMI; DAS; DAS, 2015). Os benefícios destes lipídios na saúde cerebral têm sido estudados em ensaios epidemiológicos e modelos experimentais. Suas propriedades específicas se associam a elevação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), facilitação da plasticidade sináptica, aumento da fluidez de membrana, estímulo da função mitocondrial e redução do estresse oxidativo (GÓMEZ-PINILLA, 2008).

Adicionalmente às ações fisiológicas, estes lipídios compartilham vias de ação similar a drogas psicotrópicas como a ação imunomoduladora, antiinflamatória, atuação na transdução de sinal, neurotransmissão e neuroproteção. De forma que o uso de AGPI n-3 pode constituir uma ferramenta importante para prevenção de doenças neuropsiquiátricas em populações de risco (SU; MATSUOKA; PAE, 2015).

Em indivíduos saudáveis, a maioria das pesquisas com suplementação de ácidos graxos ômega 3 tem sido feita na infância ou senescência (GILES et al, 2014). Poucos trabalhos examinaram o efeito desses ácidos graxos na fase adulta, onde a suplementação dietética é possivelmente maior (BRIEFEL; JOHNSON, 2004). No entanto, um estudo recente em humanos mostrou redução apenas da sensação de fadiga e não da ansiedade (ANTYPA et al., 2009).

Em relação aos parâmetros cognitivos, os resultados também têm sido divergentes. A suplementação de ômega 3 em indivíduos adultos saudáveis melhorou a memória episódica e

de trabalho (STONEHOUSE et al., 2013), ou não teve efeito sobre o desempenho cognitivo (ANTYPA et al., 2009).

Em roedores saudáveis, os efeitos da suplementação com AGPI n-3 têm sido estudados principalmente nas fases de desenvolvimento. A indução da deficiência de AGPI n-3 até à 15ª semana da prole de machos aumentou os parâmetros de ansiedade avaliados pelo teste do Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Teste de Adaptação ao Campo aberto (TCA), o que teve associação com diminuição da proporção dos níveis de DHA no cérebro e dos níveis de BDNF, evidenciando que a deficiência de DHA durante a maturação do cérebro reduz a plasticidade e compromete a função do cérebro na idade adulta (BHATIA et al., 2011).

Apesar dos resultados promissores sobre a importância dos AGPIs no desenvolvimento neural, ainda não existe um consenso sobre a influência dos AGPICL no comportamento ansioso e memória em animais adultos. Plamondon and Roberge (2008) ao avaliarem a suplementação de dietas enriquecidas com 11,5% de óleo de peixe por 3 meses antes da indução da injúria isquêmica cerebral observaram que a suplementação com óleo de peixe não apresentou impacto no comportamento ansioso avaliado pelo tempo gasto nos braços abertos do LCE, apesar de melhores resultados nos testes de memória.

Em camundongos adultos saudáveis, a suplementação com OP por curto (3 dias) ou longo período (4 semanas) se mostrou benéfica para diminuir o comportamento ansioso no LCE quando comparado a suplementação com banha de porco mas não em relação ao óleo de soja, evidenciando mais um possível efeito ansiogênico da banha de porco do que o efeito ansiolítico do OP (MIZUNOYA et al., 2013).

Especificamente em relação à memória, os estudos com OP têm se delineado principalmente em modelos de animais com doença de Alzheimer (HASHIMOTO et al., 2011), injúria cerebral (WANG et al., 2013), hipotireoidismo (ABD ALLAH; GOMAA; SAYED, 2014) e mania (TREVIZOL et al., 2013), uma vez que tais situações estão envolvidas com prejuízos cognitivos.

O exercício físico também se associa à melhora do desempenho cognitivo e à redução do risco de doenças neurodegenerativas. Este parece reduzir as respostas inflamatórias do tecido neural e minimizar os fatores de risco periféricos associados à neurodegeneração (BERCHTOLD; CASTELLO; COTMAN, 2010). Além de ser um dos fatores mais acessíveis e de baixo custo associado à proteção das funções encefálicas (KRAMER; ERICKSON, 2007). Do ponto de vista fisiológico, ele regula processos adaptativos que trazem benefícios ao funcionamento cerebral, potenciação de longo prazo e memória (RADÁK et al., 2001; OGONOVSKY et al., 2005).

COSTA et al. (2012) verificaram que ratos adultos submetidos ao exercício forçado em esteira com intensidade moderada apresentaram comportamento ansioso reduzido independente da frequência estabelecida (uma, duas ou sete vezes/semana durante 8 semanas).

O exercício físico também mostrou ter efeitos dependentes da idade. Enquanto ratos adultos submetidos a exercício aeróbico com 60 a 70% do  $VO_2$  máximo apresentaram melhores desempenhos nos testes de memória de trabalho e espacial, ratos idosos exercitados tiveram melhores desempenhos em teste de memória e na redução do comportamento ansioso, evidenciando o papel protetor sobre parâmetros cognitivos e comportamentais especialmente contra danos provenientes da idade (PIETRELLI et al., 2012).

Adicionalmente, o exercício físico moderado se mostrou eficaz na aquisição e retenção de informação em testes do labirinto aquático de Moris (MELLO et al., 2008) e de reconhecimento de objetos (O'CALLAGHAN; OHLE; KELLY, 2007; MELLO et al., 2008) em roedores adultos saudáveis.

Poucos estudos têm sido feitos para avaliar efeitos da associação entre o consumo de AGPI n-3 e a prática de exercício físico moderado e o comportamento ansioso de roedores. SANTOS-SOTO et al. (2013) ao avaliarem a influência do exercício físico voluntário por um mês em camundongos observou que o grupo exercitado teve melhor desempenho no LCE e aumento nos níveis de ácido araquidônico (AA) e DHA cerebrais, bem como aumento na expressão da proteína fosfolipase A2, necessária para a produção de AA e DHA. Os autores sugeriram que esta modulação do perfil de ácidos graxos através de processos moleculares pode estar associada aos efeitos benéficos do exercício no humor. No entanto, existem poucas pesquisas que associem o uso em conjunto das duas modalidades e sua relação com comportamento ansioso.

No que se refere ao aspecto cognitivo, a suplementação com 85mg/kg/dia de óleo de peixe no período pré-natal até a vida adulta e o exercício forçado moderado, iniciado a partir da adolescência, facilitou a persistência de memórias de reconhecimento a longo prazo (RACHETTI et al. 2013).

Ratos suplementados com 1,25% de DHA e exercitados de maneira voluntária (roda giratória) por 12 dias apresentaram melhor desempenho nas tarefas de memória espacial, aumento na concentração do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), da proteína ligante de resposta ao AMPc (CREB), da sinapsina I, das formas ativas da proteína quinase B (Akt) e Cinase dependente de calmodulina tipo II (CAMKII), bem como apresentaram redução nos níveis de oxidação de proteínas hipocâmpais, sugerindo que efeitos complementares das

duas modalidades podem ser usados como ferramentas para promover saúde mental (WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2008).

O mesmo protocolo de suplementação e exercício citados anteriormente também se mostrou efetivo na otimização de desempenhos de ratos adultos no teste de Labirinto Aquático de Moris, associado a maiores níveis de sintaxina 3 (STX-3) e da subunidade do receptor 2B do N-Metil D-Aspartato (NR2B) do receptor de N-metil D- Aspartato (NMDA), revelando outro possível mecanismo pelo qual essas duas abordagens podem interagir e elevar a capacidade de crescimento axonal, plasticidade sináptica e função cognitiva do cérebro adulto (CHYTROVA; YING; GOMEZ-PINILLA, 2010).

### **2.3 IMPLICAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 E DO EXERCÍCIO NA ELETROFISIOLOGIA CEREBRAL**

Uma das maneiras do encéfalo executar ações fisiológicas simples e complexas é através da atividade elétrica cortical (AEC). Dessa maneira, o registro e a análise da AEC podem fornecer informações importantes para a compreensão do funcionamento do sistema nervoso (GUEDES, 2005).

Nessa linha, e adicionalmente aos aspectos apresentados nos tópicos anteriores, o grupo de pesquisa do qual este projeto faz parte se interessa no desenvolvimento de uma nova área para investigar mecanismos subjacentes aos efeitos do exercício e da suplementação com ácidos graxos essenciais utilizando o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC).

A DAC é caracterizada por ser uma “onda” propagável de depressão da atividade elétrica cortical espontânea (LEÃO, 1944). O fenômeno é deflagrado de forma concêntrica e reversível, este pode ser provocado por estimulação elétrica, mecânica ou química. Essa depressão tem velocidade da ordem de 2 a 5mm/min e ao final de cerca de 10 a 15 minutos o tecido tem se recuperado da estimulação inicial. Em concomitância, é observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região onde se desenvolve o fenômeno da DAC. O uso da DAC para investigação experimental possibilita a investigação da influência de aspectos nutricionais no desenvolvimento da eletrofisiologia cerebral (Guedes, 2005).

Distúrbios comportamentais (como ansiedade) se relacionam a alterações na eletrofisiologia cerebral. Animais submetidos a protocolo de estresse demonstram alterações na fisiologia cerebral, com aumento da excitabilidade em áreas como a amígdala e o hipocampo (MCEWEN, B; 2009). Da mesma forma, humanos diagnosticados com distúrbios de ansiedade apresentaram maior atividade na amígdala após estímulo com palavras negativas, sugerindo a

intensificação da experiência e falta de habilidade para responder a emoções (VAN TOL et al (2004).

Deficiência de ácidos graxos n-3 é encontrada em distúrbios como a esquizofrenia, caracterizados pelo aumento da excitabilidade cerebral. Os ácidos graxos n-3 se relacionam a normalização da excitabilidade cerebral em diversos níveis e um adequado suporte de AGPI pode representar uma estratégia para a prevenção de distúrbios psiquiátricos (SAUGSTAD, 2006).

YANGA *et al.*, 2012 demonstraram que a alteração na excitabilidade dos neurônios piramidais apresentada por ratos diabéticos foi corrigida após a suplementação com OP. E em um estudo utilizando modelo animal de epilepsia, a infusão intraperitoneal de 1.85µg de DHA mostrou limitar a hiper excitabilidade induzida pelo *kindling* (MUSTO; GJORSTRUP; BAZAN, 2011).

Até o momento, não existem pesquisas sobre a implicação dos AGPI n-3 na eletrofisiologia cerebral utilizando o modelo da DAC. No entanto, ratos alimentados com dietas deficientes em ácidos graxos essenciais (5% de óleo de coco) desde concepção até a fase adulta apresentaram redução na velocidade de propagação da DAC persistente até a segunda geração de filhotes (BORBA et al., 2010).

Ensaio preliminares realizados pelo nosso grupo demonstraram que exercício físico moderado influenciou a eletrofisiologia cortical de maneira duradoura em ratos. Esse efeito depende da idade, da prática do exercício e do estado nutricional prévio do animal (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Em paralelo, um de nossos colaboradores ao aplicar um protocolo de exercício físico em ratos adolescentes, observou que o exercício aeróbico pode reduzir o risco de doenças neurodegenerativas e melhorar as funções cerebrais ao longo da vida (GOMES DA SILVA et al., 2010, 2011, 2012a, 2012b)

No entanto, apesar das evidências sobre o AGPI n-3 e o exercício físico moderado sobre o funcionamento do SNC no que concerne à excitabilidade cerebral, os estudos com OP têm sido delineados em modelos animais submetidos a situações de injúria ( MUSTO; GJORSTRUP; BAZAN, 2011; YANGA et al., 2012) e apesar do papel promissor do exercício na redução da excitabilidade cerebral (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012) ainda não se têm na literatura sua associação com uso da suplementação com OP e a possível potenciação dessas abordagens, visto que ambas parecem influenciar a DAC (BORBA et al., 2010; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).



### **3. OBJETIVO GERAL**

---

- Avaliar, em ratos adultos, os efeitos da associação entre exercício físico forçado e suplementação com óleo de peixe sobre ansiedade, memória, murinometria, aspectos eletrofisiológicos corticais e perfil lipídico plasmático.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Acompanhar a evolução ponderal e a murinometria durante o período de experimentação;
- Determinar se o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe influenciam glicemia e perfil lipídico plasmático;
- Averiguar o efeito do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre a ansiedade e memória, a julgar pelo desempenho no labirinto em cruz elevado (LCE), na adaptação ao campo aberto (TCA) e reconhecimento de objetos (TRO), respectivamente;
- Investigar o efeito do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe sobre a velocidade de propagação da DAC;

#### 4. HIPÓTESE

---

A associação da suplementação do óleo de peixe com o exercício físico forçado na vida adulta de ratos *Wistar* otimiza parâmetros associados à saúde metabólica e neural, de forma que reduz parâmetros murinométricos, glicemia de jejum e perfil lipídico plasmáticos; influencia indicadores ansiogênicos com diminuição na frequência nos braços fechados do LCE, otimiza o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos, diminui a excitabilidade cerebral a julgar pela redução na velocidade da depressão alastrante cortical (DAC).

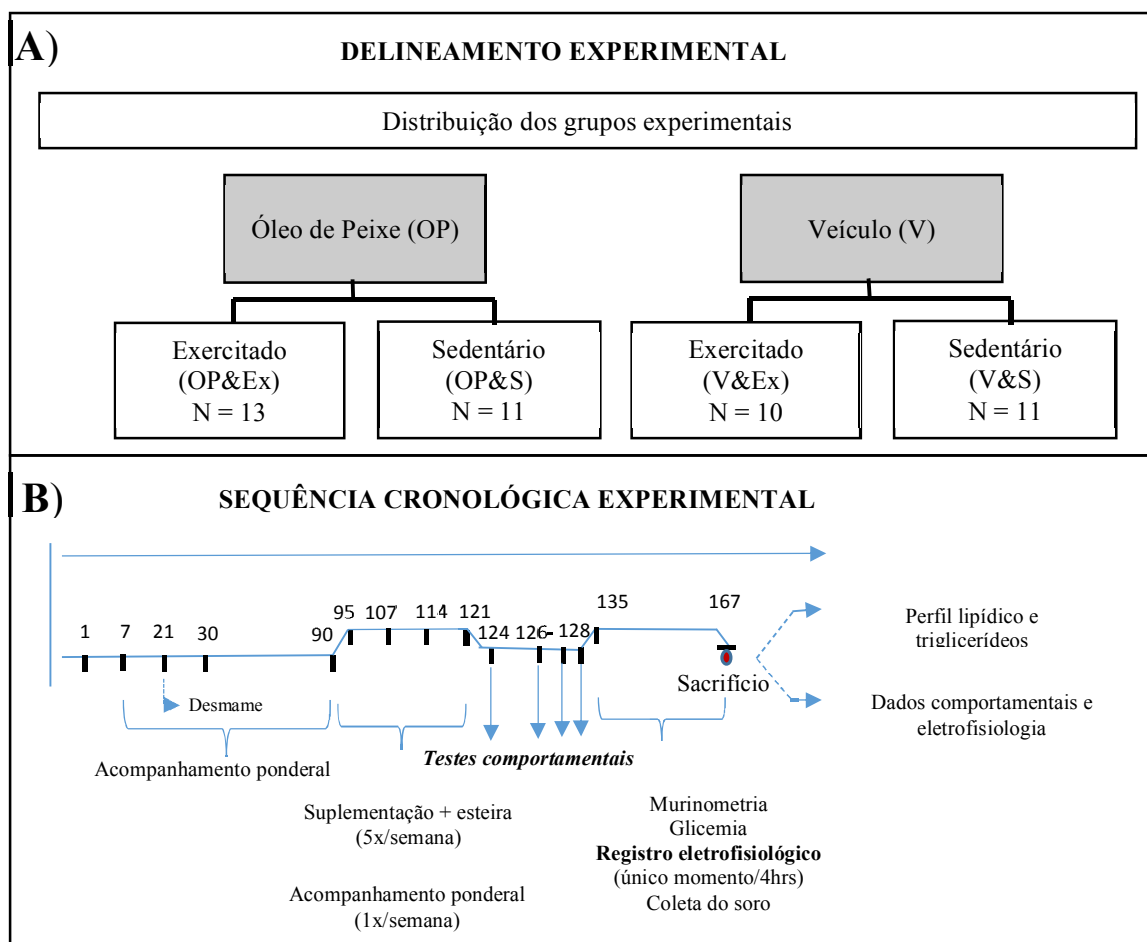
## 5. METODOLOGIA

---

### 5.1 Delineamento experimental

As etapas experimentais dessa pesquisa foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (23076.027072/2014-20). A metodologia realizada está de acordo com o disposto na Lei nº 11.794, respeitando, especialmente, às Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Foram utilizados ratos adultos da linhagem *Wistar*, da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Ratos neonatos foram aleatoriamente distribuídos, 24h após o parto, em ninhadas de 9 filhotes por mãe. Em cada ninhada, os filhotes foram subdivididos em 2 grupos: óleo de peixe (OP) ou Veículo (V) e subdivididos em exercitados (E) ou controle sedentário (S) (**figura 1A**). O período de treinamento se deu dos 90º a 120º dias de vida. Durante esse período, animais exercitados ou sedentários foram suplementados por via oral (gavagem) com óleo de peixe ou solução veículo. Durante todo o período de experimentação, os ratos foram alimentados com a dieta de manutenção do biotério (“Presence”, Purina do Brasil). A partir dos 120 dias de vida, foi realizada avaliação dos efeitos da associação do exercício com a suplementação com óleo de peixe sobre a murinometria, glicemia de jejum, perfil lipídico plasmático, triglicerídeos, respostas comportamentais e eletrofisiologia cortical (**figura 1B**). Foram avaliados 4 grupos experimentais, cada grupo contendo de 10-13 animais, com número total de 45 animais para o desenvolvimento desse projeto.



**Figura 1.** Divisão dos grupos experimentais (1A) e sequência cronológica experimental (1B). Ratos *Wistar* neonatos foram alocados em gaiolas (9 ratos/ninhada) 48hrs após o parto. Após o desmame (21 dias) foram separados 3 a 4 machos/gaiola e designados os grupos experimentais (1A). Peso corporal foi mensurado semanalmente até o 21 dia de vida, mensalmente até o 90 dia onde se iniciou a etapa de suplementação /exercício nos ratos adultos por 4 semanas. Em seguida, iniciaram-se os testes comportamentais com o labirinto em cruz elevada e com intervalo de 48hrs os testes de adaptação ao campo aberto, reconhecimento de objetos e reconhecimento espacial (tendo intervalo de 24hrs entre cada um dos três testes); Cerca de 5 dias após os testes comportamentais, mensurava-se a eletrofisiologia cortical e ao final os animais eram sacrificados e o soro retirado por punção cardíaca (1B).

## 5.2 Procedimentos gerais para o treinamento físico

Conforme parâmetros descritos na literatura (SCOPEL et al, 2006 e BATISTA-DE-OLIVEIRA et al, 2012), os animais foram submetidos ao exercício físico em esteira motorizada (Insight EP-131, 0° inclinação) com duração de 30 minutos e velocidade média aumentada semanalmente (**Tabela 1**). Os animais do grupo sedentário (S) também foram colocados na esteira, no entanto a mesma permaneceu desligada pelo mesmo intervalo de tempo estabelecido para os animais exercitados

O exercício físico se deu no período do 90 aos 120 dias de vida em concomitância com a administração da suplementação de doses diárias de 85mg/kg/dia de ômega-3 nos grupos óleo de peixe (OP) e solução veículo de cremophor 0,009% (Sigma) para o grupo controle (V) pela técnica de gavagem.

A solução de óleo de peixe (ômega-3) foi preparada a partir de cápsulas (Sundown - *Naturalis*®) contendo os seguintes ácidos graxos poliinsaturados: DHA (180 mg/ 1 g) e EPA (120mg/ 1 g) e diluída em água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®). A solução veículo foi preparada utilizando somente água destilada e cremophor 0,009% (Sigma®).

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

**Tabela 1.** Parâmetros para o treinamento físico *Adaptado de Batista-de-Oliveira et al., 2012.*

## 5.3 Determinações Ponderais

### 5.3.1 Evolução ponderal

O peso corporal foi obtido aos 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120 e último dia de vida do animal (152,18± 10,47); além disso, também foram pesados no primeiro e último dia de cada semana de treino. Estes pesos corporais foram comparados entre os grupos experimentais, para identificar efeitos da suplementação, do exercício, ou da associação entre tais fatores.

### 5.3.2 Avaliação Murinométrica

No dia do registro eletrofisiológico (procedimentos descritos a seguir), após anestesia, os animais tiveram seu comprimento aferido (ponta do nariz até o ânus, utilizando fita métrica), para análise dos parâmetros murinométricos e, juntamente com o peso, utilizado para calcular:

- Índice de Massa Corpórea (IMC) = [peso corporal (g)]/[comprimento (cm)]<sup>2</sup> (Novelli et al., 2007).

A circunferência torácica (CT) e abdominal (CA) foram aferidas utilizando fita métrica (cm) e utilizadas para o cálculo da relação CA/CT (cm) (NOVELLI et al., 2007).

## 5.4 Análises comportamentais

### 5.4.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste consiste em colocar o animal em um labirinto em forma de cruz, elevado do solo (55cm), formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos (medindo 49cm de comprimento x 10cm de largura cada); através do teste se analisa a frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço, e outros comportamentos como deslocamentos, levantar-se, esticar-se, etc. O animal explora os dois tipos de braço, porém entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986).

O procedimento foi realizado entre as 10:00–14:00h, utilizando no mínimo 10 animais de cada grupo dos 120 aos 135 dias de vida. No dia do experimento, os ratos machos foram colocados na ante-sala experimental, individualmente, em gaiola apropriada e permaneceram 5 minutos antes do início do teste, para adaptação ao novo ambiente.

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

As sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo instalada no teto. Em seguida, os vídeos foram analisados e as categorias comportamentais identificadas e registradas através do

programa ANYmaze (Versão 4.99 m). Foram selecionados os seguintes parâmetros comportamentais para análise:

- 1) Distância percorrida (m)
- 2) Tempo de imobilidade (s)
- 3) Número de entradas nos braços abertos: considerada uma entrada quando o animal entrar com as quatro patas no braço;
- 4) Tempo gasto nos braços abertos;

#### 5.4.2 *Teste de Adaptação ao Campo Aberto (Open Field Test)*

O teste de campo aberto avalia indicadores de comportamento ansioso em roedores. Esse método qualitativo e quantitativo analisa medidas gerais de atividade locomotora e exploração espontânea de ratos enquanto expostos a uma arena circular (PRUT E BELZUNG, 2003). O aparato consistiu de uma arena circular (89cm de diâmetro) aberta no topo e com paredes marrons. O chão da arena era composto por três círculos concêntricos os quais delimitavam as áreas centrais e periférica.

O teste foi realizado entre os 120 e 135 dias de vida do rato ( $n = 45$ , OP&Ex: 13; OP&S:11; V&Ex:10; V&S:11). Durante esse período, parâmetros associados ao comportamento ansioso foram identificados pelo: 1) Distância percorrida; 2) tempo de imobilidade 3) número de entradas no centro; 4) tempo de permanência no centro do aparato

As sessões foram gravadas por uma câmera instalada no teto. Entre as sessões, o campo era higienizado com solução de álcool a 70% para remover pistas olfativas. Posteriormente, os vídeos foram analisados no software ANY-maze (versão 4.99 m).

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

Entre os 120 a 135 dias de idade, os animais realizaram os testes de reconhecimento de objetos. O aparato consistia em uma arena circular (campo aberto) localizada em um ambiente com iluminação reduzida. Os animais foram colocados, por 5 minutos na arena, para se adaptarem ao ambiente e o experimento comportamental propriamente dito foi realizado no dia seguinte à adaptação. Avaliaram-se as diferenças entre os grupos na capacidade de identificação de objetos com base na sua forma e localização no campo aberto.

Em cada uma dessas duas tarefas, os animais, em uma primeira sessão, exploraram por 5 minutos o ambiente, enquanto dois examinadores (de modo “cego”) treinados previamente,

utilizando cronômetros, registraram o tempo gasto pelo animal para explorar cada objeto (ver abaixo). Numa segunda sessão, após 50 minutos, foram avaliados o reconhecimento das características de forma e localização espacial dos objetos, como descrito adiante. Se, nessa segunda sessão, diante de dois objetos, um conhecido (da sessão anterior) e outro com características de “novidade” (seja na forma, ou na posição), o rato reconhecer o objeto apresentado na primeira análise, ele, então, passará mais tempo explorando o objeto “desconhecido”, demonstrando assim reconhecimento do objeto “familiar”.

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

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

- 1) Na discriminação das formas: dois objetos idênticos (A e B) são posicionados na arena para a primeira análise. Após 50 minutos, os animais são recolocados no campo aberto (segunda sessão) com o mesmo objeto A (conhecido), porém, o objeto B é substituído por outro, C (desconhecido), da mesma cor, tamanho e cheiro do objeto A, mas com uma forma diferente. O animal demonstrará que pode diferenciar as formas quando, nessa segunda sessão, passar mais tempo explorando o objeto com a forma desconhecida.
- 2) Para avaliar a distinção de localização espacial: dois objetos idênticos (A e B) são colocados em determinadas posições no campo aberto. Passados 50 minutos, os animais serão novamente colocados no campo aberto (segunda sessão) na presença dos mesmos objetos (A e B), todavia, neste segundo momento a posição de A se mantém (posição conhecida), já a localização de B modifica-se. Se o animal distingue uma posição desconhecida, ele gastará mais tempo explorando o objeto nessa posição.

Nas sessões de ensaio, tanto para forma quanto para posição, foi calculada para cada animal a razão de preferência como sendo o tempo que o animal explora cada objeto/ tempo total de exploração. Esta razão garante que os animais gastem inicialmente o mesmo tempo explorando cada um dos objetos, e então, não existe preferência por nenhum deles. Apenas ratos que apresentaram razão próxima a 0,5 foram considerados elegíveis para o teste.

Em seguida, calcularam-se as razões de preferência para o familiar e a novo (forma e posição) nas sessões de teste, e esperava-se que os animais gastassem mais tempo explorando os objetos de novo formato e posição na arena.



O desempenho foi apresentado pelo **índice de discriminação (%)** o qual consiste no tempo de exploração de cada critério analisado (familiar *versus* novo e estacionário *versus* deslocado), expressados como a porcentagem do tempo total de exploração. Esse paradigma não envolve o aprendizado de nenhuma regra, já que é inteiramente baseado no conceito de comportamento exploratório espontâneo dos animais entre os objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Os objetos não apresentavam significado etológico, uma vez que nunca foram emparelhados com um reforçador e eram suficientemente pesados para não serem movidos pelo animal.

### 5.5 Registro eletrofisiológico

Para a realização dos registros eletrofisiológicos, todos os animais (entre 135 a 167 dias) foram 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. O animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável. Em seguida, fixou-se a cabeça do animal à base de um aparelho estereotático. Por meio de trepanação foram feitos três orifícios, sendo um frontal e dois parietais do hemisfério direito, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada, alinhados paralelamente à linha média.

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

Calculou-se a velocidade de propagação da DAC com base na distância entre os eletrodos de registro e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

## 5.6 Perfil lipídico plasmático

### 5.6.1 *Análises Bioquímicas*

Antes do registro eletrofisiológico, com os animais anestesiados, realizou-se a dosagem da glicemia de jejum. A coleta de sangue foi feita na extremidade da cauda do animal com auxílio de um bisturi estéril. Para mensuração da glicemia utilizou-se medidor de glicose logo após a coleta (Accu-Chek®).

Imediatamente após o registro eletrofisiológico, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. O sangue foi coletado dos animais ainda em anestesia profunda e, em seguida, colocado em tubos de ensaio. Aproximadamente 20 minutos após cada coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos e o soro foi coletado e armazenados em tubos *eppendorfs* sob refrigeração a -15 °C até o dia da análise.

### 5.6.2 *Dosagem das frações lipídicas*

As dosagens das frações lipídicas séricas foram realizadas ao final do experimento após sacrifício dos ratos. Dosaram-se, através de kits colorimétricos (Doles®) de reagente enzimático para colesterol total, HDL e triglicerídeos, o conteúdo plasmático de colesterol total (CT), o HDL-colesterol e os triglicerídeos (TG), seguindo as recomendações de ALLAIN et al. (1974). Utilizando-se a fórmula proposta por FRIEDWALD et al. (1972), se determinou o LDL-colesterol = colesterol total - HDL colesterol – VLDL colesterol, sendo que VLDL colesterol = triglicerídeos/5. O índice aterogênico foi determinado pela fórmula  $[\log (\text{triglicerídeos} / \text{HfDL-colesterol})]$  (DOBIASOVA E FROLICH, 2001).

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

---

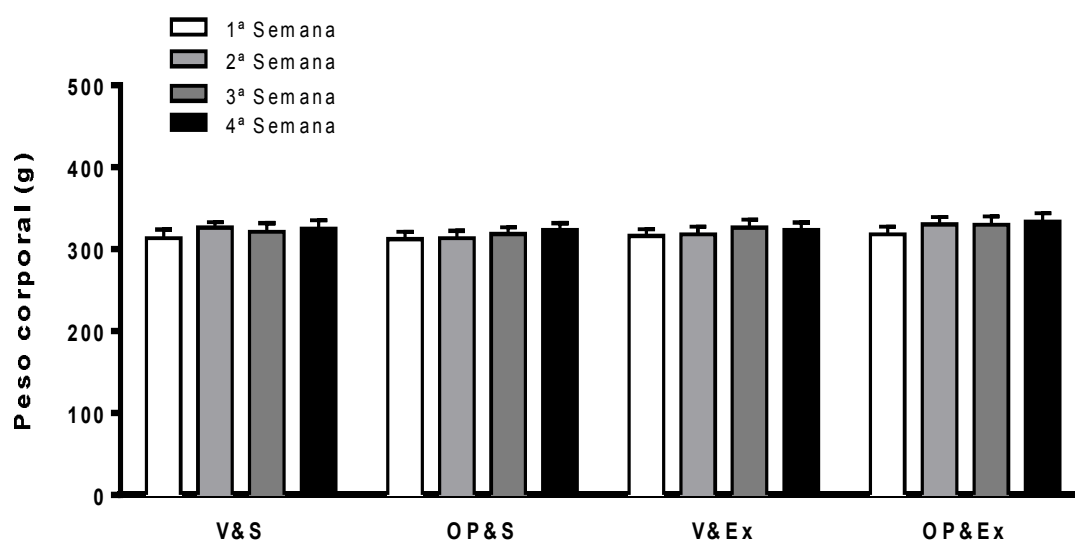
A normalidade dos dados foi verificada a partir do teste de Kolmogorov Smirnov ( $p < 0.05$ ). Os dados (média±EPM) de distribuição paramétrica foram analisados estatisticamente com a ANOVA, seguida do teste “post hoc” (Tukey), quando indicado.

Os dados comportamentais do TRO foram avaliados com teste t de *student* para distinguir diferenças intra-grupo ou ANOVA de duas vias, para definir diferenças entre os grupos, seguida por teste post-hoc de acordo com as recomendações do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Foram consideradas significantes as diferenças em que  $P \leq 0,05$ .

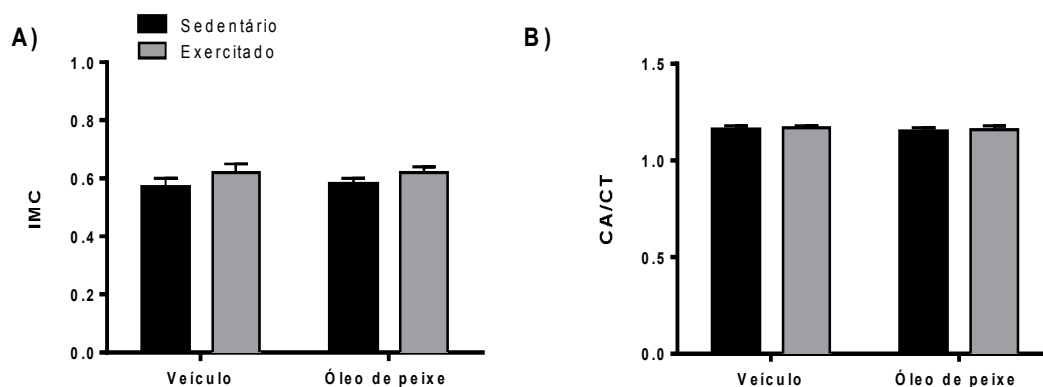
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Acompanhamento ponderal e medidas murinométricas

O acompanhamento ponderal realizado dos 90 aos 120 dias de vida revelou que não houve efeito do tratamento óleo de peixe e/ou exercício moderado forçado em esteira entre os diferentes grupos ao longo das 4 semanas de suplementação/exercício. Também não houve diferenças significantes entre valores médios das medidas murinométricas dos diferentes grupos experimentais aferidas no último dia de vida dos animais ( $152,18 \pm 10,47$ ) (Teste two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ). Os resultados estão representados a seguir na **figura 1** e **figura 2 (A e B)**.



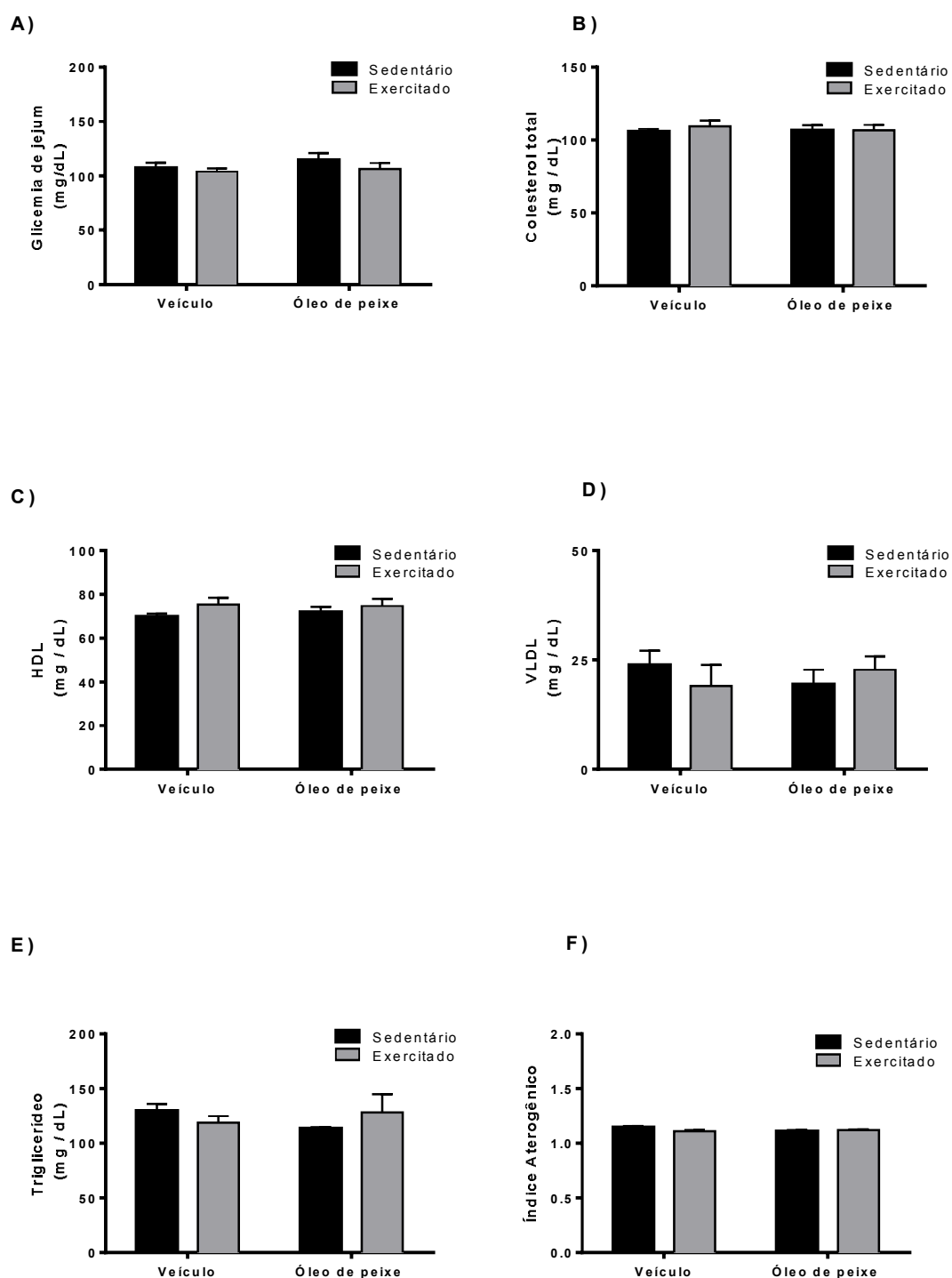
**Figura 1.** Peso corporal de animais adultos (90 aos 120 dias) alimentados com dieta padrão (presence©) e submetidos a diferentes grupos de experimentação. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. O peso corporal foi mensurado uma vez por semana (durante 4 semanas) quando os animais foram submetidos ao exercício em esteira e suplementação diária com dose única de óleo de peixe. Teste Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) não mostrou diferenças significativas entre os grupos. V&S: sedentário suplementado com solução veículo; V&Ex: exercitado suplementado com solução veículo; OP&S: sedentário suplementado com óleo de peixes; OP&Ex: exercitado suplementado com óleo de peixe.



**Figura 2.** (A) Índice de Massa Corporal (IMC) e (B) Razão circunferência abdominal/ circunferência torácica (CA/CT) de ratos adultos submetidos ao exercício forçado em esteira ou não (sedentários) e suplementação com óleo de peixe ou solução veículo por 4 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. As medidas foram mensuradas no último dia de vida do rato adulto ( $152,18 \pm 10,47$ ). Teste Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

## 7.2. Parâmetros metabólicos (glicemia de jejum, triglicerídeos, perfil lipídico e índice aterogênico)

Não houve efeito do tratamento óleo de peixe e/ou exercício moderado forçado em esteira para os parâmetros metabólicos glicemia (**figura 3A**), perfil lipídico (**figura 3B-D**), triglicerídeos (**figura 3E**) e índice aterogênico (**figura 3F**) aferidos no último dia de vida dos animais ( $152,18 \pm 10,47$ ) (Teste two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Glicemia plasmática (A), perfil lipídico (B-D), triglicerídeos (E) e índice aterogênico (F) de ratos adultos submetidos a exercício em esteira ou não (sedentários) e suplementação com óleo de peixe ou solução veículo por 4 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. As medidas foram mensuradas no último dia de vida do rato adulto ( $152,18 \pm 10,47$ ). Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) não mostrou diferenças significativas entre os grupos

### 7.3. Teste de adaptação ao campo aberto (TCA) e Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A análise dos dados de comportamento no teste de Adaptação ao Campo Aberto (TCA) demonstraram que animais do grupo OP&Ex apresentaram o tempo de permanência na área central do TCA significativamente aumentado em relação aos animais OP&S bem como tendência no aumento do tempo de permanência na área central no grupo V&Ex em relação ao animais sedentários (V&S e OP&S). No teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) não houve diferenças significativas em relação à alteração de indicadores ansiogênicos de ratos adultos, no entanto, também se notou uma tendência na redução do comportamento ansioso a julgar pelo o aumento da permanência no braço aberto no LCE nos grupos exercitados (V&Ex e OP&Ex) em relação aos sedentários (V&S e OP&S) (tabela 1).

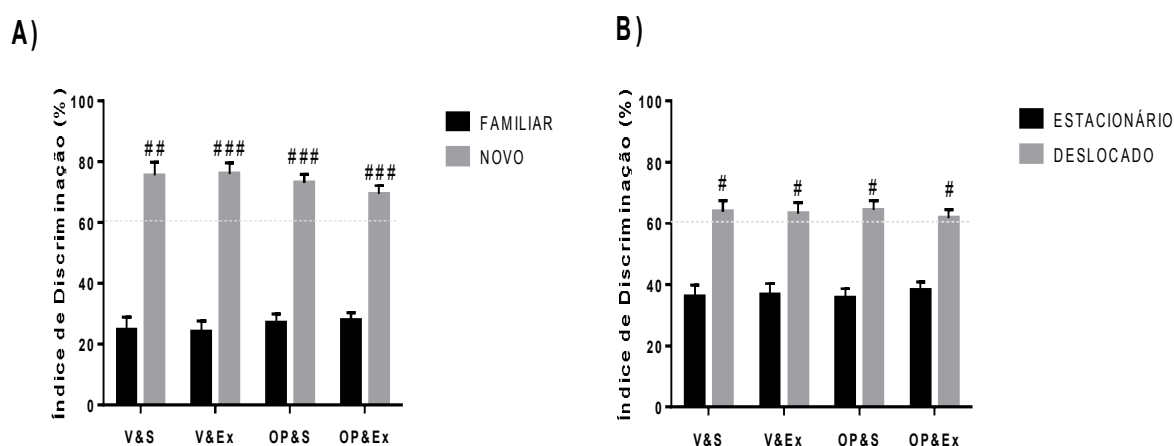
Análises comportamentais	Grupos experimentais			
	V&S (n=9)	V&Ex (n=8)	OP&S (n=9)	OP&Ex (n=11)
<i>(A) TCA</i>				
Distância total percorrida (m)	19,41±1,71	18,46±1,73	15,91±1,57	16,94,00±1,65
Tempo de imobilidade (s)	86,09±11,29	93,43±14,77	109,33±13,85	106,02±16,71
Nº de entradas na área central	3,5(2-5,75)	5,5(3,25-7)	2 (1-4)	5 (2,5-5)
Tempo na área central (s)	13,08±1,38	20,29±2,80	11,40±1,45*	22,25±3,50*
<i>(B) LCE</i>				
Distância percorrida (m)	11,27±1,23	10,89±0,69	9,82±1,03	9,37 ±0,76
Tempo de imobilidade (s)	115,53±11,93	107,63±14,08	111,67±13,63	130,64 ±8,28
Nº de entradas no braço aberto	13 (12,5-14)	11(8,5-11,75)	8,50 (7,75-10,25)	8,00 (6-13)
Tempo no braço aberto (s)	29,31±3,67	34,55±4,40	27,87±3,34	32,08 ±3,57

**Tabela 1.** (A) Teste de adaptação ao Campo Aberto (TCA) e (B) de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratos adultos submetidos a exercício em esteira ou não (sedentários) e suplementação com óleo de peixe ou solução veículo por 4 semanas. Os valores dos dados estão descritos em média±EPM ou mediana (intervalo interquartilico). \*Two-way ANOVA (+ pos hoc Tukey's) mostrou diferenças significativas entre os grupos sinalizados. V&S: sedentário suplementado com solução veículo; V&Ex: exercitado suplementado com solução veículo; OP&S: sedentário suplementado com óleo de peixe; OP&Ex: exercitado suplementado com óleo de peixe.

### 7.4. Teste de reconhecimento da identidade e forma do objeto

Animais adultos tiveram a habilidade de reconhecer tanto a identidade do objeto quanto a posição espacial a julgar pelas diferenças intra grupo (teste T pareado,  $p < 0,05$ ) dos índices de discriminação nos testes de reconhecimento da identidade (novo *versus* familiar) e da posição

do objeto (deslocado *versus* estacionário). Em relação a identidade do objeto, ratos adultos apresentaram altos valores de índice de discriminação (Média±EPM) para o novo quando comparado ao familiar (OP&Ex, 69.3±2.9 *versus* 30.7±2.9,  $p < 0.001$ ; OP&S, 72.9±2.9 *versus* 27.0±2.9,  $p < 0.001$ ; V&Ex, 76.0±3.6 *versus* 24.0±3.6,  $p < 0.001$  e V&S, 75.5±4.26 *versus* 24.5±4.26,  $p < 0.001$ ). Resultado similar foi observado para as tarefas de reconhecimento da forma do objeto, conforme observado pelo aumento nos índices de discriminação (Média±EPM) para o objeto deslocado comparado ao estacionário (OP&Ex, 61.8±2.7 *versus*



38.2±2.7,  $p < 0.01$ ; OP&S, 64.4±3.1 *versus* 35.6±3.1,  $p < 0.01$ ; V&Ex, 63.2±3.6 *versus* 36.8±3.6,  $p < 0.01$  e V&S, 63.9±3.7 *versus* 36.1±3.7,  $p < 0.01$ ). A **Figura 4 A e B** descrevem esses resultados.

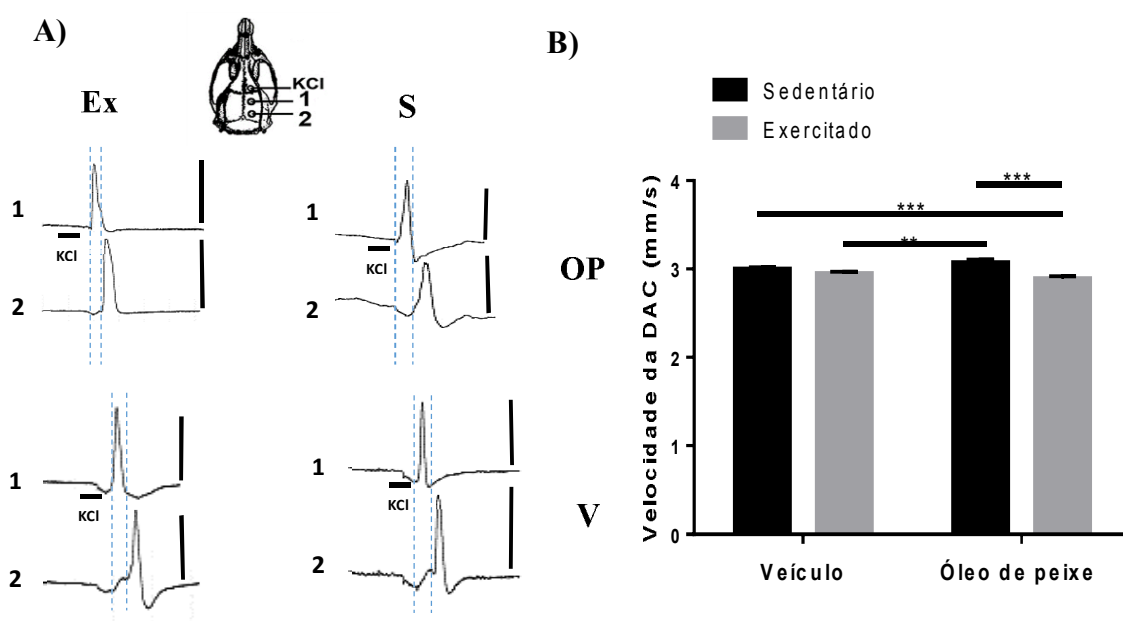
**Figura 4.** Testes de identidade do objeto (A) e reconhecimento espacial (B) representados pelo percentual do índice de discriminação dos animais sob diferentes condições experimentais. Valores expressos em percentuais médios ± EPM. # $p < 0.001$ , ## $p = 0.001$  or ### $p < 0.0001$  indica diferenças significativas intra grupo (test t pareado). Teste Two-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) não encontrou diferenças significantes inter grupo para reconhecimento da forma ou posição do objeto. V&S: sedentário suplementado com solução veículo; V&Ex: exercitado suplementado com solução veículo; OP&S: sedentário suplementado com óleo de peixes; OP&Ex: exercitado suplementado com óleo de peixe.

## 7.5. Depressão Alastrante Cortical (DAC)

Em todos os grupos, a estimulação cortical com 2% de KCL resultou na propagação de uma onda única de DAC sem interrupção registrada em eletrodos posicionados em dois pontos parietais 1 e 2 (figura 5A). A ANOVA indicou diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados nos animais adultos, e o teste post hoc (Tukey's) demonstrou que animais exercitados, suplementados com OP exibiram redução da velocidade de propagação da DAC em relação aos seus controles sedentários (OP&Ex vs V&S; OP&Ex vs OP&S:  $p < 0,001$ ). E que apesar do



grupo exercitado suplementado com solução veículo(V&Ex) apresentar menores valores de DAC do que o grupo sedentário suplementado com óleo de peixe (V&Ex vs OP&S:  $p<0,01$ ), não houve diferença nas velocidades da DAC entre ambos os grupos suplementados com solução veículo (exercitado ou sedentário) (tabela 5B). As velocidades de propagação nos grupos exercitados (OP&Ex; V&Ex) foi de, respectivamente,  $2,89\pm0,1$  e  $2,94\pm0,1$ , enquanto dos grupos sedentários (OP&S; V&S) ficaram em torno de  $3,07\pm0,1$  e  $3,00\pm0,1$ . Dessa forma, o grupo com as duas modalidades de intervenção, exercício e suplementação, expressou a menor média de velocidade da DAC.



**Figura 5.** (A) figura do crânio de roedor adaptada de Francisco e Guedes (2015) representando os três orifícios na superfície ventral do animal sendo o anterior para estímulo com KCL e os dois parietais posteriores para os registros eletrofisiológico; posteriormente, as variações de lenta voltagem (VLV) registradas nos pontos 1 e 2 em quatro animais adultos: a esquerda VLVs de animais exercitados (Ex) e a direita de animais sedentários (S), suplementados com óleo de peixe (OP) ou veículo (V). As barras horizontais sobre as 1<sup>as</sup> ondas indicam o tempo (1 minuto) da aplicação tópica do KCL necessário para iniciar uma única onda da DAC; As barras verticais indicam 10mV (para cima negativos) (B) Velocidade de propagação da DAC (mm/s) em animais adultos ( $152,18 \pm 10,47$ ) submetidos a exercício em esteira, ou não (sedentários), e suplementação com óleo de peixe ou solução veículo por 4 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias (+ pos hoc Tukey's) mostrou diferenças significativas entre os grupos (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

## 8. DISCUSSÃO

---

O óleo de peixe é uma fonte acessível de AGPI n-3. Uma vez que os mamíferos não conseguem produzi-los endogenamente, é necessária sua obtenção a partir de fontes dietéticas (YEHUDA; RABINOVITZ; MOSTOFISKY, 2005). A prescrição de óleo de peixe ou outras fontes de AGPI têm crescido exponencialmente por médicos e nutricionistas, tanto pela propaganda midiática, mas também como resultado da dificuldade de parte da população em alcançar as recomendações estipuladas (PAPANIKOLAOU et al., 2014). Além da sua essencialidade, os AGPI têm sido recomendados para uma variedade de doenças agudas e crônicas (CALDER, 2006). No entanto, ensaios clínicos e experimentais sobre a eficiência clínica dos AGPICL ainda são conflitantes (LAIDLAW; COCKERLINE; ROWE, 2014).

Neste modelo experimental, no qual suplementaram-se ratos *Wistar* adultos com óleo de peixe associado, ou não, ao exercício forçado em esteira, não se obteve mudanças no peso corporal, medidas murinométricas, glicemia, perfil lipídico plasmático, triglicerídeos, índice aterogênico e nos indicadores de memória episódica, mas ocorreram alterações significativas na redução do comportamento ansioso e na eletrofisiologia cerebral dos animais exercitados, sendo esse resultado mais proeminente com a implementação da suplementação de OP.

Não existe consenso quanto a dose de AGPI indicada para população saudável. Alguns comitês estabeleceram as recomendações de AGPI do tipo n-3 em torno de 1 - 0,5% do VET (HOLMAN, 1958; SIMOPOULOS; LEAF; SALEM, 2000; CHOQUE et al., 2015). O *Dietary Guidelines for Americans* (2010) recomenda que indivíduos com ou sem DCV consumam pelo menos duas porções de peixes por semana para garantir 250mg por dia de AGPI do tipo n-3.

DE SOUZA et al., (2008) avaliaram a composição de ácidos graxos da mesma dieta padrão utilizada no presente estudo, descreveram a relação ômega 6/ômega 3 em 13,49. Sendo o percentual de ômega 6, 3 e gordura saturada de respectivamente 46,39, 3,44 e 27,41.

Ao levar em consideração os achados de DE SOUZA et al., (2008), notou-se que a dieta padrão utilizada apresenta razão w-6/w3 maior do que a recomendação da AIN-93 que estipula que a quantidade de óleo de soja em dietas padrões deve fornecer uma razão em torno de 7 (REEVES, 1997). Dessa forma, consideramos que a dose média de AGPI n-3 suplementada via gavagem ( $\pm 27\text{mg/dia}$ ) contribuiu para diminuição da razão w6/w3 e para se atingir a recomendação diária de 100mg de ômega 3 para roedores em fase de manutenção (HOLMAN, 1958)

É válido ressaltar que essa dieta padrão é comumente utilizada e DE SOUZA et al., (2008) demonstraram que a mesma foi capaz de corrigir deficiências nutricionais induzidas pela Dieta Básica Regional (DBR).

Alguns autores avaliaram os efeitos da administração de óleo de peixe em medidas de composição corporal, glicemia, perfil lipídico plasmáticos de roedores e triglicerídeos. Assim como no presente estudo, LLUÍS et al. (2013) e DASILVA et al. (2015) ao avaliar a suplementação de OP em ratos saudáveis não encontraram diferenças significativas nos parâmetros citados anteriormente. No entanto, os autores alegam que houve uma tendência na diminuição de triglicerídeos, colesterol total e colesterol LDL nos grupos suplementados com EPA/DHA na razão 1:1.

No presente trabalho a razão EPA/DHA ficou em torno de 1,2:1,8. Dasilva et al. (2015) afirma que a razão 1:1 e 2:1 parece ser mais efetiva na produção de respostas anti-inflamatórias pois o EPA está menos susceptível a oxidação que o DHA.

Outra questão sobre a redução dos fatores de risco para DCV é que apesar da glicemia de jejum se manter inalterada nos diferentes grupos experimentais do presente estudo, vale ressaltar o achado de LLUÍS et al. (2013), no qual apesar de também ter encontrado glicemia de jejum inalterada entre os diferentes grupos do seu experimento; houve redução de 33% na hemoglobina glicada dos animais suplementados com OP, o que os levaram a concluir sobre a ação benéfica do OP em animais saudáveis.

Os efeitos da associação entre OP e exercício físico em animais saudáveis têm sido pouco explorados em pesquisas experimentais. Nossos achados, junto com um de nossos colaboradores, demonstram que esta associação pode ser considerada idade-dependente, uma vez que enquanto no presente estudo ratos adultos não apresentaram alterações nos parâmetros metabólicos em questão, ratos idosos no estudo de PEDROZA et al. (2015). exibiram maiores valores de colesterol total, no entanto, associado a maiores valores de HDL e redução do índice aterogênico.

Alguns autores demonstraram que a associação entre OP e exercício físico em roedores saudáveis pode exercer efeitos metabólicos positivos por outras vias que não as estudadas nesse experimento; como através da redução de indicadores inflamatórios (interleucina 7, creatina quinase e proteína C reativa) após 8 semanas de exercício aeróbico e suplementação com OP (0,2ml/dia) (ALIZADEH et al., 2014).

No que concerne aos efeitos dos AGPI sobre funcionamento do SNC a julgar pelos desempenhos em testes de ansiedade e memória, achados prévios mostraram que tanto os AGPICL quanto o exercício têm a capacidade de melhorar funções cognitivas e de memória

em roedores adultos saudáveis (MURPHY; DIAS; THURET, 2014). Esses autores revisaram uma série de dados demonstrando forte influência de intervenções dietéticas com AGPI, exercício e função cerebral.

No entanto, nos animais do presente estudo, não houve diferenças significativas para os dados comportamentais de memória. É válido ressaltar que os estudos com OP com objetivo de avaliação de parâmetros de memória em animais adultos tem sido delineados principalmente em situações conhecidas por levar ao desenvolvimento de prejuízos cognitivos (HASHIMOTO et al., 2011; TREVIZOL et al., 2013; WANG et al., 2013; ABD ALLAH; GOMAA; SAYED, 2014).

A literatura também demonstra resultados positivos na retenção de informação em testes de memória em animais adultos saudáveis submetidos ao exercício físico moderado (O'CALLAGHAN; OHLE; KELLY, 2007; MELLO et al., 2008). Os animais do nosso experimento, apesar de preservarem a capacidade de discernir entre o antigo e o novo no TRO, não obtiveram diferenças significativas entre os grupos quando aos índices de discriminação para reconhecimento da posição ou forma do objeto.

Vale ressaltar os achados de MELLO et al. (2008), no qual o autor sugere que o exercício pode influenciar o comportamento em testes de aprendizado de ratos, entretanto, o estresse inerente de cada procedimento experimental também tem efeito proeminente e deve ser considerado. Em seu experimento, os animais em exercício forçado por 2 semanas tiveram prejuízos em testes de memória semelhantes aos animais submetidos a protocolo de estresse, enquanto animais exercitados por 8 semanas não tiveram diferenças no TRO, apesar de apresentaram redução do tempo de latência no Labirinto Aquático de Morris.

Dessa forma, um único tipo de teste pode não ser suficiente para prever melhoras nas habilidades cognitivas. Outra questão é a encontrada por um de nossos colaboradores ao submeter animais no período pre natal até a vida adulta ao mesmo protocolo de suplementação com OP escolhido no nosso experimento (RACHETTI et al., 2013).

RACHETTI et al. (2013) demonstraram que o efeito da suplementação com OP e exercício forçado em esteira pode promover efeitos distintos a depender do teste de memória aplicado. Em seu experimento, apenas ratos suplementados com OP no período pre natal até a vida adulta exploraram mais o objeto novo em relação ao familiar 7 dias após a primeira exposição no TRO, indicando efeito do OP na persistência de memórias de longo prazo. No teste da esQUIVA discriminativa em labirinto em cruz elevado (com mesmo intervalo de 7 dias), apenas os animais exercitados apresentaram menor valor no tempo de exploração no braço

fechado com estímulo aversivo. Vale ressaltar que a suplementação neste estudo se deu por um período superior ao do nosso experimento.

No que concerne a influência de AGPI do tipo n-3 na redução do comportamento ansioso em roedores, já foi observado que a deficiência de AGPI n-3 reduz níveis de DHA cerebral o que se associa à prejuízo em testes de ansiedade no LCE e TCA. E o exercício moderado também têm se mostrado eficiente na redução da ansiedade pelos testes de LCE (COSTA et al., 2012; PIETRELLI et al., 2012) e TCA (PIETRELLI et al., 2012). No nosso experimento, notou-se uma tendência dos animais exercitados a permanecer mais tempo na área central do TCA (V&Ex:  $20,29 \pm 2,80$ ; OP&Ex:  $22,25 \pm 3,50$ ; V&S:  $13,08 \pm 1,38$ ; OP&S:  $11,40 \pm 1,45$ ) e no braço aberto do LCE (V&Ex:  $34,55 \pm 4,40$ ; OP&Ex:  $32,08 \pm 3,57$ ; V&S:  $29,31 \pm 3,67$ ; OP&S:  $27,87 \pm 3,34$ ). E de fato o grupo OP&Ex apresentou aumento significativo no tempo de permanência do TCA comparado aos animais sedentários do grupo OP&S. Os resultados dos testes comportamentais indicaram uma tendência na redução do comportamento ansioso no teste do LCE nos animais exercitados e uma potencialização do efeito ansiolítico da junção OP&Ex em relação ao grupo OP&S no tempo de permanência na área central do TCA ( $p < 0,05$ ). Os dados encontrados na velocidade de propagação da DAC parecem corroborar com este fenômeno. Uma vez que houve redução da velocidade da DAC nos animais exercitados, um indicativo de diminuição da excitabilidade cerebral; a qual se encontrara alterada em ensaios com animais e humanos com distúrbios de ansiedade (MCEWEN, 2004; VAN TOL et al., 2012). BOGDANOV et al., 2013 demonstraram que sintomas de ansiedade no TCA se associaram a maior susceptibilidade a DAC em ratos adultos.

Apesar dos animais suplementados com OP sedentários terem apresentado maior velocidade de propagação em relação aos animais exercitados suplementados com solução veículo ( $3,07 \pm 0,1$  vs  $2,94 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ), não houve diferenças significativas nas velocidades de propagação em relação ao grupo controle V&S ( $3,00 \pm 0,1$ ). O que pode indicar o papel preponderante do exercício na redução da velocidade de propagação da DAC, e não o efeito isolado do OP na aceleração desse indicador.

O efeito na redução da velocidade da DAC em animais exercitados corrobora com achados prévios deste grupo de pesquisa, no qual animais jovens, adultos e idosos, submetidos a redução do número de ninhadas tiveram redução da velocidade de propagação da DAC quando submetidos ao mesmo protocolo de exercício do presente estudo (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

Esse efeito do exercício na redução da velocidade de propagação da DAC parece persiste em fases subsequentes da vida, como demonstrado por MONTEIRO et al. (2011), onde

animais submetidos a protocolo de exercício em esteira por 20 dias no início da vida (15 -35 dias) apresentaram menores velocidades médias de propagação da DAC nas fases subsequentes (35 – 45 e 90 – 120 dias de vida) em relação aos grupos controles.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno da redução da eletrofisiologia cerebral induzida pelo exercício. MONTEIRO et al. (2015) demonstraram que em ratos *wistar* jovens adultos (40 – 60 dias de idade) o exercício em esteira reduziu a velocidade de propagação da DAC de modo mais efetivo aos tratados com antidepressivo fluoxetina ( $2.96 \pm 0.23$  e  $3.03 \pm 0.35$  mm/min, respectivamente *versus*  $3.24 \pm 0.39$  mm/min no controle), sugerindo mecanismos adicionais ao aumento da disponibilidade de serotonina cerebral e redução da velocidade de propagação da DAC.

LIMA et al. (2014) observaram que ratos submetidos ao exercício em esteira no início da vida apresentaram redução da atividade elétrica cortical associada ao aumento da imunoreatividade microglial indicando a investigação da reação celular como epifenômeno para os efeitos do exercício sobre a DAC.

Mecanismos sinérgicos como aumento do fluxo sanguíneo cerebral, aumento da sinaptogênese, do metabolismo glicídico e da defesa antioxidante também podem estar relacionados aos efeitos na redução da excitabilidade cerebral induzida pelo exercício físico (MONTEIRO et al., 2015).

Até o momento, não existem pesquisas sobre a implicação dos AGPI n-3 na eletrofisiologia cerebral utilizando o modelo da DAC. No entanto, YANGA et al. (2012) demonstraram que a alteração na excitabilidade dos neurônios piramidais apresentada por ratos diabéticos foi corrigida após a suplementação com OP. E em um estudo utilizando modelo animal de epilepsia, a infusão intraperitoneal de  $1.85 \mu\text{g}$  de DHA mostrou limitar a hiper excitabilidade induzida pelo *kindling* (MUSTO; GJORSTRUP; BAZAN, 2011).

CHAMPEIL-POTOKAR et al., (2016) demonstraram que a aplicação tópica de DHA em cultura de astrócitos reduz o efeito estressor da corticosterona sobre a síntese e recaptação de glutamato. Sugerindo que o DHA ajuda astrócitos a resistir à influência de corticosterona, por isso, talvez promovendo uma resposta sustentável pelo cérebro estressado.

E de fato, glutamato se relaciona às mudanças iônicas que acontecem com o fenômeno da DAC, uma vez que o fenômeno se caracteriza pela profunda elevação de potássio extracelular e glutamato, alterações de fluxo sanguíneo multifásicos, e queda na tensão de oxigênio nos tecidos (ENGER et al., 2015). A influência da ativação do receptor de glutamato sobre a DAC é conhecida, como demonstrado por GUEDES et al. (1988).

Outro dado interessante é que apesar do OP isoladamente não ter alterado a velocidade de propagação da DAC, quando associado ao exercício, houve potencialização no efeito redutor do exercício sobre a excitabilidade cerebral. Alguns autores demonstram mecanismos moleculares pelos quais essas abordagens atuam de forma sinérgica, como na redução da oxidação de proteínas hipocâmpais e aumento na síntese de Akt e CAMKKI e consequente otimização em vias de sinalização sináptica (WU; YING e GOMEZ-PINILLA 2008).

Ou ainda, a presença de maiores níveis de syntaxina 3 (STX-3) e subunidade NR2B do receptor de NMDA, revelando outro possível mecanismo pelo qual essas duas abordagens podem interagir e elevar a capacidade de crescimento axonal, plasticidade sináptica e função cognitiva do cérebro adulto (CHYTROVA; YING; GOMEZ-PINILLA, 2010).

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Com base nos dados obtidos, podemos concluir que sob esta condição de duração e dosagem de OP e exercício físico forçado em esteira, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os parâmetros metabólicos pesquisados, houve uma tendência de redução do comportamento ansioso vista nos testes de TCA e LCE e uma melhora significativa na redução da velocidade de DAC nos animais exercitados, a qual foi potencializada pela suplementação com OP.

É válido ressaltar a condição limiar mostrada por esse trabalho para obtenção de mudanças em aspectos cognitivos e eletrofisiológicos, visto que o tratamento foi realizado por curto período e com baixa dosagem de óleo de peixe. As tendências na redução do comportamento ansioso com o exercício físico e óleo de peixe, bem como a pequena diferença percentual nos resultados eletrofisiológicos indicam que mudança na duração ou nas doses utilizadas poderão ser mais efetivas.

Este é o único trabalho com este tipo de abordagem, especificamente sobre faixa etária adulta, o que o torna importante dentro do escopo da investigação experimental de abordagens acessíveis e de baixo custo associadas a melhora de fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos de doenças crônicas e mentais, no entanto, mais estudos são necessários para definição de dose, duração, população alvo e mecanismos subjacentes por meio do qual esta associação pode exercer efeitos benéficos sobre o organismo.



## REFERÊNCIAS

---

ABD ALLAH, E. S. H.; GOMAA, A. M. S.; SAYED, M. M. The effect of omega-3 on cognition in hypothyroid adult male rats. **Acta physiologica Hungarica**, v. 101, n. 3, p. 362–76, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183510>>.

AGRICULTURE, U. S. D. of; SERVICES, U. S. D. of H. and H. **Dietary guideline for americans**. 7th. ed. Washington DC: U.S. Government Printing Office, 2010.

ALIZADEH, H.; BAZGIR, B.; DARYANOOSH, F.; KOUSHKI, M.; SOBHANI, V. Effect of aerobic exercise and fish oil supplements on plasma levels of inflammatory indexes in mice. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 28, p. 1–8, 2014.

ANTYPA, N.; VAN DER DOES, a J. W.; SMELT, a H. M.; ROGERS, R. D. Omega-3 fatty acids (fish-oil) and depression-related cognition in healthy volunteers. **Journal of psychopharmacology**, v. 23, n. 7, p. 831–840, 2009.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A. A. C.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; GUEDES, R. C. A. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 6, p. 452–7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504277>>.

BERCHTOLD, N. C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C. W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, p. 588–597, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452210002782>>.

BHATIA, H. S.; AGRAWAL, R.; SHARMA, S.; HUO, Y.-X.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28451, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3233581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BOGDANOV, V. B.; BOGDANOVA, O. V.; KOULCHITSKY, S. V.; CHAUVEL, V.; MULTON, S.; MAKARCHUK, M. Y.; BRENNAN, K. C.; RENSHAW, P. F.; SCHOENEN, J. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 90–93, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.004>>.

BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DOS SANTOS, A. A.; DA COSTA, B. L. D. S. A.; DA SILVA, R. P.; 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, p. 144–50, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423564>>.

BOTEZELLI, J. D.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; DALIA, R. a; M SCARIOT, P. P.; RIBEIRO, C.; VOLTARELLI, F. a; MELLO, M. A. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 3, n. 1, p. 35, 2011. Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3296599&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3296599&tool=pmcentrez&render_type=abstract)>.

BRIEFEL, R. R.; JOHNSON, C. L. Secular Trends in Dietary Intake in the United States. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 401–431, 2004. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073349?select23=Choose>>.

CALDER, P. C. n 3 Polyunsaturated fatty acids , inflammation , and inflammatory. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1505–1519, 2006.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645–62, mar. 2013. Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575932&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575932&tool=pmcentrez&render_type=abstract)>. Acesso em: 26 mar. 2014.

CALDER, P. C. P. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279140>\n[http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Mechanisms+of+Action+of+\(+n-3+\)+Fatty+Acids+1+,+2#4](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Mechanisms+of+Action+of+(+n-3+)+Fatty+Acids+1+,+2#4)>.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgraduate Medical Journal** L, v. 121, p. 148–57, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940425>>.

CARO, J.; NAVARRO, I.; ROMERO, P.; LORENTE, R. I.; ANTONIA, M.; MARTÍNEZ-HERVÁS, S.; REAL, J. T.; ASCASO, J. F. Metabolic effects of regular physical exercise in healthy population. **Endocrinología y Nutrición**, v. 60, n. 4, p. 167–72, 2013.

CHAMPEIL-POTOKAR, G.; HENNEBELLE, M.; LATOUR, A.; VANCASSEL, S.; DENIS, I. Docosahexaenoic acid (DHA) prevents corticosterone-induced changes in astrocyte morphology and function. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 6, p. 1155–1167, 2016.

CHOQUE, B.; CATHELINE, D.; DELPLANQUE, B.; GUESNET, P.; LEGRAND, P. Dietary linoleic acid requirements in the presence of alpha-linolenic acid are lower than the historical 2 % of energy intake value, study in rats. **The British journal of nutrition**, v. 113, p. 1056–1068, 2015. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=25787691>>.

CHYTROVA, G.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. **Brain research**, v. 1341, p. 32–40, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

COSTA, M. S.; ARDAIS, A. P.; FIOREZE, G. T.; MIORANZZA, S.; BOTTON, P. H. S.; PORTELA, L. V.; SOUZA, D. O.; PORCIÚNCULA, L. O. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Treadmill running frequency on anxiety and hippocampal adenosine receptors density in adult and middle-aged rats. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 198–204, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.10.015>>.

COUET, C.; DELARUE, J.; RITZ, P.; ANTOINE, J. M.; LAMISSE, F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. **International journal of obesity**, v. 21, p. 637–643, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481762>>.

DASILVA, G.; PAZOS, M.; GARCÍA-EGIDO, E.; GALLARDO, J. M.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R.; MEDINA, I. Healthy effect of different proportions of marine  $\omega$ -3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286315001631>>.

DE SOUZA, A. S.; PACHECO, L. da C.; CASTRO, P. da S.; HOKOÇ, J. N.; ROCHA, M. S.; DO CARMO, M. das G. T. Brain fatty acid profiles and spatial learning in malnourished rats: effects of nutritional intervention. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 119–127, 2008. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50449107805&partnerID=tZOtx3y1>>.

ENGER, R.; TANG, W.; VINDEDAL, G. F.; JENSEN, V.; HELM, P. J.; SPRENGEL, R.; LOOGER, L. L.; NAGELHUS, E. A. Dynamics of ionic shifts in cortical spreading depression. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 11, p. 4469–4476, 2015.

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

FONTANI, G.; CORRADESCHI, F.; FELICI, A.; ALFATTI, F.; MIGLIORINI, S.; LODI, L. Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. **European journal of clinical investigation**, v. 35, n. 11, p. 691–699, 2005.

GHARAMI, K.; DAS, M.; DAS, S. Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 51–62, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018615300413>>.

GOMES DA SILVA, S.; ALMEIDA, A. A. de; SILVA ARAÚJO, B. H.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R. M. Early physical exercise and seizure susceptibility later in life. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 861–865, 2011.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736574811001110>>.

GOMES DA SILVA, S.; ARAUJO, B. H. S.; COSSA, A. C.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. da G.; ARIDA, R. M. Physical exercise in adolescence changes CB1 cannabinoid receptor expression in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 5, p. 492–496, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018610002184>>.

GOMES DA SILVA, S.; DONÁ, F.; FERNANDES, M. J. da S.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R. M. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain&Development**, v. 32, n. 2, p. 137–142, 2012a.

GOMES DA SILVA, S.; UNSAIN, N.; MASCÓ, D. H.; TOSCANO-SILVA, M.; AMORIM, H. A. de; ARAÚJO, B. H. S.; SIMÕES, P. S. R.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. da G.; MORTARA, R. A.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R. M. Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 347–358, 2012b. Disponível em: <[http://www.readcube.com/articles/10.1002/hipo.20903?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1&purchase\\_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase\\_site\\_license=LICENSE\\_DENIED](http://www.readcube.com/articles/10.1002/hipo.20903?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED)>.

GÓMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 568–578, 2008.

GOMEZ-PINILLA, F.; TYAGI, E. Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuroplasticity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

GOUTIANOS, G.; TZIOURA, A.; KYPAROS, A.; PASCHALIS, V.; MARGARITELIS, N. V.; VESKOUKIS, a. S.; ZAFEIRIDIS, A.; DIPLA, K.; NIKOLAIDIS, M. G.; VRABAS, I. S. The rat adequately reflects human responses to exercise in blood biochemical profile: a comparative study. **Physiological Reports**, v. 3, n. 2, p. e12293–e12293, 2015. Disponível em: <<http://physreports.physiology.org/cgi/doi/10.14814/phy2.12293>>.

GUEDES, R. C. A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: LIEBERMANN, H.; KANAREK, R.; PRASAD, C. (Ed.). **Nutrition, Brain and Behavior Series**. CRC Press ed. [s.l: s.n.]p. 39–54.

GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D.; CARVALHO, E. A. Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: **Frontiers in Excitatory Amino Acid Research**. [s.l: s.n.]p. 667 – 670.

HARRIS, W. S. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins : animal studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1611S–6S, 1997.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, n. 4, p. 387–393, 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/colipidology/pages/articleviewer.aspx?year=2006&issue=08000&article=00003&type=abstract>>.

HASHIMOTO, M.; TOZAWA, R.; KATAKURA, M.; SHAHDAT, H.; HAQUE, A. M.; TANABE, Y.; GAMOH, S.; SHIDO, O. Protective effects of prescription n-3 fatty acids against impairment of spatial cognitive learning ability in amyloid  $\beta$ -infused rats. **Food & function**, v. 2, p. 386–394, 2011.

HILL, A. M.; BUCKLEY, J. D.; MURPHY, K. J.; HOWE, P. R. C. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1267–74, 2007. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/85/5/1267.full>>.

HOLMAN, R. T. Essential Fatty Acids. **Nutrition Reviews**, v. 16, n. 2, p. 33–35, 1958. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v194/n4832/abs/194973a0.html>>  
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1753-4887.1958.tb00660.x>>.

KRAMER, A. F.; ERICKSON, K. I. Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 11, n. 8, p. 342–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629545>>.

KRAUSS, R. M.; ECKEL, R. H.; HOWARD, B.; APPEL, L. J.; DANIELS, S. R.; DECKELBAUM, R. J.; ERDMAN, J. W.; KRIS-ETHERTON, P.; GOLDBERG, I. J.; KOTCHEN, T. a; LICHTENSTEIN, A. H.; MITCH, W. E.; MULLIS, R.; ROBINSON, K.; WYLIE-ROSETT, J.; JEOR, S. S.; SUTTIE, J.; TRIBBLE, D. L.; BAZZARRE, T. L. Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. **Circulation**, v. 102, p. 2284–2299, 2000.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: New Recommendations From the American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 151–152, 2003. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000057393.97337.AE>>.

KROMHOUT, D.; BOSSCHIETER, E.; COULANDER, L. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 19, 1985.

LIDLAW, M.; COCKERLINE, C. a; ROWE, W. J. A randomized clinical trial to determine the efficacy of manufacturers' recommended doses of omega-3 fatty acids from different sources in facilitating cardiovascular disease risk reduction. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 99, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4085663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of physiology**, v. 7, n. 6, p. 359–390, 1944.

LEE, J. H.; FUKUMOTO, M.; NISHIDA, H.; IKEDA, I.; SUGANO, M. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. **The Journal of nutrition**, v. 119, n. 12, p. 1893–9, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2621483>>.

LIMA, C. B.; SOARES, G. de S. F.; VITOR, S. M.; ANDRADE-DA-COSTA, B. L. da S.;

CASTELLANO, B.; GUEDES, R. C. A. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 1, p. 98–105, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.12.008>>.

LLUÍS, L.; TALTAVULL, N.; MUÑOZ-CORTÉS, M.; SÁNCHEZ-MARTOS, V.; ROMEU, M.; GIRALT, M.; MOLINAR-TORIBIO, E.; TORRES, J. L.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; PAZOS, M.; MÉNDEZ, L.; GALLARDO, J. M.; MEDINA, I.; NOGUÉS, M. R. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 140, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3850782&tool=pmcentrez&renderertype=abstract>>.

MAEHRE, H.; JENSEN, I.-J.; ELVEVOLL, E.; EILERTSEN, K.-E.  $\omega$ -3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22636–22661, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/22636/>>.

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MCEWEN, B. S. Structural plasticity of the adult brain: how animal models help us understand brain changes in depression and systemic disorders related to depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119–128, 2004. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77950153424&partnerID=tZOTx3y1>>.

MELLO, P. B.; MELLO, P. B.; BENETTI, F.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 2, p. 301–9, 2008. Disponível em:



<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18506256>>.

MIRELLE COSTA MONTEIRO, H.; LIMA BARRETO-SILVA, N.; ELIZABETE DOS SANTOS, G.; DE SANTANA SANTOS, A.; SÉFORA BEZERRA SOUSA, M.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â. Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 49–54, 2015.

MIZUNOYA, W.; OHNUKI, K.; BABA, K.; MIYAHARA, H.; SHIMIZU, N.; TABATA, K.; KINO, T.; SATO, Y.; TATSUMI, R.; IKEUCHI, Y. Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. p. 1–9, 2013.

MURPHY, T.; DIAS, G. P.; THURET, S. Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. **Neural Plasticity**, v. 2014, p. 32, 2014. Disponível em: <[http://apps.webofknowledge.com.gate1.inist.fr/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=U2ifpb2mhWmeONILTta&page=7&doc=64&cacheurlFromRightClick=no](http://apps.webofknowledge.com.gate1.inist.fr/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=U2ifpb2mhWmeONILTta&page=7&doc=64&cacheurlFromRightClick=no)>.

MUSTO, A. E.; GJORSTRUP, P.; BAZAN, N. G. The omega-3 fatty acid-derived neuroprotectin D1 limits hippocampal hyperexcitability and seizure susceptibility in kindling epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 52, n. 9, p. 1601–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569016>>.

NOVELLI, E. L. B.; 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. 111–119, 2007.

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

OGONOVSKY, H.; BERKES, I.; KUMAGAI, S.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; GOTO, S.; RADÁK, Z. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 46, n. 8, p. 635–40,

2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863241>>.

PAPANIKOLAOU, Y.; BROOKS, J.; REIDER, C.; FULGONI, V. L. U.S. adults are not meeting recommended levels for fish and omega-3 fatty acid intake: results of an analysis using observational data from NHANES 2003-2008. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 31, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3992162&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PATTERSON, E.; WALL, R.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 1–16, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/539426/>>.

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

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165027085900317>>.

PIETRELLI, A.; LOPEZ-COSTA, J.; GOÑI, R.; BRUSCO, A.; BASSO, N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. **Neuroscience**, v. 202, p. 252–266, 2012.

PLAMONDON, H.; ROBERGE, M. Physiology & Behavior Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 492–500, 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, 2003.

RACHETTI, a. L. F.; ARIDA, R. M.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. a.; FERNADES-SANTOS, L.; FRUSSA-FILHO, R.; DA SILVA, S. G.; SCORZA, F. a.; CYSNEIROS, R. M. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, n. 1, p. 283–289, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.048>>.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 38, n. 1, p. 17–23, 2001.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **Experimental Biology**, v. 127, p. 838–841, 1997.

ROS, E.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; PICÓ, C.; RUBIO, M. Á.; BABIO, N.; PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; ESCRICH, E.; BULLÓ, M.; SOLANAS, M.; HERNÁNDEZ, A. G.; SALAS-SALVADÓ, J. Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta; postura de la Federación Española de Sociedades de Alimentación, Nutrición y Dietética (FESNAD). **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 2, p. 435–477, 2015.

SANTOS-SOTO, I. J.; CHORNA, N.; CARBALLEIRA, N. M.; VÉLEZ-BARTOLOMEI, J. G.; MÉNDEZ-MERCED, A. T.; CHORNY, A. P.; DE ORTIZ, S. P. Voluntary Running in Young Adult Mice Reduces Anxiety-Like Behavior and Increases the Accumulation of Bioactive Lipids in the Cerebral Cortex. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81459, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081459>>.

SAUGSTAD, L. F. Are Neurodegenerative Disorder and Psychotic Manifestations Avoidable Brain Dysfunctions with Adequate Dietary Omega-3? **Nutrition and Health**, v. 18, n. 2, p. 89–101, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859172>>.

SIMOPOULO, A. P. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. **Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 2, p. 203–15, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12035-010-8162-0>>.

SIMOPOULOS, a P.; LEAF, A.; SALEM, N. Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 63, n. 3, p. 119–121, 2000.

SIMOPOULOS, A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 128, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/8/3/128>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, S. I Diretriz Brasileira De Diagnóstico e Tratamento Da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. I, p. 1–28, 2005.

STONEHOUSE, W.; CONLON, C. A.; PODD, J.; HILL, S. R.; MINIHANE, A. M.; HASKELL, C.; KENNEDY, D. DHA supplementation improved both memory and reaction time in healthy young adults : a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 1134–1143, 2013.

SU, K.-P.; MATSUOKA, Y.; PAE, C.-U. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prevention of Mood and Anxiety Disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 129–37, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4540034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TREVIZOL, F.; ROVERSI, K.; DIAS, V. T.; ROVERSI, K.; PASE, C. S.; BARCELOS, R. C. S.; BENVEGNI, D. M.; KUHN, F. T.; DOLCI, G. S.; ROSS, D. H.; VEIT, J. C.; PICCOLO, J.; EMANUELLI, T.; BÜRGER, M. E. Influence of lifelong dietary fats on the brain fatty acids and amphetamine-induced behavioral responses in adult rat. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 45, p. 215–22, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584613001188>>.

VAN TOL, M. J.; DEMENESCU, L. R.; VAN DER WEE, N. J. A.; KORTEKAAS, R.; MARJAN M.A., N.; BOER, J. A. Den; RENKEN, R. J.; VAN BUCHEM, M. A.; ZITMAN, F. G.; ALEMAN, A.; VELTMAN, D. J. Functional magnetic resonance imaging correlates of emotional word encoding and recognition in depression and anxiety disorders. **Biological**

**Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 593–602, 2012.

WANG, T.; VAN, K. C.; GAVITT, B. J.; GRAYSON, J. K.; LU, Y. C.; LYETH, B. G.; PICHAKRON, K. O. Effect of fish oil supplementation in a rat model of multiple mild traumatic brain injuries. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 31, p. 647–659, 2013.

WU, a.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 751–759, 2008.


YANGA, R. H.; WANGA, F.; HOUA, X. H.; CAO, Z. P.; WANGA, B.; XUA, X. N.; HUB, S. J. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids improves learning performance of diabetic rats by regulating the neuron excitability. **Neuroscience**, v. 212, n. 14, p. 93–103, 2012. Disponível em: <doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.005>.

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

## APÊNDICE

---

APÊNDICE A - Artigo original submetido ao periódico “Applied Physiology, Nutrition and Metabolism”

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism	
Submission Confirmation	 Print
Thank you for your submission	
<hr/>	
<b>Submitted to</b>	Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism
<b>Manuscript ID</b>	apnm-2016-0454
<b>Title</b>	Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus
<b>Authors</b>	Macedo, Patrícia de Melo, Janatar Stella Costa, Laís Alves Braz, Glauber Ruda Sousa, Shirley Lagranha, Claudia Batista-de-Oliveira-Hornsby, Manuella
<b>Date Submitted</b>	11-Aug-2016
<b>Payment Method</b>	Waived 11-Aug-2016

---

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

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

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

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

\*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding author

Mailing addresses:

Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby

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

E-mail: [batistadeoliveiram@gmail.com](mailto:batistadeoliveiram@gmail.com)

## Abstract

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

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

## 1.0 Introduction

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

Therefore, there is a growing interest to better understand how lifestyle choices and their underlying mechanisms can improve cognition, memory and brain function to benefit neurodevelopment, and to prevent or counteract neurodegenerative diseases (Murphy, Dias et al. 2014, Reijls, Teunissen et al. 2015). The object recognition task allows to separately analyze different memory processes, such as acquisition, consolidation and retrieval (Prickaerts, Sik et al. 2005).

Studies in humans (Churchill, Galvez et al. 2002, Murphy, Dias et al. 2014, Sachdeva, Kumar et al. 2015) and animals (Radak, Kaneko et al. 2001, Rachetti, Arida et al. 2013, Murphy, Dias et al. 2014) suggest that the effects of long chain omega-3 (n-3) fatty acids and physical exercise can act on cognition and improve brain function. Since the consumption of (n-3) PUFA and exercise can be simultaneously present in daily life, the association between them could indicate that their effects on the brain are complementary (Wu, Ying et al. 2008).

From early fetal life to adulthood, the adequate nutrition is an essential requirement for morphogenesis of the brain, during this initial *period*, PUFAs play an important role (Gharami, Das et al. 2015). The n-3 consumption can benefits brain's health, these benefits have been investigated by experimental and epidemiologic studies. Specific features caused by n-3 consumption are associated to hippocampal BDNF elevation, stimulation of mitochondrial function and reduced oxidative stress (Gomez-Pinilla 2008).



Experimental designs have been focused on the use of different sources of fish oil supplementation on injury situations and their effects to minimize oxidative stress in aged mice (Cutuli, De Bartolo et al. 2014), as well as in young rats (Zugno, Chipindo et al. 2014). Furthermore, beneficial properties of fish oil can be extended to a better performance of memory tests in animal models of Alzheimer's disease (Hashimoto, Tozawa et al. 2011) and brain injury (Wang, Van et al. 2013).

Likewise, exercise can be useful for both maintaining health and in specific pathological conditions. In animal studies, exercise can improve cognitive function depending on which life stage the animal was submitted to the exercise routine (Churchill, Galvez et al. 2002), (Radak, Kaneko et al. 2001). The underlying mechanisms demonstrated beneficial effects such as preventing oxidative stress in brain regions of adolescent (Chalimoniuk, Jagsz et al. 2015) and aging rats (Flores, Martins et al. 2014).

It is also known that beneficial effects provided by the association between fish oil supplementation and exercise are characterized by enhanced antioxidant defenses that can prevent deleterious effects of aging (da Silva Pedroza, Lopes et al. 2015). However, depending on the life stage effects of fish oil supplementation or exercise can be contradictory (Batista-de-Oliveira, Lopes et al. 2012, Murphy, Dias et al. 2014, Pusceddu, Kelly et al. 2015).

Notwithstanding, evidence show beneficial effects for the use of fish oil coupled with exercise on oxidative stress and memory, there is still a lack of information about the appropriate timings to maximize results of this therapeutic approach, as well as the underlying mechanisms for these effects are still unclear. Therefore, we aimed to investigate whether the daily supplementation with fish oil coupled with moderate treadmill exercise in both young and adult rats would influence memory and hippocampal oxidative stress.

## *2. Materials and methods*

### *2.1 Animals and experimental design*

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

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

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

## 2.2 Supplementation with fish oil

The daily supplementation was performed by gavage. Rats received a single daily dose of fish oil (Fo, 85mg/kg/d and 1ml/250g/d) or vehicle solution (V, 1 ml/250g/d) as adapted from (Rachetti, Arida et al. 2013, da Silva Pedroza, Lopes et al. 2015). The capsules of fish oil (Sundown®) containing polyunsaturated fatty acids [docosahexaenoic (DHA; 85mg/1g) and eicosapentaenoic (EPA; 128mg/1g)] were dissolved in Cremophor (Sigma ®) 0.009% then in distilled water and administered via gavage. To perform the control group, a vehicle solution

(V) was given with the same amount of Cremophor and distilled water that were used to prepare the solution provided to supplement the fish oil.

### 2.3 Treadmill exercise

All exercised rats were placed on the treadmill (Insight EP-131, 0° inclination) following parameters of moderate exercise that were adapted from previous studies (Batista-de-Oliveira, Lopes et al. 2012). Briefly, animals were placed 30min/day on the treadmill and the speed was increased as it follows: 5m/min (first week); 10 m/min (second week) and 15m/min (third and fourth weeks). The rats in the sedentary group (S) were placed at same time in the apparatus but it remained off.

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

### 2.4 Behavioral analysis

All the behavioral tests were assessed individually at either 46 or 121 days old to perform the young and adult groups, respectively. Detailed protocols and the rationale for the test choices provided are discussed elsewhere (Ennaceur and Delacour 1988, Dere, Huston et al. 2005, Viana, Lima et al. 2013).

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

24 and 48 hours later, in the **second and third days**, each rat was returned to the circular arena, which now contained two equal objects, made of clear glass. These objects were explored by each rat during five minutes, and this constituted the trial session. After a fifty-min interval, the animal returned to the arena to perform a five-min test session, in which the capability of the rats to recognize novel object's shape or novel object's location (dislocated object) was tested in the second and third day, respectively. Each experiment was recorded by a camera installed in the room roof. The files were analyzed with the ANY-Maze Software (version 4.99 m) by two previously trained observers, who were "blinded" regarding the previous treatment of the animal. The videos were analyzed to assess the time spent by the rat to explore each object. The criteria to define the time spent by the rats were based on the "active exploration", when rats were touching the objects with the vibrissae, snout or forepaws, as previous published (Dere, Huston et al. 2005, Viana, Lima et al. 2013). In the trial session, the preference ratio was calculated for each animal as being the time spent by the rat in exploring each object/total exploration time. The trial sessions ensured that rats employed equal time in exploring each of the two objects, and therefore there was no preference for one of them. Rats that presented in the trial session a ratio near 0.5, indicating equal exploration of the two objects, were eligible to realize the test session; otherwise they were discarded.

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

The performance was represented by a ***discrimination index*** (%) which consisted of the exploration time for each analyzed criteria (familiar *versus* novel shape and stationary *versus* dislocated position), expressed as a percentage of the total time of exploration. This paradigm

does not involve the learning of any rule, since it is entirely based on the spontaneous exploratory behavior of rats towards objects (Ennaceur and Delacour 1988). The objects were devoid of any ethological meaning, they had never been paired as a reinforcer, and were heavy enough to prevent being moved by the animal. Because the objects were made with the same material, the rats could not distinguish them by olfactory cues during the trial session. After each session, the objects and the apparatus were thoroughly cleaned with 70% ethanol solution.

## 2.5 Drugs and reagents

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

## 2.6 Oxidative Stress Biomarkers

### 2.6.1 Sample preparation for oxidative stress and antioxidant analyses

Hippocampus from young and adult rats were homogenized in 50 mM-TRIS and 1mM-EDTA (pH 7.4), with the addition of 1 mM-sodium orthovanadate and 200µg/mL phenylmethanesulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at 4000 RPM for 10 min at 4°C and the protein supernatant used for biochemical analyses after the protein content had been quantified by Bradford method (Bradford 1976) .

### 2.6.2 Evaluation of Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated using malondialdehyde (MDA) levels as previously published (Buege and Aust 1978). Three hundred µg protein was sequentially mixed to 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM-TRIS buffer (pH 7.4). This mixture was centrifuged at 2500g for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment yielded then was measured at 535 nm absorption at RT and expressed as nmol/mg protein.

### 2.6.3 Evaluation of Protein Oxidation

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

#### 2.6.4 Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity

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

#### 2.6.5 Measurement of Catalase (CAT) activity

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

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

GST activity was measured as described previously by Habig, Pabst (1974) (Habig, Pabst et al. 1974). Two hundred  $\mu$ g of protein was incubated in a 0.1 M-phosphate buffer (pH 6.5) containing 1mM-EDTA at 30° C and had the assay started with the addition of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM-GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was

monitored through the absorbance at 340 nm. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1  $\mu$ mol-2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (Habig, Pabst et al. 1974).

#### 2.6.7 Measurement of reduced glutathione (GSH)

To assess GSH levels, the samples were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM-EDTA (pH 8.0). Then, an aliquot from the diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde at room temperature for exactly 15 min. Fluorescence intensities measured at 420 nm and excitation at 350 nm were compared with a standard curve of known concentrations of GSH (0.5-10 mM) as previously described (Hissin and Hilf 1976).

#### 2.6.8 Sulfhydryl content

To evaluate the levels of sulfhydryl we based the assay on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) that absorb at 412 nm in spectrophotometry (Aksenov and Markesbery 2001). Briefly, at TRIS buffer, pH 7.4, 0.450 mg of homogenate was added in addition to 1 mM DTNB. This mix was incubated 30 min at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as mmol TNB/mg protein.

#### 2.7 Statistical analysis

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

the statistical analysis performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3.0 Results

#### 3.1 Behavioral assays

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

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

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



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

### 3.2 Oxidative state

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

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

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

Furthermore, in terms of the capacity to convert  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  by catalase, we observed that exercise is the only variable that can induce a significant increase. This increase does not depend on the supplementation with or without fish oil (V&S:  $1.0 \pm 0.1$  U/mg prot,  $n=6$ ; V&Ex:  $1.7 \pm 0.1$  U/mg prot,  $n=7$ ,  $p<0.01$ , and Fo&S:  $0.9 \pm 0.1$  U/mg prot,  $n=6$ ; Fo&Ex:  $1.6 \pm 0.3$  U/mg prot,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ). However, in regards to glutathione-S-Transferase, neither exercise, nor fish oil supplementation induce differences in GST activity. In adult rats, the antioxidant defense had a different response than observed in young rats, either exercise or fish oil supplementation were able to induces differences in SOD, CAT or GST activity. All the data of SOD, CAT and GST are described in **figure 3**.

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

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

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

#### *4.0 Discussion*

Fish oil intake coupled with treadmill exercise has been associated to improvements on rat performance in different memory tasks. Evidence show that these improvements on brain function can be long-lasting. The improvements depend on the memory task that is performed (Rachetti, Arida et al. 2013).

Our data suggests that fish oil supplementation changes the rat performance on the task of placement recognition in an age-dependent manner. In fact, young rats that received fish oil during the brain critical development period had reduced ability to recognize the novel object placement as compared to the performance of the respective controls. Since, depending on the life stage, effects of fish oil supplementation can be contradictory, the present data highlight the need to better understand the relationship between: (1) the dose and volume of fish oil supplementation, (2) the combination between (Fo) and moderate exercise, (3) and most importantly an appropriate timing for this intervention.

Similarly to the present data, previous findings show that PUFAs and exercise have been implicated in enhancing cognition and memory functions in healthy, adult rodents (Murphy,

Dias et al. 2014). These authors reviewed a variety of data demonstrating a strong and influential relationship between dietary intervention with PUFAs, exercise, and brain function. Besides these previous findings in adult rodents, there are published data showing that the perinatal supplementation with essential fatty acids improved hippocampal development in the offspring, only when the dam received the enriched diet also during pregnancy (Niculescu, Lupu et al. 2011). Herein, we observed an impairment to recognize the novel object placement when young rats received fish oil during the brain critical development period. Present and previous data highlight the importance of the appropriate timings for this lifestyle intervention to maximize results on memory functions (Niculescu, Lupu et al. 2011, Murphy, Dias et al. 2014).

Fish oil is a reliable source of (LC-PUFAs). These lipids have important role in one's health state; they are considered essential because mammals are not able to produce them, therefore LC-PUFAs have to be obtained by dietetic sources (Yehuda, Rabinovitz et al. 2005). On the other hand, there are challenges to reach the daily standard LC-PUFA recommendations through dietetic sources, and to achieve beneficial effects on health care. Therefore, the supplementation with fish oil as well as with other dietetic sources of LC-PUFA has grown exponentially either prescribed by several physicians and nutritionists; or by the use from the general population without an acknowledgement from a health care professional. In fact, the use of LC-PUFA has been pointed out in a variety of acute and chronic inflammatory settings (Calder 2006). However, experimental and clinical data about LC-PUFA underlying mechanisms and clinical efficacy are still weak in some settings (Murphy, Dias et al. 2014).

Experimental data shows that LC-PUFA and treadmill exercise underlying mechanisms on heart metabolism are related to enhancement of antioxidant defenses (da Silva Pedroza, Lopes et al. 2015). On the other hand, clinical trials describe LC-PUFA benefits by reducing

the time to fatigue, increased grip strength, and decreased use of nonsteroidal antiinflammatory drugs (Calder 2006).

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

We believe that there is a timing-related association between the behavioral data and the changes on hippocampal defenses as judged by the present results. According to recently published data diet coupled with exercise are key modulators of brain structure and function. Together, diet and exercise can influence multiple aspects of brain plasticity, such as neurodevelopment, neurotrophins, neurogenesis, synaptogenesis, and ultimate activity at the brain network level (Murphy, Dias et al. 2014).

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

### *5.0 Acknowledgements*

The authors are thankful to the CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development MCTI/CNPq/Universal 2014/APQ 444500/2014-6) and FACEPE (Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil, APQ 1026.4-09/12). CNPq and FACEPE provided grants to fund this work. The authors also acknowledge the scholarships

provided by CNPq to PFCM, by FACEPE to GRFB, and by CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) to LARC and JSVM

## 6.0 References

- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." **Methods Enzymol** 105: 121-126.
- Aksenov, M. Y. and W. R. Markesbery (2001). "Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease." **Neurosci Lett** 302(2-3): 141-145.
- Batista-de-Oliveira, M., A. A. Lopes, R. F. Mendes-da-Silva and R. C. Guedes (2012). "Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis." **Exp Gerontol** 47(6): 452-457.
- 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: 248-254.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." **Methods Enzymol** 52: 302-310.
- Calder, P. C. (2006). "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases." **Am J Clin Nutr** 83(6 Suppl): 1505S-1519S.
- Chalimoniuk, M., S. Jagsz, E. Sadowska-Krepa, S. J. Chrapusta, B. Klapcinska and J. Langfort (2015). "Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats." **J Physiol Pharmacol** 66(4): 539-547.
- Churchill, J. D., R. Galvez, S. Colcombe, R. A. Swain, A. F. Kramer and W. T. Greenough (2002). "Exercise, experience and the aging brain." **Neurobiol Aging** 23(5): 941-955.
- Cutuli, D., P. De Bartolo, P. Caporali, D. Laricchiuta, F. Foti, M. Ronci, C. Rossi, C. Neri, G. Spalletta, C. Caltagirone, S. Farioli-Vecchioli and L. Petrosini (2014). "n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice." **Front Aging Neurosci** 6: 220.
- da Silva Pedroza, A. A., A. Lopes, R. F. Mendes da Silva, G. R. Braz, L. P. Nascimento, D. S. Ferreira, A. A. dos Santos, M. Batista-de-Oliveira-Hornsby and C. J. Lagranha (2015). "Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts?" **Life Sci** 137: 133-141.
- Dere, E., J. P. Huston and M. A. De Souza Silva (2005). "Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory." **Brain Res Protoc** 16(1-3): 10-19.
- Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." **Behav Brain Res** 31(1): 47-59.
- Flores, M. F., A. Martins, H. L. Schimdt, F. W. Santos, I. Izquierdo, P. B. Mello-Carpes and F. P. Carpes (2014). "Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging." **Neurochem Int** 78: 53-60.
- Gharami, K., M. Das and S. Das (2015). "Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain." **Neurochem Int** 89: 51-62.
- Gomez-Pinilla, F. (2008). "Brain foods: the effects of nutrients on brain function." **Nat Rev Neurosci** 9(7): 568-578.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I. M. Arias and W. B. Jakoby (1974). "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver." **Proc Natl Acad Sci U S A** 71(10): 3879-3882.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." **J Biol Chem** 249(22): 7130-7139.
- Hashimoto, M., R. Tozawa, M. Katakura, H. Shahdat, A. M. Haque, Y. Tanabe, S. Gamoh and O. Shido (2011). "Protective effects of prescription n-3 fatty acids against impairment of spatial cognitive learning ability in amyloid beta-infused rats." **Food Funct** 2(7): 386-394.
- Hissin, P. J. and R. Hilf (1976). "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues." **Anal Biochem** 74(1): 214-226.

- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." **J Biol Chem** 247(10): 3170-3175.
- Murphy, T., G. P. Dias and S. Thuret (2014). "Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap." **Neural Plast** 2014: 563160.
- Niculescu, M. D., D. S. Lupu and C. N. Craciunescu (2011). "Maternal alpha-linolenic acid availability during gestation and lactation alters the postnatal hippocampal development in the mouse offspring." **Int J Dev Neurosci** 29(8): 795-802.
- Prickaerts, J., A. Sik, F. J. van der Staay, J. de Vente and A. Blokland (2005). "Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation." **Psychopharmacology** (Berl) 177(4): 381-390.
- Pusceddu, M. M., P. Kelly, N. Ariffin, J. F. Cryan, G. Clarke and T. G. Dinan (2015). "n-3 PUFAs have beneficial effects on anxiety and cognition in female rats: Effects of early life stress." **Psychoneuroendocrinology** 58: 79-90.
- Rachetti, A. L., R. M. Arida, C. L. Patti, K. A. Zanin, L. Fernandes-Santos, R. Frussa-Filho, S. Gomes da Silva, F. A. Scorza and R. M. Cysneiros (2013). "Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks." **Behav Brain Res** 237: 283-289.
- Radak, Z., T. Kaneko, S. Tahara, H. Nakamoto, J. Pucsok, M. Sasvari, C. Nyakas and S. Goto (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." **Neurochem Int** 38(1): 17-23.
- Reijs, B. L., C. E. Teunissen, N. Goncharenko, F. Betsou, K. Blennow, I. Baldeiras, F. Brosse, E. Cavado, T. Fladby, L. Froelich, T. Gabryelewicz, H. Gurvit, E. Kapaki, P. Koson, L. Kulic, S. Lehmann, P. Lewczuk, A. Lleo, W. Maetzler, A. de Mendonca, A. M. Miller, J. L. Molinuevo, B. Mollenhauer, L. Parnetti, U. Rot, A. Schneider, A. H. Simonsen, F. Tagliavini, M. Tsolaki, M. M. Verbeek, F. R. Verhey, M. Zboch, B. Winblad, P. Scheltens, H. Zetterberg and P. J. Visser (2015). "The Central Biobank and Virtual Biobank of BIOMARKAPD: A Resource for Studies on Neurodegenerative Diseases." **Front Neurol** 6: 216.
- Reznick, A. Z. and L. Packer (1994). "Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay." **Methods Enzymol** 233: 357-363.
- Sachdeva, A., K. Kumar and K. S. Anand (2015). "Non Pharmacological Cognitive Enhancers - Current Perspectives." **J Clin Diagn Res** 9(7): VE01-VE06.
- Viana, L. C., C. M. Lima, M. A. Oliveira, R. P. Borges, T. T. Cardoso, I. N. Almeida, D. G. Diniz, J. Bento-Torres, A. Pereira, M. Batista-de-Oliveira, A. A. Lopes, R. F. Silva, R. Abadie-Guedes, A. Amancio Dos Santos, D. S. Lima, P. F. Vasconcelos, C. Cunningham, R. C. Guedes and C. W. Picanco-Diniz (2013). "Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry." **Neuroscience** 238: 280-296.
- Wang, T., K. C. Van, B. J. Gavitt, J. K. Grayson, Y. C. Lu, B. G. Lyeth and K. O. Pichakron (2013). "Effect of fish oil supplementation in a rat model of multiple mild traumatic brain injuries." **Restor Neurol Neurosci** 31(5): 647-659.
- Wu, A., Z. Ying and F. Gomez-Pinilla (2008). "Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition." **Neuroscience** 155(3): 751-759.
- Yehuda, S., S. Rabinovitz and D. I. Mostofsky (2005). "Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging." **Neurobiol Aging** 26 Suppl 1: 98-102.
- Zugno, A. I., H. L. Chipindo, A. M. Volpato, J. Budni, A. V. Steckert, M. B. de Oliveira, A. S. Heylmann, F. da Rosa Silveira, G. A. Mastella, S. G. Maravai, P. G. Wessler, A. R. Binatti, B. Panizzutti, P. F. Schuck, J. Quevedo and C. S. Gama (2014). "Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia." **Neuroscience** 259: 223-231.

### Figure captions

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

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

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

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



## ANEXO

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



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (51) 2126 9840 / 2126 8361  
Fax: (51) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 19 de novembro de 2014.

Ofício nº 75/14

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

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

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 150 dias; Peso: 15 a 500g; Sexo:  
machos; Nº total de animais: 144.

Atenciosamente,

*Prof. Dr. Pedro V. Carneiro*  
Prof. Dr. Pedro V. Carneiro  
Diretor Presidente do CCB/UFPE  
UFPE 50670-420

CCB: Integrar para desenvolver