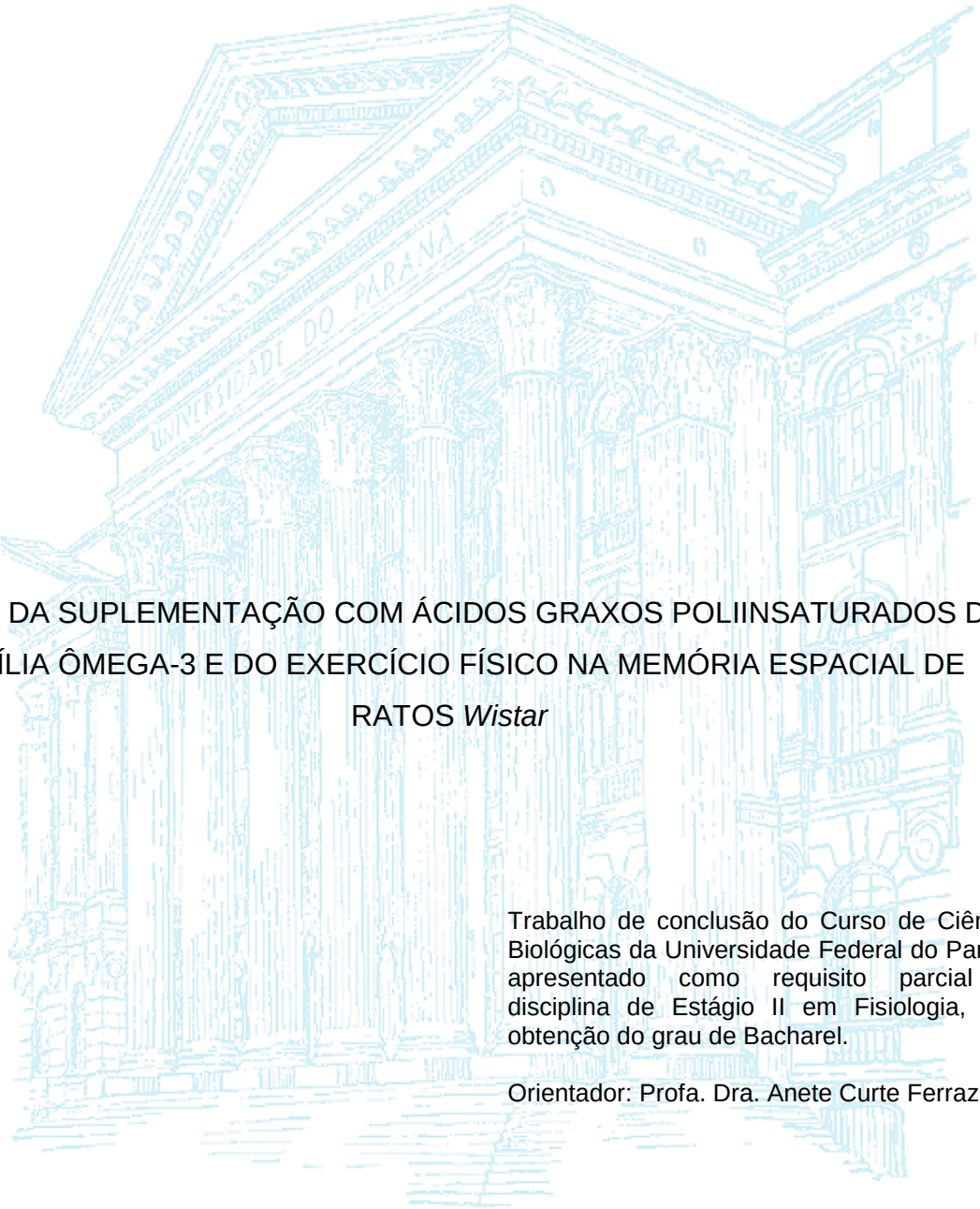
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO TARGA DIAS SANTOS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 E DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS *Wistar*

CURITIBA
2011

ADRIANO TARGA DIAS SANTOS



EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3 E DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS *Wistar*

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial da disciplina de Estágio II em Fisiologia, para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz.

CURITIBA
2011

Dedico esse trabalho às três mulheres da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha avó Lindaci, por ter dado tudo o que podia para que eu conseguisse atingir meus objetivos. Pelo amor incondicional, carinho, dedicação e exemplo de vida.

Agradeço à Luana por estar comigo em todos esses momentos, pelo apoio, compreensão, conselhos e paciência quando a única coisa que eu sabia dizer era que eu não tinha tempo. Sem você eu não teria a confiança e a coragem que hoje tenho.

Agradeço à minha mãe Jocasta, pela confiança e apoio, principalmente financeiro e ao meu pai pelas conversas e amizade.

Agradeço aos demais familiares que contribuíram indiretamente para que eu conseguisse concluir a graduação: primos-irmãos (Pac-boy, Xatuca-girl), avós, tios (Tia Rose e Tia Zita pelo apoio e valorização do meu esforço).

À Professora Dra. Anete Curte Ferraz por ter me recebido no Laboratório e assim tornado possível a realização desse trabalho. Pela dedicação e paciência, principalmente quando eu reclamava do Boyler, quando inventei um *p* que não existia e pela aula sobre memória. Consolidei bem, agora vou evocar.

Ao professor Marcelo pela dedicação e paciência, principalmente durante a análise dos dados não paramétricos que não foi possível (ainda). Durante o mestrado, resolveremos esse e mais problemas que irão aparecer.

À Fabíola, pela amizade, paciência com minhas reclamações, risadas e lanches “saudáveis” pela manhã. Não poderia pedir por uma “dupla” melhor. Espero ainda fazer muitos Barnes com você.

Aos demais amigos do laboratório: Ana Márcia, a moça séria e comprometida que não tem Facebook, pela ajuda em vários momentos, principalmente durante o sacrifício e por me fazer rir da minha manga 3/4, Aparecida pelas conversas e pela Luma, à minha concorrente Laís (ou Thaís?) pela amizade e risadas, à Cláudia (menina do café) pelas risadas, por ajudar durante o Barnes e escutar desabafos, ao Bruno (só trabalha sexta, ou seja, só dá relaxo), ao Marco (estímulo aversivo do Barnes), à Sarah, Dani, Isa, Paula, Maíra, Mariana e Ana pelos momentos no laboratório. Espero que eu não tenha esquecido de ninguém...

Ao pessoal do PIBID e aos amigos da graduação: Jaque, Carol, Camila, Dessa, Giu, Alejandro, Micheli, Dani, Laura e Val. Vocês tornaram esse processo muito menos cansativo. Muito obrigado.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta (e que talvez não tenham sido mencionados) para que esse estudo fosse possível, muito obrigado.

RESUMO

Vários estudos mostram que uma dieta balanceada e rica em ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 (AGPIs ω-3) e a prática da atividade física regularmente são fatores que contribuem para a qualidade de vida, podendo melhorar a performance cognitiva, incluindo a memória. Esse estudo investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe em uma curta janela temporal e o efeito da atividade física em dez dias de treino de natação, bem como o efeito da associação entre esses dois tratamentos na memória espacial de ratos *Wistar* testados no Labirinto de Barnes. Também foi observado se os efeitos da suplementação e do exercício perduram após 21 dias. Os resultados mostraram que apenas o exercício físico em uma curta janela temporal foi capaz de aumentar o aprendizado e memória espacial e que, após 21 dias, não se pode mais observar esse efeito. Não foi observado efeito da suplementação em nenhum dos dois momentos (logo após o treino e após 21 dias sem treinamento). Isso indica que existe uma necessidade maior que 12 dias de uma dieta balanceada e enriquecida com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 para observar resultados no aprendizado e memória espacial e que é necessária a realização de atividade física com uma maior freqüência para observar os efeitos.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados. Óleo de peixe. Exercício físico. Memória. Labirinto de Barnes.

ABSTRACT

Several studies show that a balanced diet that is rich in polyunsaturated ω-3 fatty acids (PUFAs ω-3) and regular exercising are contributing factors to the quality of life, improving cognitive performance, including memory. This study investigates the effect of fish oil supplementation in a short time frame and the effect of physical activity in ten swimming training days, as well as the effect of the association between those treatments on the spatial memory of *Wistar* rats tested in the Barnes maze. It was observed whether or not the supplementation and exercising were effective after 21 days. Results showed that only the short-term exercising was able to improve learning and spatial memory and that, after 21 days, its effects were no longer observable. The supplementation was not observed to have an effect in any of the two moments (right after the training and after 21 days without training). That indicates the necessity of a balanced diet that is longer than 12 days and enriched with polyunsaturated ω-3 fatty acids in order for it to yield results in learning and spatial memory, and that more frequent physical activity is necessary for the effects to be observed.

Key-words: Polyunsaturated fatty acids. Fish oil. Exercise. Memory. Barnes maze.

SUMÁRIO

	RESUMO	
1.	**INTRODUÇÃO**	8
1.1	MEMÓRIA	8
1.2	ÁCIDOS GRAXOS	10
1.3	EXERCÍCIO FÍSICO	12
1.4	ÓLEO DE PEIXE, EXERCÍCIO FÍSICO E MEMÓRIA	14
2.	**OBJETIVOS**	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	**MATERIAL E MÉTODOS**	17
3.1	ANIMAIS	17
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	17
3.3	TRATAMENTOS	17
3.3.1	Suplementação	18
3.3.2	Treino de Natação	18
3.4	DESENHO EXPERIMENTAL	18
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS	19
3.5.1	Labirinto de Barnes	20
3.5.2	Teste do Campo Aberto	21
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4.	**RESULTADOS**	23
4.1	LABIRINTO DE BARNES	23
4.2	TESTE DO CAMPO ABERTO	32
5.	**DISCUSSÃO**	35
6.	**CONCLUSÕES**	40
	REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

De acordo com Izquierdo (2002), memória é “a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações”. A aquisição permite a ocorrência do processo de aprendizagem, quando algo é gravado. Conseqüentemente, esse processo de aprendizagem permite a ocorrência da evocação.

As memórias podem ser classificadas em diversos tipos de acordo com sua natureza e tempo de duração. De acordo com Lent (2001), em relação ao tempo de duração, as memórias podem ser classificadas em memória ultra-rápida (dura apenas alguns segundos), memória de curta duração (dura minutos ou horas, garante o sentido de continuidade do presente) e memória de longa duração (dura horas, dias ou anos, garantindo o registro do passado e dos conhecimentos do indivíduo).

Quanto à natureza, a memória pode ser classificada em explícita ou declarativa (podendo ser descrita por meio de palavras) sendo subdividida em memória episódica (relacionada a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos), memória semântica (quando envolve conceitos atemporais, como conhecimentos de português e medicina, por exemplo) e um subtipo espacial (a memória das informações espaciais). A memória espacial envolve a habilidade de lembrar o arranjo espacial de um ambiente por meio da formação de um mapa espacial no encéfalo. Assim, a memória espacial permite saber a localização de objetos, de si mesmo, além de utilizar-se destas informações para possibilitar o movimento de um lugar para outro. Ainda quanto à natureza, a memória pode ser classificada como implícita ou não-declarativa (não podendo ser descrita por meio de palavras) e pode ser subdividida em memória de representação perceptual (representa imagem de algo sem a preliminar compreensão do significado deste), memória de procedimentos (memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais), memória associativa (associa dois ou mais estímulos ou um estímulo a uma determinada resposta) e memória não-associativa (atenua uma resposta ou a aumenta através da repetição de um mesmo estímulo). Finalmente, quanto à natureza ainda, a memória pode ser classificada como memória operacional, a qual

permite o raciocínio e o planejamento do comportamento (LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002; BIRZNIECE *et al*., 2006; KISS, 2010).

Os mecanismos de formação ou consolidação da memória passaram a ser mais bem discutidos a partir da descoberta do mecanismo conhecido como potenciação de longa duração (LTP). Esse mecanismo consiste no aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetitiva de um axônio que faz sinapse com eles (IZQUIERDO, 2002). Como essa resposta pode durar horas, semanas ou meses, associou-se esse processo com o processo de consolidação de memórias.

Atualmente sabe-se que para a formação e consolidação das memórias relacionadas à região CA1 do hipocampo, por exemplo, é necessária uma excitação repetida de células hipocampais por meio da estimulação dos receptores de glutamato AMPA, NMDA e metabotrópicos. Isso propicia a intervenção seqüencial de diversas vias metabólicas mediadas por proteínas quinases pré e pós-sinápticas (PKG, PKC, CaMKII, PKA e MAPKs) que ativam seqüencialmente proteínas necessárias para a formação da memória: receptores glutamatérgicos e o fator de transcrição constitutivo CREB. Disso, derivam as ativações de outros genes e síntese de proteínas necessárias para as alterações morfológicas associadas à constituição definitiva das memórias (MILNER *et al*., 1998; LENT, 2001; IZQUIERDO, 2002).

Sabe-se que as memórias transitórias e de longa duração são armazenadas em diversas áreas corticais, podendo isso acontecer de acordo com a sua função: memórias motoras armazenadas no córtex motor, memórias visuais no córtex visual, e assim sucessivamente. Dessas regiões, elas podem ser mobilizadas como memória operacional pelas áreas pré-frontais, em ligação com áreas do córtex parietal e occipitotemporal. O hipocampo é importante na consolidação das memórias explícitas bem como as áreas corticais adjacentes ao lobo temporal medial (BIRZNIECE *et al*., 2006; KISS, 2010).

Finalmente, é importante citar que o processo de consolidação da memória é modulado, sendo “enfraquecido” ou “fortalecido” por situações que dão contorno aos eventos. A emoção representa um importante componente modulador, bem como a atenção e o estado de alerta. A amígdala é um dos sistemas moduladores mais importantes e está situada no lobo temporal medial. Essa estrutura tem participação

na fisiologia das emoções, sendo que o grupo basolateral da amígdala é reconhecido como o modulador emocional da memória (LENT, 2001).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos são hidrocarbonetos, sendo compostos por átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio. Quando há apenas ligações simples entre os átomos de carbono, esses são chamados de ácidos graxos saturados. No caso de uma ligação dupla entre dois carbonos, são chamados de ácidos graxos monoinsaturados e, se estiver presente mais de uma ligação dupla na cadeia, são denominados ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs). Essa última família é dividida em dois tipos de acordo com a região na qual a primeira ligação dupla está situada. Quando a primeira ligação dupla está a seis carbonos do carbono terminal da cadeia, são chamados de ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 (ω-6). São chamados de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (ω-3) quando a primeira ligação dupla está situada no terceiro carbono a partir do carbono terminal da cadeia. As diferentes posições e o número de duplas ligações conferem aos ácidos graxos diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (NELSON; COX, 2011; ALBERTS *et al.*, 2010).

O ácido linoléico (18:2n-6, LA) e o ácido α-linolênico (18:3n-3, ALA) são considerados essenciais por não serem sintetizados pelos seres humanos. Assim, é importante que sua obtenção seja feita pela dieta (GORJÃO *et al*., 2009).

O ácido α-linolênico é encontrado em óleos vegetais de linhaça e canola, sendo também encontrado em plantas e animais marinhos como o fitoplâncton, algas e peixes (HULBERT *et al*., 2005). Já o ácido linoléico pode ser encontrado em sementes de milho, soja e girassol (SANGIOVANNI; CHEW, 2005; TAPIERO *et al*., 2002).

Ao ser ingerido, o LA pode ser metabolizado em um ácido graxo ω-6 de cadeia longa, o ácido araquidônico (AA) ou o ácido dihomo-γ-linolênico (DGLA). O ALA pode ser metabolizado em um ácido graxo ω-3 de cadeia longa como o ácido eicosapentaenóico (EPA) ou no ácido docosahexaenóico (DHA) (INNIS, 2009).

Nas membranas celulares, os ácidos graxos podem ser encontrados como constituintes dos fosfolipídios de membrana ou podem estar livres. Nas duas formas,

os ácidos graxos contribuem para as propriedades físicas das membranas biológicas, incluindo a organização da membrana, permeabilidade iônica e elasticidade (GORJÃO *et al*., 2009).

Dentre os diversos AGPIs disponíveis na dieta, o encéfalo acumula preferencialmente ácido docosahexaenóico (DHA, ω-3) e ácido araquidônico (AA, ω-6) em suas membranas (INNIS, 2007).

Os ácidos graxos ω-3 podem influenciar funções fisiológicas incluindo a cognição e visão por promover maturação sensorial e neuronal (INNIS, 2008). Alguns trabalhos apontam os ácidos graxos ω-3 como tendo também um efeito antidepressivo (FERRAZ *et al*., 2008; DA SILVA *et al*., 2008; VINES *et al*., 2012). Além disso, observa-se também um efeito na diminuição do estresse e da ansiedade (FEDOROVA; SALEM, 2006).

O ALA e o LA participam como precursores dos eicosanóides, fatores autócrinos ou parácrinos altamente bioativos, que podem ser subdivididos em três classes: as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (ANDRADE; CARMO, 2006). Os substratos para a formação dos eicosanóides são o ácido araquidônico (AA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido dihomo-γ-linolênico (DGLA), os quais, uma vez formados, atuam regulando alguns aspectos funcionais da célula, incluindo respostas vasculares, imunológicas e inflamatórias (YOUDIM, 2000).

O DHA representa aproximadamente 17% do total de ácidos graxos constituintes das membranas plasmáticas neuronais (SALEM *et al*., 2001). Ele pode afetar a fluidez e a permeabilidade da membrana nas regiões sinápticas, podendo assim alterar a função sináptica e as habilidades cognitivas (CHEN; SUBBAIAH, 2007; GORJÃO *et al*., 2009; STILLWELL; WASSALL, 2003).

A suplementação com DHA promove um acréscimo nos níveis de STX-3, proteína de membrana plasmática associada ao crescimento neuronal e à expansão da membrana celular. A suplementação aumenta também os níveis de GAP-43, proteína associada à remodelação axonal, com ação também no aprendizado e memória (CHYTROVA *et al*., 2010).

A dieta com óleo de peixe, além de poder contribuir como um antidepressivo, promove também um aumento do volume hipocampal, da sinaptogênese e do nascimento de novas células no giro denteado. Ainda, o óleo de peixe promove um aumento da expressão de BDNF (VENNA *et al*., 2009).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) tem sido foco de interesse devido ao seu papel fundamental na plasticidade neuronal. Sabe-se que o BDNF influencia positivamente a potenciação de longa duração (LTP), estando assim, associado à memória e ao aprendizado. Além disso, o BDNF pode ser um componente muito importante para sobrevivência de determinados tipos de células, agindo como neuroprotetor (BERCHTOLD *et al*., 2005; POO, 2001; TYLER *et al*., 2002; HOPKINS; BUCCI, 2010; GOMEZ-PINILLA, 2008).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO

Estudos têm apontado diferentes benefícios promovidos pela atividade física no organismo. Ao exercício é atribuída a capacidade de retardar o envelhecimento, melhorar a estrutura óssea e a musculatura (ALLEN *et al*., 2001; SAMORAJSKI *et al*., 1985). O exercício também pode ter um efeito benéfico para portadores de transtorno bipolar. O exercício aumenta a noradrenalina do plasma, a síntese de dopamina, aumenta a resposta anti-inflamatória e a neurogênese hipocampal, fatores esses que ajudam na atenuação dos efeitos da bipolaridade (ALSUWAIDAN *et al*., 2009).

Em relação ao sistema nervoso, são inúmeras as relações e benefícios atribuídos ao exercício físico. O exercício estimula a neurogênese, a plasticidade sináptica e aumenta a densidade dendrítica (VAN PRAAG, 2009; VAN PRAAG *et al*., 1999; STRANAHAN *et al*., 2007).

Alaei *et al*. (2008) observou uma melhora na memória de ratos e na velocidade de nado no Labirinto Aquático de Morris (LAM) ao submeter esses animais a um treino de aproximadamente 30 dias. Outros autores também observaram resultados positivos do exercício físico em relação à memória e aprendizado espacial (ANDERSON *et al*., 2000; ASL *et al*., 2008).

O exercício é capaz de afetar a subunidade NR2B do receptor NMDA, que é responsável positivamente na modulação do crescimento sináptico e plasticidade neural. Além disso, em animais que foram submetidos à atividade física, foi observado um aumento nos níveis de STX-3, proteína de membrana plasmática associada ao crescimento neuronal e à expansão da membrana celular. O exercício também pode potencializar o efeito causado pela suplementação, deixando ainda

mais altos os níveis de GAP-43, proteína associada à remodelação axonal, aprendizado e memória (CHYTROVA *et al*., 2010).

Molteni *et al*. (2002) observou que animais que realizaram exercício apresentaram uma elevação no nível de mRNA que codifica BDNF após 3 dias de exercício. O mesmo ocorreu após 7 e 28 dias de exercício. De fato, outros estudos apontam a influência do exercício físico nos níveis de BDNF. Berchtold *et al*. (2005) observou que animais treinados diariamente apresentaram uma elevação significativa do nível de BDNF a partir da segunda semana de treino. Esse aumento continuou a ocorrer mesmo após 90 dias de treino diário.

Gomez-Pinilla (2008) observou que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis de mRNA do hormônio grelina no hipocampo. Esse hormônio é secretado pelo estômago em resposta a uma diminuição de energia devido à falta de ingestão de alimentos (ARIYASU *et al*., 2001). Porém, no hipocampo, esse hormônio está associado com a memória de retenção (CARLINI *et al*., 2002). Além disso, esse autor observou que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), que também pode estar associado com a cognição, demonstrou uma elevação de expressão do seu transcrito. No entanto, quando o autor utilizou uma droga para bloquear a ação do BDNF, observou que o aumento do mRNA do hormônio grelina e do fator neurotrófico IGF-I induzido pelo exercício não ocorreu, demonstrando a importância do BDNF no processo de cognição.

Em apenas três dias de exercício físico, Vaynman *et al*. (2003) observou um aumento nos níveis de mRNA do elemento de ligação em resposta ao cAMP (CREB), um fator de transcrição que faz mediação nas cascatas do cAMP na expressão gênica e está associado à formação da LTP (MEYER *et al*., 1993; YIN *et al*., 1996). Observou também um aumento no mRNA da sinapsina I, fosfoproteína associada às vesículas pré-sinápticas, responsável pela liberação de neurotransmissores (BAEKELANDT *et al*., 1994). Bloqueando a ação do BDNF, o autor observou que não houve aumento nos níveis de mRNA de CREB ou sinapsina I. Molteni *et al*. (2002) obteve resultados semelhantes.

Em Hopkins e Bucci (2010), animais exercitados durante quatro semanas, demonstraram uma maior memória de reconhecimento de objetos, demonstrando o efeito do exercício físico em outras regiões cerebrais que não o hipocampo. Foi evidenciada também uma relação entre a expressão do BNDF no córtex perirrinal e a memória de reconhecimento de objetos. Ainda, foi observado um decréscimo no

comportamento de ansiedade em animais exercitados (HOPKINS; BUCCI, 2010; DROSTE *et al*., 2009).

1.4 ÓLEO DE PEIXE, EXERCÍCIO FÍSICO E MEMÓRIA

Sabe-se que nas últimas décadas grande parte das crianças, adolescentes, bem como a população em geral têm se alimentado de uma maneira cada vez menos saudável e também não mantêm o hábito de realizar atividades físicas. As justificativas são variadas, sendo que a falta de tempo é um fator relevante para essa situação nos dias atuais. Além disso, tem se observado um crescente aumento no índice de doenças da modernidade, como as doenças psíquicas, e isso pode ser atribuído também ao estilo de vida das pessoas atualmente (SIMOPOULOS, 2002; GOMEZ-PINILLA, 2011).

Uma dieta balanceada e a prática de atividades físicas são fatores essenciais para manter a qualidade de vida. A dieta com ácidos graxos poliinsaturados da família ω-3, como anteriormente descrito, pode influenciar a cognição de forma positiva (INNIS, 2008), aumentar o aprendizado e memória espacial (CHYTROVA *et al*., 2010; WU *et al.*, 2008), apresentar um efeito antidepressivo (FERRAZ *et al*., 2008; DA SILVA *et al*., 2008; VINES *et al*., 2012), diminuir o estresse e ansiedade (FEDOROVA; SALEM, 2006), podendo também auxiliar na prevenção ou amenização dos sintomas de doenças crônico-degenerativas como Alzheimer e Parkinson (LOU *et al.*, 2008; DELATTRE, 2010). Apesar disso, a ingestão diária destes ácidos graxos atualmente, principalmente a do ácido docosahexaenóico (DHA), está muito abaixo das doses recomendadas (MAZZA *et al.*, 2007).

A atividade física contribui para uma boa qualidade de vida por meio de uma melhora na estrutura óssea e musculatura, retardando o envelhecimento (ALLEN *et al*., 2001; SAMORAJSKI *et al*., 1985), estimulando a neurogênese e a plasticidade sináptica (VAN PRAAG, 2009; VAN PRAAG *et al*., 1999; STRANAHAN *et al*., 2007). O exercício também pode servir como atenuador dos efeitos do distúrbio bipolar (ALSUWAIDAN *et al*., 2009). Ainda assim, grande parte da população atualmente não tem o hábito de praticar atividades físicas.

Percebendo o efeito benéfico desses dois fatores, alguns autores fizeram uma associação e observaram que grupos que realizaram os dois tratamentos

(suplementação e exercício físico) obtiveram resultados ainda melhores que grupos que receberam apenas um dos tratamentos em relação ao aprendizado e memória espacial (CHYTROVA *et al.*, 2010; WU *et al*., 2008).

Gomez-Pinilla e Zing (2010) observaram que esses dois fatores contribuem para a homeostase do encéfalo tanto individualmente quanto em associação. A suplementação e o exercício podem alterar os níveis de importantes substâncias que controlam a homeostase como hormônios que controlam a necessidade de alimento, fatores associados ao metabolismo energético e estresse, todos podendo influenciar na cognição.

Apesar disso, existem controvérsias em relação à janela de suplementação, sendo que diversos autores que verificam o efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família ω-3 utilizam uma janela superior a 30 dias (MORIGUCHI *et al*., 2000; LIM *et al*., 2005; CARRIE *et al*., 2000; FERRAZ *et al*., 2008; FERRAZ *et al*., 2010; DELATTRE *et al*., 2010; VINES *et al*., 2012). No entanto, outros estudos afirmam que um período curto de suplementação (5 a 12 dias) é suficiente para que os efeitos na memória espacial sejam observados (CHYTROVA *et al*., 2010; WU *et al*., 2008).

Ainda, um aspecto importante a ser analisado é a longevidade dos efeitos mnemônicos decorrentes de tratamentos com exercício físico e dieta. Muitas pessoas, por motivos diversos, não podem praticar atividade física regularmente, por exemplo. Existem poucos trabalhos que analisam a longevidade dos efeitos da suplementação após a sua interrupção e grande parte dos trabalhos que analisam a longevidade do efeito do exercício após interrupção não o fazem a partir de um período de treino curto (BERCHTOLD *et al*., 2005). Assim, é interessante observar até que ponto a atividade física ou uma dieta saudável em um curto período de tempo podem trazer benefícios após a interrupção.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da associação entre a dieta enriquecida com ácidos graxos poliinsaturados da família ω-3 (DHA e EPA) realizada por 12 dias e o efeito do exercício físico realizado por 10 dias, durante e após a interrupção desses tratamentos, sobre os aspectos comportamentais da memória e do aprendizado espacial em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da aplicação simultânea de suplementação e do exercício físico em uma fase crítica do desenvolvimento do sistema nervoso central (animais de 30 dias de idade) sobre a aprendizagem espacial em ratos *Wistar*, através da aplicação de testes específicos;
- Verificar, após 3 semanas de ausência de treinamento e suplementação, se os efeitos do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe persistem sobre a memória e aprendizado espacial de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia da UFPR, no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, na sala de Fisiologia do Exercício e nas salas de testes comportamentais do Laboratório de Fisiologia no Departamento de Fisiologia da UFPR.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (número total de animais: 48) com idade de 30 dias, obtidos no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais permaneceram sob ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura ambiente controlada de 22ºC ± 1ºC, sendo mantidos em caixas coletivas (60 x 25 x 15 cm), nas quais eram colocados 4 ratos. O sepilho foi trocado em dias alternados e os animais receberam água e ração (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes S/A) à vontade.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPR sob o Artigo de número 140. Todos os experimentos contidos nesta pesquisa seguiram as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Aos 30 dias de vida os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos diferentes:

- Grupo Controle (C): esses animais não foram suplementados com óleo de peixe e não realizaram o treino de natação.
- Grupo Controle/Exercitado (CE): esses animais não foram suplementados com óleo de peixe e realizaram o treino de natação.
- Grupo Óleo de Peixe (OP): esses animais foram suplementados com óleo de peixe e não realizaram o treino de natação.
- Grupo Óleo de Peixe/Exercitado (OPE): esses animais foram suplementados com óleo de peixe e realizaram o treino de natação.

3.3 TRATAMENTOS

3.3.1 Suplementação

Os animais pertencentes aos grupos suplementados com óleo de peixe receberam um volume de 3,0 ml/kg/dia de composto enriquecido com ácidos graxos poliinsaturados (12% de DHA, 18% de EPA e antioxidante tocoferol), administrado via oral através de uma agulha de gavagem. As cápsulas contendo óleo de peixe foram doadas pela empresa Herbarium Laboratório Botânico Ltda. Os animais pertencentes aos grupos não suplementados com óleo de peixe receberam água filtrada via oral através de uma agulha de gavagem para mimetizar a manipulação recebida pelos animais dos demais grupos.

3.3.2 Treino de natação

Os animais pertencentes aos grupos que realizaram atividade física foram levados à sala de Fisiologia do Exercício no Departamento de Fisiologia para o treino de natação. Os animais foram treinados durante 60 minutos por dia e nadaram com carga de 5% do peso corporal (GOMES *et al*., 2006). Os animais pertencentes aos grupos que não realizaram atividade física eram levados à sala de treino para mimetizar a movimentação.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em dois grupos, um grupo foi submetido ao Experimento 1 e outro ao Experimento 2. No experimento 1 ocorreu a suplementação com óleo de peixe por 12 dias consecutivos para os grupos suplementados (OP e OPE) e a mimetização com água para os grupos não suplementados (C e CE). Concomitantemente, ocorreu a natação para os grupos exercitados (CE e OPE). O treino de natação teve a duração de uma hora diária durante 10 dias no total, sendo esses dias divididos em dois grupos de cinco dias consecutivos separados por um dia para descanso. Ainda, no 6º dia de suplementação, os animais foram submetidos ao teste de Barnes com duração de 6 dias. No 13º dia, os animais foram submetidos ao teste do Campo Aberto e posteriormente ortotanasiados.

No Experimento 2 os animais receberam o mesmo tratamento em relação à suplementação e ao treino de natação realizados no experimento 1. Porém, após o término da suplementação (12º dia), esses animais foram submetidos a um intervalo de 21 dias sem suplementação e/ou treino de natação. Após os 21 dias, esses foram submetidos ao teste de Barnes e Campo Aberto e, posteriormente, ortotanasiados. Para maiores detalhes a respeito do desenho experimental vide Figura 1.

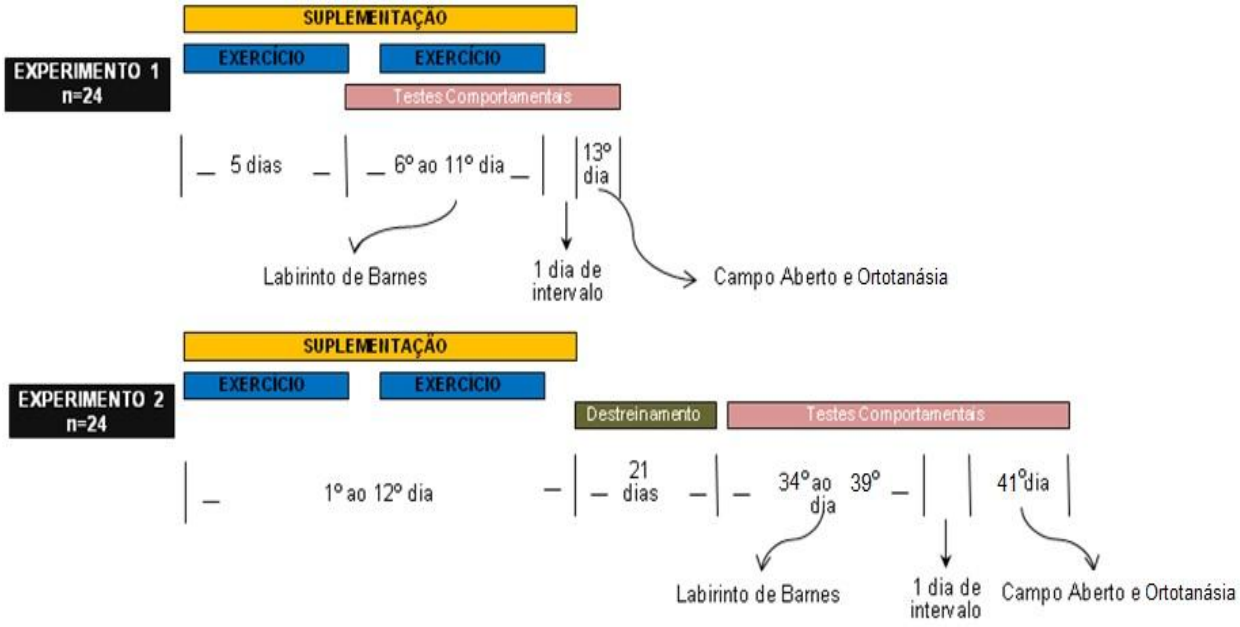


Figura 1. Desenho Experimental representando o Experimento 1 e o Experimento 2.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os ratos foram testados para verificar o aprendizado espacial através do Labirinto de Barnes e para a verificação da atividade motora foi utilizado o Teste de Campo Aberto.

Estes testes aconteceram em dois momentos específicos. Primeiramente a partir do 6º dia de tratamento (Experimento 1) e numa segunda fase, após 3 semanas do término do tratamento (Experimento 2). Neste momento, os ratos se encontravam na fase na qual não existia suplementação e/ou treinamento. O objetivo desta testagem era verificar se os efeitos do óleo de peixe e da atividade física sobre a memória e aprendizado perduram por um tempo maior depois de cessado o tratamento.

3.5.1 Labirinto de Barnes

O teste do Labirinto de Barnes foi utilizado conforme descrito por Barnes (1979). Esse teste é utilizado para verificar o aprendizado espacial em roedores.

A estrutura do labirinto consiste em uma plataforma circular (120 cm do diâmetro) com 18 furos eqüidistantes (diâmetro de 5 cm) ao longo do perímetro, sendo que esta plataforma está elevada a 90 cm do chão. O labirinto foi utilizado na cor preta, a fim de fornecer bastante contraste entre a superfície e o rato, de modo que o software pudesse reconhecê-lo.

O labirinto estava delimitado por duas paredes brancas e duas cortinas formando uma sala na forma de um quadrado. Cada uma das paredes e das cortinas possuía uma pista (presente através de representações de formas geométricas).

No labirinto de Barnes, o animal recebe um estímulo aversivo com o intuito de fazê-lo escapar da superfície aberta da plataforma para uma câmara escura e pequena situada sob a plataforma chamada de “caixa alvo”. O estímulo aversivo utilizado foi um estímulo sonoro.

Para o teste, os ratos foram submetidos primeiramente a um período de adaptação. Essa adaptação foi modificada a partir do protocolo inicial de Barnes (1979). Os ratos foram colocados diretamente na “caixa alvo”. Assim que tentavam sair e andar sobre a plataforma, o estímulo aversivo era acionado e permanecia ligado até que o rato entrasse novamente na “caixa alvo”. Esse período teve a duração de 4 minutos para cada rato, sendo que aqueles que estavam dentro da caixa alvo assim que os quatro minutos expiravam, eram imediatamente retirados e colocados em suas caixas. Aqueles que estavam sobre a plataforma, eram conduzidos até a caixa alvo, o estímulo era desligado e lá permaneciam por 30 segundos, sendo posteriormente retirados e colocados em suas caixas. Assim que o período de adaptação acabava, o rato era conduzido até sua caixa como anteriormente descrito e lá permanecia por um minuto, voltando para realizar o seu primeiro teste (teste 1). No teste 1, o rato era colocado no centro da plataforma e sobre ele era colocado um cilindro impedindo que o animal pudesse perceber o ambiente externo. O animal permanecia nessa condição por 30 segundos. Assim que esse tempo expirava, o cilindro era retirado, o estímulo aversivo acionado e o software passava a captar o movimento do animal. O animal tinha quatro minutos

para explorar o ambiente e encontrar o buraco alvo, entrando na caixa alvo. Assim que isso acontecia, o estímulo era desligado e o rato era deixado lá por um minuto e depois levado até a sua caixa. Quando o animal não entrava na caixa alvo dentro dos 4 minutos, o mesmo era conduzido até a caixa alvo e lá permanecia por 1 minuto, sendo posteriormente retirado e colocado em sua caixa. Entre um teste e outro o labirinto era limpo com solução de etanol 10% para eliminar pistas olfatórias. Em adição à limpeza, o labirinto era submetido à ventilação para eliminar a umidade e também eliminar pistas olfatórias. Durante a captação, o software mensurava a distância percorrida pelo animal, sua velocidade, latência para entrar na caixa alvo, latência para encontrar o buraco alvo, tempo no centro da plataforma, tempo na região periférica da plataforma e tempo despendido próximo ao buraco alvo. Além disso, eram mensurados os erros e os padrões de procura.

No segundo dia, os ratos realizaram os testes 2 e 3. A metodologia utilizada foi exatamente a mesma utilizada para o teste 1, sendo que o rato realizava o teste 2 e era colocado em sua caixa por um minuto, retornando logo em seguida para realizar o teste 3. Para o dia 3 e dia 4 a metodologia empregada foi a mesma, sendo realizados os testes 4 e 5 no dia 3 e testes 6 e 7 no dia 4. Para o quinto dia (teste 8), a plataforma sofreu uma rotação de 135º, modificando assim a posição do buraco alvo e conseqüentemente da caixa alvo. O objetivo era verificar se o rato lembrava-se onde o buraco alvo estava localizado. Para isso, a partir desse teste, foi mensurado o tempo em que o rato permanecia em cada um dos quadrantes da plataforma (sendo a posição antiga do buraco alvo no quadrante nordeste e a nova posição no quadrante sudoeste). Nesse mesmo dia, foi realizado mais um teste (9) para cada um dos animais utilizando a mesma metodologia. No sexto e último dia, foram realizados mais dois testes (10 e 11) com o buraco alvo nessa mesma posição (quadrante sudoeste).

3.5.2 Teste do Campo Aberto

Este teste avalia a atividade motora do animal. O teste foi realizado em uma arena circular com 100 cm de diâmetro, fechada com paredes laterais com 40 cm de altura, iluminada por uma lâmpada de 100 watts e com o piso escuro para proporcionar contraste com o animal, facilitando a captação pelo software. A arena estava circundada por uma cortina, numa tentativa de se evitar que o animal

pudesse se distrair com o ambiente, o que poderia causar alterações no comportamento em andamento.

Cada animal foi colocado na região central da arena e pôde explorar o ambiente durante 5 minutos. Foi mensurada a distância percorrida, a velocidade e a exploração vertical *(rearing)*, comportamento no qual o animal se levanta para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras. Após cada animal ser testado, o campo aberto foi limpo com solução de etanol 10% (NALIWAIKO *et al*., 2004).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via ou ANOVA de medidas repetidas de três vias, seguidas, quando indicado, de pós-teste de Duncan. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 LABIRINTO DE BARNES

Os padrões de procura durante a realização do teste foram categorizados em três tipos diferentes como descrito por Barnes (1979). Todos os padrões foram observados em cada um dos grupos. No Experimento 1, o padrão randômico, aquele no qual o animal investiga muitos buracos retornando ao centro do labirinto freqüentemente após fazer uma investigação na borda, foi observado principalmente nos primeiros dias (Figura 2A). Com mais experiência no labirinto, os animais apresentaram uma tendência em adquirir um padrão de procura em série no qual eles faziam investigações de buraco a buraco sistematicamente até chegar ao buraco alvo (Figura 2B). Nesse padrão, o animal passava a maior parte do tempo na periferia do labirinto e não cruzava o centro com tanta freqüência. Por volta do quarto dia, observou-se com mais freqüência o padrão de procura espacial no qual o animal utiliza as dicas espaciais e dirige-se diretamente ao buraco alvo ou a uma região muito próxima a esse (Figura 2C). No Experimento 2, todos os padrões de procura também foram observados em cada um dos grupos. O padrão randômico foi observado com maior freqüência nas primeiras tentativas, ocorrendo um declínio da utilização desse padrão com o passar dos dias. O padrão de procura em série foi observado com maior freqüência no total, sendo predominante principalmente no dia 3. Observou-se o padrão de procura espacial, mas não da forma acentuada como observado no dia 4 do experimento 1. As figuras 3A e 3B mostram a utilização de cada um desses padrões por cada um dos grupos ao longo de cada uma das tentativas nos experimentos 1 e 2, respectivamente.

O primeiro buraco investigado assim que o teste era iniciado quando o animal deixava o centro do labirinto foi observado. Houve uma tendência em o primeiro buraco investigado estar cada vez mais próximo do buraco alvo da tentativa um (dia 1) a tentativa sete (dia 4) em ambos os experimentos. Com a mudança da localização do buraco alvo na tentativa oito (dia 5), os animais dirigiam-se a regiões próximas à antiga localização, havendo uma mudança em direção à nova localização com o decorrer das demais tentativas (9, 10, 11).

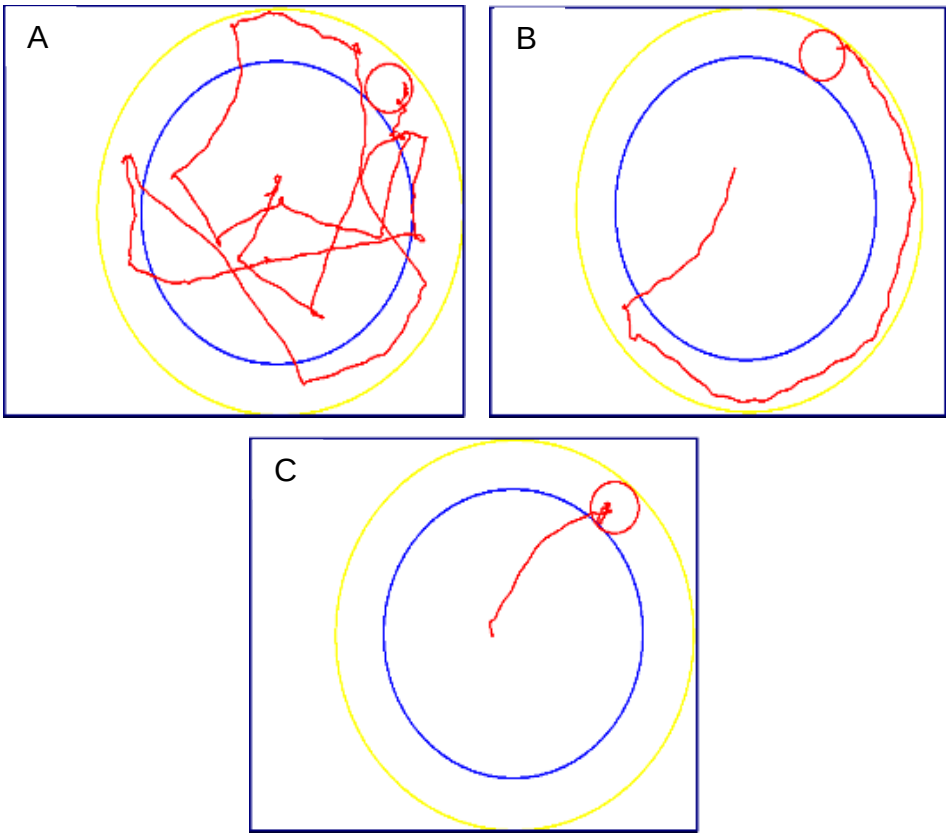


Figura 2. Representação dos tipos de padrões de procura utilizados pelos animais durante a realização do teste de Barnes: (A) padrão de procura randômico, (B) padrão de procura em série, (C) padrão de procura espacial.

Figura 3A. Porcentagem de cada padrão de procura utilizado por cada um dos grupos ao longo dos dias no Experimento 1.

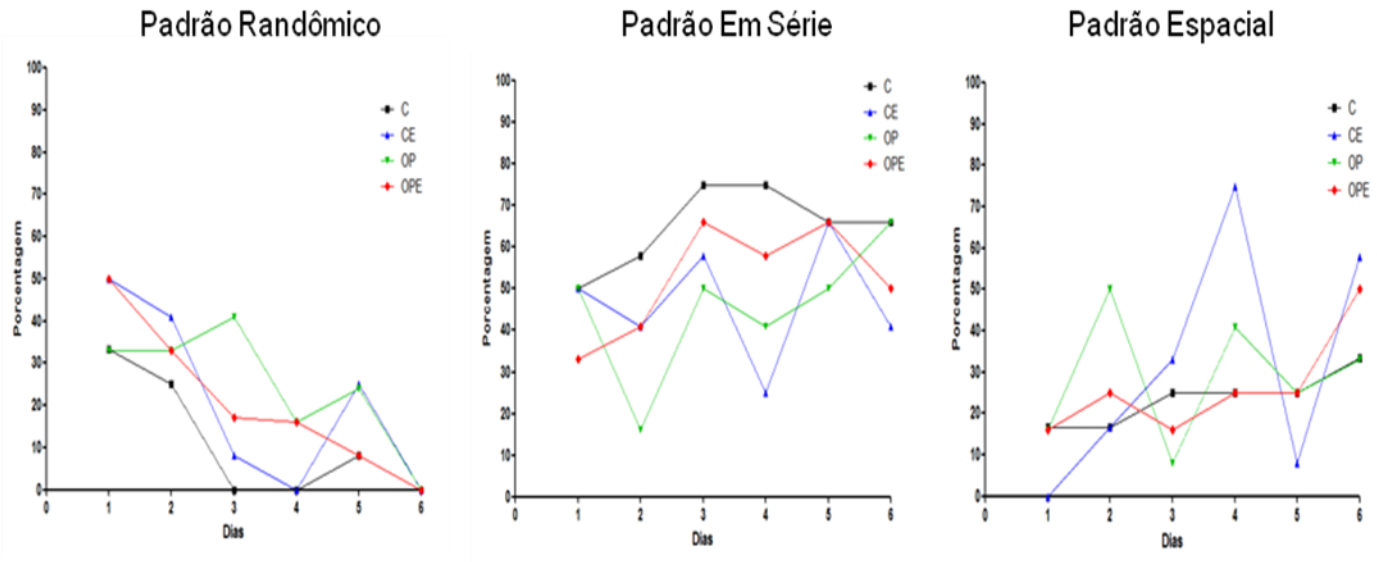


Figura 3B. Porcentagem de cada padrão de procura utilizado por cada um dos grupos ao longo dos dias no Experimento 2.

No Experimento 1 foi observada, durante a tentativa 8 (dia 5), uma tendência dos animais de todos os grupos em permanecer por mais tempo no quadrante onde estava localizado o buraco alvo anteriormente (quadrante NE). Isso sugere que os animais aprenderam a ir ao local correto para achar o buraco alvo e não o faziam de acordo com uma possível pista presente no próprio labirinto. Não houve uma diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(3,20)=1,20$; $p=0,33$) em relação ao percentual de tempo de permanência no quadrante onde o buraco alvo estava localizado anteriormente, sugerindo que houve um aprendizado espacial para os animais de todos os grupos (Figura 4A). No Experimento 2 ocorreu um comportamento semelhante. Também não houve uma diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(3,20)=0,83$; $p=0,49$) em relação ao parâmetro descrito acima (Figura 4B).

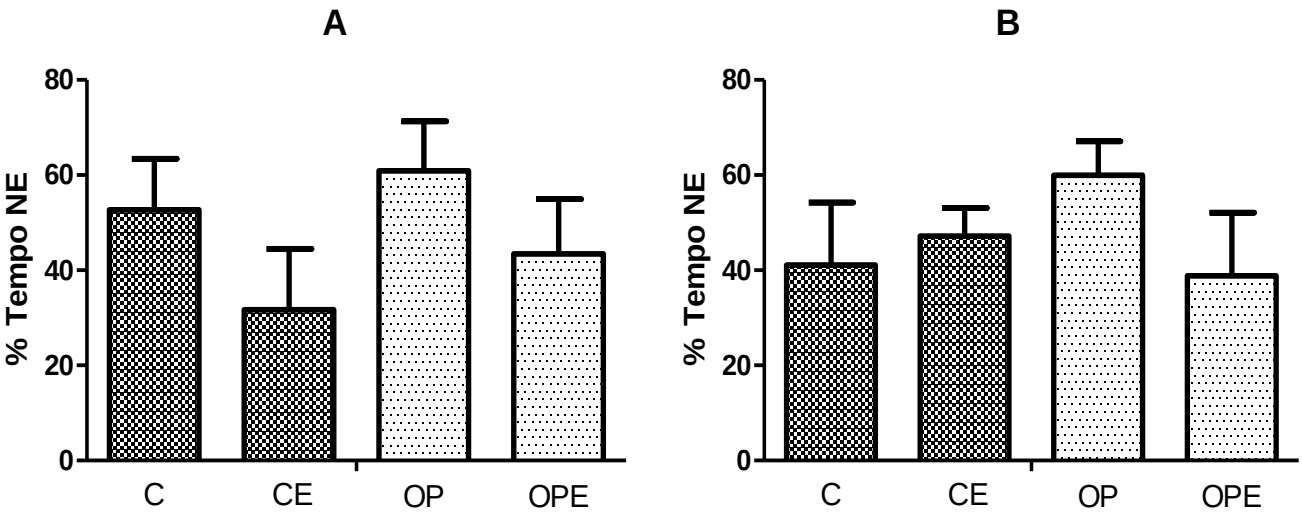


Figura 4. Porcentagem de tempo despendida no quadrante NE no teste 8, após ter ocorrido a rotação da plataforma em 135º. O quadrante NE é o quadrante onde estava localizado o buraco alvo antes da rotação. Experimento 1 (A) e Experimento 2 (B). Os resultados expressam a média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Duncan.

A figura 5A mostra o desempenho dos animais de cada um dos grupos do Experimento 1 em relação ao tempo para encontrar o buraco alvo e entrar, denominado latência. A avaliação da memória de referência espacial indica que houve efeito do exercício físico ($F(1,20)=12,97$; $p \leq 0,001$), dos dias ($F(5,100)=15,42$; $p \leq 0,0001$) e da interação exercício físico X dias ($F(5,100)=2,73$; $p \leq 0,05$). Não foi observado um efeito significativo da suplementação ($F(1,20)=0,42$; $p=0,52$), nem das interações suplementação X dias ($F(5,100)=0,46$; $p=0,80$), suplementação X exercício físico ($F(1,20)=0,23$; $p=0,63$) e exercício físico X suplementação X dias ($F(5,100)=2,06$; $p=0,07$). Foi observada uma diferença significativa na latência entre o grupo C e os demais grupos (CE, OP e OPE) no dia 2 ($p \leq 0,05$), do grupo C em relação aos grupos CE e OPE no dia 3 ($p \leq 0,001$) e do grupo OP em relação aos grupos CE e OPE no dia 3 também ($p \leq 0,001$).

A figura 5B representa o mesmo parâmetro descrito acima para o Experimento 2. A avaliação da memória de referência espacial indica que houve efeito dos dias somente ($F(5,100)=11,95$; $p \leq 0,0001$). Não houve efeito do exercício físico ($F(1,20)=0,14$; $p=0,71$) e da interação exercício físico X dias ($F(5,100)=0,30$; $p=0,91$) ao contrário do que ocorreu no experimento 1. Não foi observado um efeito significativo da suplementação ($F(1,20)=0,01$; $p=0,90$), nem das interações suplementação X dias ($F(5,100)=0,27$; $p=0,93$), suplementação X exercício físico ($F(1,20)=0,10$; $p=0,75$) e exercício físico X suplementação X dias ($F(5,100)=0,43$;

p=0,83) assim como ocorreu no Experimento 1. Não foi observada uma diferença significativa na latência entre os grupos em nenhum dos dias de teste.

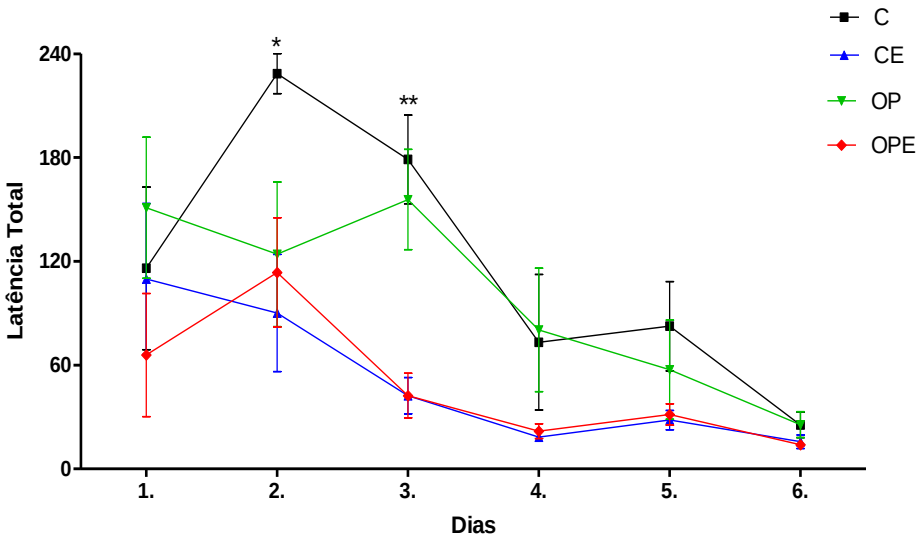


Figura 5A. Representação da Latência Total dos grupos (em segundos) ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan. *$p \leq 0,05$, diferença entre o grupo controle e demais grupos; **$p \leq 0,001$, diferença do grupo C em relação aos grupos CE e OPE e diferença do grupo OP em relação aos grupos CE e OPE.

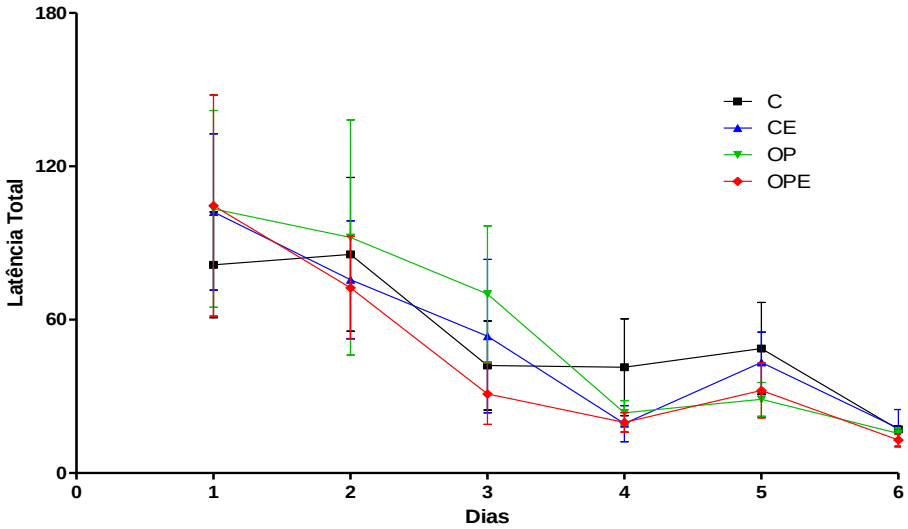


Figura 5B. Representação da Latência Total dos grupos (em segundos) ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan.

A figura 6A mostra o desempenho dos animais de cada um dos grupos (C, CE, OP e OPE) em relação aos erros observados durante o teste no Experimento 1. Houve um efeito do exercício físico ($F(1,20)=6,05$; $p \leq 0,05$) e dos dias ($F(5,100)=10,65$; $p \leq 0,0001$). Não foi observado efeito da suplementação

(F(1,20)=0,38; *p*=0,54), assim como não foi observado efeito das interações suplementação X exercício (F(1,20)=0,80; *p*=0,38), suplementação X dias (F(5,100)=0,44; *p*=0,82), exercício X dias (F(5,100)=1,10; *p*=0,36) e suplementação X exercício X dias (F(5,100)=1,04; *p*=0,40). Não foi observada diferença significativa em relação ao número de erros entre os grupos em nenhum dos seis dias de teste.

A figura 6B representa o mesmo parâmetro para o Experimento 2. Houve um efeito somente dos dias (F(5,100)=13,42; *p*≤0,0001), não havendo o efeito do exercício físico (F(1,20)=0,12; *p*=0,73) observado no Experimento 1. Não foi observado efeito da suplementação (F(1,20)=0,57; *p*=0,46), assim como não foi observado efeito das interações suplementação X exercício (F(1,20)=0,01; *p*=0,90), suplementação X dias (F(5,100)=0,93; *p*=0,46), exercício X dias (F(5,100)=0,48; *p*=0,79) e suplementação X exercício X dias (F(5,100)=0,13; *p*=0,99). Não foi observada diferença significativa em relação ao número de erros entre os grupos em nenhum dos seis dias de teste.

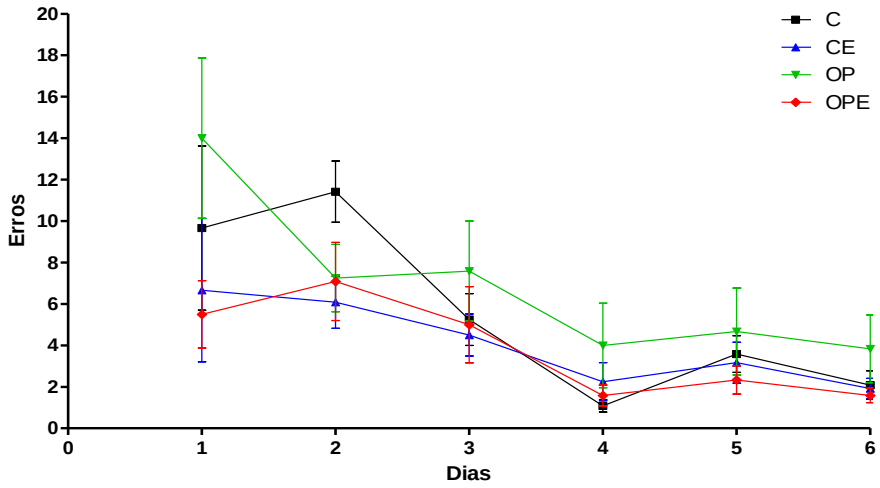


Figura 6A. Representação dos erros dos grupos ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan.

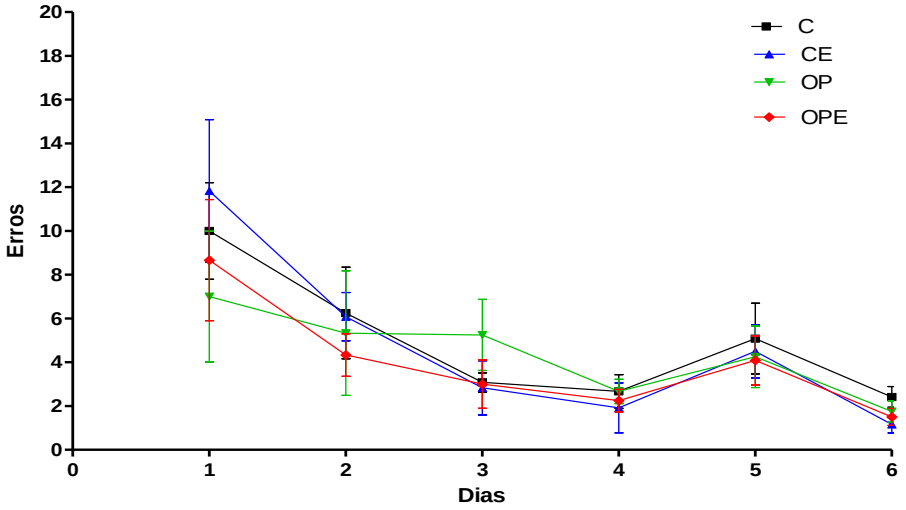


Figura 6B. Representação dos erros dos grupos ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan.

A figura 7A mostra o desempenho dos animais de cada um dos grupos (C, CE, OP e OPE) em relação à distância percorrida durante o teste no Experimento 1. A avaliação da média de distância percorrida por cada um dos grupos ao longo dos dias indica que houve efeito apenas dos dias ($F(5,100)=14,74$; $p\leq0,0001$). Não foi observado efeito da suplementação ($F(1,20)=2,89$; $p=0,10$) ou do exercício físico ($F(1,20)=0,53$; $p=0,47$), da mesma forma que não foi observado efeito das interações suplementação X exercício ($F(1,20)=0,04$; $p=0,85$), suplementação X dias ($F(5,100)=1,02$; $p=0,41$), exercício X dias ($F(5,100)=0,12$; $p=0,99$) ou suplementação X exercício X dias ($F(5,100)=1,81$; $p=0,12$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a distância percorrida em nenhum dos seis dias de teste.

A figura 7B mostra o mesmo que a figura 7A, mas para o Experimento 2. A avaliação da média de distância percorrida por cada um dos grupos ao longo dos dias indica que houve efeito apenas dos dias ($F(5,100)=15,63$; $p\leq0,0001$) como ocorreu com o Experimento 1. Também não foi observado efeito da suplementação ($F(1,20)=0,13$; $p=0,72$) ou do exercício físico ($F(1,20)=0,09$; $p=0,76$), da mesma forma que não foi observado efeito das interações suplementação X exercício ($F(1,20)=0,34$; $p=0,56$), suplementação X dias ($F(5,100)=0,70$; $p=0,63$), exercício X dias ($F(5,100)=0,25$; $p=0,94$) ou suplementação X exercício X dias ($F(5,100)=0,14$; $p=0,98$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a distância percorrida em nenhum dos seis dias de teste.

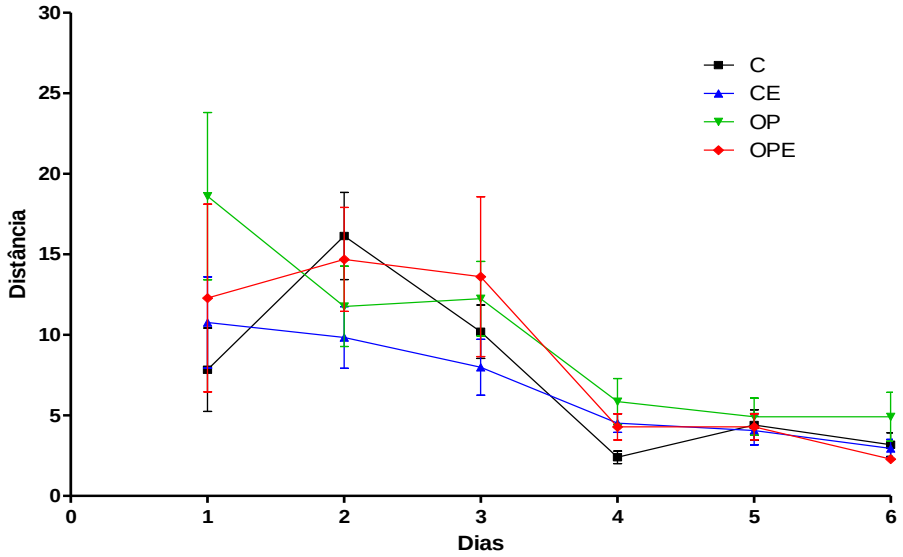


Figura 7A. Representação da distância percorrida (em metros) pelos animais ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan.

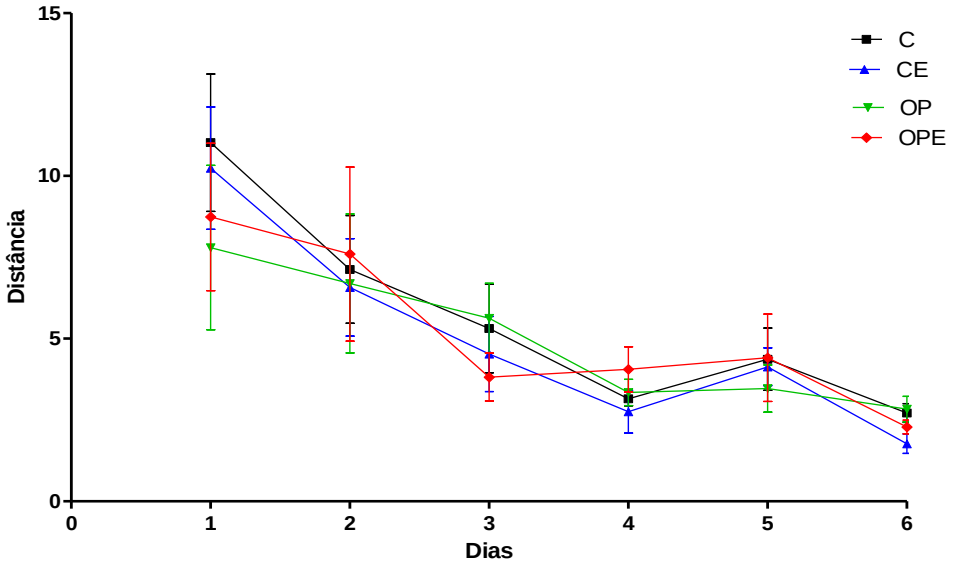


Figura 7B. Representação da distância percorrida (em metros) pelos animais ao longo dos dias. Os resultados foram expressos como média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida pelo teste de Duncan.

A figura 8A mostra a média da velocidade dos animais de cada um dos grupos ao longo dos dias de teste no Experimento 1. Foi observado um efeito do exercício físico ($F(1,20)=17,04$; $p \leq 0,001$), dos dias ($F(5,100)=2,25$; $p \leq 0,05$) e da interação exercício X dias ($F(5,100)=2,63$; $p \leq 0,05$). Não foi observado efeito da suplementação ($F(1,20)=1,01$; $p=0,33$), bem como não foi observado efeito entre as interações suplementação X exercício ($F(1,20)=0,08$; $p=0,77$), suplementação X dias

(F(5,100)=1,08; *p*=0,38) ou ainda suplementação X exercício X dias (F(5,100)=0,98; *p*=0,44). Foi observado um aumento na velocidade do grupo OPE em relação aos demais grupos no dia 3 (*p*≤0,05) e no dia 4 foi observado aumento na velocidade média do grupo CE em relação aos grupos C e OP (*p*≤0,05).

A figura 8B mostra o parâmetro descrito acima para o Experimento 2. Foi observado um efeito dos dias (F(5,100)=4,93; *p*≤0,001) como no Experimento 1. Não foi observado efeito do exercício físico (F(1,20)=0,008; *p*=0,93) assim como não foi observado efeito da interação exercício X dias (F(5,100)=1,06; *p*=0,39) ao contrário do observado no experimento anterior. Não houve efeito da suplementação (F(1,20)=0,57; *p*=0,46), das interações suplementação X exercício (F(1,20)=0,14; *p*=0,71), suplementação X dias (F(5,100)=1,31; *p*=0,26) ou ainda suplementação X exercício X dias (F(5,100)=0,24; *p*=0,94). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a velocidade em nenhum dos seis dias de teste, ao contrário do observado no experimento 1.

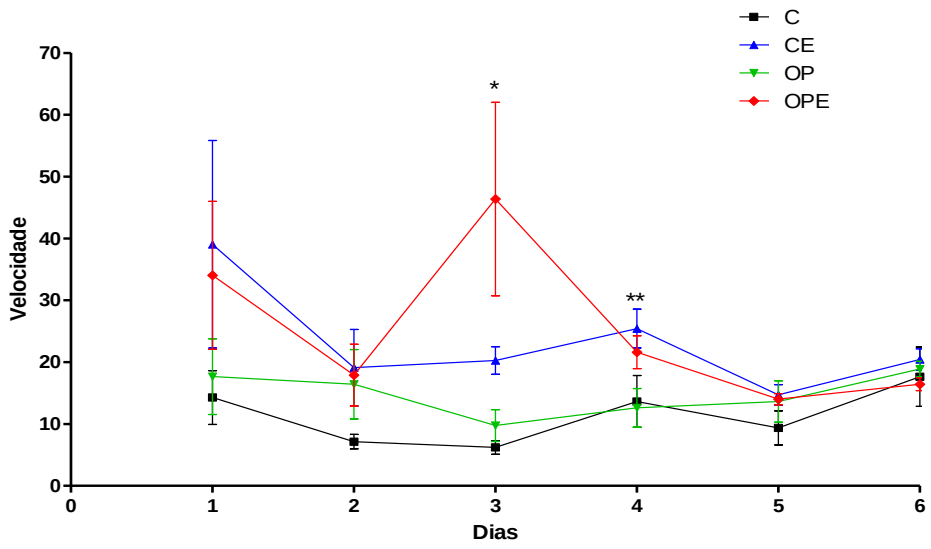


Figura 8A. Representação da média da velocidade percorrida (em cm/s) por cada um dos grupos ao longo dos dias. Os resultados expressam a média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida de teste de Duncan. **p*≤0,05, diferença entre o grupo OPE e demais grupos; ***p*≤0,05, diferença entre o grupo CE em relação aos grupos C e OP.

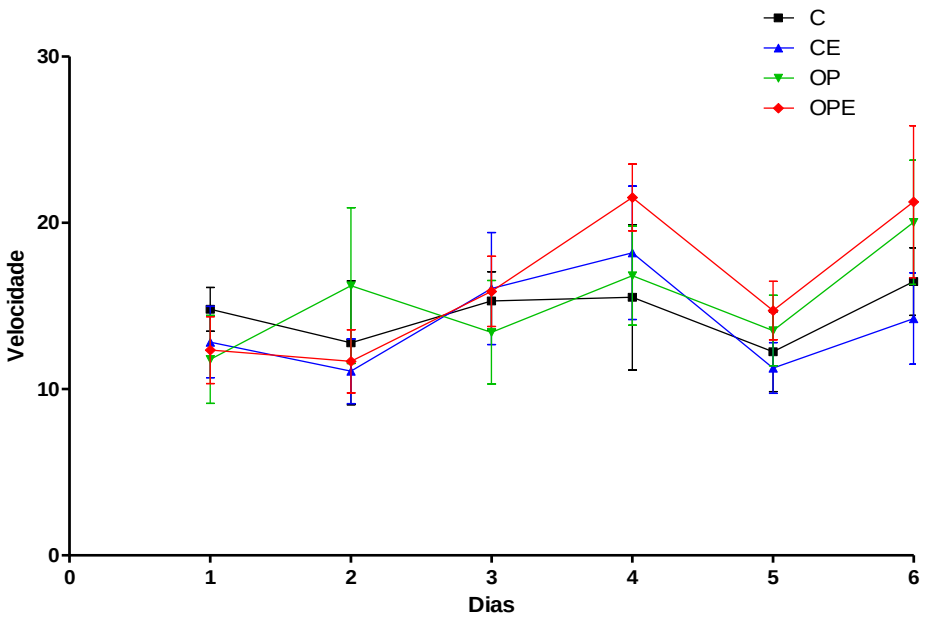


Figura 8B. Representação da média da velocidade percorrida (em cm/s) por cada um dos grupos ao longo dos dias. Os resultados expressam a média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de três vias seguida de teste de Duncan.

4.2 CAMPO ABERTO

Para o Experimento 1 (Figura 9), a distância percorrida pelos animais durante o teste não foi significativamente diferente entre os grupos (ANOVA de uma via, $F(3,20)=0,05$; $p=0,98$) assim como a velocidade (ANOVA de uma via, $F(3,20)=0,05$; $p=0,98$). Assim, não houve diferença significativa na atividade locomotora dos animais entre os grupos.

No Experimento 2 (Figura 10) também não houve diferença estatisticamente significativa em relação à distância percorrida pelos animais (ANOVA de uma via, $F(3,20)=1,08$; $p=0,38$) bem como à velocidade (ANOVA de uma via, $F(3,20)=1,08$; $p=0,38$).

Em relação ao comportamento de exploração vertical, não houve diferença significativa entre os grupos para o Experimento 1 (Figura 9) (ANOVA de uma via, $F(3,20)=0,33$; $p=0,80$) bem como para o Experimento 2 (Figura 10) (ANOVA de uma via, $F(3,20)=0,85$; $p=0,48$).

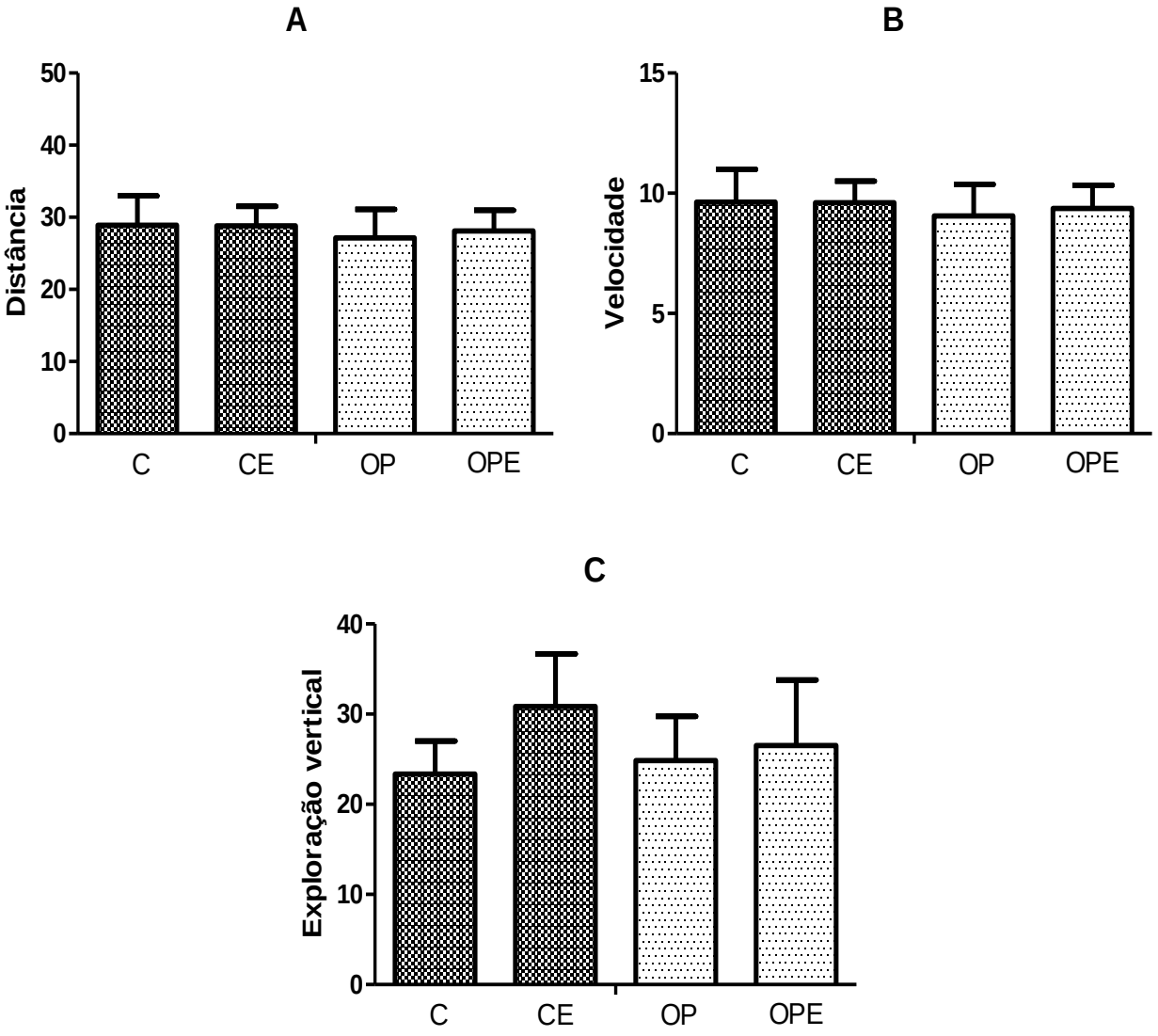


Figura 9. Experimento 1. Representação de (A) distância percorrida (em metros), (B) da velocidade média percorrida (em cm/s) e (C) da exploração vertical por cada um dos grupos. Os resultados expressam a média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Duncan.

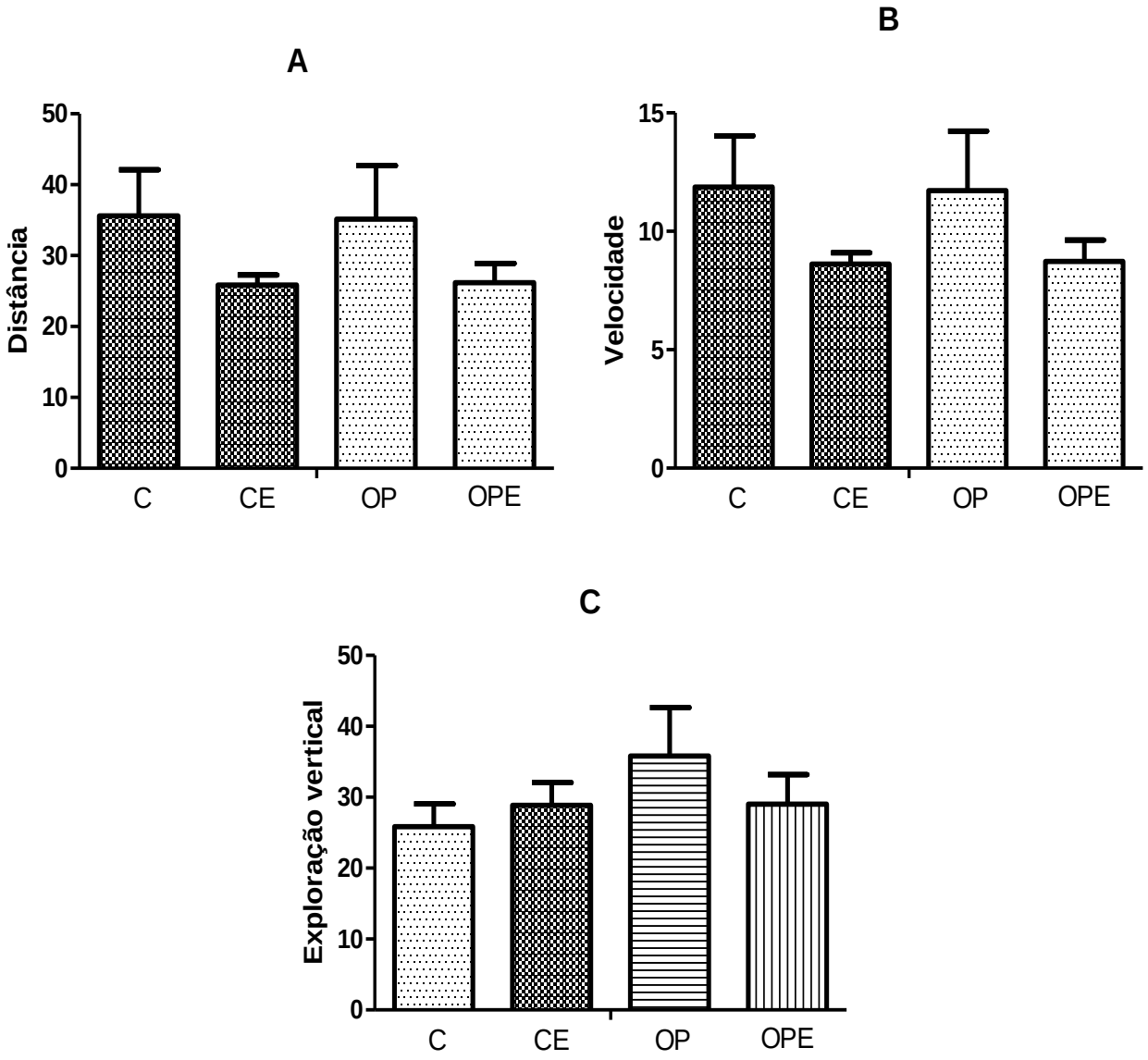


Figura 10. Experimento 2. Representação de (A) distância percorrida (em metros), (B) da velocidade média percorrida (em cm/s) e (C) da exploração vertical por cada um dos grupos. Os resultados expressam a média ± EPM para 6 animais em cada grupo e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Duncan.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que há uma diferença no aprendizado e na memória espacial dos animais dependente do grupo/tratamento.

Em relação ao padrão de procura utilizado, observou-se uma tendência em apresentar uma estratégia de procura randômica nos primeiros dias, sendo logo substituída por uma estratégia em série e finalmente, nos últimos dias, uma estratégia espacial na maioria das vezes. Essa situação também foi observada em outros estudos (BARNES, 1979; INMAN-WOOD *et al*., 2000; FOX *et al*., 1998).

Na tentativa 8 foi realizada uma rotação no labirinto de 135º. Isso foi importante para demonstrar quais animais haviam aprendido a localização do buraco alvo. Esses animais ficariam uma porcentagem de tempo maior no quadrante onde antes estava localizado o buraco alvo. Com essa tentativa, foi possível observar que os animais de todos os grupos haviam aprendido a localização, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos em relação à porcentagem de tempo que ficaram no quadrante onde estava localizado o túnel de escape. Além disso, essa tentativa foi importante para evidenciar se os animais não estavam utilizando alguma pista presente no próprio labirinto, sendo ela visual ou olfatória. Caso isso acontecesse, tais animais não apresentariam um comportamento semelhante aos demais (ficando maior quantidade de tempo no quadrante onde o buraco alvo estava localizado anteriormente), e se dirigiriam diretamente ao buraco alvo, na localização atual. Embora isto tenha ocorrido algumas vezes, foi possível considerar como uma situação acidental, visto que na próxima tentativa, os animais apresentaram o comportamento esperado.

Diversos estudos mostram que a suplementação com óleo de peixe ou um nível adequado de ácidos graxos ω-3 é capaz de aumentar o aprendizado e a memória espacial. No entanto, a janela de suplementação utilizada nesses estudos equivale a um período superior a 30 dias (MORIGUCHI *et al*., 2000; MORIGUCHI; SALEM, 2003; LIM *et al*., 2005; CARRIE *et al*., 2000). Outros estudos que analisam o efeito da suplementação com óleo de peixe também utilizam uma janela maior que a utilizada nesse estudo (FERRAZ *et al*., 2008; DELATTRE *et al*., 2010; VINES *et al*., 2012). Porém, alguns autores defendem que uma pequena janela de

suplementação (5 a 12 dias) é suficiente para se observar benefícios cognitivos (CHYTROVA *et al*., 2010; WU *et al*., 2008).

Nesse trabalho, foi utilizada uma janela de suplementação curta de apenas 12 dias. No entanto, não foi observado efeito da suplementação no aprendizado e memória espacial como encontrado em Wu *et al*. (2008) e Chytrova *et al*. (2010). Pode-se explicar essa diferença por vários motivos. Primeiramente, o número amostral utilizado nesse estudo é pequeno, podendo ter mascarado os resultados. Além disso, o teste utilizado por esses autores para avaliar o aprendizado e memória espacial foi o LAM, enquanto que nesse estudo utilizou-se o Labirinto de Barnes. Ainda, apesar de a janela de suplementação desse estudo ser equivalente à utilizada pelos autores, os testes iniciaram-se a partir do 6º dia, assim era necessário que aproximadamente uma semana de suplementação fosse suficiente para se observar efeitos comportamentais.

Apesar de ter sido observada uma diferença significativa entre o grupo C e OP no dia 2, acredita-se que essa diferença seja decorrente do pequeno número amostral, visto que ela não foi mantida no dia 3. Além disso, de acordo com Wu *et al*. (2008) e Chytrova *et al*. (2010), quando a suplementação e o exercício possuem um efeito significativo, os animais que recebem os dois tratamentos devem apresentar um efeito aumentado em relação aos animais que recebem apenas um dos tratamentos, o que não foi observado nesse trabalho. Observou-se que os animais que receberam os dois tratamentos apresentaram resultados semelhantes aos animais exercitados apenas, evidenciando que o aumento do aprendizado e memória espacial nesse estudo pode ser atribuído ao exercício físico.

Foi possível observar um efeito do exercício físico no teste em relação à latência para entrar no buraco alvo ao contrário do observado por Barnes *et al*. (1991) ao testar animais idosos exercitados no labirinto. O teste foi iniciado após o quinto dia de exercício físico, demonstrando assim que poucos dias de exercício físico são suficientes para que haja um aumento da memória espacial. Esses resultados corroboram com resultados obtidos por diversos autores (VAYNMAN *et al.,* 2004; VAYNMAN *et al*., 2007; WU *et al*., 2008; CHYTROVA *et al*., 2010). Vaynman *et al.* (2004, 2007), observou que ratos submetidos ao exercício físico por apenas uma semana foram capazes de apresentar uma performance significativamente melhor em relação a controles não exercitados no Labirinto

Aquático de Morris (LAM). Chytrova *et al*. (2010) também observou um efeito do exercício físico no LAM com apenas uma semana de treino.

Em relação aos animais que realizaram o teste 21 dias após o término do tratamento, foi observada uma melhora ao longo dos dias, demonstrando que os animais aprenderam o local do buraco alvo. No entanto, não foi possível observar efeito do exercício físico ou da suplementação em relação aos animais controles. Em relação à suplementação, era esperado que não fosse observado efeito algum, já que não houve efeito desse tratamento no experimento 1. Proença (2010) observou que animais que receberam ácidos graxos poliinsaturados da família ω-3 por meio de mães suplementadas durante a gestação, por meio do leite materno durante a lactação até os seus 21 dias de idade, apresentaram melhora no aprendizado e memória espacial em relação ao grupo controle no LAM após terem ficado 70 dias sem o tratamento. No entanto, observa-se que a janela de suplementação utilizada foi uma janela grande e feita em um período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso.

Quanto aos animais exercitados, apesar de ter sido observado efeito do exercício no aprendizado espacial daqueles animais que realizaram o teste enquanto treinavam (Experimento 1), não foi possível observar esse mesmo efeito para os animais testados após 21 dias. Assim, pode-se concluir que com apenas dez dias de exercício físico, não se pode observar os efeitos comportamentais desse tratamento após 21 dias. Pode-se fazer uma associação entre esses resultados comportamentais e resultados obtidos por Berchtold *et al*. (2005) através da dosagem do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo. O BDNF tem sido foco de diversos estudos pelo seu papel na plasticidade neuronal e sua relação com a memória espacial associada ao hipocampo (BERCHTOLD *et al*., 2005; DRAGANSKI; MAY, 2008; GÓMEZ-PINILLA, 2008; GÓMEZ-PINILLA *et al*., 2008; HOPKINS; BUCCI, 2010; VAYNMAN *et al*., 2004; VAYNMAN *et al*., 2007). Alguns autores observaram que o exercício permite um aumento de BDNF no hipocampo (NEEPER *et al*., 1995; VAYNMAN *et al*., 2003). Assim, os resultados apresentados nesse trabalho são corroborados pelos resultados obtidos por Berchtold *et al*. (2005). Esse autor observou os níveis de BDNF no hipocampo 0, 1, 3, 7 e 14 dias após o término de um período de 28 dias de exercício diário ou em dias alternados. Chegou à conclusão de que o nível de BDNF permanece elevado até uma semana após o término do exercício (treino diário), enquanto que para um

treino no período de 28 dias em dias alternados (14 dias no total), o nível de BDNF após três dias do término de exercício já não é significativamente maior em relação aos controles. Pode-se afirmar assim que os resultados apresentados nesse trabalho estão de acordo com o esperado. Em um cronograma de 10 dias de exercício no total, era de se esperar que após 21 dias sem treino, não houvesse mais o efeito do exercício na aprendizagem espacial.

Em relação aos erros durante a realização do teste, foi observada uma melhora ao longo dos dias para os animais de todos os grupos, sendo que o número de erros diminuiu ao longo dos dias. No entanto, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos quanto a quantidade de erros cometidos em ambos os experimentos, apesar de no experimento 1 ter se observado um efeito do exercício físico na quantidade de erros cometidos. Não se tem conhecimento de nenhum outro trabalho utilizando a suplementação com óleo de peixe e exercício físico que tenha utilizado como teste comportamental o labirinto de Barnes e tenha, assim, contabilizado os erros de cada grupo. Dessa forma, acredita-se que a suplementação e o exercício físico não tenham sido eficazes para que os animais tratados cometessem menos erros durante o teste em relação a animais controle.

Em relação aos resultados referentes à velocidade dos animais durante o teste, observou-se uma influência dos dias de teste em ambos os experimentos, sendo que os animais aumentavam a velocidade durante o teste ao longo dos dias. No experimento 1, observou-se um efeito do exercício físico na velocidade, o que não foi observado no experimento 2, como esperado. Ainda no experimento 1 foi observada um aumento na velocidade do grupo OPE em relação aos demais grupos no dia 3 e no dia 4 foi observada um aumento na velocidade do grupo CE em relação aos grupos C e OP. Observando a velocidade, poder-se-ia dizer que as diferenças nas latências poderiam estar ocorrendo devido a diferenças ambulatórias entre os grupos e não necessariamente devido a um aprendizado espacial. No entanto, resultados obtidos da distância percorrida pelos animais durante o teste mostram que não houve diferença entre os grupos em nenhum dos experimentos, ocorrendo diminuição da distância percorrida ao longo dos dias para todos os grupos de ambos os experimentos. Além disso, mensurações tanto da distância e da velocidade no teste do campo aberto indicam habilidade motora equivalente entre os grupos de ambos experimentos. Isso evidencia que o aprendizado e memória

espacial, além da velocidade maior dos animais exercitados, contribuem para uma menor latência durante o teste.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados nesse trabalho, pode-se dizer que a prática de exercício físico em apenas 10 dias aumentou o aprendizado e memória espacial. No entanto, a suplementação durante um curto período de tempo (5-12 dias) não foi capaz de melhorar essas habilidades.

Ainda, a associação entre os dois tratamentos (suplementação e exercício) não se apresenta como algo vantajoso em relação a animais que realizaram apenas o exercício físico.

O treino de natação de 10 dias não foi suficiente para se observar o efeito na memória espacial após 21 dias sem treinamento algum.

Mais estudos são necessários no intuito de observar qual a janela de suplementação mínima para que os efeitos no aprendizado e memória espacial sejam observados, bem como o tempo máximo de duração do efeito da atividade física e da suplementação dentro dessas janelas.

REFERÊNCIAS

ALAEI, H.; MOLOUDI, R.; SARKAKI, A.R. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 12, p. 72-75, 2008.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALLEN, D.L.; HARRISON, B.C.; MAASS, A.; BELL, M.L.; BYRNES, W.C.; LEINWAND, L.A. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 1900-1908, 2001.

ALSUWAIDAN, M. T.; KUCYI, A.; LAW, C. W. Y.; McINTYRE, R. S. Exercise and bipolar disorder: A review of neurobiological mediators. **Neuromolecular Medicine**, v. 11, p. 328-336, 2009.

ANDERSON, B. J.; RAPPA, D. N.; BAEKA, D. H.; MCCLOSKEYA, D. P.; COBURN-LITVAKB, P.S.; ROBINSON, J.K. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. **Physiology & Behavior,** v. 70, p. 425-429, 2000.

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.

ARIYASU, H.; TAKAYA, K.; TAGAMI, T.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; AKAMIZU, T.; SUDA, M.; KOH, T.; NATSUI, K.; TOYOOKA, S. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 4753–4758, 2001.

ASL, N. A.; SHEIKHZADE, F.; TORCHI, M.; ROSHANGAR, L.; KHAMNEI, S. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. **Pathophysiology**, v. 15, p. 9-12, 2008.

BAEKELANDT, V.; ARCKENS, L.; ANNAERT, W.; EYSEL, U.T.; ORBAN G.A.; VANDESANDE, F. Alterations in GAP-43 and synapsin immunoreactivity provide evidence for synaptic reorganization in adult dorsal later geniculate nucleus following retinal lesions. **Eur J Neurosci**, v. 6, p. 754–765, 1994.

BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **J. Comp. Physiol**, v. 93, p. 74-104, 1979.

BARNES, C. A.; FORSTER, M.J.; FLESHNER, M.; AHANOTU, E.N.; LAUDENSLAGER, M.L.; MAZZEO, R.S.; MAIER, S.F.; LAL, H. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. **Neurobiol Aging**, v. 12, p. 47–53, 1991.

BERCHTOLD, N. C.; CHINN, G.; CHOU, M.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 133, p. 853-861, 2005.

BIRZNIECE, V.L.; BACKSTRÖM, T.; JOHANSSON, I.M.; LINDBLAD, C.; LUNDGREN, P.; LÖFGREN, M.; OLSSON, T.; RAGAGNIN, G.; TAUBE, M.; TURKMEN, S.; WAHLSTRÖM, G.; WANG, M.D.; WIHLBÄCK, A.C.; ZHU, D. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. **Brain Research Rewiews**, v. 51, p. 212-239, 2006.

CARLINI, V.P.; MONZON, M.E.; VARAS, M.M.; CRAGNOLINI, A.B.; SCHIOTH, H.B.; SCIMONELLI, T.N.; BARIOGLIO, S.R. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 43, p. 299-739, 2002.

CARRIÉ, I.; GUESNET, P.; BOURRE, J.M.; FRANCÈS, H. Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 439-447, 2000.

CHEN, S.; SUBBAIAH, P.V. Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 1319–1328, 2007.

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.

DA SILVA, T.M.; MUNHOZ, R.P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, A.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**, v. 111, p. 351-359, 2008.

DELATTRE, A.M. **Estudo do efeito da suplementação crônica com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 (n-3) sobre aspectos motores e bioquímicos em modelo animal de doença de Parkinson**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DELATTRE, A. M.; KISS, A.; SWAKA, R.E.; ANSELMO-FRANCI, J.; BAGATINI, P.B.; XAVIER, L.L.; RIGON, P.; ACHAVAL, M.; LANGHER, F.; DAVID, C.; MARRONI, N.A.P.; FERRAZ, A.C. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neuroscience Research**, v. 66, p. 256–264, 2010.

DRAGANSKI, B.; MAY, A. Training-induced structural changes in the adult human brain. **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 137-142, 2008.

DROSTE, S. K.; COLLINS, A.; LIGHTMAN, S. L.; LINTHORST, A. C. E.; REUL, J. M. H. M. Distinct, Time-Dependent Effects of Voluntary Exercise on Circadian and

Ultradian Rhythms and Stress Responses of Free Corticosterone in the Rat Hippocampus. **Endocrinology**, p. 4170-4179, 2009.

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

FERRAZ, A.C.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; NALIWAIKO, K.; PAMPLONA, J.; MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 78, p. 183-188, 2008.

FOX, G.B.; FAN, L.; LEVASSEUR, R.A.; FADEN, A.I. Effect of Traumatic Brain Injury on Mouse Spatial and Nonspatial Learning in the Barnes Circular Maze. **Journal of Neurotrauma**, v. 15, p. 1037-1046, 1998.

GOMES, R.J.; DE MELLO, M.A.R.; CAETANO, F.H.; SIBUYA, C.Y.; ANARUMA, C.A.; ROGATTO, G.P.; PAULI, J.R.; LUCIANO, E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 16, p. 326–331, 2006.

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

GOMEZ-PINILLA, F.; VAYNMAN, S.; YING, Z. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. **Eur J Neurosci**, v. 28, p. 2278-2287, 2008.

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

GOMEZ-PINILLA, F. The combined effects of exercise and foods in preventing neurological and cognitive disorders. **Preventive Medicine**, v. 52, p. 75-80, 2011.

GORJÃO, R.; AZEVEDO-MARTINS, A.N.; RODRIGUES, H.G.; ABDULKADER, F.; ARCISIO-MIRANDA, M.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Comparative effects of DHA e EPA on cell function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 56–64, 2009.

HOPKINS, M. E.; BUCCI, D. J. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, p. 278-284, 2010.

HULBERT, A.J.; TURNER, N.; STORLIEN, L.H.; ELSE, P.L. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biology Reviews**, v. 80, p. 155-169, 2005.

INMAN-WOOD, S.L.; WILLIAMS, M.T.; MORFORD, L.L.; VORHEES, C.V. Effects of prenatal cocaine on Morris and Barnes maze tests of spatial learning and memory in the offspring of C57BL/6J mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 547-557, 2000.

INNIS, S.M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **J.Nutr**, v. 137, p. 855–859, 2007.

INNIS, S.M.; FRIESEN, R.W. Essential n-3 fatty acids among pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. **Am.J.Clin.Nutr**, v. 87, p. 548–557, 2008.

INNIS, S.M. Omega-3 Fatty Acids and Neural Development to 2 Years of Age: Do We Know Enough for Dietary Recommendations? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, p. 16-24, 2009.

IZQUIERDO, I. **Memória**. São Paulo: Artmed, 2006.

KISS, A. **Efeito do tratamento com 17B-Estradiol sobre a memória de ratas *Wistar* ovariectomizadas jovens, de meia idade e senescentes**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**: Conceitos Fundamentais de Neurociência. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

LIM, S.Y.; HOSHIBA, J.; SALEM JR, N. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, p. 848-857, 2005.

LOU, S.; LIU, J.; CHANG, H.; CHEN, P. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research**, v. 1210, p. 48 – 55, 2008.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P.; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric disease: An overview. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 12-26, 2007.

MEYER, T.; WAEBER, G.; LIN, J.; BECKMANN, W.; HABENER, J.F. The promoter of the gene encoding 3_, 5_-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein contains cAMP response elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription. **Endocrinology**, v. 132, p. 770–780, 1993.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, p. 445-468, 1998.

MOLTENI, R.; BARNARD, R.J.; YING, Z.; ROBERTS, C.K.; GOMEZ-PINILLA, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hipocampal brain-derives neurotrophic factor, neuronal plasticity and learning. **Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 803-814, 2002.

MORIGUCHI, T.; GREINER, R.S.; SALEM JR, N. Behavioral Deficits Associated with Dietary Induction of Decreased Brain Docosahexaenoic Acid Concentration. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 2563-2573, 2000.

MORIGUCHI, T.; SALEM Jr, N. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, p. 297-309, 2003.

NALIWAIKO, K.; ARAÚJO, R.L.F.; FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; FERNANDES, L.C.; MARTINS, E.F.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; CURI, R.; FERRAZ, A.C. Fish oil and central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 91-99, 2004.

NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, p. 373:109, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

POO, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 24-32, 2001.

PROENÇA, M.B.; **Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 durante o desenvolvimento do sistema nervoso central sobre a memória espacial de ratos Wistar**. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Biomedicina) – Faculdades Integradas do Brasil, 2010.

RADÁK, Z.; KANEKOB, T.; TAHARAB, S.; NAKAMOTOC, H.; PUCSOKD, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 17-23, 2001.

ROSS, B. M. ω-3 Fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 515–524, 2007.

SALEM Jr, N.; LITMAN, B.; KIM, H-Y.; GAWRISCH, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v. 36, p. 945-979, 2001.

SAMORAJSKI, T.; DELANEY, C.; DUNLAP, W.P. Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57B1 mice. **Neurobiology of Aging**, v. 6, p. 17-24, 1985.

SANGIOVANNI, J.P.; CHEW, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 87-138, 2005.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

STILLWELL, W.; WASSALL, S. R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 1–27, 2003.

STRANAHAN, A.M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and Entorhinal cortex. **Hippocampus**, v. 17, p. 1017–1022, 2007.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215–222, 2002.

TYLER, W.J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C.R.; POZZO-MILLER, L.D. From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning. **Learning & Memory**, v. 9, p. 224-237, 2002.

VAN PRAAG, H.V.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 3, 1999.

VAN PRAAG, H.V.; SHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F.H. Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8680–8685, 2005.

VAN PRAAG. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci**, v. 32, p. 283-290, 2009.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. **Neuroscience**, v. 122, p. 647-657, 2003.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v. 20, p. 2580–2590, 2004.

VAYNMAN, S.; YING, Z., GOMEZ-PINILLA, F. The Select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. **Neuroscience**, v. 144, p. 825 – 833, 2007.

VENNA, V.R.; DEPLANQUE, D.; ALET, C.; BELARBI, K.; HAMDANE, M.; BORDET, R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 199 – 211, 2009.

VINES, A.; DELATTRE, A.M.; LIMA, M.M.S.; RODRIGUES, L.S.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R.B.; TUFIK, S.; PEREIRA, S.I.R.; ZANATA, S.M.; FERRAZ, A.C. The role of 5-HT1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 184-191, 2012.

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

YIN, J.C.; TULLY, T. CREB and the formation of long-term memory. **Curr Opin Neurobiol**, v. 6, p. 264–268, 1996.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 383-399, 2000.