

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABÍOLA VILA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DOS ÁCIDOS
GRAXOS POLI-INSATURADOS n-3 E DO EXERCÍCIO FÍSICO NÃO VOLUNTÁRIO
EM RATOS WISTAR

CURITIBA - 2014

FABÍOLA VILA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DOS ÁCIDOS
GRAXOS POLI-INSATURADOS $n-3$ E DO EXERCÍCIO FÍSICO NÃO VOLUNTÁRIO
EM RATOS WISTAR

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Fisiologia, no curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz

CURITIBA - 2014

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos iniciais são dirigidos a todos os meus colegas de laboratório que nas diversas fases do doutorado estiveram lá para compartilhar seus conhecimentos e dificuldades, além de me ajudar nos experimentos. Agradeço principalmente ao meu grande amigo Adriano Targa Dias Santos que foi fundamental na execução dos experimentos e na troca de experiências diárias e de vida, e não poderia esquecer da valiosa ajuda dos colegas amigos Lais Soares, Ivilin Hammerschidt, Simone Cunha, Flávia Gulak e Ana Márcia Delattre, além das pequenas ajudas diárias que em sua somatória se tornam grandes dos amigos Marco Mori, Bruno Carabelli, Mariana Fortes, Paula Kempe, Ana Damm e Ana Nosedá.

Agradeço também à professora Belmira Andrade da Costa, ao Professor Marcelo Meira e ao Professor Sílvio Marques Zanata.

Em especial agradeço a minha Profa. Anete Curte Ferraz, por aceitar uma nova proposta e por nos momentos de dificuldade nunca ter desistido desta árdua tarefa que foi ensinar uma professora de educação física a entender um pouquinho de neurofisiologia.

E por fim, agradeço a minha família, a minha amada mãe que é a pessoa que mais amo e admiro neste mundo, ao meu super e grande amor que me incentivou a assumir este grande desafio, as minhas irmãs e cunhado e aos pequenos da família, pessoas essenciais e fundamentais.

RESUMO

Estudos mostram que a suplementação com Óleo de Peixe (OP) rico em Ácido Docosaheptaenóico (DHA) e Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e a aplicação do exercício físico em ratos produzem efeitos benéficos no aprendizado e na neuroplasticidade. Considerando estes efeitos, a presente pesquisa dedicou-se a investigar o impacto da natação e da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) em ratos juvenis, já que os mesmos se encontram em períodos críticos de desenvolvimento das circuitarias cerebrais, e, portanto podem ser mais sensíveis a tais intervenções. Outra finalidade do estudo foi o de verificar por quanto tempo os efeitos do exercício e da suplementação depois de cessados podem persistir. Ratos machos Wistar de 30 dias de vida foram suplementados com OP e praticaram exercício físico durante 12 ou 50 dias. O uso de duas janelas temporais distintas teve a finalidade de certificar-se que os efeitos destas intervenções são dependentes do tempo de aplicação. Ao término destes períodos, metade dos ratos de cada experimento foi submetida a testes comportamentais e então ortotanasiados para retirada do hipocampo direito e esquerdo. Posteriormente foram realizadas análises bioquímicas com o propósito de quantificar os níveis de incorporação lipídica, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e estresse oxidativo (glutaciona peroxidase - GPx, glutaciona reduzida - GSH, glutaciona oxidada - GSSG). Após 21 dias de interrupção, a outra metade dos ratos foi testada. Os ratos submetidos ao protocolo de exercício físico e suplementação com OP durante curto período de aplicação não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros analisados. Da mesma forma, não foram encontrados efeitos das intervenções após 21 dias de interrupção no experimento de curta duração. Os ratos que se exercitaram no experimento de duração de 50 dias, denominado longo, independente de serem suplementados (OPE) ou não (CE), apresentaram baixo desempenho no aprendizado e diminuição dos níveis de BDNF. O exercício foi capaz de aumentar a ambulação dos ratos CE e apesar dos prejuízos causados nos processos mnemônicos, foi capaz de melhorar a capacidade antioxidante. Após a interrupção de 21 dias, embora o exercício tenha persistido em prejudicar o aprendizado e diminuir os níveis de BDNF, a capacidade antioxidante de ratos CE foi mantida incrementada. Já a suplementação foi capaz de reverter o efeito deletério do exercício nos ratos OPE, demonstrado pela normalização dos níveis de BDNF e do aprendizado em relação aos grupos controle e óleo de peixe, somente após o evento estressor, ou seja, o exercício físico ter sido cessado. Em conclusão, este estudo mostra a possibilidade de um efeito adverso do treinamento físico sobre o desempenho cognitivo de ratos *Wistar*, principalmente se não forem levados em conta os aspectos relacionados a idade do animal testado, ao tipo de exercício realizado e ao tempo de aplicação das intervenções suplementação com OP e exercício físico.

Palavras-chave: exercício físico, óleo de peixe, aprendizado e memória.

ABSTRACT

Studies show that supplementation with fish oil (FO) rich in Docosahexaenoic acid (DHA) and Eicosapentaenoic acid (EPA) and the practice of physical exercise in rats produce beneficial effects on learning and neuroplasticity. Considering these effects, the present study aimed to investigate the impact of swimming and polyunsaturated fatty-acids supplementation on young rats, since such period is critical for brain development and, therefore, may be more sensitive to such interventions. Another purpose of the study was to determine how long the effects of exercise and supplementation can persist after terminated. Male Wistar rats 30 days old were supplemented with FO and performed exercise for 12 (short) or 50 (long) days. The use of two distinct temporal windows was chosen to ensure that the interventions effects are time - dependent. At the end of these periods, half of the rats in each experiment was submitted to behavioral tests and then was made orthotanasia for left and right hippocampus withdraw. Afterward, biochemical analyzes were performed to quantify the levels of lipid embedding, derived neurotrophic factor (BDNF) and oxidative stress (GPx, GSH and GSSG). The other half of the rats suffered an interruption of interventions for 21 days, in order to ascertain whether the effects persisted after the interventions were ceased. Rats subjected to the protocol of exercise and supplementation with FO during short application showed no change in the parameters analyzed. Likewise, no changes were found after 21 days of interruption in the short-term experiment. The rats that exercised in the experiment duration of 50 days, long-winded, regardless of being supplemented (OPE) or not (CE), showed no learning and decreased levels of BDNF. The exercise was able to increase the ambulation of the CE rats and, despite of the damage in the mnemonic processes, was able to improve the antioxidant capacity. Furthermore, the changes in CE rats were ambulation in an open field and regulation of antioxidant capacity. After the interruption of 21 days, although it persisted the impaired learning and the decreased levels of BDNF, the antioxidant capacity of CE rats was kept incremented. On the other hand, supplementation was able to reverse the deleterious effect of exercise on OPE rats, as demonstrated by the normalization of BDNF levels and learning in relation to the control and fish oil groups, only after the stressor, ie, exercise has been ceased. In conclusion, our study shows the possibility of an adverse effect of exercise over cognition on Wistar rats, especially if one do not consider aspects as animal age, type of exercise and application time of the interventions i.e., supplementation with FO and physical exercise.

Keywords: exercise, fish oil, learning and memory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática dos mecanismos de formação de memórias.	14
FIGURA 2: Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos	16
FIGURA 3: Ácidos graxos da família n-3, plasticidade sináptica e cognição	19
FIGURA 4: Metabolismo da glutatona.....	31
FIGURA 5: Sistema antioxidante relacionado à glutatona..	32
FIGURA 6: Representação esquemática dos experimentos.....	38
FIGURA 7: Natação	40
FIGURA 8: Teste de memória de localização	42
FIGURA 9: Teste de localização de objetos. Experimento curto	49
FIGURA 10: Teste de localização de objetos. Experimento curto e interrupção.....	50
FIGURA 11: Campo aberto. Experimento curto.....	52
FIGURA 12: Campo aberto. Experimento curto e interrupção	53
FIGURA 13: BDNF	56
FIGURA 14: Teste de localização de objetos. Experimento longo.....	57
FIGURA 15: Teste de localização de objetos. Experimento longo e interrupção.....	58
FIGURA 16: Campo aberto. Experimento longo	59
FIGURA 17: Campo aberto. Experimento longo e interrupção.	61
FIGURA 18: BDNF.....	64
FIGURA 19: Estresse Oxidativo. Experimento longo.....	66
FIGURA 20: Estresse oxidativo. Experimento longo e interrupção.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas hipocâmpais de ratos treinados por período curto	54
TABELA 2 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas hipocâmpais de ratos treinados por período curto e com interrupção do experimento por 21 dias	55
TABELA 3 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas hipocâmpais de ratos treinados por período longo.....	62
TABELA 4 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas hipocâmpais de ratos treinados por longo curto e com interrupção do experimento por 21 dias	63
TABELA 5 - Concentração de lactato sanguíneo durante treinamento físico de natação nos ratos exercitados (mmol/l).....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 MEMÓRIA	12
1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (AGPIs) E MEMÓRIA	15
1.3 EXERCÍCIO E MEMÓRIA	21
1.4 SUPLEMENTAÇÃO E PROTOCOLO DE TREINAMENTO	23
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE RELACIONADO A GLUTATIONA	28
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 HIPÓTESE	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 ANIMAIS	37
5.2 DESENHO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
5.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE	39
5.4 EXERCÍCIO FÍSICO	40
5.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	41
5.5.1 Teste do campo aberto	41
5.5.2 Teste de localização de objetos	41
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXERCÍCIO E METABOLISMO REQUERIDO	42
5.7 ORTOTANÁSIA	43
5.8 PERFIL LIPÍDICO	43
5.9 BDNF HIPOCAMPAL	44
5.10 ESTRESSE OXIDATIVO	45
5.10.1 Ensaio da glutathione peroxidase (GPx)	45
5.10.2 Ensaio da glutathione reduzida (GSH)	47
5.10.3 Ensaio da glutathione oxidada (GSSG)	47
6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	48
7 RESULTADOS	49
7.1 EXPERIMENTO CURTO	49

7.1.1	Teste de localização de objetos	49
7.1.2	Campo aberto	50
7.1.3	Perfil lipídico	54
7.1.4	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).....	55
7.2	EXPERIMENTO LONGO	56
7.2.1	Teste de localização de objetos	56
7.2.2	Campo aberto	58
7.2.3	Perfil lipídico	62
7.2.4	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).....	63
7.2.5	Caracterização do exercício e metabolismo requerido.....	64
7.2.6	Estresse oxidativo	65
8	DISCUSSÃO	68
8.1	APLICAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM CURTA JANELA TEMPORAL	69
8.2	APLICAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM LONGA JANELA TEMPORAL.....	72
	PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	84
	9 CONCLUSÕES	85
	REFERENCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos apontam os benefícios que a atividade física regular pode causar nos sistemas biológicos, tais como melhora na condição cardiovascular, aumento de força e flexibilidade (BOMPA, 2002), melhorias nos parâmetros cognitivos (KHABOUR *et al.*, 2013; AGUIAR Jr *et al.*, 2011; ALOMARI *et al.*, 2013) e consequente melhora na qualidade de vida.

Levando-se em consideração o crescente aumento no índice de doenças da modernidade como, por exemplo, as doenças psíquicas e crônico-degenerativas, a prática de atividade física torna-se essencial em proporcionar benefícios ao indivíduo como melhora na memória e no aprendizado (ASL *et al.*, 2008; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; RADÁK *et al.*, 2001; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007).

Ademais a dieta saudável e balanceada pode trazer outras vantagens diretamente relacionadas à qualidade de vida. A inserção ou reposição de componentes nutritivos/orgânicos como vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados tem sido destaque em muitas pesquisas (ABUSHUFA *et al.*, 1994; CHEN e SUBBAIAH, 2007; CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010; DELATTRE *et al.*, 2010).

Alguns estudos combinando o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe têm sido realizados (RACHETTI *et al.*, 2013; CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; GOMEZ-PINILLA e YING, 2010), e os resultados ainda tem sido bastante distintos. Outros poucos estudos têm investigado por quanto tempo estes efeitos perduram depois de cessadas as intervenções (RADÁK *et al.*, 2006; BERCHTOLD, CASTELLO E COTMAN, 2010). Há muitas questões a serem respondidas sobre este assunto e faz-se necessário investigar quais variáveis podem influenciar nos benefícios que a atividade física e a suplementação com óleo de peixe vida podem proporcionar.

1.1 MEMÓRIA

A memória se constitui da aquisição, consolidação e evocação de informações (ABEL e LATTAL, 2001) e é dividida segundo sua natureza em memória declarativa ou explícita que pode ser declarada e relatada, operacional que permite raciocínio rápido e planejamento de comportamento e implícita ou não declarativa que se constitui das capacidades, habilidades motoras ou sensoriais (IZQUIERDO, 2006; LENT, 2004; SQUIRE e KANDEL, 2003). As memórias podem ser ainda divididas segundo seu tempo de retenção, como ultra-rápida, de curta duração e de longa duração (LENT, 2004).

As memórias declarativas podem se dividir em episódicas e semânticas. As episódicas dizem respeito a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos e as semânticas são as que envolvem conceitos atemporais e memória cultural (LENT, 2004). Ambas têm como estruturas nervosas responsáveis o hipocampo e o córtex entorrinal, localizados no lobo temporal (IZQUIERDO, 2006).

Além das estruturas do hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala são estruturas importantes para a memória. Por exemplo, o córtex pré-frontal medial ventral é importante para a memória de funcionamento e o processamento de atenção, já o córtex pré-frontal medial dorsal tem uma participação maior na memória para processos motores. Embora ambas as regiões estejam envolvidas na aprendizagem espacial, a sub-região ventral tem uma participação maior no processamento emocional do que a sub-região dorsal, que tem uma participação maior na aprendizagem e na memória espacial e no condicionamento do medo (McCORMICK e MATHEWS, 2010).

As memórias são formadas a partir da sinalização dos neurônios, e suas modificações estruturais e funcionais. A alteração das sinapses neuronais se dá estruturalmente através do aumento do número de terminais pré-sinápticos e de zonas ativas, e funcionalmente pela facilidade que as mesmas terão em excitar ou inibir uma célula-alvo a partir de uma maior liberação de neurotransmissores. Estes processos constituem a base neuroquímica e morfofuncional da aprendizagem (SQUIRE e KANDEL, 2003).

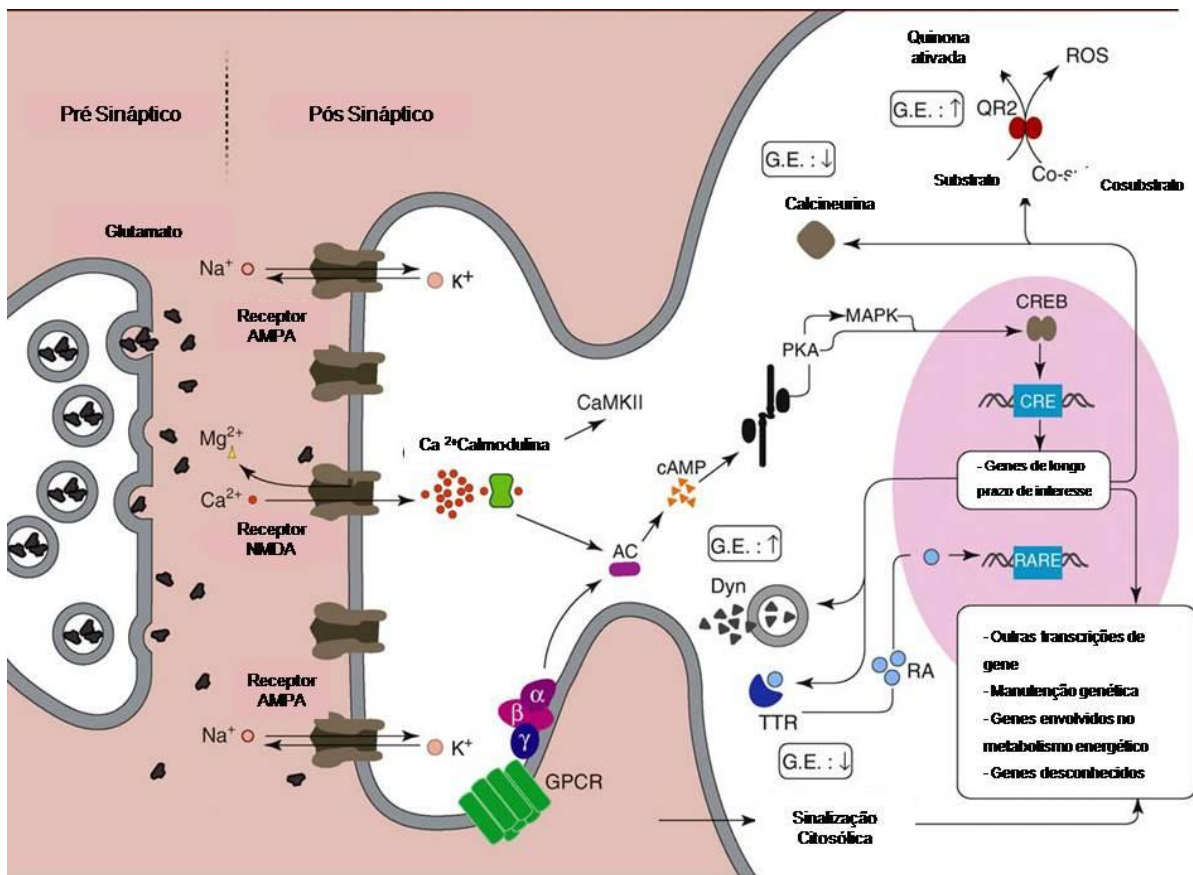
O principal neurotransmissor excitatório (causador da despolarização da célula) relacionado à aprendizagem e à memória é o glutamato (ABEL e LATTAL,

2001). Maior captação e liberação de glutamato ou maior expressão dos receptores de glutamato estão envolvidos com melhorias na memória (AGUIAR Jr *et al.*, 2011). O influxo de íons no neurônio pós-sináptico através de três principais receptores ou classe de receptores (AMPA, NMDA e receptores metabotrópicos), e as consequências provenientes da mudança de voltagem na célula relacionam-se com um processo longo e duradouro que desencadeia os processos de memória e aprendizado (IZQUIERDO, 2006).

A memória de longa duração é formada a partir de processos complexos que envolvem a potenciação de longa duração (LTP), responsável pela melhoria duradoura da transmissão de sinal entre dois neurônios e base da consolidação da memória em nível celular no hipocampo. A natureza e a sequência dos passos bioquímicos da LTP são os mesmos da consolidação da memória (FURINI *et al.*, 2013).

Nestes processos, ocorre a excitação das células hipocâmpais via glutamato, e consequente influxo de íons Na^+ , desobstrução dos canais NMDA pela saída do Mg^{+2} e influxo de Ca^{+2} . O cálcio ativa várias proteínas quinases intracelulares (CaMKII, PKC, PKG, PKA, MAPK dentre outras) e suas respectivas vias de sinalização (ABEL e LATTAL, 2001). Estas enzimas são verdadeiros catalisadores biológicos que incrementam as funções através da fosforilação de outras proteínas e fatores de transcrição, modificando as vias metabólicas através de segundos mensageiros, atuando na expressão gênica e consequentemente na transmissão sináptica (IZQUIERDO, 2006).

A seguir na figura 1, tem-se uma figura esquemática mostrando os mecanismos da formação das memórias de curta e longa duração:



TRENDS in Pharmacological Sciences

FIGURA 1: Representação esquemática dos mecanismos de formação de memórias. O glutamato e seus receptores ionotrópicos (α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)) estão envolvidos com a formação da memória. Uma vez na fenda sináptica, o glutamato liga-se ativando os receptores AMPA, permitindo que os íons sódio se movam para o interior e os íons potássio para o exterior. A rápida despolarização da membrana libera os íons magnésio que estavam bloqueando o canal do receptor NMDA, deixando em um estado ativado. Enormes quantidades de íons cálcio entram nos neurônios pós-sinápticos, ativando várias vias de sinalização. Um complexo de proteínas de Ca^{+2} /calmodulina é então formado. Esta molécula vai ativar as proteínas quinases Ca^{+2} /calmodulina dependentes (CaMKII), chave na plasticidade neuronal. A CaMKII estimula a produção do segundo mensageiro adenosina-monofosfato cíclico pós-sináptico (AMPc) através da cascata da adenilil ciclase (AC). Receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (GPCR) ativados por dopamina e serotonina colocam em atividade a AC. Os níveis aumentados de AMPc podem efetivamente aumentar inicialmente a ativação da proteína quinase A (PKA), e então a quinase MAP (MAPK), que vai mover-se a partir da sinapse para o núcleo. No núcleo, o AMPc ativa um importante fator de transcrição nuclear: o elemento responsivo cAMP (CREB). Estas proteínas recrutam a maquinaria transcricional e iniciam a transcrição dos genes precoces imediatos (IEG). As memórias de curto e longo prazo conduzirão à expressão de numerosos genes e proteínas. G.E.= expressão gênica; TTR = transtirretina; QR2 = quinona redutase 2; Dyn = calcineurina e dinorfina (BENOIT *et al.*, 2011, tradução nossa).

Depois que as memórias são consolidadas na região CA1, eles são armazenados (dias, semanas, anos) em outras regiões próximas ao hipocampo, tais como córtex entorrinal, sensorial e regiões pré-frontais e parietais (FURINI *et al.*, 2013).

Em âmbito celular, o armazenamento das memórias de longa duração está associado à expressão de genes, síntese de proteínas e formação de conexões neuronais, mediadas pelos níveis de proteínas tais como o CREB, AKT e BDNF (AGUIAR Jr *et al.*, 2011).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (AGPIs) E MEMÓRIA

Os ácidos graxos são um tipo de molécula não polimérica, e se apresentam como ácidos carboxílicos com grupos laterais de longas cadeias de hidrocarbonetos. Agregadas, possuem diversas funções como reserva de alimentos na forma de triacilgliceróis, como moléculas de colesterol e ou como hormônios (ex. testosterona) na forma de esteróides, como glicolípídeos que são ácidos graxos ligados a açúcares, ou como fosfolípídeos, os principais componentes juntamente com as proteínas das membranas celulares (ALBERTS *et al.*, 2006).

Podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados. São chamados de poli-insaturados se possuírem duas ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono das cadeias hidrocarbonadas. Estas ligações duplas tendem a ocorrer a cada três carbonos, não sendo conjugadas. A organização biológica das membranas depende da cadeia pesada e do nível de insaturação do ácido graxo (GORJÃO *et al.*, 2009).

A união de duas cadeias hidrocarbonadas (normalmente uma delas é saturada e a outra é insaturada), do grupo carboxila, do glicerol, do fosfato e de um grupo polar (geralmente a colina) forma os fosfolípídeos, moléculas anfipáticas, que são os componentes principais das membranas celulares (ALBERTS *et al.*, 2006).

Dois importantes famílias dos AGPIs, ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), são caracterizadas como essenciais aos mamíferos, uma vez que estes não são capazes de sintetizá-los. A abreviação n-3 representa a posição da primeira dupla ligação contida no átomo de carbono metil na cadeia poliinsaturada do ácido graxo (YOU DIM, MARTIN, JOSEPH, 2000).

Os metabólitos do ácido graxo essencial alfa-linolênico (n-3) são importantes constituintes das membranas celulares (CHEN e SUBBAIAH, 2007). Estes

metabólitos são o ácido docosahexaenóico (DHA) e o eicosapentaenóico (EPA), que podem ser encontrados em diversos alimentos como os óleos marinhos e de peixes (FERRAZ *et al.*, 2008; LAURITZEN *et al.*, 2001).

As etapas bioquímicas para a formação desses dois ácidos graxos poli-insaturados essenciais a partir de seu precursor, o ácido alfa-linolênico é mostrado abaixo:

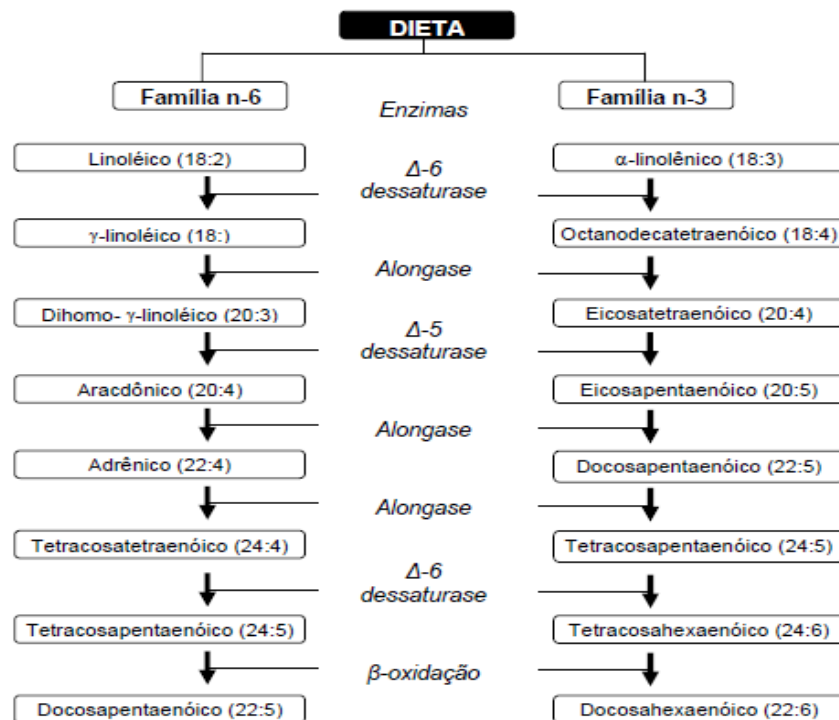


FIGURA 2: Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos (LAURITZEN *et al.*, 2001).

Atualmente, nas sociedades ocidentais, a alimentação foi deveras modificada. Estudos antropológicos e nutricionais indicam que houve mudança na dieta humana, especialmente nos últimos 150 anos (SIMOPOULOS, 2002). A industrialização e a inserção na sociedade de novos hábitos alimentares aumentaram drasticamente a quantidade de gorduras saturadas ingeridas diariamente.

As gorduras saturadas reduzem os substratos moleculares, os quais suportam processos cognitivos e aumentam o risco de disfunções neurológicas tanto em humanos como em animais. A alimentação pode exercer papel fundamental nas funções mentais. Fatores da dieta podem afetar múltiplos processos encefálicos como a regulação dos neurotransmissores, a transmissão sináptica, a fluidez das

membranas e os caminhos dos sinalizadores na tradução genética (GOMEZ-PINILLA, 2008).

É de extrema necessidade a ingestão dos ácidos graxos da família n-3 para manter os benefícios da função cognitiva. Dietas deficientes neste ácido graxo em humanos estão associadas ao aumento dos riscos em vários distúrbios mentais (CHEN e SUBBAIAH, 2007). Uma alimentação rica em ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 (AGPIs) pode auxiliar na prevenção ou amenização dos sintomas de doenças crônico-degenerativas como Alzheimer e Parkinson, depressão e demências (VENNA *et al.*, 2009; VINES *et al.*, 2012; DELATTRE *et al.*, 2010; FERRAZ *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2008), além de melhorar e otimizar os aspectos relacionados ao desempenho cognitivo, como melhora do aprendizado espacial (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; ASL *et al.*, 2008).

Contudo, atualmente a ingestão diária destes ácidos graxos, principalmente a do DHA está muito abaixo da proporção admitida como saudável (MAZZA *et al.*, 2007). Somando-se a isso, há uma grande discrepância na razão de ingestão dos ácidos graxos da família n-3 em relação aos ácidos graxos da família n-6 (em torno de 15:1 - 16,7:1), quando a mesma deveria ser de 1:1. Isto é consequência da evolução do agronegócio e da revolução industrial que modificou severamente a alimentação (SIMOPOULOS, 2002).

Os seres humanos evoluíram a partir de padrões genéticos estabelecidos na relação 1:1. Os fatores genéticos determinam os tipos de doença a que os seres humanos serão suscetíveis e os fatores ambientais determinam quais indivíduos suscetíveis serão afetados. A alimentação é um fator ambiental. Este desequilíbrio pode promover a patogênese de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças inflamatórias e autoimunes (SIMOPOULOS, 2002).

Há duas fases muito importantes para a aquisição dos ácidos graxos da família n-3. Um deles é o período fetal e o segundo ocorre após o nascimento até o completo desenvolvimento bioquímico do encéfalo. Em situação de deficiência de ácidos desta família, o organismo trabalha através de mecanismo de substituição por ácidos graxos da família n-6, como o ácido docosapentaenóico. Isto pode levar à mudanças funcionais e pode trazer danos cognitivos e prejuízos visuais (CONNOR, 2000).

O DHA que representa aproximadamente 17% do total de ácidos graxos constituinte das membranas plasmáticas (CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010), é comprovadamente importante para atividades relacionadas à emoção, atividade exploratória e função cognitiva (RACHETTI *et al.*, 2013; MOTOHASHI *et al.*, 2009).

O DHA pode afetar a função sináptica e as habilidades cognitivas influenciando na integridade e na melhora da fluidez da membrana e consequente permeabilidade iônica nas regiões sinápticas, na excitabilidade neuronal e no crescimento sináptico e axonal (CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010; GORJÃO *et al.*, 2009; CHEN e SUBBAIAH, 2007; CONNOR, 2000). A relação do DHA com o sistema glutamatérgico é muito importante tendo em vista que aumenta a liberação de glutamato e restaura a potenciação de longo prazo (RACHETTI *et al.*, 2013).

Este ácido graxo pode ativar os caminhos metabólicos produtores de energia (FIGURA 3) que afetam subsequentemente moléculas fundamentais para a memória, como por exemplo, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (GOMEZ-PINILLA, 2008). O BDNF está relacionado com o processo de aquisição e consolidação das memórias (TRUDEAU e SHEPHARDT, 2008) e é encontrado abundantemente em áreas do encéfalo que são associadas com a regulação cognitiva e metabólica: respectivamente o hipocampo e o hipotálamo. Aprendizado de uma tarefa aumenta a plasticidade sináptica mediada pelo BDNF, e a falta por causas genéticas do gene do BDNF atrapalha a formação de memórias (GOMEZ-PINILLA, 2008).

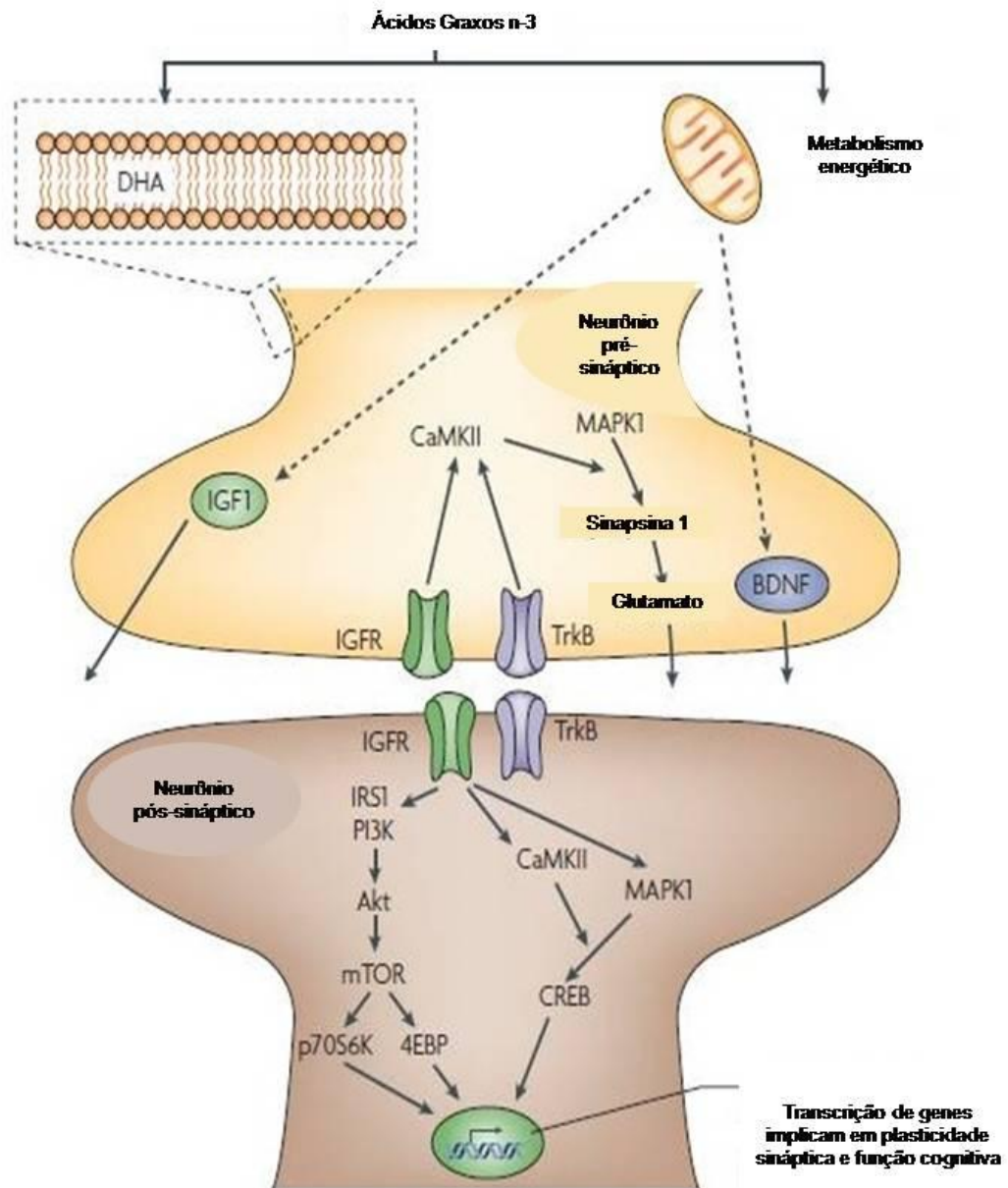


FIGURA 3: Ácidos graxos da família n-3, plasticidade sináptica e cognição. O DHA pode afetar a função sináptica e as capacidades cognitivas, melhorando a fluidez da membrana plasmática em regiões sinápticas. O DHA constitui mais de 30% da composição total de fosfolipídios da membrana plasmática no cérebro, e, portanto, é crucial para manter a integridade da membrana e, conseqüentemente, a excitabilidade neuronal e a função sináptica. O DHA na dieta é indispensável para a manutenção da permeabilidade iônica da membrana e a função dos receptores transmembrânicos que suportam a transmissão sináptica e habilidades cognitivas. Os AGPIs n-3 também ativam vias metabólicas de geração de energia que afetam posteriormente moléculas, tais como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O BDNF atua nos receptores pré-sinápticos e pós-sinápticos, que podem ativar os sistemas de sinalização, tais como a proteína quinase ativada por mitógeno II (MAPK) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII), que facilitam a transmissão sináptica e apoia a potenciação de longo prazo que está associado com o aprendizado e a memória (tradução nossa) (GOMEZ-PINILLA, 2008).

Este fator neurotrófico em sua forma madura influencia na indução da potenciação de longo prazo e na transmissão sináptica. Atua nos receptores pré-sinápticos e pós-sinápticos e mobiliza os sistemas de sinalização das proteínas quinases ativáveis por agentes mitógenos (MAPK) e da proteína quinase cálcio-calmodulina dependentes (CaMKII) (GOMEZ-PINILLA, 2008).

A MAPK e a CaMKII fosforilam fatores de transcrição de DNA presentes no núcleo das células. Um exemplo disso é a proteína de ligação do elemento responsivo de AMP cíclico (CREB) (2-6 horas após a LTP), sinalizador que está envolvido na produção de proteínas de adesão celular e de outros fatores de transcrição (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; IZQUIERDO, 2006).

Por fim, o BDNF atua também na ativação de outro sinalizador intracelular, o Akt (Proteína Quinase B ou PKB) que tem um importante papel na função cognitiva e na neuroplasticidade (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004).

Segundo Wu, Ying e Gomez-Pinilla (2008) a relação entre DHA e níveis aumentados de BDNF pode ser explicada através da conversão do DHA em uma neuroproteína chamada D1 (NPD1) que pode elevar os níveis de BDNF. Outra explicação vem do fato do DHA nas membranas plasmáticas ativarem mecanismos de sinalização exacerbando os níveis de BDNF. O DHA também possui capacidade antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo que atua diretamente na diminuição de BDNF e por fim, o DHA pode auxiliar o transportador de glicose da membrana neuronal provendo uma maior fonte de energia aos neurônios.

Enfim, a alimentação é um modulador da aprendizagem e memória e a adição de alimentos saudáveis contendo os ácidos graxos poli-insaturados (n-3) podem afetar a capacidade cognitiva, e ajudar no tratamento de desordens cerebrais (KHABOUR *et al.*, 2013; GOMEZ-PINILLA, 2008).

1.3 EXERCÍCIO E MEMÓRIA

A plasticidade cerebral (mudanças cerebrais estruturais, celulares e moleculares) é muito importante para a manutenção da saúde e a atividade física pode influenciar positivamente nestes fatores (COTMAN e BERCHTOLD, 2002).

Para a neurofisiologia, o exercício exerce papel fundamental na melhoria dos processos mnemônicos, através do aumento da neurogênese e da expressão de fatores de crescimento do endotélio capilar e conseqüente angiogênese, melhora da captação de glicose, aumento da geração de neurotrofinas e alteração do estado antioxidante e redox do encéfalo, modificando o metabolismo cerebral (TOLDY *et al.*, 2009).

A partir de programas de atividade física foram verificadas melhoras no aprendizado e na memória, na capacidade de concentração e no desempenho acadêmico a partir de programas de atividade física escolar (TRUDEAU e SHEPHARDT, 2008).

Em estudos realizados com ratos, o exercício físico voluntário melhorou a neurogênese (PRAAG, KEMPERMANN e CAGE, 1999), a vascularização cerebral (COTMAN e BERCHTOLD, 2002), o aprendizado (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004), a atividade neuronal e a neuroquímica do hipocampo (ANDERSON *et al.*, 2000) que é a região onde se formam as memórias declarativas (IZQUIERDO, 2006).

O exercício tende a trazer benefícios em relação à diminuição da liberação de corticosteroides, reduzindo a ansiedade e a depressão. Além disso, enquanto os corticosteroides trazem a diminuição da quantidade de BDNF no hipocampo (COTMAN e BERCHTOLD, 2002), o exercício pode influenciar diretamente no aumento dos níveis deste fator trófico (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; KHABOUR *et al.*, 2013; ALOMARI *et al.*, 2013; AGUIAR Jr *et al.*, 2011; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004).

Muitas pesquisas encontraram benefícios do exercício físico sobre a memória espacial, tanto através de mudanças estruturais como funcionais (ANDERSON *et al.*, 2000; PRAAG *et al.*, 2005; ALOMARI *et al.*, 2013; CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010). 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 (LENT, 2004; BIRZNIECE *et al.*, 2006). Alguns autores (ASL *et al.*, 2008; BARNES *et al.*, 1991), tiveram dificuldades em reproduzir resultados semelhantes, provavelmente porque o tipo de memória avaliada foi outra.

O conjunto de dados encontrados na literatura nos sugere que os efeitos do exercício sobre a memória dependem não só da idade e do tipo da memória, como também da intensidade, do tipo e da duração da atividade, que constituem o que chamamos de exigência do protocolo do exercício.

A intensidade do exercício pode determinar os efeitos que o mesmo pode causar na memória (BLUSTEIN, McLAUGHLIN e HOFFMAN, 2006). A intensidade pode ser definida como quantidade de trabalho realizada por unidade de tempo. Quanto mais trabalho realizado neste tempo, maior a intensidade do trabalho (BOMPA, 2002). Exercício moderado como natação forçada (frequência de 5x por semana, duração de 60 minutos, carga de 5% do peso corporal por 6 semanas) tem se mostrado eficiente para melhorar a aptidão física de ratos (GOMES *et al.*, 2006). Tendo em vista o benefício dos exercícios nos aspectos físicos, sugere-se que protocolos com intensidade semelhante ao do autor acima, sejam úteis em trazer melhoras aos aspectos cognitivos. Outros artigos utilizaram protocolos parecidos (TOLDY *et al.*, 2009; RADÁK *et al.*, 2001).

O exercício físico em decorrência de condições físicas ou fisiológicas estressantes (GOMES DA SILVA *et al.*, 2012) pode também trazer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, moléculas estas indutoras do dano oxidativo e da neurodegeneração (RADÁK *et al.*, 2013). Os mecanismos moleculares que se relacionam com o estresse e a cognição são pouco entendidos e podem ser responsáveis por doenças mentais não resolvidas ou ausência/déficit de aprendizado, assim, é importante compreender a ação do exercício físico sobre a saúde mental (GOMEZ-PINILLA e YING, 2010).

1.4 SUPLEMENTAÇÃO E PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Estudos que envolvem suplementação com AGPIs e protocolos de treinamento físico podem apresentar grande variação em relação ao tempo de experimento, faixa etária do experimentado, características do exercício e da suplementação, dentre outros fatores. Ao considerar isso, é necessário fazer uma análise mais apurada de estudos atuais a fim de entender os diversos resultados encontrados na literatura e os reais benefícios destas intervenções na saúde.

Alguns grupos de estudiosos optaram em utilizar janelas temporais de suplementação consideradas longas, outros se utilizaram de experimentos em curto período de tempo encontrando também resultados. Estudos de Naliwaiko *et al.* (2004), Ferraz *et al.* (2011) e Ferraz *et al.* (2008) mostraram comportamento antidepressivo em ratos na fase adulta a partir da suplementação crônica com óleo de peixe, durante as fases de gestação e lactação (suplementação indireta dos filhotes) e pós-desmame (21 dias de idade) até 90-100 dias. Além disso, estes autores encontraram incorporação aumentada de DHA e EPA às membranas de córtex cerebral e hipocampo de ratos suplementados com óleo de peixe desde a fase de gestação e lactação (suplementação indireta) até os 90 dias de idade.

Tal como os estudos acima, animais muito jovens (21 dias de vida) foram suplementados com óleo de peixe por aproximadamente 3 meses apresentando incorporação aumentada de DHA às membranas do córtex cerebral e da substância negra (DELATTRE *et al.*, 2010).

Surpreendentemente, utilizando-se de protocolos de suplementação/dieta enriquecida por vários AGPIs da família n-3 e n-6 de duração considerada curta (durante 6 semanas em animais adultos), Venna *et al.* (2009) verificaram comportamento antidepressivo em ratos adultos, apesar de não conseguirem demonstrar incorporação dos ácidos graxos às membranas neuronais.

A não identificação de incorporação de DHA pode ser consequência da aplicação de curtíssimo período de suplementação, tendo em vista a necessidade de um maior tempo (8 semanas) para que o organismo consiga se beneficiar desta dieta neste sentido (YOU DIM, MARTIN, JOSEPH, 2000). Isto indica que os resultados podem estar se mostrando diferentes por conta da influência da faixa etária dos testados nas pesquisas.

Segundo McCormick e Mathews (2010) a escala de idade amplamente utilizada para roedores se dá da seguinte forma: fase infantil entre o 21º e 25º dia de vida, adolescência entre o período do 28º ao 42º dia de vida e vida adulta após o 60º dia de vida. Uysal *et al.* (2005) considera o fim da adolescência aos 60 dias de vida.

O desenvolvimento encefálico inicia-se na vida intra-uterina e se desenrola até o final da adolescência, sendo altamente influenciado pelos fatores ambientais, sendo o hipocampo uma das áreas mais sujeitas a essas influências (UYSAL *et al.*, 2005). A suplementação com ácidos graxos da família n-3 pode ser eficaz, mas parece ser dependente da fase da vida em que é aplicada, e mostra-se menos eficaz quando iniciado em idades mais avançadas (LANGUILLE, AUJARD e PIFFERI, 2012).

Apesar de existir a possibilidade de reestruturação morfológica e funcional do encéfalo na vida adulta, após o período de maturação, já que esta é uma propriedade intrínseca do sistema nervoso (DRAGANSKI e MAY, 2008), os períodos críticos de desenvolvimento do encéfalo acontecem na infância e na adolescência, sendo o DHA fator fundamental no desenvolvimento do SNC (CHEN e SUBBAIAH, 2007). O hipotálamo, a amígdala e o córtex pré-frontal são regiões do encéfalo que se submetem à remodelação morfológica e funcional extensiva durante a adolescência, com a maturação que ocorre mais cedo em regiões límbicas subcorticais do que em regiões corticais frontais (McCORMICK e MATHEWS, 2010).

Faz-se necessário avaliar que eventos e experiências na aprendizagem durante a adolescência podem conduzir a um desenvolvimento mais complexo das estruturas, funções e circuitarias cerebrais, auxiliando na neurogênese e na neuroplasticidade, que é a habilidade do encéfalo mudar em resposta a esses processos e que tende a diminuir durante a decorrer da vida (LOU *et al.*, 2008).

Assim, parece que o tempo de suplementação e a fase de maturação do encéfalo durante a suplementação são variáveis importantes para verificar efeitos comportamentais e bioquímicos positivos no sistema nervoso e na saúde cognitiva na vida adulta dos animais.

Protocolos de treinamento físico também podem ser analisados por diversas vertentes, já que se distinguem em muito nas pesquisas e há uma ampla gama de relatos sobre a natureza dos consequentes efeitos. Os protocolos de treinamento variam de acordo com objetivos, período de aplicação do treinamento, nível de treinabilidade, idade, tipo de exercício (forçado ou voluntário), modalidade (natação,

esteira mecânica ou roda giratória), duração da sessão, frequência semanal, intensidade/velocidade, resultados esperados, dentre outros fatores.

Alguns autores, como Vaynman, Ying e Gomez-Pinilla (2004) defendem que curtos períodos de aplicação de exercícios físicos são suficientes para gerar desempenho aumentado sobre o aprendizado espacial em modelos animais verificado no teste do Labirinto Aquático de Morris, além de aumentar os níveis de marcadores de proteínas relacionados à plasticidade. Ratos adultos foram submetidos ao exercício durante 5 dias consecutivos, e este experimento foi capaz de elevar os níveis de RNA mensageiro do BDNF, de seu receptor (TrkB) e os níveis dos subprodutos, a proteína sinapsina I e o CREB.

Em outro estudo deste mesmo grupo (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007) foi demonstrado que uma semana de exercício foi eficaz em aumentar os níveis de CaMKII hipocampal em modelos animais, mediando os efeitos do exercício na cognição.

Da mesma corrente de pensamento, Lou *et al.* (2006) treinaram ratos juvenis (35 dias de vida) em esteira rolante durante uma semana. Obtiveram melhoras na memória espacial no teste do Labirinto de Morris também em curto período de treinamento. Ainda em estudo mais recente de Lou *et al.* (2008), os ratos juvenis foram submetidos ao exercício físico durante uma semana, e os autores verificaram aumento na neurogenese, nos níveis dos receptores tipo 1 de N-metil-D-aspartato (NMDAR1) e nos níveis de BDNF.

Foram encontrados em maior número, estudos com protocolos de treinamento de duração mais longa (21 dias até meses) que mostram efeitos positivos na memória de ratos (MARLATT *et al.*, 2012; ASL *et al.*, 2008; GARCIA-CAPDEVILA *et al.*, 2009; BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010; GOMES *et al.*, 2006), aumento nos níveis de moléculas sinalizadoras (AGUIAR Jr *et al.*, 2011) e nos fatores neurotróficos (RADÁK *et al.*, 2006; BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010).

A variabilidade de resultados pode ser dependente também do tipo de exercício. Exercício físico voluntário (roda giratória) resultou em aumento da neurogenese hipocampal em ratos adultos, diferentemente do exercício forçado (natação) (PRAAG, KEMPERMANN e CAGE, 1999), reversão dos efeitos negativos da dieta baseada em gorduras saturadas, tais como diminuição do desempenho no teste de memória espacial, diminuição dos níveis de BDNF, sinapsina I e CREB e

aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (MOLTENI *et al.*, 2004) e melhora do aprendizado espacial (VAYNMAN, YING E GOMEZ-PINILLA, 2004; 2007).

Em estudo de Mello *et al.* (2008) os ratos foram submetidos ao exercício forçado por 2 semanas em esteira mecânica, decorrendo em prejuízo no desempenho dos ratos no teste de reconhecimento de objeto. Curiosamente, o mesmo tipo de exercício aplicado durante 8 semanas não mostrou efeito deletério na aprendizagem, entretanto o grupo exercitado não se diferenciou do grupo controle, mostrando efeito nulo da atividade física no teste de memória espacial.

Exercícios físicos aeróbicos têm sido relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio que em concentrações significativas podem causar danos oxidativos e neurodegeneração (RADÁK *et al.*, 2013). Protocolos de exercício forçado de curta ou longa duração trouxeram aumento do estresse oxidativo em ratos submetidos a exercício de natação (TSAKIRIS *et al.*, 2004).

Opondo-se aos achados acima, outras pesquisas relatam benefícios na utilização do exercício forçado, tais como aumento do número de neurônios hipocampais em ratos (UYSAL *et al.*, 2005), melhora da memória espacial de curta e longa duração e aumento nos níveis de BDNF (KHABOUR *et al.*, 2013, O'CALLAGHAN, OHLE e KELLY, 2007) e aumento da densidade dos astrócitos GFAP positivos hipocampais que estão diretamente envolvidos com a neuroplasticidade (SAUR *et al.*, 2014). O exercício forçado é mais semelhante ao treinamento físico de humanos, ao contrário do exercício voluntário.

Por fim, estudos que submeteram os ratos tanto a exercício voluntário como a exercício forçado foram eficazes em verificar aprendizado e melhoras em parâmetros moleculares associados à memória (ALOMARI *et al.*, 2013; CETINKAYA *et al.*, 2013).

Além do tipo de exercício, a intensidade do mesmo é outro parâmetro crítico a ser considerado. Intensidade alta do exercício pode ser um fator estressor e resultar em prejuízos iniciais a aquisição de uma tarefa de aprendizado espacial (BLUSTEIN, McLAUGHLIN e HOFFMAN, 2006).

Pequenas quantidades diárias de exercício, resultando em exercício de baixa intensidade foram eficazes em demonstrar melhoras no aprendizado espacial, diferentemente de quantidades médias ou altas de atividade física (GARCIA-CAPDEVILA *et al.*, 2009), em aumentar os níveis de AKT, CREB (AGUIAR Jr *et al.*,

2011), BDNF (LOU *et al.*, 2008; AGUIAR Jr *et al.*, 2011) e densidade dos astrócitos GFAP positivos hipocámpais (SAUR *et al.*, 2014).

Contrapondo os estudos acima, Aguiar Jr *et al.* (2009) foram capazes de verificar aumento nos níveis de BDNF através da submissão de ratos a exercício de elevada intensidade.

Percebe-se a partir das leituras acima que o exercício físico tem sido extenuantemente estudado, mas há algumas divergências nos resultados em relação à intensidade utilizada nos protocolos, bem como à caracterização da intensidade do exercício pelos autores em cada um destes estudos.

Para complementar estas análises críticas que dizem respeito aos protocolos de exercício e à suplementação, em nosso conhecimento, há poucos estudos caracterizados por metodologias combinadas. Efeitos positivos na memória espacial (RACHETTI *et al.*, 2013), no crescimento axonal (CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010), em parâmetros moleculares (aumento dos níveis de proteínas intracelulares e de fatores neurotróficos) (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008) e na homeostase do hipocampo (GOMEZ-PINILLA e YING, 2010) têm sido encontrados quando verifica-se o efeito combinado das duas variáveis. Assim mesmo, há divergências entre o estudo de Rachetti *et al.* (2013) e dos demais estudos citados no que diz respeito ao tempo de suplementação e protocolo do exercício utilizados.

A dieta está intimamente relacionada com modificações na composição lipídica das membranas celulares (LAURITZEN *et al.*, 2001; SIMOPOULOS, 2002), e a associação entre dieta e exercício pode afetar a produção de energia mitocondrial, que tem papel importante em manter a excitabilidade neuronal e a função sináptica. Assim, a correta combinação destes dois fatores pode trazer benefícios adicionais à plasticidade sináptica e à função cognitiva (GOMEZ-PINILLA, 2008; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008).

O destreinamento e a interrupção do experimento são caracterizados pela interrupção do exercício físico e da suplementação, respectivamente. Este fato parece ser comum no dia-a-dia das pessoas, já que por conta de suas muitas tarefas e atribuições acabam deixando de lado hábitos saudáveis como boa alimentação e prática da atividade física. Por quanto tempo os benefícios do exercício permanecem na memória? Os benefícios da suplementação em fases iniciais da vida são capazes de gerar benefícios que se mantêm ao longo da vida?

Com o propósito de responder a estas perguntas, nos baseamos em achados de dois diferentes estudos que fazem constatações a respeito do destreino físico.

Segundo Radák *et al.* (2006) animais destreinados por 1 ou 2 semanas não diferiram dos ratos sedentários em relação ao aprendizado espacial no Labirinto Aquático Radial. Entretanto, juntamente com os ratos exercitados mostraram níveis de espécies reativas de oxigênio em níveis mais baixos do que os ratos controles.

Em outro experimento, os ratos submetidos ao exercício por 3 semanas e destreinados por 7 ou 14 dias demonstraram que os benefícios cognitivos do exercício na plasticidade hipocampal e no aprendizado espacial perduraram após o exercício ter cessado. Isto pôde ser observado no teste do Labirinto de Moris e no conteúdo elevado de BDNF destes grupos em relação ao grupo sedentário (BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010).

Portanto, deveremos considerar também que as interrupções têm consequências distintas nos resultados dos experimentos e o tempo de destreino pode interferir em algumas variáveis, mas não em outras.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE RELACIONADO A GLUTATIONA

O estresse oxidativo é um fenômeno decorrente do desequilíbrio da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de sua eliminação através dos processos de defesa do organismo. As espécies reativas podem causar a peroxidação lipídica, modificação das proteínas e danos no RNA, e a finalidade dos processos de defesa é evitar que isto aconteça (DRINGEN, 2000).

O encéfalo é um dos órgãos que mais sofre com as ROS, já que tem uma alta atividade metabólica e, conseqüentemente, elevada produção destas substâncias tóxicas comparadas à sua massa e capacidade de ação dos seus sistemas antioxidantes. Além de tudo, este órgão é composto por ácidos graxos poli-insaturados, alvo principal da peroxidação lipídica, alto conteúdo de ferro e cobre, que em combinação com outras moléculas são geradores dos radicais hidroxil (tipo de ROS) e neurotransmissores que podem gerar número massivo de radicais livres,

como por exemplo, o glutamato que é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (REITER, 1995). A quebra da dopamina e da serotonina e a super ativação dos neurônios pelo cálcio também são geradores de ROS (BAINS e SHAW, 1997).

Dentro dos átomos ou moléculas, os elétrons ocupam regiões chamadas de órbitas que são capazes de conter dois elétrons, onde um percorre direção oposta ao outro (horário e anti horário). Quando uma dessas órbitas contém apenas um elétron, denominado não pareado, esta molécula ou átomo é chamado de radical livre. O O_2 é considerado um radical livre porque possui dois elétrons não pareados, cada qual em órbita diferente, mas percorrendo a mesma direção. Sendo assim, o O_2 só é capaz de aceitar outro par de elétrons de uma molécula que tenha também dois elétrons não pareados que sigam direção igual entre eles, mas oposta à sua. Porém, durante determinado momento esta conversão feita pela cadeia respiratória mitocondrial pode reduzir uma molécula de O_2 , produzindo inicialmente o ânion superóxido (O_2^-). Este radical pode ser novamente reduzido (ganho de mais um elétron) por um agente dos sistemas antioxidantes, produzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie não radical (REITER, 1995).

O óxido nítrico (NO^-) é uma espécie reativa de nitrogênio (RNS). Este radical livre gasoso é um importante mensageiro biológico, altamente difusível, que desempenha um importante papel na fisiologia do sistema nervoso central e produz o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é o mais reativo dos RNS. ROS e RNS são a causa do estresse oxidativo no sistema nervoso. Eles são produzidos em grandes quantidades em situações patológicas. A regulação redox envolvendo ROS é a chave para a modulação das funções celulares (principalmente para os astrócitos e microglia) tais como a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP), o transporte de íons, a mobilização de cálcio e a ativação da apoptose programada. Os neurônios são células pós-mitóticas e tem pequena capacidade de gerar divisão, o que explica o envelhecimento e algumas doenças neurodegenerativas (EMERIT, EDEAS e BRICAIRE, 2004).

As espécies reativas não orgânicas são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e os radicais hidroxil (OH^-), e as orgânicas são os radicais alcóxil e peróxil (DRINGEN, 2000). Apesar de sua reatividade ser baixa, em altas concentrações o H_2O_2 pode ser tóxico, já que ele cruza as membranas celulares e permanecem em locais onde podem sofrer reações de outros radicais, como por exemplo, o ferro ou o cobre, resultando na produção de HO^- (REITER, 1995).

Um dos mais importantes sistemas antioxidantes é o relacionado a glutathiona (GSH) e têm três componentes: a própria GSH, as enzimas relacionadas à GSH e o complexo proteico exportador glutathiona-S-conjugada dependente do ATP (bomba GS-X) (DRINGEN, 2000). Além da função antioxidante da GSH, ela ainda age na proliferação celular e na regulação da apoptose (REITER, 1995).

A GSH é um tripeptídeo linear de glutamina, cisteína e glicina presente na concentração de 1 a 3 mM nas células neurais (bem mais baixa do que em células do fígado e rins) e se apresenta em maiores concentrações nos astrócitos do que nos neurônios e nas células gliais (REITER, 1995; MYTILINEOU, KRAMER e YABUT, 2002). Sua síntese começa com a conjugação da cisteína e do glutamato por ação da gama-glutamilcisteína sintase (γ GCS), formando o dipeptídeo gama-glutamilcisteína (γ GluCys). Outra enzima, a glutathiona sintetase (GSS) catalisa a adição da glicina a γ GluCys para formar a GSH. A adenosina trifosfato (ATP) é um cosubstrato das duas enzimas. O equilíbrio da produção da GSH se dá pela inibição da primeira enzima citada (REITER, 1995; YANG *et al.*, 2006; DRINGEN, 2000).

Durante a geração da glutathiona-S-conjugada catalisada pela glutathiona-S-transferase ou pela liberação de glutathiona para as células, o nível total da glutathiona celular diminui. Então, a glutathiona usada por estes processos pode ser resintetizada por aminoácidos. A glutathiona extracelular e a glutathiona conjugada são substratos da ectoenzima γ glutamil traspeptidase (γ GT). Esta enzima catalisa a transferência da porção γ glutamil da glutathiona ou um conjugado da glutathiona para uma molécula aceptora, gerando deste modo o dipeptídeo γ GluCys ou o conjugado do γ GluCys, respectivamente. A γ GluCys pode ser hidrolisada pela ectopeptidase em cisteína ou glicina, aminoácidos que são subsequentemente usados pelas células que podem servir de substrato para a síntese de glutathiona (DRINGEN, 2000).

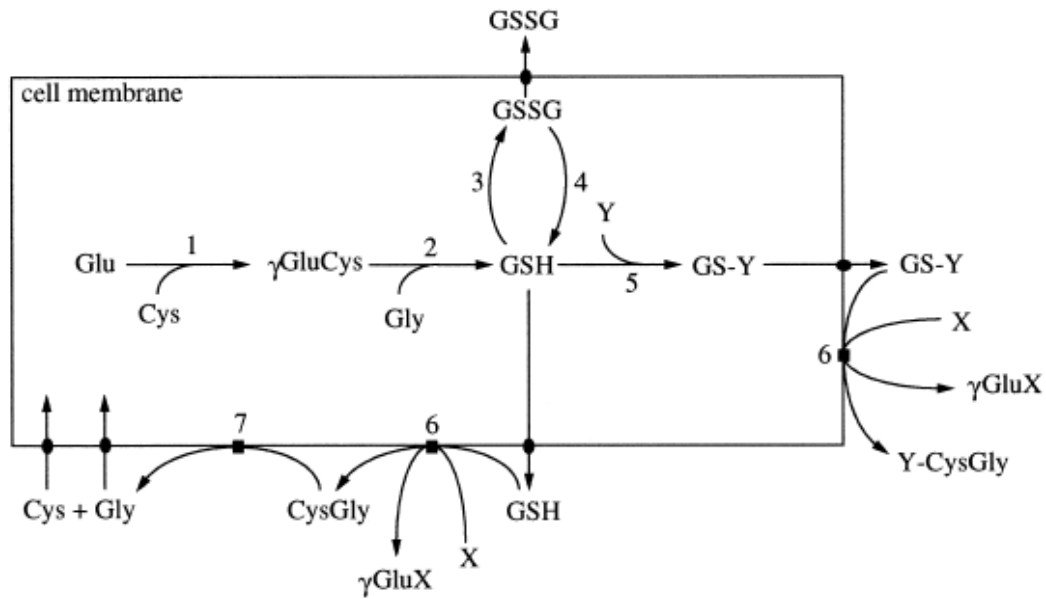


FIGURA 4: Metabolismo da Glutatona. X representa um aceptor de fração da γ -glutamil transferida pela γ GT da glutatona. Y é o substrato da glutatona-S-transferase. 1, γ -glutamilcisteína sintetase; 2, glutatona sintetase; 3, glutatona peroxidase; 4, glutatona redutase; 5, glutatona-S-transferase; 6, γ -glutamil transpeptidase; 7, ectopeptidase.(tradução nossa) (DRINGEN, 2000).

Dentro do metabolismo da glutatona acontecem duas formas de desintoxicação. A primeira é que a GSH reage não enzimaticamente com os ânions O_2^- , óxido nítrico e OH^- . Em outro processo, a glutatona peroxidase (GPx) pode catalisar a reação de doação de elétrons da GSH para reduzir os peróxidos (H_2O_2) (YANG *et al.*, 2006). A GSH é convertida em glutatona oxidada ou disulfide (GSSG) (REITER, 1995). O resultado desta conversão é a produção de água e oxigênio molecular. A GSH mantém ainda os grupos proteicos de tióis cisteínicos em estado reduzido, necessário para o funcionamento integral da célula (MYTILINEOU, KRAMER e YABUT, 2002). A GSH que foi convertida em glutatona oxidada (GSSG) pode ser reconvertida em GSH pela glutatona redutase (GR) (REITER, 1995). Esta enzima transfere elétrons do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma reduzida) (NADPH) para a GSSG, assim regenerando a GSH. Durante a reação catalisada pela GPx e pela GR não há consumo da GSH, mas sim reciclagem (DRINGEN, 2000). A figura abaixo mostra este processo:

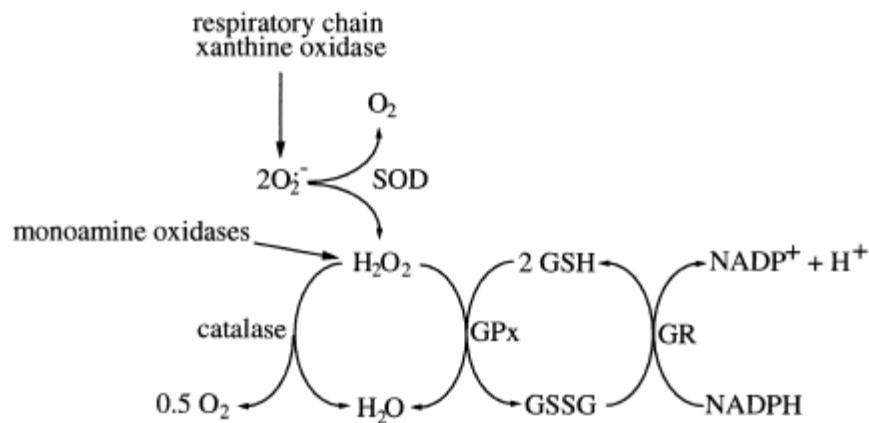


FIGURA 5: Sistema antioxidante relacionado à glutatona. O superóxido é gerado pela cadeia respiratória ou pela xantina oxidase e é convertida pela SOD em H_2O_2 . Monoamina oxidase gera peróxido de hidrogênio adicional que é catalisado pela catalase (CAT) ou pela GPx (tradução nossa). (DRINGEN, 2000).

Formas de glutatona conjugam ainda com xenobióticos e superóxidos tóxicos por conta da ação da glutatona-S-transferase (GSTs). Esta conjugação leva a produção de componentes mais aniônicos, que podem ser exportados com mais facilidade das células pelo complexo proteico exportador glutatona-S-conjugada (bomba GS-X) dependente do ATP. A GSTs e a γ GCS são enzimas críticas para o funcionamento do sistema (YANG *et al.*, 2006).

A razão entre GSH: GSSG é um índice sensível do estresse oxidativo. O GSSG é reduzido para regenerar o GSH numa reação catalisada pela GR e requer a presença da nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como o doador do hidrogênio. O acúmulo da GSSG ou razão muito baixa entre GSH:GSSG e baixos níveis de GSH representam um aumento no estresse oxidativo (BAINS e SHAW, 1997).

Os sistemas antioxidantes dependentes da glutatona têm baixa atividade no encéfalo. A atividade e quantidade da glutatona é dependente do local em que se encontra. No córtex há menos glutatona nos neurônios do que nos astrócitos. No estriado e no mesencéfalo, tem-se aproximadamente a mesma quantidade de GSH entre as duas células. Nos neurônios, tanto a GPx como a CAT são importantes e essenciais no processo de limpeza do peróxido de hidrogênio, entretanto os astrócitos são mais eficientes no processo de desintoxicação do que os neurônios (DRINGEN, 2000).

Apesar de todas as células possuírem uma rede de sistemas e enzimas antioxidantes, sua contribuição no processo de limpeza das ROS diferem nos diferentes tipos de células do encéfalo. Alteração na atividade das enzimas ou nas concentrações de antioxidantes de baixo peso molecular, bem como a disponibilidade dos precursores para a síntese de glutathione e de regeneração do NADPH podem contribuir para a susceptibilidade ou resistência contra as espécies reativas nos diferentes tipos de células do encéfalo, em condições fisiológicas ou patológicas. Há uma clara interação dos sistemas antioxidantes nos diferentes tipos de células do encéfalo (astrócitos, células gliais e neurônios) (DRINGEN, 2000).

O exercício físico, através da produção de ROS, traz adaptações metabólicas, regulando a expressão de fatores de transcrição que vão afetar as vias de sinalização, trazendo o incremento da atividade de enzimas como a SOD, CAT e GPx responsáveis pelo processo de limpeza oxidativa (MARCELINO *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Alguns estudos têm procurado verificar a influência da suplementação com AGPIs e da prática do exercício físico nos processos cognitivos e na memória e aprendizado no decorrer dos anos.

Sabe-se que o encéfalo jovem responde mais facilmente às modificações estruturais e moleculares e suas consequências. A busca por uma melhor qualidade de vida através da incorporação de hábitos saudáveis em uma fase precoce do desenvolvimento do sistema nervoso central, como a prática de atividade física e a inserção de alimentos essenciais na dieta como do AGPIs, pode ao longo da vida resultar em melhora física e mental. Entretanto, a manutenção destes hábitos exige disciplina e comprometimento, e este processo é muitas vezes interrompido. Por quanto tempo os consequentes efeitos destes processos podem ser mantidos? É possível usufruir dos benefícios após o exercício ser cessado ou a alimentação ser modificada?

Há questões pouco esclarecidas e resultados bastante controversos em relação ao exercício físico e à suplementação com AGPIs e seu papel fisiológico sobre aprendizagem e memória. Alguns pesquisadores afirmam que a saúde cognitiva pode ser beneficiada em pouco tempo com a utilização destas intervenções, entretanto a maioria dos estudos é eficaz em demonstrar benefícios do exercício e do óleo de peixe apenas após longo período de utilização.

Portanto, é de suma importância verificar as variáveis influenciadoras destas intervenções, tais como tipo, duração, exigência do exercício, quantidade e tempo de aplicação da suplementação. Além de tudo isso, faz-se necessário investigar os efeitos destas intervenções durante uma fase sensível do desenvolvimento do SNC, a infância e a adolescência, tendo em vista que este momento é fundamental para determinar os acontecimentos futuros relacionados à neuroplasticidade e ao aprendizado. Este trabalho dedicou-se a investigar a combinação do exercício físico e da suplementação com AGPIs sobre a memória de ratos em uma fase da vida crítica para o desenvolvimento das circuitarias cerebrais (final da infância e início da adolescência até a vida adulta), avaliada a partir de testes comportamentais e análises bioquímicas e a persistência destes efeitos após a interrupção das intervenções.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da associação da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 e do exercício físico, sobre os aspectos comportamentais e bioquímicos da memória e do aprendizado em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a aprendizagem espacial, comportamento motor e nível de ansiedade dos ratos em fases críticas do desenvolvimento do SNC nos testes Localização de Objetos e Campo Aberto;

Avaliar a incorporação lipídica nas membranas neuronais no hipocampo;

Examinar os potenciais efeitos do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe e de suas associações nos níveis de estresse oxidativo;

Quantificar os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo;

Verificar as diferenças dos potenciais efeitos do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe aplicados em curta e em longa janela temporal;

Verificar após 21 dias de interrupção do exercício físico e da suplementação se os efeitos encontrados persistem sobre a memória e aprendizado de ratos em fases críticas do desenvolvimento do SNC, utilizando-se das mesmas análises acima descritas em ambas as janelas temporais de aplicação.

4 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a administração de óleo de peixe e submissão de ratos ao exercício físico durante um período longo (50 dias) em fases críticas do desenvolvimento do SNC podem proporcionar melhoras nos processos mentais e no desempenho cognitivo, e seus efeitos podem persistir por um longo período após interrupção destas intervenções.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados para o experimento 192 ratos machos da linhagem Wistar, de 30 dias de idade, obtidos no Biotério Central do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor acima citado sob número 474 seguindo exigências estabelecidas em “*Guide for care and use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”.

Os animais foram mantidos em condições constantes de umidade e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes S/A) a vontade durante todo experimento. Esforços máximos foram tomados para reduzir eventuais desconfortos causados aos animais durante os experimentos, demonstrando preocupações que se adaptam às modernas práticas bioéticas de experimentação animal.

5.2 DESENHO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para este experimento, ratos Wistar machos de 30 dias de vida foram distribuídos em quatro (4) experimentos. Com a finalidade de contrapor os efeitos do exercício e da suplementação em curta e longa janela temporal e analisar se estes efeitos persistiam depois de cessadas as intervenções, classificamos os experimentos em 1 - EXPERIMENTO CURTO, 2 - EXPERIMENTO CURTO E INTERRUPTÃO, 3 - EXPERIMENTO LONGO e 3 - EXPERIMENTO LONGO E INTERRUPTÃO (FIGURA 5).

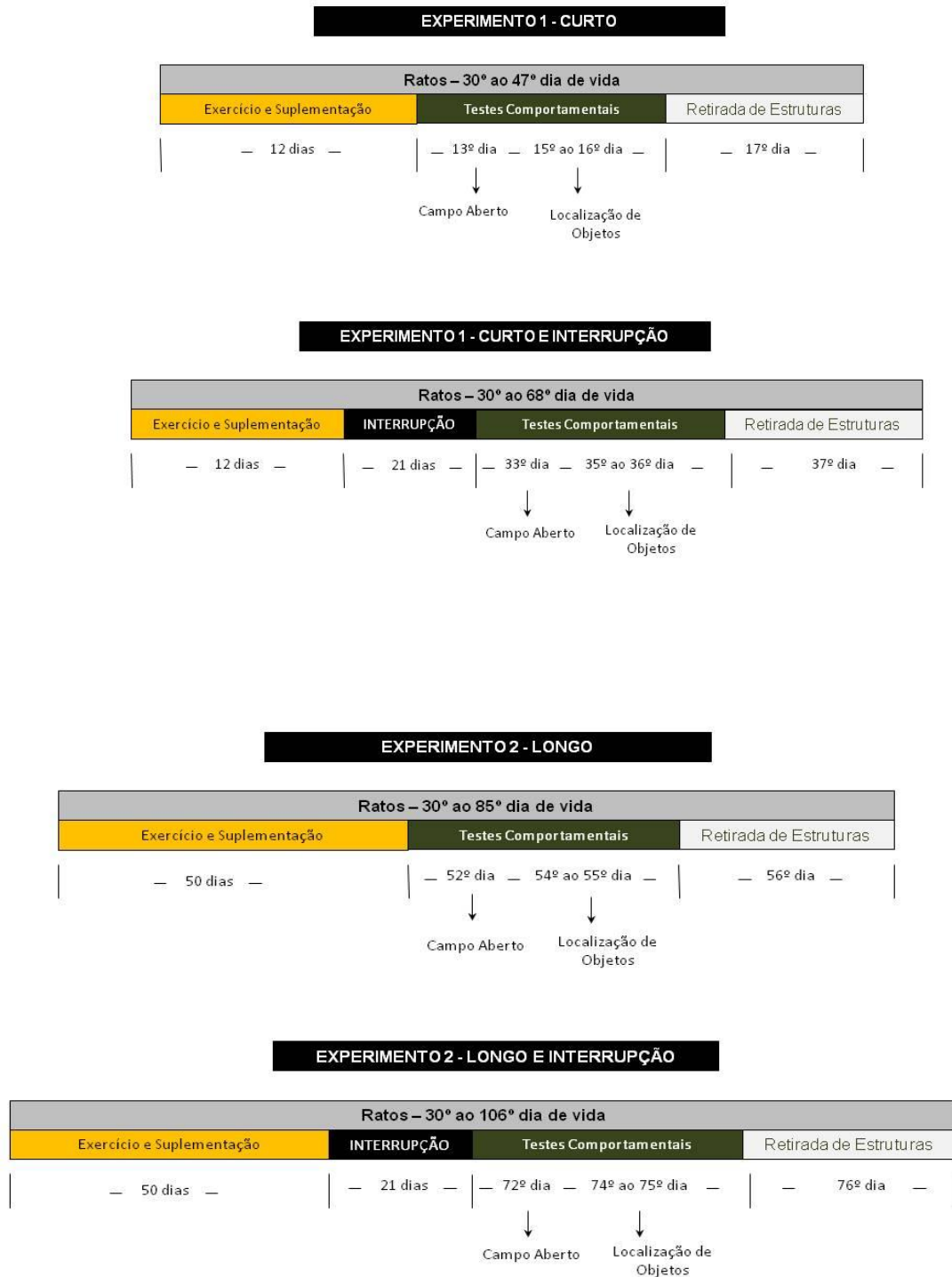


FIGURA 6: Representação esquemática dos experimentos.

- 1) EXPERIMENTO CURTO: 12 dias de exercício e suplementação
- 2) EXPERIMENTO CURTO E INTERRUPÇÃO: 12 dias de exercício e suplementação e interrupção das intervenções por 21 dias
- 3) EXPERIMENTO LONGO: 50 dias de exercício e suplementação
- 4) EXPERIMENTO LONGO E INTERRUPÇÃO: 50 dias de exercício e suplementação e interrupção das intervenções por 21 dias

Cada experimento foi composto de 48 ratos, segundo divisão que considerou a suplementação ou não com óleo de peixe e a execução ou não do exercício físico. O grupo de ratos não exercitados e não suplementados foi denominado como controle (C), o grupo de ratos exercitados e não suplementados como controle exercitado (CE), o grupo de ratos não exercitados e suplementados como óleo de peixe (OP) e o grupo de ratos exercitados e suplementados como óleo de peixe exercitado (OPE).

Após a execução de cada um dos experimentos, os ratos foram submetidos aos testes comportamentais (teste do Campo Aberto e teste de localização de objetos) e, ao final dos mesmos, foram ortotansados para remoção das estruturas cerebrais (hipocampo direito e esquerdo) a fim de analisar parâmetros moleculares como incorporação de ácidos graxos nas membranas, fator trófico de crescimento do cérebro (BDNF) e estresse oxidativo (Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Oxidada (GSH), Glutathione Reduzida (GSSG) e Razão GSH/GSSG).

5.3 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

Durante os experimentos, os ratos OP e OPE receberam alimentação regular (ração animal) e suplementação diária de 3,0 g/kg de óleo de peixe contendo 12% de EPA e 18% de DHA (doado gentilmente pelo Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Paraná, Brasil) administrado oralmente (via gavagem), enquanto os ratos C e CE receberam a alimentação regular e o mesmo volume de água como descrito acima, também via gavagem.

5.4 EXERCÍCIO FÍSICO

Os ratos OPE e CE foram submetidos ao exercício de natação. No experimento curto os animais foram exercitados em 10 sessões de treinamento, sendo 5 sessões intercaladas por 1 dia de descanso e mais 5 sessões subsequentes. Os ratos do experimento longo foram exercitados por 50 dias em uma frequência semanal de 4 sessões. A duração de cada exercício foi de 45 minutos e após o período de adaptação de 2 ou 3 treinamentos, foi adicionado aos ratos uma carga de 5% do peso corporal (GOMES *et al.*, 2006) através de um colete artesanal que continha pequenas bolas de chumbo. O colete foi anexado ao corpo dos ratos durante o exercício (FIGURA 6). A carga utilizada é ideal para trabalhar e desenvolver a capacidade aeróbica dos ratos (MACHADO *et al.*, 2006, GOBATTO *et al.*, 2001) além de ser segura para evitar lesões musculares ou restauração incompleta do nível dos substratos entre as sessões de treinamento (MACHADO *et al.*, 2012). Os ratos C e OP não foram submetidos ao exercício físico.



FIGURA 7: Natação. Rato se exercitando com carga de 5% do peso corporal.

5.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.5.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto é realizado em uma arena circular de 1 metro de diâmetro limitado por uma parede clara de 40 centímetros de altura e iluminado o suficiente com a finalidade de tornar o ambiente aversivo, com quatro lâmpadas de 60 W. O chão da arena é preto com nenhuma divisão aparente. Os ratos testados foram colocados individualmente no centro da arena, para exploração livre durante 5 minutos. Durante este período, o sistema informatizado Smart® Junior System (Panlab, Harvard Apparatus, Spain) mensurou o comportamento motor através da análise da distância e velocidade e do tempo gasto em cada uma das áreas do campo aberto (centro, meio e periferia). A arena foi limpa com 5% de solução de água/etanol antes de cada testado a fim de eliminar possíveis dicas olfatórias do rato testado anteriormente.

5.5.2 Teste de localização de objetos

Os ratos foram avaliados quanto ao seu desempenho em relação à memória de localização de objetos. Estas avaliações foram realizadas utilizando-se uma caixa retangular plástica (30 x 50 cm) e 20cm de altura. Todos os objetos utilizados no teste eram em cópias duplas idênticas e fabricados em material biologicamente neutro (acrílico ou vidro) e pesados o suficiente para que o animal não conseguisse removê-lo do lugar.

Todos os animais foram submetidos a um treino 24 horas antes da avaliação propriamente dita. Nesse treino cada animal foi colocado no centro da caixa, que continha dois objetos idênticos colocados em um dos lados da caixa (FIGURA 5).

Durante 5 minutos o animal pode explorá-los livremente; ao término deste tempo, o animal foi gentilmente retirado e colocado em sua gaiola de manutenção.

Passado um intervalo de 15 minutos o animal foi recolocado na caixa com os mesmos dois objetos por mais 5 minutos. Esse processo repetiu-se por 3 vezes consecutivas. Entre cada exposição a caixa e cada objeto foram limpos com solução de etanol 10%.

Vinte e quatro horas após o treino descrito acima, cada animal passou por mais uma sessão de treino, ou seja, foi colocado novamente no centro da caixa plástica e durante 3 minutos, sob condições idênticas às do dia anterior, explorou os objetos. Para a realização do teste que avaliou a memória de localização, 15 minutos após o treino, o animal foi recolocado na caixa plástica. Entretanto, um dos objetos foi colocado em posição oposta à situação anterior (FIGURA 7). Durante 3 minutos foram quantificados o tempo de exploração dos ratos no objeto na velha posição e no objeto reposicionado.

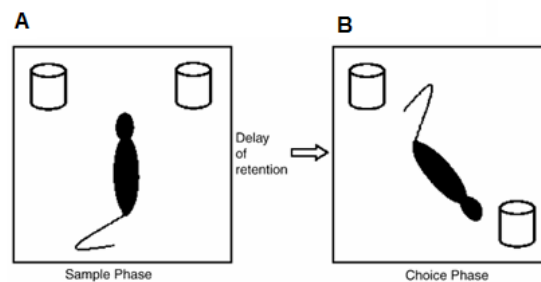


FIGURA 8: Teste de memória de localização (A e B) (ENNACEUR et al., 2005)

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXERCÍCIO E METABOLISMO REQUERIDO

Para caracterização da intensidade do exercício, os níveis de lactato sanguíneo foram avaliados de forma indireta. No último dia de treinamento de natação, foi realizada a mensuração do lactato com o objetivo de verificar a exigência metabólica do exercício.

A coleta do sangue foi feita da porção distal da cauda do rato após assepsia com álcool e punção do local, em quantidade de 25µl de sangue. O sangue foi colocado na tira de lactato e a medida foi feita utilizando-se o lactímetro de marca

Accutrend® lactate (Roche, Mannheim, Alemanha, peso 120g, dimensões 11,5 x 6,2 cm). Esta mensuração foi feita quatro vezes durante o treinamento, com intervalos de 15 minutos entre as coletas (basal, 30 e 45 minutos de exercício).

5.7 ORTOTANÁSIA

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (60mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda) e Ketamina (4mg/Kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda) e foram decapitados para dissecação do hipocampo direito e esquerdo. Estas estruturas foram mantidas em freezer -70°C até os ensaios histoquímicos.

5.8 PERFIL LIPÍDICO

Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol-água e a transesterificação dos lipídios totais foi realizada. Vinte e cinco mg de óleo ($\pm 0,1$ mg) foram pesados e adicionados a 1,5 ml de 0,50 mol de NaOH/L de metanol. A mistura foi aquecida num banho de 100°C durante 5 minutos e em seguida arrefecida até temperatura ambiente. Em seguida, 2ml de uma solução de trifluoreto de boro (BF₃) em 12% de metanol foram adicionados e aquecido novamente em banho a 100°C durante 30 minutos. As amostras foram arrefecidas em água corrente a temperatura ambiente e 1ml de isooctano foi adicionado. As amostras esterificadas foram mantidas em repouso para separação das fases. O sobrenadante foi recolhido e a amostra foi concentrada para um volume final de 1,0ml para subsequente injeção no cromatógrafo a gás. Os ésteres de ácidos graxos poli-insaturados foram separados em fases gasosas pelo cromatógrafo (Ultra Rastreio 3300) equipado com detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (FAME Select 100m de comprimento, a 0,25mm de diâmetro e 0,25mm de cianopropilo) com um fluxo de H₂ (gás transporte) de

1,2ml/min, 30ml/min de N₂ (perfazer). O volume injetado foi de aproximadamente 2,0 uL, utilizando 1:80 divisão da amostra, com as temperaturas do injetor e do detector de 220 a 230°C respectivamente, enquanto que a coluna 165°C que aumentou para 235°C em uma taxa de 4°C/min e mantido por 14,5 min. Os percentuais foram determinados pela integração de áreas de pico pelo Software Chronquest versão 5.0. Os valores foram obtidos utilizando o critério da comparação do tempo de retenção dos ésteres metílicos de padrões da Sigma (EUA), com a amostra e através da co-diluição padrão de composição conhecida.

5.9 BDNF HIPOCAMPAL

Para realizar o ensaio do BDNF hipocampal, animais de cada grupo experimental foram mortos por decapitação e tiveram o hipocampo rapidamente dissecado, e colocados em gelo seco seguido de armazenamento em freezer a -80 ° C. Antes da análise, 500 microlitros de tampão de lise gelada (deoxicolato de sódio a 0,2% , 0,5% Triton X - 100, 1% de NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 1 mM de N-etil-maleimida (NEM) e 2,5 mM de fenantrolina) foram adicionados às amostras de tecido de hipocampo, seguidos de impulsos de sonicação de curta duração por 15s. Após 40 min em gelo, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 10.000g a 4 ° C. Os sobrenadantes foram removidos em seguida e a concentração de proteína foi medida usando o método de Bradford (Bio Rad). As amostras foram trazidas a iguais concentrações de proteína (200 ug) para diluição em H₂O e congeladas a -70 ° C até à análise. A concentração de BDNF foi medida utilizando o Sistema Promega BDNF Emax Imuno (Promega Co., Madison, WY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços de polietileno foram revestidos com anticorpo monoclonal anti-BDNF (mAb) em tampão de carbonato com pH 9,2 durante a noite a 4°C. Os anticorpos não absorvidos foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e as placas foram bloqueadas com Promega Block e tampão das amostras por 1h na sala climatizada. Em seguida, 100 microlitros de cada amostra foram adicionados em triplicado e as placas foram incubadas durante 2 h. Após uma

extensa lavagem com PBST, o anticorpo policlonal anti-humano BDNF (pAb) foi adicionado e incubado durante mais 2h. Finalmente, os pAb não ligados foram removidos por lavagem com PBST e o conjugado de peróxido anti-IgY tipo cavalo foi adicionado durante 1 h. A reação foi desenvolvida usando TMB One Solution e foi parado com HCl 1M. A absorvância foi medida a 450nm.

5.10 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi verificado através da análise da atividade da glutathiona peroxidase (GPx), do conteúdo da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG) e da razão GSH:GSSG.

5.10.1 Ensaio da glutathiona peroxidase (GPx)

Para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase, cada amostra de tecido foi inicialmente homogeneizada utilizando-se um tampão de extração com a seguinte composição: Tris-Base, 50mM (pH 7.4), EDTA, 1mM, ortovanadato de sódio, 1mM, PMSF, 2mM, coquetel inibidor de protease (300 µl em 30 ml de tampão), Nonidet, 1%. As amostras foram homogeneizadas usando 1 ml de tampão de extração por amostra. A homogeneização foi feita utilizando-se um mini-homogeneizador TE-103 da Tecnal por 30 segundos, sempre mantendo a solução com bastante gelo abaixo e em volta do tubo contendo a amostra. Neste caso, o pequeno tubo foi colocado com amostra e tampão dentro de um Becker com gelo. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm a 4 graus por 10 minutos. Neste momento os ependorfs foram trocados para colocar o sobrenadante de cada amostra. Após centrifugação, foi retirado 2 µl do sobrenadante de cada amostra para dosar proteína pelo método de Bradford: 2 µl do sobrenadante, 1018 µl de água, 250 µl do reagente de Bradford. Na curva de BSA foram usados 5 pontos: 2.5, 5.0, 10.0, 15.0,

20 µg /ml. Após 10 minutos no escuro à temperatura ambiente, foi feita a leitura da curva. No caso das amostras, foram acrescentados 250 µl do reagente de Bradford aos 2 µl de cada amostra. Misturou-se bem no vórtex, com espera de 10 min no escuro à temperatura ambiente, para então realizar a leitura. Foram utilizados os reagentes: tampão fosfato pH 7, fosfato de sódio monobásico 0.05 M, EDTA 0.005 M, NADPH 0.0084 M, glutathiona redutase, azida sódica (NaN₃) 1.125 M, GSH 0.15 M, H₂O₂ 0.0022 M. Ensaio: foi preparado uma mistura contendo 8.5 µl de NADPH, 1.0 µl de glutathiona redutase e 1.0 µl de Na N₃. Meio prévio à reação: X µl tampão, X µl amostra (amostra + tampão= 222,5 µl para 250 µl final), 10,5 µl mix para 250 µl final. A leitura foi feita por 1 minuto no espectrofotômetro usando 340 nm de comprimento de onda, o que corresponde à etapa prévia à reação. Após esta leitura, foram adicionados os substratos a cada amostra: 8,5 µl de GSH para 250 µl final e 8,5 µl de H₂O₂ para 250 µl final. Após a adição dos dois acima, foram retiradas todas as bolhas de cada amostra com uma agulha de seringa de insulina para evitar alteração na leitura. A leitura foi feita a 340 nm por 4 minutos a cada 30 segundos. Para cada amostra prepara-se um branco. Os resultados foram expressos em um gráfico onde na fase pré-reação as 4 leituras foram similares e formaram um platô. Após adição do substrato para reação, os valores de absorbância foram sendo reduzidos em função do tempo. As primeiras 4 medidas foram realizadas na ausência do substrato. Depois, foi retirado do espectrofluorímetro e colocado o substrato para a enzima. A cada 12 amostras foi utilizado cerca de 4 min e 50 segundos em média. Assim, as 6 últimas medidas mostraram uma reta decrescente, refletindo as absorbâncias obtidas em cada leitura como função do tempo. Os cálculos finais foram feitos considerando todas as medidas obtidas, subtraindo o valor da última pelo da penúltima e desta pelo da antepenúltima e assim sucessivamente.

5.10.2 Ensaio da glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida e oxidada (GSH e da GSSG) foram obtidas a partir de Boehringer - Mannheim (Nova Iorque , N.Y.); N-etilmaleimida (NEM) e o-ftalaldeído foi obtido a partir de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). O espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer (Modelo MPF- 3) foi utilizado para as determinações da intensidade de fluorescência. A GSH e a GSSG foram preparados em 0,1 M de fosfato de sódio - 0,005 M de EDTA (pH 8,0) e mantido em gelo até ser utilizado. A solução o-ftalaldeído (OPT) foi preparada em reagente de grau absoluto metanol, imediatamente antes de usar.

A determinação da GSH foi realizada. Para 0,5 ml de 100 g de sobrenadante, 4.5 ml de tampão fosfato - EDTA, pH 8.0, foi adicionado. A mistura final (2,0 mL) continha 100 µl de tecido sobrenadante diluído, 1.8 ml de tampão fosfato - EDTA, e 100 µl de solução OPT, contendo 100 µg de OPT. Após mistura e incubação completa a temperatura ambiente durante 15 min, a solução foi transferida para uma cuveta de quartzo. Fluorescência a 420 nm foi determinada com a ativação a 350 nm.

5.10.3 Ensaio da glutathiona oxidada (GSSG)

Porção de 0,5 ml do supernadante original de 100 g foi incubada a temperatura ambiente com 200 µl de 0,04 M de NEM durante 30 min a interagir com a GSH presente no tecido. A esta mistura, 4.3 ml de 0,1 N de NaOH foi adicionado. Uma porção de 100 µl desta mistura foi feita para medição da GSSG, usando o procedimento descrito acima para o ensaio de GSH, exceto que NaOH 0,1 N foi adicionado como diluente, em vez do tampão de fosfato EDTA.

6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando a suplementação com óleo de peixe e o protocolo de exercício como variáveis independentes. Diferenças entre os grupos foram posteriormente, quando indicado, analisadas pelo pós-teste de Duncan. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 EXPERIMENTO CURTO

7.1.1 Teste de localização de objetos

Os grupos foram testados através do teste de localização de objetos para verificar a aprendizagem espacial a partir de três parâmetros: tempo de exploração, frequência de exploração e índice de discriminação dos objetos.

No experimento curto, os resultados mostram que não houve influência do exercício [$F(1,86)=0.01$; $p=0.91$], da suplementação [$F(1,86)=0.16$; $p=0.68$], assim como da interação entre exercício e suplementação [$F(1,86)=1.60$; $p=0.20$] no tempo de exploração dos objetos (FIGURA 8).

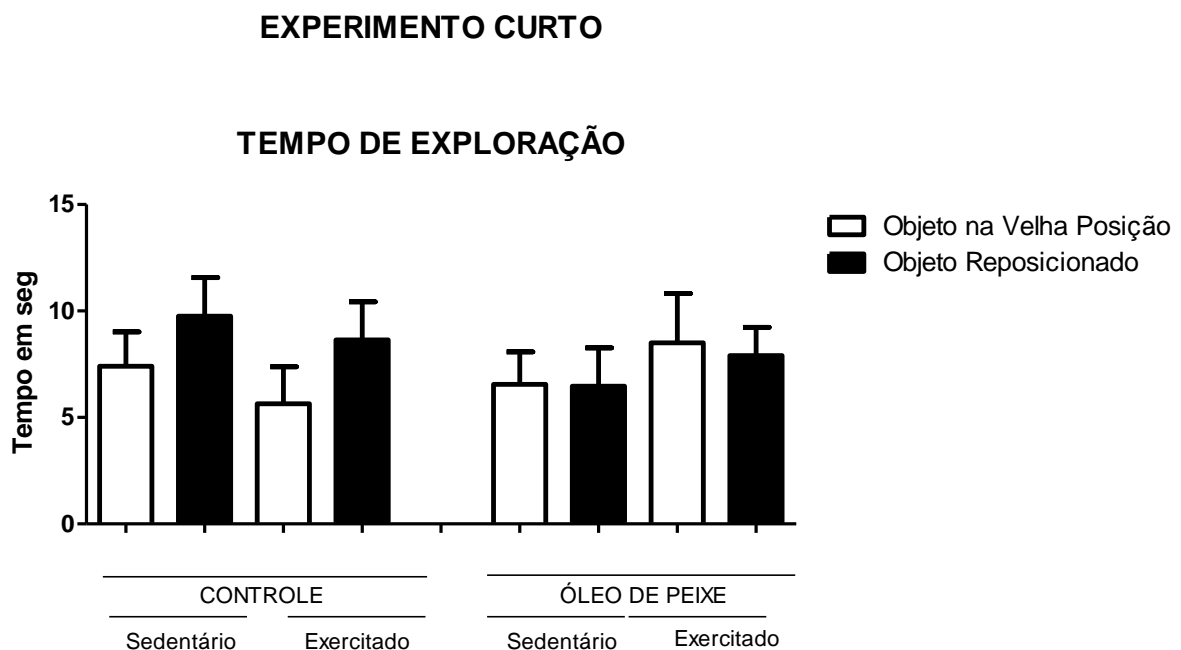


FIGURA 9: Teste de localização de objetos. Experimento curto - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 12 animais em cada grupo. Comparação entre o tempo de exploração do objeto reposicionado versus do objeto na velha posição. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no tempo de exploração dos objetos ($*p \leq 0.05$).

Após a interrupção das intervenções por 21 dias, os resultados dos ratos do grupo submetido a este experimento também mostraram que não houve influência do exercício [$F(1,40)=3.81$; $p=0.05$], da suplementação [$F(1,40)=3.06$; $p=0.08$], assim como da interação entre exercício e suplementação [$F(1,40)=0.41$; $p=0.52$] no tempo de exploração dos objetos (FIGURA 9).

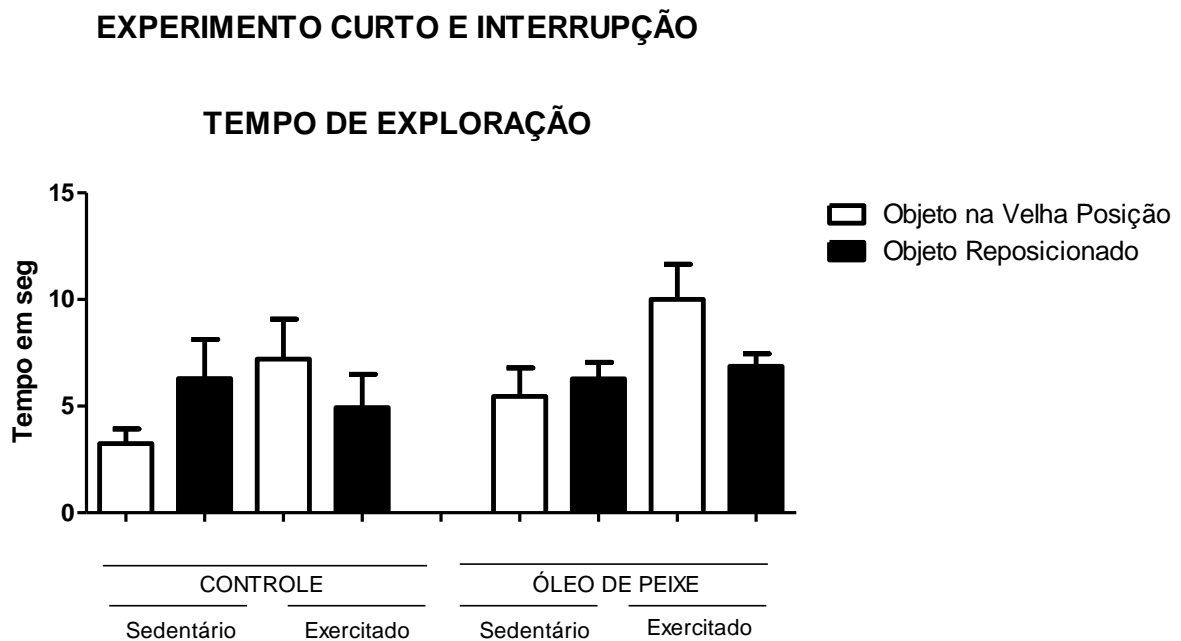


FIGURA 10: Teste de localização de objetos. Experimento curto e interrupção - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 12 animais em cada grupo. Comparação entre o tempo de exploração do objeto reposicionado versus do objeto na velha posição. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no tempo de exploração dos objetos ($*p \leq 0.05$).

7.1.2 Campo Aberto

A fim de verificar a atividade locomotora do animal e nível de ansiedade, os ratos foram testados no Campo Aberto.

A FIGURA 10 mostra que no experimento curto não houve influência do exercício na distância total ($F(1,43)=0.11$; $p=0.73$), no tempo gasto na periferia ($F(1,43)=0.60$; $p=0.43$), na distância percorrida na periferia ($F(1,43)=0.09$; $p=0.76$),

no tempo gasto no centro ($F(1,43)=0.20$; $p=0.65$) e na distância percorrida no centro ($F(1,43)=0.14$; $p=0.70$).

Neste mesmo experimento não houve influência da suplementação na distância total percorrida ($F(1,43)=0.02$; $p=0.87$), no tempo gasto na periferia ($F(1,43)=0.70$; $p=0.39$), na distância percorrida na periferia ($F(1,43)=0.04$; $p=0.83$), assim como no tempo gasto no centro ($F(1,43)=2.48$; $p=0.12$) e na distância percorrida no centro ($F(1,43)=2.22$; $p=0.14$). Também não foi observada influência da interação entre exercício e suplementação em nenhum dos parâmetros analisados.

Da mesma forma, após a interrupção das intervenções por 21 dias (FIGURA 11), verificou-se que não houve influência do exercício na distância total percorrida ($F(1,42)=3.74$; $p=0.06$), no tempo gasto na periferia ($F(1,42)=0.00$; $p=0.50$), na distância percorrida na periferia ($F(1,42)=3.90$; $p=0.06$), bem como no tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.54$; $p=0.46$) e na distância percorrida no centro ($F(1,42)=1.25$; $p=0.26$). Também não foi verificada influência da suplementação em nenhum dos parâmetros analisados, tal como segue: distância total ($F(1,42)=0.20$; $p=0.65$), tempo gasto na periferia ($F(1,42)=0.00$; $p=0.86$), distância percorrida na periferia ($F(1,42)=0.18$; $p=0.66$), tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.00$; $p=0.96$) e distância percorrida no centro ($F(1,42)=0.72$; $p=0.39$). Não foi verificada influência da interação entre exercício e suplementação em nenhum dos parâmetros analisados.

EXPERIMENTO CURTO

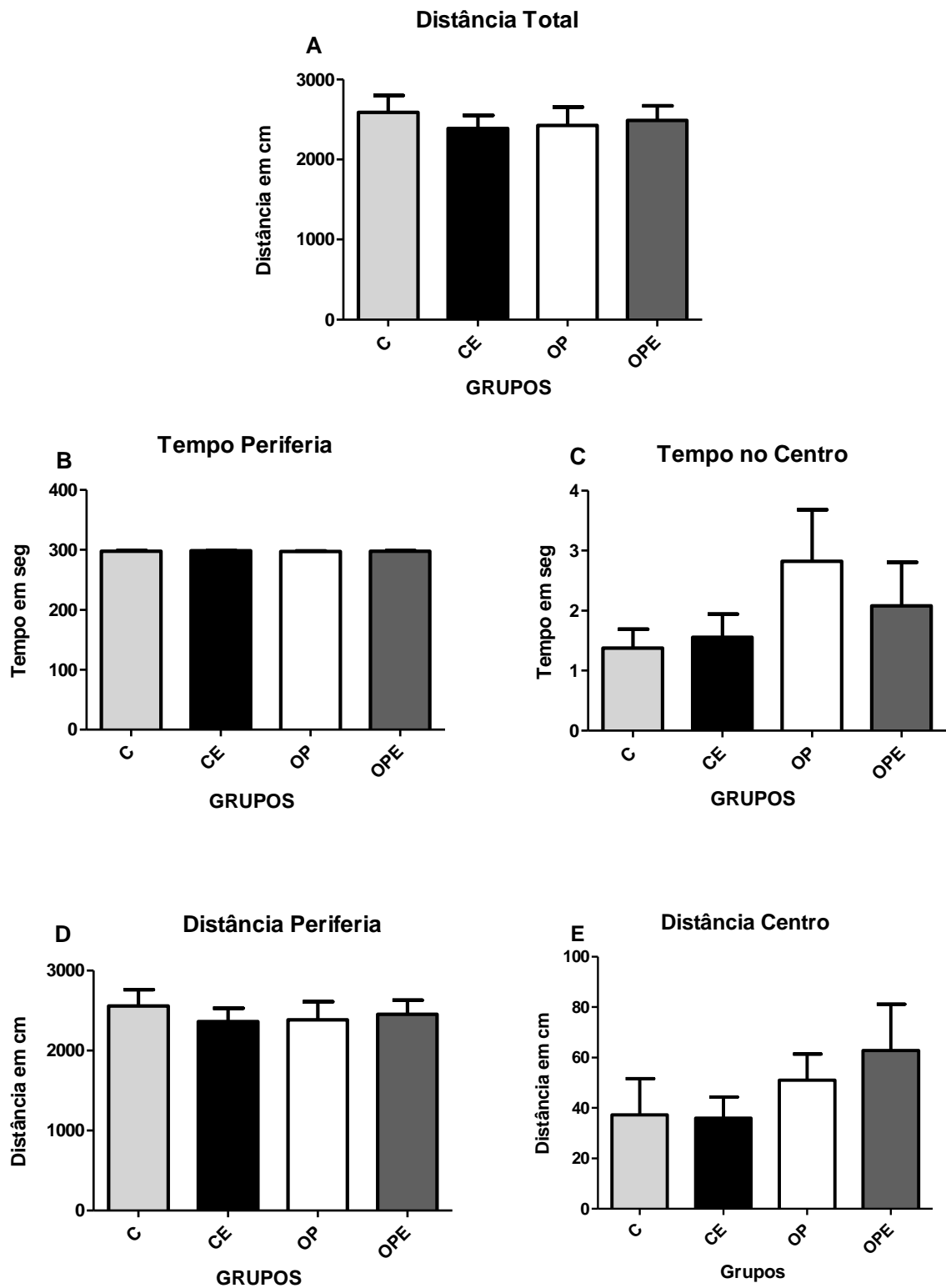


FIGURA 11: Campo aberto - Experimento curto. ANOVA de duas vias. Valores expressos como média \pm EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

EXPERIMENTO CURTO E INTERRUPÇÃO

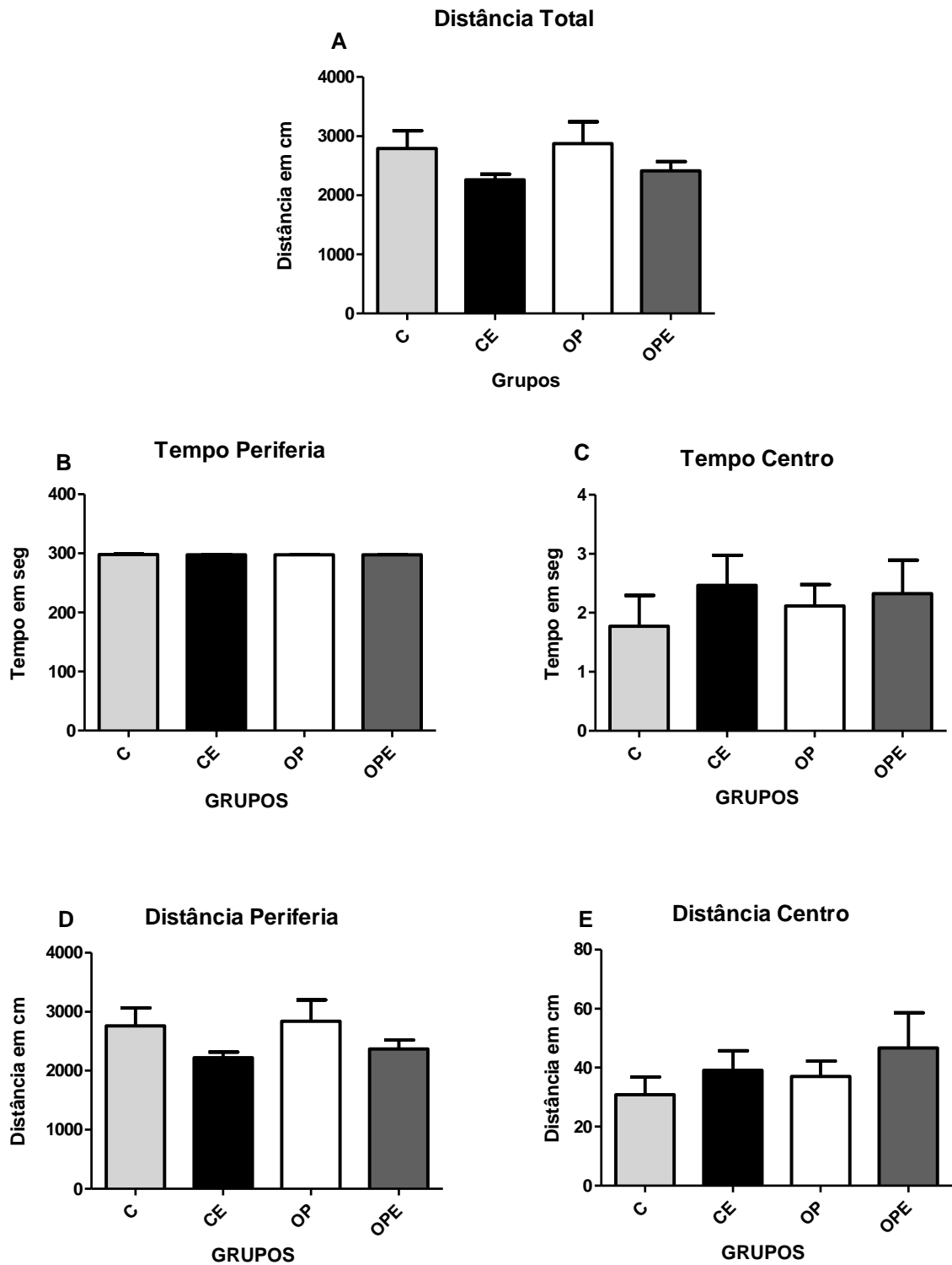


FIGURA 12: Campo aberto - Experimento curto e interrupção. ANOVA de duas vias. Valores expressos como média \pm EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

7.1.3 Perfil Lipídico

Para a determinação do perfil lipídico foram utilizadas as membranas hipocâmpais. No experimento curto não houve influência da suplementação com óleo de peixe [$F(1,14)=0.34$; $p=0.56$], do exercício [$F(1,14)=0.34$; $p=0.56$], assim como da interação entre ambos os fatores [$F(1,14)=0.25$; $p=0.62$] nos níveis de DHA sobre o perfil lipídico das membranas hipocâmpais.

TABELA 1 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas neuronais hipocâmpais de ratos do experimento curto

Ácidos Graxos	HIPOCAMPO			
	C n=5	OP n=5	OPE n=5	CE n=5
Myristic (14:0)	0.22 ± 0.02	0.32 ± 0.07	0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.03
Palmitic (16:0)	21.23 ± 0.39	21.05 ± 0.21	21.22 ± 0.28	20.71 ± 0.12
7-hexadecenoic (16:1n-9)	0.38 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.44 ± 0.04
Margaric (17:0)	2.75 ± 0.06	2.78 ± 0.09	2.81 ± 0.09	3.25 ± 0.37
Estearic (18:0)	21.31 ± 0.77	19.66 ± 0.53	21.52 ± 0.16	21.22 ± 1.30
Oleic (18:1n-9)	14.82 ± 0.45	15.28 ± 0.30	15.88 ± 0.58	14.35 ± 0.42
Vacenic (18:1n-7)	3.37 ± 0.20	3.46 ± 0.11	3.40 ± 0.13	3.60 ± 0.07
Linoleic (18:2n-6)	0.72 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.88 ± 0.08	0.82 ± 0.06
Eicosanoic (20:0)	0.50 ± 0.20	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.03
Aracdonic (20:4n-6)	14.27 ± 0.34	15.07 ± 0.37	13.29 ± 0.37	13.04 ± 0.79
EPA (20:5n-3)	0.33 ± 0.23	0.15 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.06
DHA (22:6n-3)	14.18 ± 0.64	14.92 ± 0.36	15.22 ± 0.33	15.28 ± 0.99

Valores expressos como média ± EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Podemos observar que a interrupção das intervenções por 21 dias (TABELA 2) não afetou o perfil lipídico hipocâmpal dos ratos suplementados com óleo de peixe [$F(1,14)=1.34$; $p=0.26$] ou exercitados [$F(1,14)=0.57$; $p=0.46$]. Também não foi observado efeito da interação entre suplementação e exercício [$F(1,14)=1.44$; $p=0.24$] nos níveis de DHA.

Neste mesmo experimento, os resultados obtidos para o EPA foram semelhantes aqueles encontrados para o DHA, ou seja, não houve influência do óleo de peixe [$F(1,14)=0.01$; $p=0.98$], do exercício [$F(1,14)=0.54$; $p=0.47$], assim como da interação entre ambos os fatores [$F(1,14)=0.77$; $p=0.39$] na concentração desse ácido graxo, tal qual observado na interrupção, não havendo influência da

suplementação com óleo de peixe [$F(1,14)=2.78$; $p=0.11$], do exercício [$F(1,14)=0.70$; $p=0.41$] e da interação entre ambos os fatores [$F(1,14)=1.74$; $p=0.20$].

TABELA 2 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas neuronais hipocâmpais de ratos do experimento curto e interrupção

Ácidos Graxos	HIPOCAMPPO			
	C n=5	OP n=5	OPE n=5	CE n=5
Myristic (14:0)	0.16 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.05
Palmitic (16:0)	21.00 ± 0.61	20.77 ± 0.22	20.61 ± 0.28	20.12 ± 0.03
7-hexadecenoic (16:1n-9)	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.01	0.48 ± 0.06	0.51 ± 0.08
Margaric (17:0)	3.29 ± 0.49	2.77 ± 0.10	2.91 ± 0.12	2.72 ± 0.06
Estearic (18:0)	21.66 ± 1.04	20.65 ± 0.72	20.37 ± 0.75	20.55 ± 0.52
Oleic (18:1n-9)	16.53 ± 0.74	15.09 ± 0.13	16.81 ± 0.35	17.71 ± 0.47
Vacenic (18:1n-7)	3.68 ± 0.18	3.64 ± 0.06	3.65 ± 0.11	4.24 ± 0.51
Linoleic (18:2n-6)	0.60 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.92 ± 0.32	1.52 ± 0.53
Eicosanoic (20:0)	0.25 ± 0.08	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.34 ± 0.04
Aracdonic (20:4n-6)	13.14 ± 0.81	14.32 ± 0.25	13.83 ± 0.32	12.96 ± 0.81
EPA (20:5n-3)	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.07	0.31 ± 0.06
DHA (22:6n-3)	13.46 ± 0.96	14.58 ± 0.45	14.81 ± 0.34	14.55 ± 0.45

Valores expressos como média ± EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

7.1.4 Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF)

Analizamos os níveis de BDNF nos ratos dos experimentos de curta duração. Segundo a ANOVA de 2 vias, os ratos do experimento curto não tiveram influência da suplementação [$F(1,16)=1.13$; $p=0.30$], do exercício [$F(1,16)=0.27$; $p=0.61$] e da interação entre os fatores suplementação e exercício [$F(1,16) = 0.23$; $p=0.63$] nos níveis de BDNF hipocâmpal. Após a interrupção das intervenções (FIGURA 12B), os ratos deste experimento também não apresentaram influência da suplementação [$F(1,16)=1.13$; $p=0.71$], do exercício [$F(1,16)=1.52$; $p=0.23$] e da interação entre os fatores suplementação e exercício [$F(1,16) = 0.13$; $p=0.71$] nos níveis de BDNF.

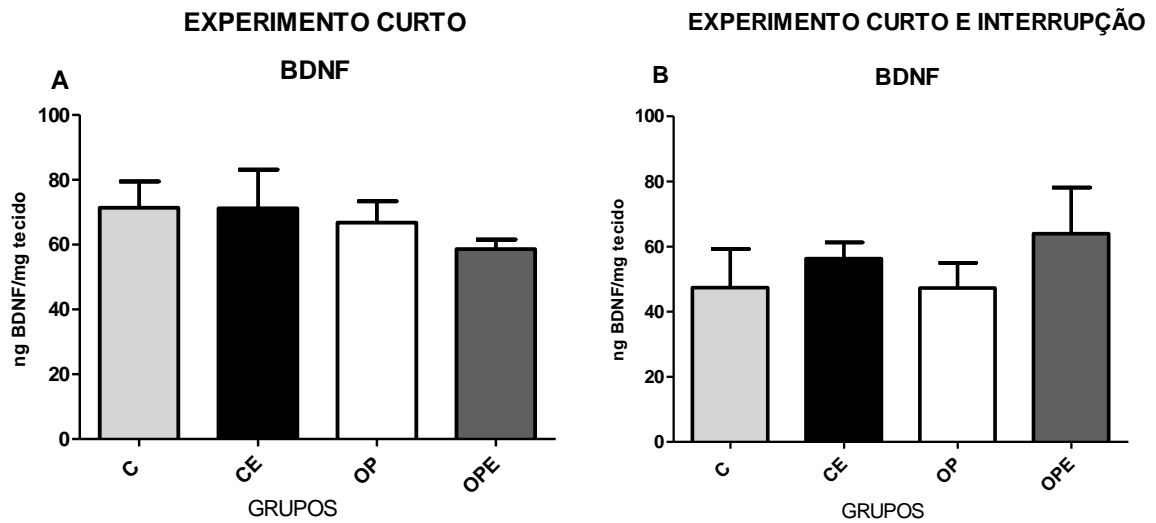


FIGURA 13: BDNF - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 5 animais em cada grupo. Experimento curto - (A) Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos. Experimento curto e interrupção - (B) Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

7.2 EXPERIMENTO LONGO

7.2.1 Localização de objetos

No teste de localização de objetos conforme mostra a FIGURA 13, verificamos que houve influência do exercício [$F(1,82)=5.72$; $p\leq 0.05$], mas não houve influência da suplementação [$F(1,82)=0.12$; $p=0.72$], assim como da interação entre exercício e suplementação [$F(1,82)=0.16$; $p=0.68$] no tempo de exploração dos objetos. Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que os grupos C ($p\leq 0.05$) e OP ($p\leq 0.001$) gastaram mais tempo explorando o objeto reposicionado em comparação com a antiga. Entretanto, os grupos exercitados OPE ($p=0.96$) e CE ($p=0.40$) não demonstraram aprendizado, já que não houve diferença significativa na exploração entre o objeto na posição antiga em relação à nova. Nesta mesma figura, podemos verificar que os grupos OPE e CE gastaram menos tempo explorando o objeto na nova localização em relação aos grupos C e OP ($p\leq 0.05$).

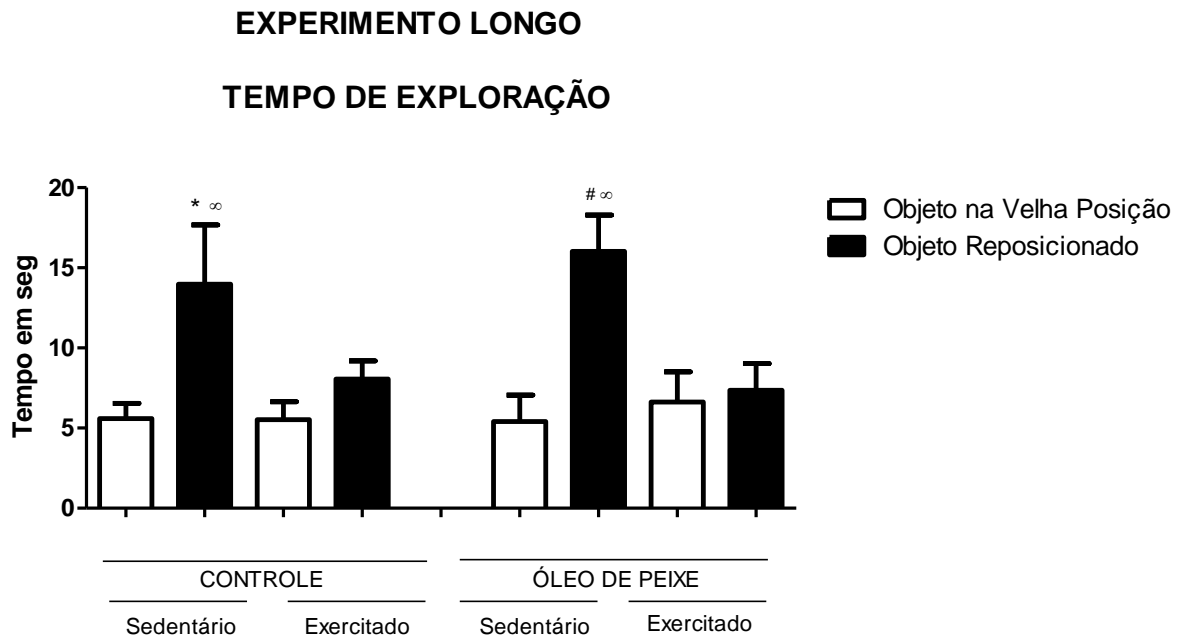


FIGURA 14: Teste de localização de objetos. Experimento longo - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 12 animais em cada grupo. Comparação entre o tempo de exploração do objeto reposicionado versus do objeto na velha posição para o grupo C (* $p \leq 0.05$) e grupo OP (# $p \leq 0.001$). Comparação do tempo de exploração do objeto reposicionado entre os grupos C e OP ($\infty p \leq 0.05$) em relação aos grupos CE e OPE.

Após a interrupção das intervenções por 21 dias, conforme mostra a FIGURA 14, o resultado mostra que houve influência do exercício [$F(1,82)=3.67$; $p \leq 0.05$], mas não da suplementação [$F(1,82)=1.13$; $p=0.28$] e da interação entre exercício e suplementação [$F(1,82)=1.57$; $p=0.21$] no tempo de exploração. Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que os grupos C, OP e OPE ($p \leq 0.05$) gastaram mais tempo explorando o objeto reposicionado em comparação com a antiga. O grupo CE ($p=0.70$) não demonstrou aprendizado espacial, já que não houve diferença significativa na exploração entre o objeto na posição antiga em relação à nova. Por fim, o grupo CE apresentou menor tempo de exploração no objeto na nova localização em relação aos grupos C, OP e OPE ($p \leq 0.05$).

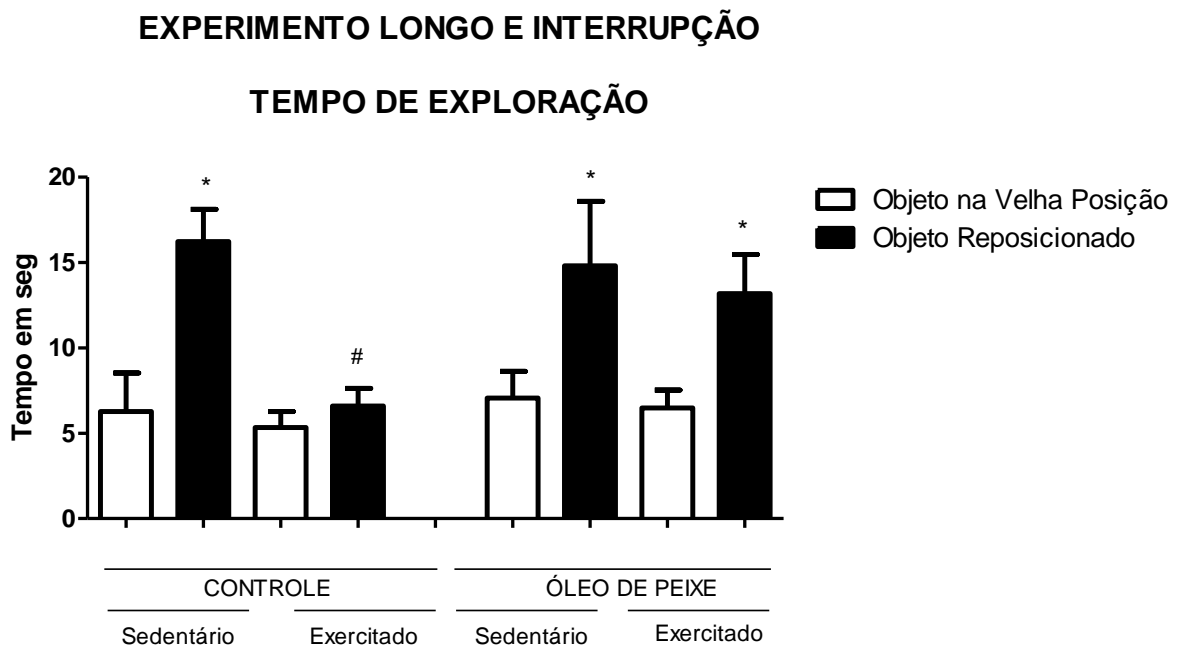


FIGURA 15: Teste de localização de objetos. Experimento longo e interrupção - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 12 animais em cada grupo. Comparação entre o tempo de exploração do objeto reposicionado versus do objeto na velha posição para o grupo C, OP e OPE ($*p \leq 0.05$). Comparação do tempo de exploração do objeto reposicionado entre os grupos CE ($\#p \leq 0.05$) em relação aos grupos C, OP e OPE.

7.2.2 Campo Aberto

A fim de verificar a motricidade e nível de ansiedade dos animais dos experimentos de duração longo, os ratos foram testados no teste de campo aberto. A FIGURA 15 mostra que no experimento longo houve influência do exercício na distância total percorrida ($F(1,42)=5.76$; $p \leq 0.05$), na distância percorrida no centro ($F(1,42)=5.19$; $p \leq 0.05$) e na distância percorrida na periferia ($F(1,42)=5.49$; $p \leq 0.05$). Não houve influência do exercício no tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.61$; $p=0.43$) e no tempo gasto na periferia ($F(1,42)=0.06$; $p=0.43$). Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que o grupo CE percorreu distância total e distância na periferia significativamente maior do que o grupo C ($p \leq 0.05$). Entretanto, o pós-teste de Duncan não revelou diferenças entre os grupos na distância percorrida no centro.

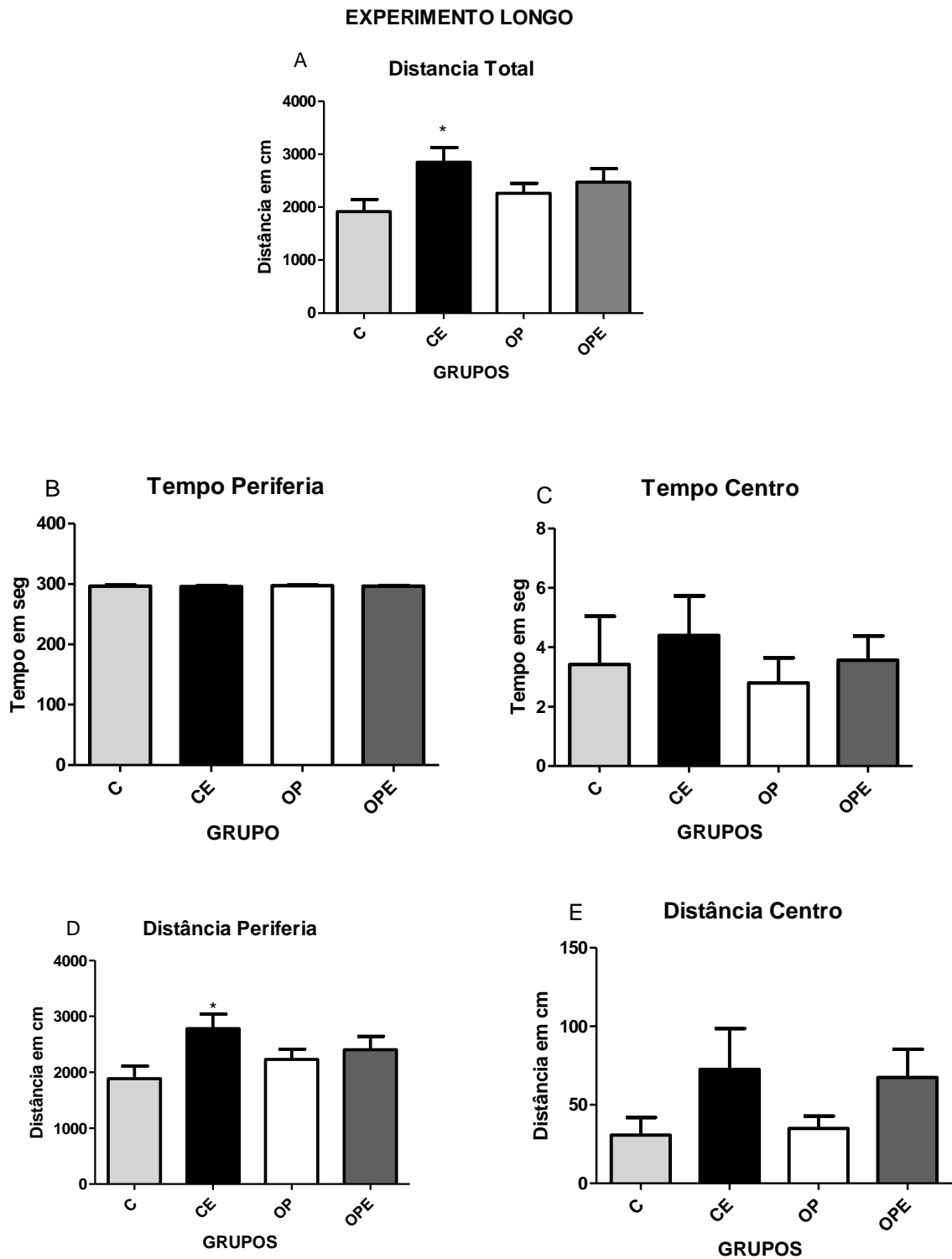


FIGURA 16: Campo aberto - experimento longo. ANOVA de duas vias. Valores expressos como média \pm EPM. (A) Comparação da distância total percorrida entre os grupos C versus CE e (D) comparação da distância percorrida na periferia entre os grupos C versus CE (* $p \leq 0.05$).

Neste mesmo experimento não houve influência da suplementação na distância total percorrida ($F(1,42)=0.00$; $p=0.94$), no tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.27$; $p=0.60$), na distância percorrida no centro ($F(1,42)=0.00$; $p=0.98$), no tempo gasto na periferia ($F(1,42)=0.30$; $p=0.59$) e na distância percorrida na periferia ($F(1,42)=0.00$; $p=0.93$). Não foi verificada influência da interação entre exercício e suplementação em nenhum dos parâmetros analisados.

Após a interrupção do protocolo de treinamento e suplementação (FIGURA 16), verificou-se que não houve influência do exercício na distância total percorrida ($F(1,42)=0.72$; $p=0.39$), no tempo gasto na periferia ($F(1,42)=1.00$; $p=0.48$), na distância percorrida na periferia ($F(1,42)=0.79$; $p=0.37$), bem como no tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.51$; $p=0.47$) e na distância percorrida no centro ($F(1,42)=0.59$; $p=0.44$). Também não foi verificada influência da suplementação em nenhum dos parâmetros analisados, tal como segue: distância total ($F(1,42)=0.00$; $p=0.94$), tempo gasto na periferia ($F(1,42)=0.00$; $p=0.76$), distância percorrida na periferia ($F(1,42)=0.00$; $p=0.96$), tempo gasto no centro ($F(1,42)=0.09$; $p=0.76$) e distância percorrida no centro ($F(1,42)=0.46$; $p=0.50$). Não foi verificada influência da interação entre exercício e suplementação em nenhum dos parâmetros analisados.

EXPERIMENTO LONGO E INTERRUPÇÃO

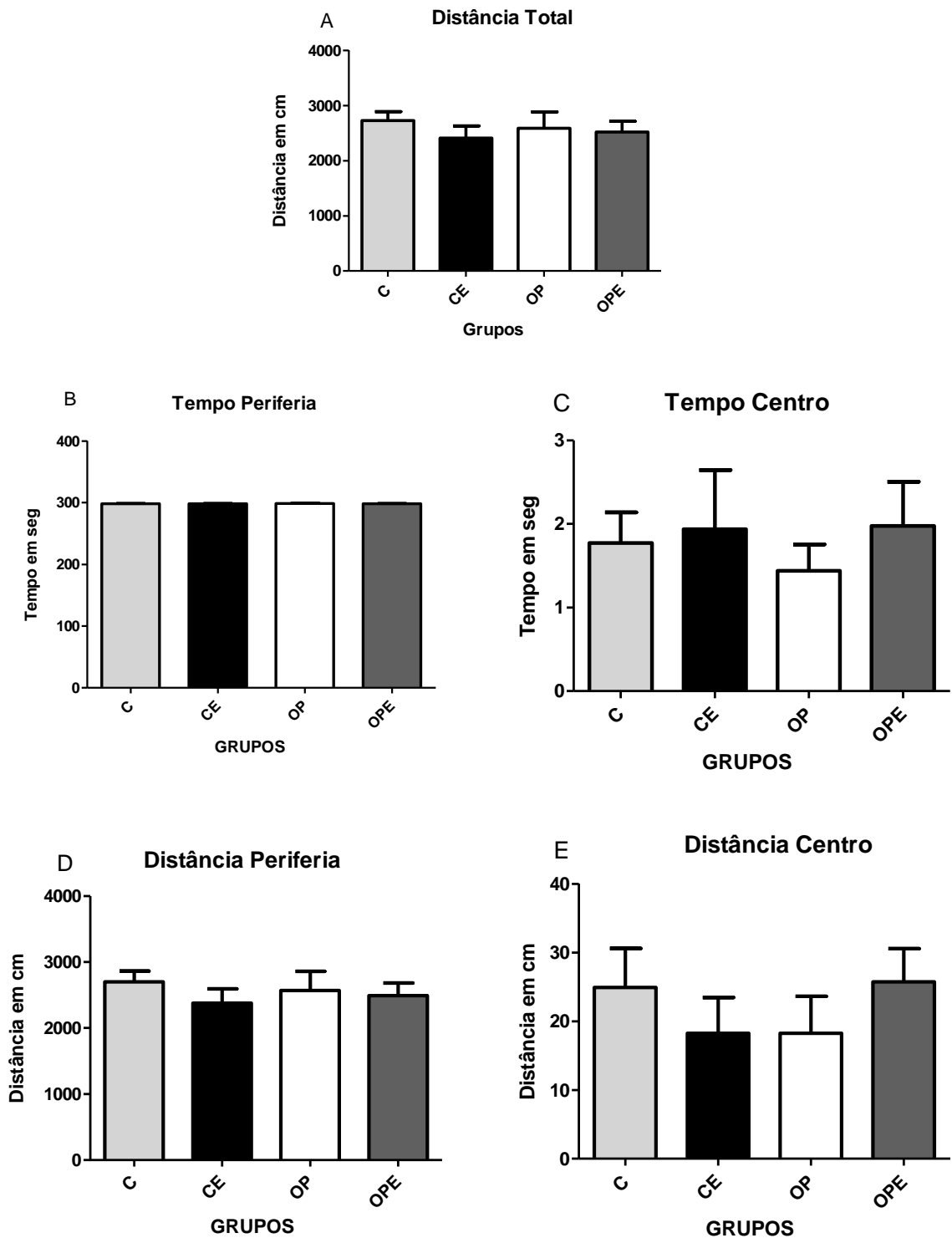


FIGURA 17: Campo aberto - experimento longo e interrupção. ANOVA de duas vias. Valores expressos como média \pm EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

7.2.3 Perfil lipídico

Quando determinamos o perfil lipídico encontramos que nos ratos do experimento longo conforme mostra TABELA 3, a análise das membranas hipocâmpais demonstrou aumento significativo de DHA nos animais que receberam suplementação com óleo de peixe [F(1,12)=14.89; $p \leq 0.005$]. Porém, não houve influência do exercício na concentração deste ácido graxo [F(1,12)=1.42; $p=0.25$], assim como não houve efeito na interação entre suplementação e exercício [F(1,12)=0.01; $p=0.93$].

Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que os grupos suplementados com óleo de peixe, grupos OP e OPE ($p \leq 0.05$) apresentaram níveis significativamente maiores de DHA nas membranas hipocâmpais quando comparados ao grupo controle.

Em relação aos níveis de EPA, não houve influência da suplementação com óleo de peixe [F(1,12)=1.69; $p=0.21$], do exercício [F(1,12)=1.51; $p=0.24$] e da interação entre ambos os fatores [F(1,12)=3.42; $p=0.08$].

TABELA 3 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas neuronais hipocâmpais de ratos do experimento longo

Ácidos Graxos	HIPOCAMPO			
	C n=5	OP n=5	OPE n=5	CE n=5
Myristic (14:0)	0.25 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.27 ± 0,01	0.32 ± 0.01
Palmitic (16:0)	20.50 ± 0.24	21.03 ± 0.22	21.17 ± 0.12	20.61 ± 0.26
7-hexadecenoic (16:1n-9)	0.42 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.51 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Margaric (17:0)	2.82 ± 0.07	2.73 ± 0.06	2.69 ± 0.07	3.06 ± 0.15
Estearic (18:0)	21.31 ± 1.83	20.05 ± 0.58	19.78 ± 0.99	20.82 ± 0.40
Oleic (18:1n-9)	16.37 ± 0.53	17.08 ± 0.43	15.33 ± 0.29	15.74 ± 0.34
Vacenic (18:1n-7)	3.55 ± 0.19	3.62 ± 0.16	3.38 ± 0.12	3.64 ± 0.04
Linoleic (18:2n-6)	0.92 ± 0.28	1.32 ± 0.29	1.00 ± 0.10	0.65 ± 0.06
Eicosanoic (20:0)	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.05	0.26 ± 0.03	0.31 ± 0.02
Aracdonic (20:4n-6)	13.97 ± 0.28	12.87 ± 0.73	14.22 ± 0.47	14.11 ± 0.29
EPA (20:5n-3)	0.27 ± 0.07	0.30 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.30 ± 0.02
DHA (22:6n-3)	13.52 ± 0.32	15.90 ± 0.60*	16.71 ± 1.01*	14.22 ± 0.31

Valores expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida de Pós-Teste de Duncan. Comparação dos animais do grupo OP e OPE em relação ao C (* $p \leq 0.05$).

No entanto, nos animais submetidos à suplementação e treinamento por longo período, com interrupção das intervenções por 21 dias, verificamos ausência de efeito da suplementação com óleo de peixe [$F(1,13)=2.92$; $p=0.11$], do exercício [$F(1,13)=1.52$; $p=0.23$] e ausência de interação entre ambos os fatores [$F(1,13) = 0.55$; $p=0.46$] nos níveis de DHA (TABELA 4).

Analisando os níveis de EPA na interrupção, não foi observado influência da suplementação com óleo de peixe [$F(1,13)=0.51$; $p=0.48$], do exercício [$F(1,13)=0.01$; $p=0.94$], assim como da interação entre ambos os fatores [$F(1,13) = 2.02$; $p=0.17$].

TABELA 4 - Concentração dos ácidos graxos (%) nas membranas neuronais hipocâmpais de ratos do experimento longo e interrupção

Ácidos Graxos	HIPOCAMPO			
	C n=5	OP n=5	OPE n=5	CE n=5
Myristic (14:0)	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.26 ± 0.09	0.18 ± 0.01
Palmitic (16:0)	20.16 ± 0.42	20.60 ± 0.18	20.19 ± 0.24	20.55 ± 0.30
7-hexadecenoic (16:1n-9)	0.46 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.49 ± 0.09	0.38 ± 0.03
Margaric (17:0)	3.23 ± 0.12	3.04 ± 0.18	3.18 ± 0.13	3.25 ± 0.40
Estearic (18:0)	21.44 ± 0.59	21.35 ± 0.44	21.42 ± 0.36	21.60 ± 1.12
Oleic (18:1n-9)	16.43 ± 0.57	15.85 ± 0.42	15.95 ± 0.36	15.94 ± 0.25
Vacenic (18:1n-7)	3.66 ± 0.06	3.56 ± 0.11	3.53 ± 0.15	3.69 ± 0.05
Linoleic (18:2n-6)	0.76 ± 0.09	0.62 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.60 ± 0.01
Eicosanoic (20:0)	0.39 ± 0.07	0.33 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02
Aracdonic (20:4n-6)	12.77 ± 1.08	13.82 ± 0.09	13.62 ± 0.46	13.74 ± 0.59
EPA (20:5n-3)	0.36 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.44 ± 0.18	0.29 ± 0.06
DHA (22:6n-3)	14.58 ± 0.41	15.14 ± 0.14	14.86 ± 0.30	13.42 ± 0.87

Valores expressos como média ± EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

7.2.4 Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF)

No experimento longo, os níveis de BDNF também foram verificados. Segundo a ANOVA de 2 vias, houve influência do exercício [$F(1,16)=8.74$; $p\leq 0.05$], mas não houve influência da suplementação [$F(1,16)=0.04$; $p=0.82$] e da interação entre os fatores suplementação e exercício [$F(1,16)=0.67$; $p=0.42$] nos níveis de

BDNF hipocampal. Análise pelo pós-teste de Duncan revela que o grupo CE e OPE tiveram os níveis de BDNF significativamente menores do que o grupo C ($p \leq 0.05$).

Após a interrupção das intervenções (FIGURA 17B), os resultados mostram que houve influência do exercício [$F(1,16)=4.53$; $p \leq 0.05$] e da interação entre os fatores suplementação e exercício sobre os níveis de BDNF [$F(1,16)=9.01$; $p \leq 0.05$], mas não houve efeito da suplementação [$F(1,16)=3.68$; $p=0.07$]. Análise pelo pós-teste de Duncan revela que o grupo CE teve os níveis de BDNF significativamente menores do que os grupos C, OP e OPE ($p \leq 0.05$).

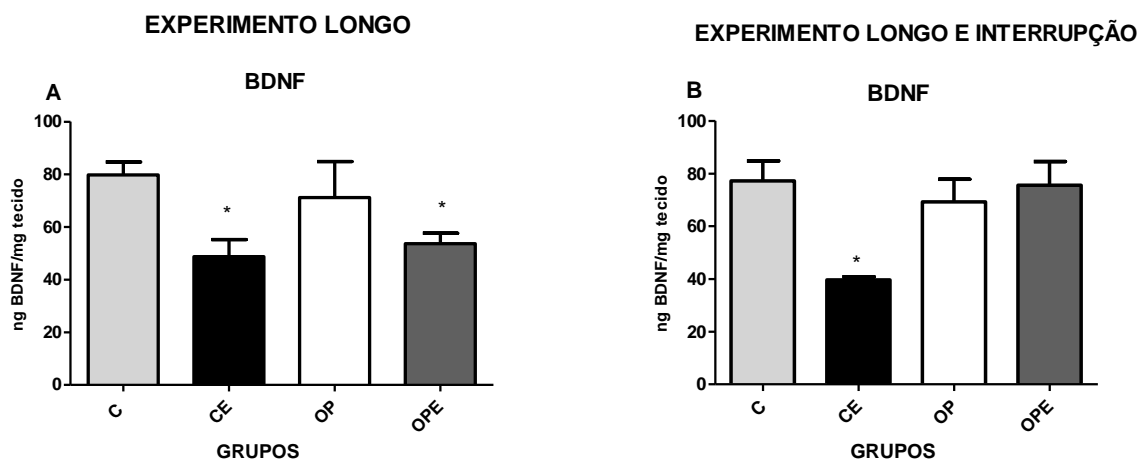


FIGURA 18: BDNF - ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 5 animais em cada grupo. Experimento longo - (A) Comparação dos níveis de BDNF dos grupos CE e OPE em relação ao grupo C ($*p \leq 0.05$). Experimento longo e interrupção - (B) Comparação dos níveis de BDNF do grupo CE em relação aos demais grupos ($*p \leq 0.05$).

7.2.5 Caracterização do exercício e metabolismo requerido

Caracterizamos o metabolismo predominantemente requerido no exercício físico do nosso protocolo. Para tanto, fizemos a mensuração indireta de lactato sanguíneo no período basal, 30 e 45 minutos de atividade contínua de natação, e verificamos respectivamente os seguintes níveis médios: 3.27 (± 0.13), 3.25 (± 0.12) e 3.20 (± 0.11) mmol/l (TABELA 5), caracterizando assim o exercício administrado como aeróbio.

TABELA 5 - Concentração de lactato sanguíneo durante treinamento físico de natação nos ratos exercitados (mmol/l)

Grupo	Basal	30 min	45 min	Média 30/45 min
OPE	3.35 ±0.18	3.25 ±0.23	3.15 ±0.24	3.20 ±0.23
CE	3.20 ±0.20	3.25 ±0.13	3.25 ±0.02	3.25 ±0.07
Média	3.27 ±0.13	3.25 ±0.12	3.20 ± 0.11	3.22 ±0.11

Valores expressos como média ± EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, assim como nos diferentes momentos da coleta (basal, 30 minutos e 45 minutos).

7.2.6 Estresse oxidativo

Realizamos as análises referente ao estresse oxidativo (atividade da glutathiona peroxidase - GPx , níveis de glutathiona oxidada - GSH, glutathiona reduzida - GSSG e razão GSH/GSSG) apenas nos ratos dos experimentos longos, tendo em vista não encontrarmos alterações significativas nos testes de memória e nos níveis de BDNF nos grupos dos experimentos curtos.

Segundo a ANOVA de 2 vias, no experimento longo (FIGURA 18), verificamos que não houve influência do exercício [$F(1,13)=0.41$; $p=0.52$], da suplementação com óleo de peixe [$F(1,13)=1.02$; $p=0.32$], bem como da interação entre os fatores [$F(1,13)=0.48$; $p=0.49$] na atividade da GPx. Entretanto, o exercício físico influenciou os níveis de GSH [$F(1,18)=20.71$; $p\leq 0.001$] e na razão entre GSH/GSSG [$F(1,18)=7.01$; $p\leq 0.05$], mas não causou influência nos níveis de GSSG [$F(1,18)=0.74$; $p=0.39$]. Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que os ratos CE e OPE tem maior conteúdo de GSH em relação ao grupo C e OP ($p\leq 0.05$), entretanto não revela diferenças significativas entre os grupos na razão GSH:GSSG. Já a suplementação não foi capaz de influenciar os níveis de GSH [$F(1,18)=0.17$; $p=0.67$], de GSSG [$F(1,18)=0.33$; $p=0.57$] e a razão entre GSH/GSSH [$F(1,18)=0.11$; $p=0.73$]. Por fim, não houve influência da interação entre exercício físico e suplementação nos níveis de GSH [$F(1,18)=0.29$; $p=0.59$], de GSSG [$F(1,18)=0.23$; $p=0.63$] e na razão entre GSH/GSSH [$F(1,18)=0.06$; $p=0.80$].

EXPERIMENTO LONGO

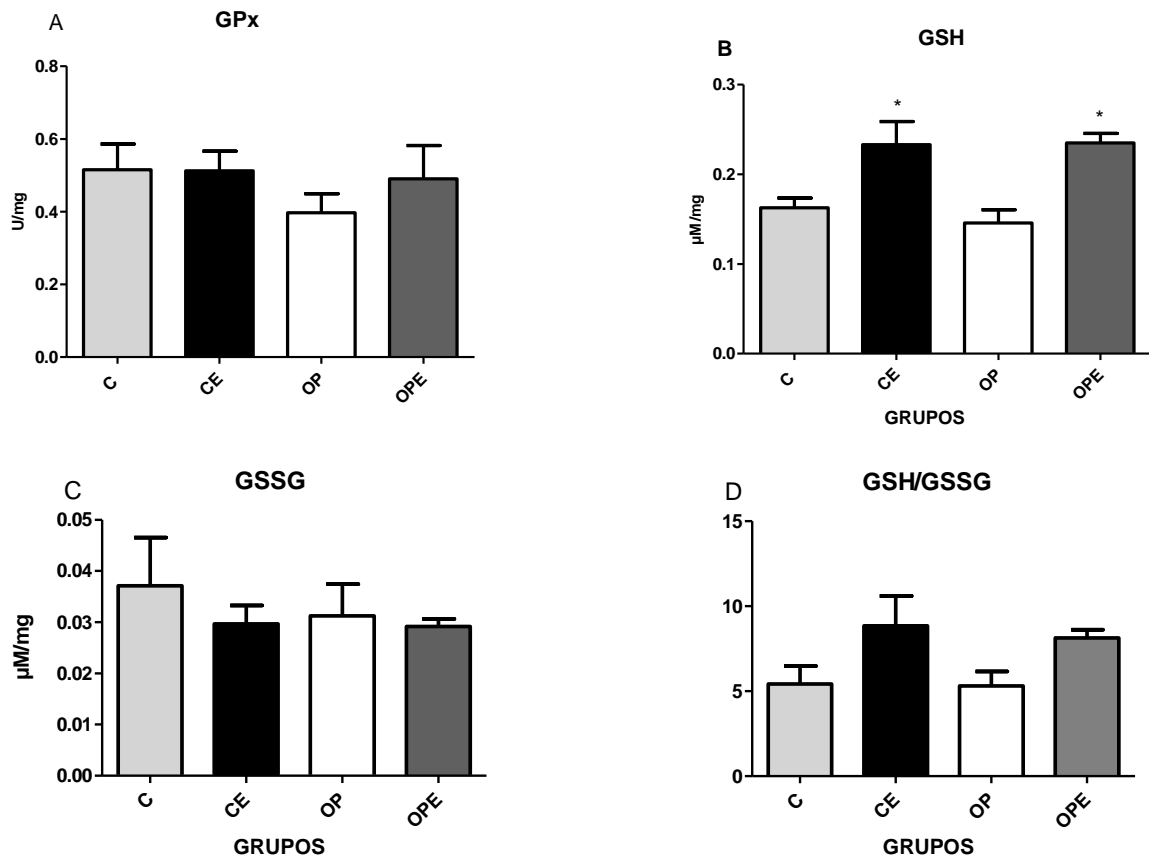


FIGURA 19: Estresse oxidativo - experimento longo. ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média \pm EPM para 4 animais em cada grupo. (A) Não foram verificadas diferenças significativas na atividade GPx entre os grupos. (B) Comparação entre o conteúdo de GSH do grupo CE e OPE em relação ao grupo C e OP (* $p \leq 0.05$). (C) Não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo de GSSG entre os grupos. (D) Não foram verificadas diferenças significativas na razão GSH/GSSG entre os grupos.

Após a interrupção das intervenções por 21 dias, conforme FIGURA 19, pudemos verificar a influência do exercício [$F(1,13)=7.48$; $p \leq 0.05$], mas não da suplementação com óleo de peixe [$F(1,13)=0.26$; $p=0.61$] e da interação entre os fatores [$F(1,13)=0.10$; $p=0.74$] na atividade da GPx. Análise pelo pós-teste de Duncan revelou que os ratos exercitados têm maior atividade da glutathiona peroxidase do que os grupos C e OP ($p \leq 0.05$). Nos outros parâmetros de análise, a suplementação não foi capaz de influenciar os níveis de GSH [$F(1,17)=0.49$; $p=0.25$], de GSSG [$F(1,17)=0.00$; $p=0.94$] e a razão entre GSH/GSSG [$F(1,17)=0.07$; $p=0.79$]. O exercício físico também não foi capaz de influenciar os níveis de GSH [$F(1,17)=0.31$; $p=0.58$], de GSSG [$F(1,17)=1.11$; $p=0.30$] e a razão entre GSH/GSSG [$F(1,17)=0.34$; $p=0.56$]. Por fim, a interação entre exercício físico e suplementação

não foi capaz de influenciar os níveis de GSH [$F(1,17)=1.00$; $p=0.33$], de GSSG [$F(1,17)=0.05$; $p=0.82$] e a razão entre GSH/GSSG [$F(1,17)=0.05$; $p=0.75$].

EXPERIMENTO LONGO E INTERRUPÇÃO

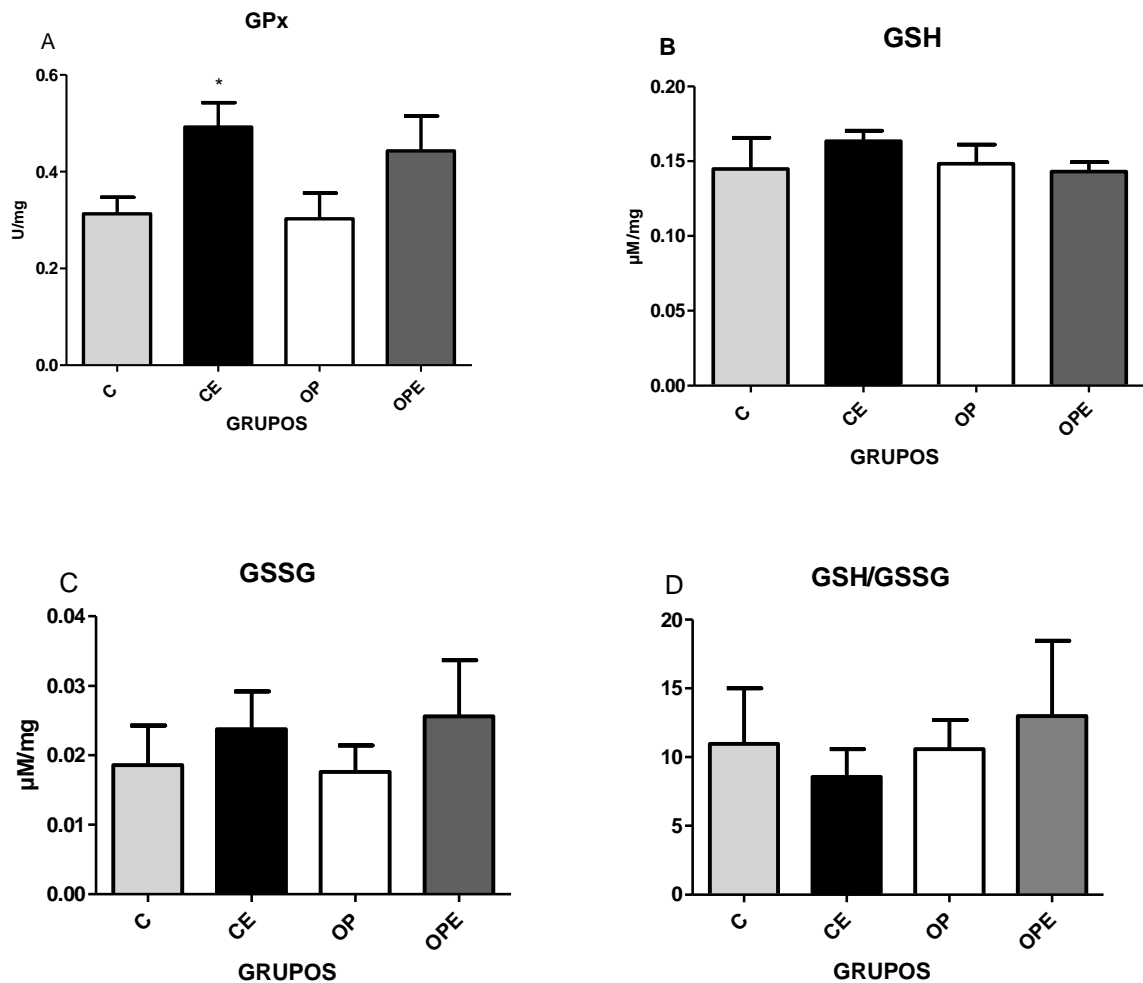


FIGURA 20: Estresse oxidativo - experimento longo e interrupção. ANOVA de duas vias. Os resultados expressam a média ± EPM para 4 animais em cada grupo. (A) Comparação da atividade da GPx entre o grupo CE e C (* $p \leq 0.05$). (B) Não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo de GSH entre os grupos. (C) Não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo de GSSG entre os grupos. (D) Não foram verificadas diferenças significativas na razão GSH/GSSG entre os grupos.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo examinou o impacto da suplementação com óleo de peixe e do exercício físico em ratos *Wistar* machos juvenis e seus efeitos sobre o aprendizado e a memória.

A presente pesquisa fornece novas evidências de que os efeitos induzidos pelo exercício físico no aprendizado e na memória nem sempre são benéficos e dependem da exigência/intensidade, do período de desenvolvimento e do tempo de aplicação das intervenções. Além disso, a suplementação mostra-se uma poderosa ferramenta no combate a possíveis danos/prejuízos à memória que podem ser causados por eventos estressantes.

O exercício físico e a suplementação com óleo de peixe aplicados durante 12 dias não foram capazes de causar influência nos processos relacionados ao aprendizado, bem como nos níveis de BDNF e na incorporação lipídica das membranas hipocâmpais. Após a interrupção do exercício e da suplementação por 21 dias, também não foi detectada influência alguma destas intervenções.

Entretanto, quando a aplicação destas intervenções foi realizada por 50 dias, o exercício realizado foi capaz de causar prejuízos no aprendizado concomitantemente com a diminuição dos níveis de BDNF, importante fator neurotrófico. Os dados da pesquisa revelam que apesar do exercício induzir a melhora dos mecanismos antioxidantes, verificada nas análises de estresse oxidativo, os prejuízos ao aprendizado estão relacionados com a intensidade e frequência do protocolo de exercício, que parecem estar produzindo estresse de outra natureza que não o oxidativo, alterando dramaticamente a função e estrutura do SNC. A suplementação com óleo de peixe aplicada durante este longo período, além de promover a incorporação de DHA nas membranas neurais, protegeu os ratos suplementados e exercitados das alterações negativas ocorridas no BDNF, mas não foi capaz de impedir os prejuízos cognitivos.

Após 21 dias de interrupção das intervenções, quando os ratos já encontravam-se na vida adulta, o prejuízo causado na memória pelo exercício se manteve nos ratos exercitados, conjuntamente com a diminuição nos níveis de BDNF, apesar da habituação do tecido ao estresse oxidativo induzida pelo exercício físico se manter, tendo em vista a maior ativação da enzima antioxidante, a GPx.

Entretanto, os efeitos da suplementação foram sentidas mesmo após cessada, já que a mesma foi capaz de bloquear a ação deletéria do exercício no aprendizado e novamente impedir a diminuição dos níveis de BDNF nos ratos exercitados e suplementados, a despeito de não haver mais resquícios da incorporação de DHA hipocampal.

8.1 APLICAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE EM CURTA JANELA TEMPORAL

A configuração das metodologias de aplicação de exercício físico e/ou da suplementação com óleo de peixe tem se mostrado muito variada, e um dos pontos a serem discutidos tem relação com a duração de aplicação. Muitas metodologias foram constituídas por alguns dias ou semanas (VENNA *et al.*, 2009; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007; LOU *et al.*, 2006, SAUR *et al.*, 2012) e outras duraram muitas semanas até meses (NALIWAIKO *et al.*, 2004; DELATTRE *et al.*, 2010; MARLATT *et al.*, 2012; ASL *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2006). Sabe-se que os efeitos do exercício sobre vias moleculares sinápticas têm uma dependência temporal (BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010) e a quantidade de tempo de aplicação dessas intervenções para que haja benefícios para a saúde mental ainda não está completamente esclarecida. A hipótese do trabalho foi a de que curtíssimos períodos de tempo seriam insuficientes para trazer alterações significativas nos processos cognitivos principalmente em animais muito jovens, cujo SNC que está em uma fase crítica de desenvolvimento é mais susceptível a influências externas de toda natureza, e que, portanto, intervenções saudáveis positivas deveriam ser incorporados na rotina diária em fases precoces da vida e mantidos por muito tempo para a otimização da saúde mental na fase adulta. Foram aplicadas intervenções consideradas saudáveis como o exercício físico e a suplementação com óleo de peixe (a partir dos 30 dias de vida) para se identificar a existência de benefícios no meio/fim da adolescência e/ou no início da vida adulta.

Primeiramente, foi avaliada a capacidade do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe em curto período de tempo de modular a

habilidade de aprender e a plasticidade sináptica. Doze (12) dias de exposição a estas intervenções durante o início da adolescência dos ratos (30^o e 42^o dias de vida do rato) não trouxeram nenhuma modificação significativa no aprendizado no teste de localização de objetos, na atividade locomotora, na incorporação lipídica e nos níveis de BDNF. Estes dados corroboram estudo de Almeida *et al.* (2013) que também não foi capaz de verificar alteração nos níveis de BDNF em ratos submetidos ao exercício físico entre o 31^o ao 40^o dia de vida. Entretanto, este mesmo estudo identificou que ratos mais velhos submetidos ao mesmo tipo de exercício físico (durante o 41^o ao 50^o dia de vida) exibiram níveis de BDNF e de citosinas inflamatórias aumentadas. Trabalhos prévios identificaram ainda que ratos adultos exercitados em curto período de tempo reproduziram melhora no aprendizado e aumento dos níveis do RNA mensageiro do BDNF (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004), aumento nos níveis da CaMKII hipocampal (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007) e aumento no aprendizado espacial (CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008).

Acredita-se que as consequências resultantes de interferências realizadas durante a adolescência na neuroplasticidade parecem depender muito mais da idade dos testados do que propriamente do tempo de aplicação, haja vista que os maiores benefícios induzidos pelo exercício aconteceram nos animais quando mais velhos, e não em ratos que estavam em fases sensíveis de desenvolvimento do SNC.

Entretanto, ratos de idade semelhante aos deste estudo tiveram melhoras na memória espacial no teste do Labirinto de Morris (LOU *et al.*, 2006) aumento na neurogênese e nos níveis de BDNF (LOU *et al.*, 2008) fazendo exercício em curta janela temporal, porém em esteira rolante, diferentemente da atividade física aplicada neste estudo, a natação. O exercício físico que é caracterizado pela sua exigência física, pode ser uma variável influenciadora. A exigência física da atividade está relacionada principalmente com intensidade, frequência e volume, que a qualificam como mais ou menos exigente. Há poucos registros de estudos que utilizaram metodologias, e quase sempre se diferiam entre si, para caracterizar/aumentar o nível de exigência do exercício em seus estudos (AGUIAR Jr *et al.*, 2010; DRUMOND *et al.*, 2012; ERICKSON *et al.*, 2011). Outros (ALAEI *et al.*, 2008; GOMES DA SILVA *et al.*, 2010; 2012) não consideraram os resultados dos ratos que se recusaram a executar o exercício, ou executavam-no abaixo da média

durante o experimento, com a finalidade de excluir possíveis diferenças nos níveis de estresse entre os animais.

A natação é uma atividade de difícil caracterização do nível de exigência, e as cargas individualizadas (peso corporal de 5%) utilizadas aqui, objetivaram mimetizar esforços físicos utilizados na busca da aptidão física em níveis básicos de saúde. Não temos conhecimento de estudos que tenham encontrado modificações nos processos mnemônicos em ratos muito jovens utilizando a natação como atividade física em uma janela temporal curta, então podemos supor que a idade dos ratos combinado a esse tipo de protocolo de exercícios não foi capaz de produzir nenhuma adaptação do organismo ao esforço nos processos ligados ao aprendizado em curto período de tempo.

A suplementação com cápsula de óleo de peixe que contém 18% de DHA e 12% de EPA foi aplicada durante curta janela temporal e não foi capaz de promover a incorporação dos ácidos graxos nas membranas neuronais e nem especificamente dos dois AGPIs citados acima. O desenvolvimento do SNC e a modificação da composição das membranas neuronais de animais jovens podem ser modulados por dietas com ácidos graxos em curto período de tempo, ao contrário de animais adultos que precisam de no mínimo 8 semanas de suplementação. Contudo, um fator que deve ser considerado quando se avalia o tempo de suplementação para causar estas modificações, é a concentração de suplemento a ser utilizada que pode variar entre 5 e 20% da dieta (YOUJIM, MARTIN e JOSEPH, 2000). Pesquisas prévias do nosso laboratório (NALIWAIKO *et al.*, 2004; DELATTRE *et al.*, 2010, PUDELL *et al.*, 2014) encontraram incorporação de ácidos graxos nas membranas lipídicas após longa janela de suplementação, além de alterações na memória e efeito antidepressivo, utilizando exatamente a mesma concentração de AGPIs do presente estudo (3,0 g/kg de óleo de peixe), entretanto como a maioria dos estudos nesta área, o exato momento que ocorreu esta alteração não foi identificado. No presente estudo a dose utilizada de AGPIs na suplementação não foi suficiente para causar modificações na membrana quando nossos ratos foram suplementados por 12 dias.

A segunda parte do experimento curto teve a finalidade de verificar se a interrupção de 21 dias de suplementação e do treinamento físico poderia trazer algum tipo de modificação nos parâmetros estudados e/ou efeitos tardios já que os ratos neste momento se encontravam no fim da adolescência (64^o dia de vida), e

portanto, em etapa mais próxima ao fim do desenvolvimento encefálico agudo. Estudo prévio identificou melhora na aquisição da tarefa no teste do Labirinto Aquático Radial de 8 braços induzido pelo exercício após 1 semana de destreinamento (BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010). No entanto, em nosso estudo, após a interrupção do exercício físico e da suplementação, não foi possível identificar qualquer tipo de modulação no aprendizado, na atividade locomotora, na incorporação lipídica e nos níveis de BDNF. Ao contrário de outros estudos (WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008; CHYTROVA, YING E GOMEZ-PINILLA, 2010; TOLDY *et al.*, 2009) o exercício físico não modulou os mecanismos neurocognitivos de forma positiva em curto período de tempo e a combinação do exercício físico e da suplementação não exacerbou os efeitos outrora esperados, nem durante a aplicação das intervenções e nem depois de um tempo após cessadas.

Nem todos os estudos têm demonstrado melhorias consistentemente no aprendizado. Como dito anteriormente, esta variabilidade está provavelmente relacionada a diferenças no protocolo de exercício, em combinação com a intensidade e duração da exposição exercício e à idade dos animais experimentais. Embora tanto o exercício forçado como o exercício voluntário possam reproduzir melhoras nos processos mnemônicos, o exercício voluntário parece produzir benefícios de forma mais confiável, especialmente se o protocolo da atividade física tiver duração mais curta. Além disso, embora algumas pesquisas mostrem melhoras na memória após 1 semana de exercício, a maioria dos benefícios têm sido associados com sua prática a longo prazo (COTMAN, BERCHTOLD e ANN-CHRISTIE, 2007). Em nossa pesquisa, as consequências induzidas pelo exercício físico e pela suplementação foram sentidas nos experimentos onde a duração dos protocolos foi mais longa.

8.2 APLICAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E DE EXERCÍCIO FÍSICO EM LONGA JANELA TEMPORAL

Outra finalidade deste estudo foi avaliar o papel do exercício físico e da suplementação com óleo de peixe por longo período de tempo (50 dias) em modular

a habilidade de aprendizagem. Os animais foram submetidos a estas intervenções a partir dos 30 dias de idade, durante a adolescência até próximo da vida adulta (80º dia de vida do rato), portanto fase crítica do desenvolvimento do sistema nervoso central. Nossos resultados mostram modificações significativas no aprendizado, na incorporação lipídica, nos níveis de BDNF, na atividade locomotora, no conteúdo de GSH e na razão entre a GSH:GSSG, mas não na atividade da GPx.

Inicialmente, era esperado que, tanto o exercício físico quanto a suplementação com AGPIs aplicados durante um longo período, fossem capazes de melhorar os aspectos relacionados à memória, já que pesquisas prévias encontraram estes ganhos usando as duas variáveis separadamente (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004; UYSAL *et al.*, 2005; GOMES DA SILVA *et al.*, 2010; GARCIA-CAPDEVILA *et al.*, 2009; MELLO *et al.*, 2008; FERRAZ *et al.*, 2008; SAUR *et al.*, 2012), conjuntamente (CHYTROVA, YING e GOMEZ-PINILLA, 2010; WU, YING e GOMEZ-PINILLA, 2008) ou frente a processos patológicos, a drogas ou a algum tipo de restrição (VENNA *et al.*, 2009; TOLDY *et al.*, 2009; FEDOROVA *et al.*, 2009; KHABOUR *et al.*, 2010, AGUIAR Jr *et al.*, 2009).

De forma oposta, nossos dados revelam que o exercício físico prejudicou significativamente o aprendizado espacial no teste de localização de objetos nos ratos do grupo CE e OPE. Os presentes dados corroboram alguns estudos que mostram que a aplicação de exercício não voluntário em ratos trouxe efeito deletério sobre a memória (BRASZKO *et al.*, 2001), déficits na memória implícita (AGUIAR Jr *et al.*, 2010) e o aumento da intensidade do exercício produziu prejuízo no desempenho cognitivo dos animais experimentais (LABELLE *et al.*, 2013; KENNARD e WOODRUFF-PAK, 2012). Apesar da maioria das pesquisas relatarem benefícios na memória decorrentes da aplicação de protocolos de treinamento físico (AGUIAR Jr *et al.*, 2009; AGUIAR Jr *et al.*, 2011; ALOMARI *et al.*, 2011; CETINKAYA *et al.*, 2013; RACHETTI *et al.*, 2013; DRUMOND *et al.*, 2012), existem estudos que relatam consequências negativas do exercício nos complexos mecanismos relacionados ao aprendizado, como aumento do estresse oxidativo e a redução da concentração de proteínas sinalizadoras que levam a prejuízos cognitivos (RADÁK *et al.*, 2013; TSAKIRIS *et al.*, 2004).

A atividade física pode comprometer os processos mnemônicos, especialmente quando é realizada de forma mais exigente ou com intervalos de descanso insuficientes entre as sessões (PELUSO e ANDRADE, 2005). Há

diferentes tipos de exercícios utilizados na literatura, caracterizados pela sua voluntariedade ou não e pelo ambiente em que é realizado (piscina, esteira, roda giratória, etc). Normalmente o organismo se adapta a diferentes tipos de esforço, o que é chamado de habituação (ALOMARI *et al.*, 2013), porém a não voluntariedade que é característica dos exercícios forçados e do protocolo dessa pesquisa podem envolver componentes de estresse comportamental e bioquímico.

O animal jovem está mais vulnerável ao estresse no curso do desenvolvimento do SNC por ter menor amadurecimento nas estruturas límbicas que regulam o eixo hipotálmo-hipófise-adrenal (HHA) em relação ao animal adulto (McCORMICK e MATHEWS, 2010). A exposição crônica ao estresse pode trazer aumento das respostas do eixo, resultando em prolongada liberação de hormônios glicocorticoides pela glândula adrenal, que ocorre em maior grau do que na vida adulta (McCORMICK *et al.*, 2012). O hipocampo tem alta expressão de receptores para glicocorticoides e é uma importante região de formação de memórias (McCORMICK e MATHEWS, 2010). Por sua vez, o estresse crônico pode resultar na estimulação desses receptores, promovendo a excitação dos neurônios e levando a aumentada liberação de glutamato na fenda sináptica. Como o excesso de glutamato no meio extracelular pode ser neurotóxico, um aumento descontrolado na liberação de neurotransmissores poderia promover excitotoxicidade e consequente alteração na plasticidade sináptica (HENNEBELLE *et al.*, 2014). Assim e a sensibilização dos receptores aos efeitos hormonais pode interferir nos processos cognitivos relacionados ao hipocampo (GOMEZ-PINILLA e YING, 2010) em consequência das mudanças morfológicas e funcionais. Estas modificações morfológicas em fases de desenvolvimento do SNC são reproduzidas na forma de retração dos dendritos no hipocampo, diminuição da neurogenese no giro denteado e dos espinhos dendríticos e funcionalmente na transmissão glutamatérgica alterada (HENNEBELLE *et al.*, 2014; McCORMICK e MATHEWS, 2010).

Nossos dados revelaram também diminuição nos níveis de BDNF hipocampal nos ratos submetidos ao exercício físico, tanto do grupo CE como do grupo OPE. A neurotrofina BDNF é uma proteína homodimérica cujo papel fisiológico é promover e regular a neurogênese, o crescimento e a maturação neural, durante o desenvolvimento do SNC. Na vida adulta, o BDNF é essencial para a plasticidade sináptica, manutenção, estabilização e sobrevivência neuronal (AZMITIA, 1999; MATTSON *et al.*, 2004; MARTINOWICH e LU, 2008; AAN HET

ROT *et al.*, 2009; LICINIO *et al.*, 2009; HASHIMOTO, 2010). A exposição a qualquer tipo de evento causador de estresse crônico pode levar à diminuição nos níveis de proteínas hipocampais como a sinaptosina e RNAm do BDNF (STERLEMANN *et al.*, 2010) e a falta por causas genéticas do gene do BDNF ou por qualquer outra razão atrapalha a formação de memórias (GOMEZ-PINILLA, 2008). A relação do exercício físico com o aumento dos níveis de BDNF e com o maior desempenho no aprendizado apesar de bastante estudada, tem se mostrado controversa. Pesquisas prévias relatam que o exercício de elevada intensidade desencadeou disfunção mitocondrial no encéfalo, dano oxidativo e diminuição nos níveis de neurotrofinas como o BDNF, o que presumivelmente piora o desempenho cognitivo (AGUIAR *et al.*, 2010). Estudo de Radák *et al.* (2006) mostrou que o exercício não voluntário diminuiu os níveis de BDNF, mas não prejudicou o aprendizado em ratos adultos. Outra pesquisa mostra que o exercício intenso foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no estriado e no hipocampo, e o exercício moderado provocou aumentos neste fator trófico apenas no hipocampo (AGUIAR *et al.*, 2008). No presente estudo, está evidente que o exercício físico desencadeou as referidas alterações nos dois grupos de ratos exercitados (OPE e CE) e os baixos níveis de BDNF possivelmente estejam relacionados aos prejuízos cognitivos. Os dados das pesquisas citadas acima conjuntamente com os do atual estudo demonstram que as modificações induzidas pelo exercício no aprendizado e nos níveis das neurotrofinas são dependentes de vários fatores, entre eles do tipo de protocolo de treinamento físico, da fase de desenvolvimento do animal testado e do tecido envolvido.

O comportamento motor e níveis de ansiedade foram mensurados pelo teste de campo aberto. Em nosso estudo, este teste revelou alterações significativas na distância total e na distância percorrida na periferia nos ratos CE em comparação aos demais grupos (C, OP e OPE). O comportamento de ansiedade no campo aberto está relacionado com menor distância total percorrida, menor distância percorrida na zona central, bem como menor percentual gasto nesta zona e maior percentual de tempo gasto na periferia do campo aberto (SESTAKOVA *et al.*, 2013). Embora este teste não seja a ferramenta mais específica para mensurar níveis de ansiedade, é muito utilizado e existem variadas controvérsias na literatura em relação à interpretação dos seus resultados. Por exemplo, a bulbectomia olfatória é um modelo de depressão que leva os animais experimentais a um comportamento de ansiedade evidenciado no teste do labirinto elevado (HARKIN, KELLY e

LEONARD, 2003). Ratos bulbectomizados demonstraram hiperatividade quando avaliados no teste de campo aberto revelada pela maior distância total percorrida, maior distância percorrida na periferia e percentual de tempo gasto nesta região (PUDELL *et al.*, 2014). Na presente pesquisa, nossos dados não exibiram alteração neste último parâmetro, entretanto a hipótese de que os ratos exercitados estão percorrendo maior distância na arena do teste em relação aos demais grupos por conta de uma maior treinabilidade é contestada por estudo de Bronikowski *et al.* (2001) que não foi capaz de demonstrar qualquer correlação positiva entre ratos com maior capacidade e treinabilidade física (selecionados geneticamente) e maior distância total percorrida no campo aberto. Como respostas de hiperatividade estão associadas a comportamentos induzidos por estresse (HARKIN, KELLY e LEONARD, 2003), não podemos afirmar com certeza que os ratos do grupo CE estão em estado de ansiedade, entretanto estas alterações de ambulação estão ocorrendo paralelamente aos prejuízos no teste de memória nos ratos do grupo CE, e acreditamos que estes dois fatores possam estar relacionados a um estado de estresse induzido pela atividade física.

Neste estudo, a natação, que é uma atividade física realizada em ambiente hostil para o animal experimental, iniciou-se na adolescência, coincidindo com os períodos críticos de desenvolvimento do SNC e terminou próximo ao início da vida adulta. Embora sem uma apreciação hormonal, a partir dos dados comportamentais (prejuízo de memória no teste de localização de objetos, alteração na locomoção no teste de campo aberto) e dos dados bioquímicos relacionados à concentração de BDNF é possível sugerir que o exercício físico tenha sido estressante. Apesar da condição experimental diferente, McCormick *et al.* (2012) e Sterlemann *et al.* (2010) fazem uma ligação entre estresse, aumento nos níveis de glicocorticoides, prejuízo cognitivo em ratos adolescentes e alteração nos níveis de proteínas sinalizadoras. Portanto, a partir dos nossos resultados, sugerimos que o prejuízo observado nos ratos está ligado ao alto nível de estresse induzido pelo exercício físico.

Levando em consideração o fato de que o protocolo de exercício físico adotado neste estudo foi responsável por respostas comportamentais e bioquímicas deletérias, a exigência metabólica/física do exercício e posteriormente o nível de estresse oxidativo dos ratos testados foram mensurados. A exigência metabólica/física do exercício é caracterizada pela concentração dos níveis de lactato sanguíneo durante a atividade física. A maior concentração de lactato

durante o exercício físico que pode ser removida, sem que haja acúmulo desse metabólito no sangue é denominada máximo estado estável de lactato (MLSS), e é um importante caracterizador do nível de esforço da atividade (GOBATTO *et al.*, 2001). Esforços físicos que se encontram abaixo ou até este MLSS são característicos do metabolismo oxidativo/aeróbio (GOBATTO *et al.*, 2001), sendo os ácidos graxos livres plasmáticos, o substrato energético preferencial do organismo neste momento (AIRES, 2012). O MLSS de ratos submetidos à atividade física natação para ratos sedentários é de 5,5 mmol/l e para ratos com nível de treinabilidade elevada é de 8 mmol/l (GOBATTO *et al.*, 2001). Aguiar *et al.* (2008) consideram que a atividade física que induz a produção de lactato próximo a 3,5 mmol/l é considerada de intensidade moderada a intensa. Os ratos dos grupos exercitados desse estudo apresentaram níveis médios de lactato sanguíneo no período basal, 30 e 45 minutos de atividade contínua de natação de 3,27 ($\pm 0,13$), 3,25 ($\pm 0,12$) e 3,20 ($\pm 0,11$) mmol/l respectivamente, caracterizando o protocolo de exercício administrado neste trabalho como aeróbio e de intensidade moderada a intensa.

O metabolismo aeróbio ou anaeróbio decorrente de exercícios de curta duração e alta intensidade é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (RADÁK, CHUNG YOUNG e GOTTO, 2008; GROUSSARD *et al.*, 2003). As ROS trazem, em grandes quantidades, o desenvolvimento de processos patológicos como inflamação, câncer e doenças neurodegenerativas, entretanto em pequenas quantidades podem ser usadas pelo organismo nos processos de sinalização (RADÁK, CHUNG YOUNG e GOTTO, 2008), regular os fatores de crescimento e estimular a neurogênese e a sinaptogênese (AGUIAR Jr *et al.*, 2010).

Na presente pesquisa, foi possível verificar que o exercício físico causou alterações positivas nos sistemas antioxidantes. O organismo é capaz de se habituar ao exercício físico e as ROS, através da regulação das defesas antioxidantes via transcrição de fatores, resultando no aumento da atividade das enzimas antioxidantes (RADÁK, YOUNG CHUNG e GOTO, 2008) e no aumento dos níveis de GSH neuronal. O aumento de GSH protege contra o estresse oxidativo e é um importante limitador de lesão neuronal, além de ser o único composto capaz de reagir com radicais hidroxila (AOYAMA, WATABE e NAKAKI, 2008). Na presente pesquisa, o exercício físico foi capaz de promover mecanismos adaptativos e melhora da capacidade antioxidante já que os ratos do grupo CE e OPE

apresentaram aumento do conteúdo de GSH em relação ao grupo C e OP de ratos sedentários, embora não tenha causado alterações na atividade da enzima GPx, a maior enzima antioxidante do encéfalo (AOYAMA, WATABE e NAKAKI, 2008). Como já mencionado na revisão de literatura, outro parâmetro sensível do estresse oxidativo é a razão entre a glutatona reduzida e glutatona oxidada, sendo que uma alta razão significa melhor proteção e maior capacidade oxidante e baixa razão um desequilíbrio no sistema redox. Em nosso experimento não houve alteração estatisticamente significativa nesta razão, mostrando que o protocolo de exercício físico utilizado em nossa pesquisa não está sendo responsável por qualquer excesso de produção de ROS e os prejuízos verificados na memória e nos níveis do BDNF não podem ser relacionados com algum tipo de desequilíbrio na capacidade antioxidante do encéfalo.

Ainda em nossa pesquisa, no tocante a suplementação com óleo de peixe, a aplicação desta intervenção por 50 dias promoveu incorporação do ácido graxo DHA, mas não do EPA nas membranas hipocámpais corroborando estudos prévios de nosso laboratório em modelos animais ou em humanos (DA SILVA *et al.*, 2008; DELATTRE *et al.*, 2010; PUDELL *et al.*, 2014). Já em relação à não incorporação do EPA, a literatura mostra que a concentração de EPA no encéfalo, em situações controle, é muito menor do que a concentração de DHA (CHEN, LIU e BAZINET, 2011). Os estoques de DHA são constantemente mantidos pela dieta ou pela retroconversão de ácidos graxos com 18, 20, 22 ou 24 carbonos, logo o EPA pode estar sendo utilizado como precursor no processo que culmina com a síntese do DHA, a partir de processos de alongamento e dessaturação (HORROCKS e FAROOQUI, 2004). Estudos prévios mostram limitada concentração de EPA na composição lipídica cortical após os ratos serem alimentados com dieta enriquecida com AGPI da família n-3 e mesmo oferecendo este ácido graxo na dieta, a sua concentração foi, em média, 46 vezes mais baixa do que a concentração de DHA no tecido examinado (BOUSQUET *et al.*, 2008; DELATTRE *et al.*, 2010).

Apesar de muitos relatos na literatura a respeito dos benefícios dos AGPIs na saúde mental como atenuação de prejuízos no aprendizado induzidos por alguma condição patológica como a Injúria Traumática do Encéfalo (WU, YINN e GOMEZ-PINILLA, 2004), no modelo de encefalopatia hepática (STAZIAKI *et al.*, 2013) ou em técnica modelo de depressão (PUDELL *et al.*, 2014) e de comportamentos relacionados ao estresse em fases iniciais do desenvolvimento encefálico (FERRAZ

et al., 2011), os dados desta pesquisa revelam que a suplementação não foi capaz de impedir o efeito prejudicial do exercício não voluntário no aprendizado dos ratos exercitados e suplementados, verificado pelo tempo de exploração no objeto novo significativamente menor desses animais em relação aos do grupo controle. Nossos dados corroboram pesquisa anterior que demonstrou que a suplementação trouxe incorporação aumentada de DHA nos níveis plasmáticos de animais não primatas sem observar benefícios para a memória espacial no teste de Barnes (LANGUILLE, AUJAR e PIFFERI, 2012). Contrapondo nossos dados, Pudell *et al.* (2014) encontraram incorporação aumentada de DHA nas membranas hipocâmpais e melhora na memória espacial nos animais suplementados com óleo de peixe. No trabalho de Pudell, a memória foi avaliada pelo mesmo teste comportamental utilizado na atual pesquisa, entretanto os animais experimentais receberam suplementação indireta nas fases de gestação e amamentação, períodos extremamente sensíveis a modulações do SNC.

Ferraz *et al.* (2011) usando do modelo de estresse por imobilização crônica, verificaram o aumento dos hormônios corticosteroides, da ansiedade e, prejuízos cognitivos em ratos adultos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. No entanto, os animais suplementados com óleo de peixe apresentaram reduzidos níveis de ansiedade e melhora no aprendizado neste teste comportamental. Com relação a memória e a suplementação com óleo de peixe, no nosso estudo não reverteu os prejuízos advindos do protocolo de exercício físico adotado.

A diferença que melhor pode explicar os resultados contraditórios acima citados é que o evento estressante na nossa análise iniciou-se no mesmo momento que a suplementação. Na pesquisa de Ferraz *et al.* (2011) a suplementação ocorreu anteriormente ao protocolo de imobilização (69 dias antes). A partir disso, podemos supor que se nosso protocolo de suplementação tivesse começado antes do protocolo de exercício físico, os ratos submetidos a suplementação poderiam ter sido beneficiados pelo OP e protegidos dos efeitos deletérios induzidos pelo estresse induzido pela atividade física.

Considerando a incorporação de DHA nos ratos suplementados e a não reversão dos efeitos deletérios sobre a memória induzidos pelo exercício, delineamos a relação deste ácido graxo com os níveis das neurotrofinas. O DHA pode ser convertido em uma neuroproteína chamada D1 (NPD1) que pode elevar os níveis de BDNF por meio de mecanismos de sinalização (WU, YING e GOMEZ-

PINILLA, 2008) e já está bem descrito na literatura o papel central que o BDNF tem em otimizar a habilidade do exercício nas melhoras dos processos mnemônicos (GOMEZ-PINILLA, VAYNMAN e YING, 2008). Neste estudo, de forma oposta, a suplementação causou a incorporação de DHA nos ratos suplementados e submetidos ao exercício físico, mas não conseguiu reverter a diminuição dos níveis do BDNF na presente pesquisa, e bem como já discutido no parágrafo anterior, os prejuízos na memória espacial. Os resultados do BDNF são contrários aos dados do estudo de Pudell *et al.* (2014) que a partir da suplementação com AGPIs protegeu os ratos experimentais contra a diminuição dos níveis desta neurotrofina, induzida por modelo de depressão, a bulbectomia e de Vines *et al.* (2012) que reproduziram aumentos nos níveis de BDNF em ratos adultos a partir da suplementação com AGPIs em fases críticas de desenvolvimento. A dose de AGPI utilizada em nosso estudo foi a mesma dos estudos de Pudell e Vines, entretanto em nossa análise, a suplementação iniciou-se a partir do 30º dia de vida dos ratos. Muito embora, o 30º dia de vida represente uma fase de grande plasticidade encefálica na formação do sistema nervoso, os autores descritos acima utilizaram a suplementação durante a fase de gestação e lactação das matrizes, fase que parece ser extremamente crítica no sentido de providenciar alterações nos níveis de BDNF, neurotransmissores e, possivelmente alterações morfológicas que persistem até a fase adulta do animal experimental as expensas de suplementação posterior ao nascimento.

Outra vertente desta pesquisa foi estudar a memória dos ratos suplementados e submetidos ao exercício físico após uma interrupção destes protocolos. Após a interrupção das intervenções por 21 dias (101 dias de vida), foi encontrado que os prejuízos à habilidade de aprender se mantiveram nos grupos CE. Alguns autores encontraram efeitos remanescentes do exercício nos processos cognitivos após interrupção do protocolo (RADÁK *et al.*, 2006; BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010). McCormick *et al.* (2012) encontraram diminuição na memória espacial no teste de localização de objetos em ratos na idade adulta expostos a situação de estresse na adolescência. Estes autores citam ainda que o baixo desempenho no teste de labirinto de Morris foi associado a uma modificação estrutural (diminuição do volume hipocampal) várias semanas após os ratos serem exercitados. Nem todos os estudos são consistentes em mostrar melhorias na aquisição e retenção, sugerindo, como citado anteriormente, que os efeitos do exercício sobre os diferentes aspectos da cognição podem depender de fatores

como a duração da exposição ao exercício, tipo de exercício realizado (por exemplo, forçado *versus* voluntário), dificuldade da tarefa, ou outras variáveis (BERCHTOLD, CASTELLO e COTMAN, 2010). Ao que tudo indica, na presente pesquisa, os ratos muito jovens que foram submetidos ao exercício não voluntário por longo período, tiveram danos estruturais e de função induzidos pelo estresse crônico que a atividade produziu. Após a interrupção de 21 dias do exercício físico, o tecido neural não foi capaz de reestabelecer sua homeostasia por conta dessas modificações terem ocorrido em uma fase plástica e extremamente sensível do SNC. A consequência deste processo foi percebida, então, além da manutenção do prejuízo cognitivo a manutenção de baixos níveis de BDNF nos ratos exercitados, mesmo após a atividade física ter sido cessada. Pesquisa prévia traz dados que mostram que ratos exercitados e destreinados por 8 semanas apresentaram níveis de BDNF abaixo dos níveis dos ratos controle sedentários (RADÁK *et al.*, 2006). Outros trabalhos associam baixos índices de BDNF a prejuízos no aprendizado (GOMEZ-PINILLA, 2008; COTMANN e BERCHTOLD, 2002) e o bloqueio dos receptores de BDNF no hipocampo por moléculas específicas durante 5 dias de exercício voluntário reduziu a habilidade de aprender (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004).

Outros dados de nossa pesquisa revelam que após 21 dias de interrupção de suplementação, não foi possível verificar incorporação de DHA. Acreditamos que à medida que os animais foram mantidos sem esta intervenção, o DHA incorporado anteriormente às membranas tenha sido degradado através da ação catalítica da fosfolipase A. Os ácidos graxos são liberados no compartimento citosólico e agem em várias vias, incluindo neuroinflamação, apoptose e sobrevivência celular. Assim, mais de 90% dos AGPIs liberados são rapidamente reesterificados e devolvidos à bicamada fosfolipídica. Parte restante dos AGPIs livres é utilizada tanto no fornecimento de energia para as células através de vias específicas de degradação, tais como reações de beta oxidação na mitocôndria ou estão envolvidos como mensageiros lipídicos que podem desencadear cascatas de sinalização intracelular, incluindo a apoptose, processos inflamatórios e de proliferação (BAZINET *et al.*, 2005). Logo na ausência da suplementação, não conseguimos mais verificar a incorporação do DHA nas membranas dos ratos suplementados.

No entanto, de forma surpreendente, após a interrupção de 21 dias do exercício físico e da suplementação com OP, a suplementação foi capaz de reverter

os danos no aprendizado e normalizar os níveis da neurotrofina nos ratos OPE. Os AGPIs podem promover o crescimento e/ou aumentar o tamanho dos neurônios em CA1 e CA3, importantes regiões do hipocampo, regular a excitose, o tráfego de vesículas, a endocitose e a liberação de glutamato, bem como aperfeiçoar a eficiência sináptica e modular a captação de glutamato pelos astrócitos evitando a excitotoxicidade que parece ser o principal evento induzido pelo estresse crônico que desencadeia os danos no aprendizado (HENEEBELLE *et al.*, 2014). A partir destes dados, podemos inferir que, após a interrupção do exercício, na ausência do estímulo estressante, o DHA ofertado durante cinquenta dias foi capaz de reestruturar morfológicamente as regiões neurais afetadas e conseqüentemente suas funções, reestabelecendo os níveis do BDNF e a capacidade de aprender dos ratos do grupo OPE.

Pudemos verificar ainda a influência do exercício físico, mesmo após 21 dias de interrupção, no equilíbrio redox do encéfalo. Foi identificada neste momento a atividade exacerbada da GPx nos ratos do grupo CE. A GPx é a primeira enzima responsável pela destruição do excesso de peróxido de hidrogênio formado nos tecidos neurais (AYDIN *et al.*, 2009, MAROSI *et al.*, 2012) e sua elevada atividade pode indicar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio que não estão sendo devidamente metabolizadas, mas apenas no caso de estar relacionada à razão muito baixa entre GSH:GSSG, ou ainda, pelo acúmulo da GSSG no tecido estudado (BAINS e SHAW, 1997). Entretanto, em nossa pesquisa, apesar de encontrarmos exacerbada atividade desta enzima, não encontramos alteração nesta razão ou acúmulo da glutathiona reduzida nos ratos exercitados em relação ao grupo C, ou seja, esta alteração representa novamente uma melhora da capacidade antioxidante dos animais em questão. Desta forma podemos concluir que não há relação alguma do prejuízo no aprendizado e da alteração dos níveis de BDNF com a alteração da atividade da GPx nos ratos do grupo CE, quando testados após 21 dias de interrupção.

Diferentes formas de exercício resultam em diferentes respostas ao estresse em determinado tecido. A natação é um tipo de atividade que causa outras formas de estresse e as respostas a esforços aeróbicos são altamente variadas (AGUIAR Jr *et al.*, 2008). Os dados encontrados neste trabalho nos permitem concluir que as características do protocolo de exercícios (não voluntário, realizado em ambiente hostil e de intensidade moderada a intensa) aplicado em período crítico de

desenvolvimento do SNC foi o estímulo responsável por causar alterações morfológicas e estruturais no encéfalo dos animais experimentais, resultando em prejuízos na memória e alteração nos níveis da neurotrofina. A suplementação com óleo de peixe que pode influenciar os processos mnemônicos de forma restauradora não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do exercício, enquanto este estímulo estressor não foi interrompido. Acreditamos que a partir da ausência do exercício físico, e enquanto não totalmente degradado, o óleo de peixe foi capaz de reverter as modificações induzidas pelo exercício, reestabelecendo e modulando a capacidade de aprendizado dos ratos e os complexos processos moleculares associados.

PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Tendo em vista encontrarmos prejuízos no aprendizado a partir da realização do exercício físico, e posteriormente após sua interrupção a reversão destes danos conjuntamente com a ação da suplementação com óleo de peixe, faz-se necessário entender melhor os mecanismos envolvidos neste processo.

Acreditamos que outras análises, tal como a atividade da AKt e da AKt fosforilada devem ser avaliadas, já que a sinalização envolvendo estas duas moléculas fazem parte dos mecanismos de sobrevivência neuronal e estão relacionados com a memória e a aprendizagem. Estamos em andamento com estas novas análises que serão úteis para esclarecer a relação encontrada entre o prejuízo na memória, o exercício físico e o óleo de peixe.

9 CONCLUSÕES

Os protocolos de exercícios e de suplementação utilizados aqui foram capazes de causar influência no aprendizado apenas quando administrados em longa janela temporal.

As alterações foram percebidas logo após o término das intervenções e posteriormente na vida adulta, apesar das intervenções terem sido aplicadas em ratos em fases críticas do desenvolvimento do SNC.

Os efeitos da suplementação e do exercício físico aplicados ratos em fases críticas do desenvolvimento do SNC foram percebidos logo após o término destas intervenções, assim como posteriormente, na vida adulta.

O protocolo de exercício físico utilizado neste estudo trouxe prejuízos aos processos ligados ao aprendizado e à memória.

Efeitos remanescentes da suplementação com óleo de peixe foram observados na reversão dos danos causados pelo exercício apenas quando o evento causador foi cessado, ou seja, após 21 dias de interrupção de ambas as intervenções.

REFERENCIAS

AAN HET ROT, M.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. Review. **CMAJ**, vol.180, n.3, p.305-313, 2009.

ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, vol. 11, p.180-187, 2001.

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, vol.40, p.1707-1712, 1994.

AGUIAR Jr, A.S; TUON, T.; PINHO, C.; SILVA, L.A.; ANDREAZZA, A.C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.; PINHO, R. Intense Exercise Induces Mitochondrial Dysfunction in Mice. **Brain. Neurochem Res** vol.33, p.51–58, 2008.

AGUIAR Jr, A.S.; ARAÚJO, A.L.; CUNHA, T.R.; SPECKA, A.E.; IGNÁCIO, Z.M.; MELLO, N.; PREDIGER, R.D.S. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, vol.79, p.452–457, 2009.

AGUIAR Jr, A.S.; BOEMER, G.; RIAL, D.; CORDOVA, F.M.; MANCINI, G.; WALZ, R.; DE BEM, A.F.; LATINI, A.B.; LEAL, R.; PINHO, R.A.; PREDIGER, R.D.S. High-Intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, vol.171, p.1216–1227, 2010.

AGUIAR Jr, A.S.; CASTRO, A.A; MOREIRA, E.L.; GLASER, V.; SANTOS, A.R.S; TASCA, C.I.; LATINI, A.; PREDIGER, R.D.S. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mechanisms of Ageing and Development**, vol.132, p.560–567, 2011.

AIRES, M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ALAEI, H.; MOLOUDIA, R.; SARKAKIB, 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**, vol.12, p.72–75, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ALMEIDA, A.A.; SILVA, S.G.; FERNANDES, J.; PEIXINHO-PENA, L.F.; SOCRZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A.; ARIDA, R.M. Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. **Neuroscience Letters**, vol.553, p.1– 6, 2013.

ALOMARI, M.A.; KHABOUR, O.F.; ALZOUBI, K.H.; ALZUBI, M.A. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. **Behavioural Brain Research**, vol.247, p.34 – 39, 2013.

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**, vol.70, 2000.

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. **J Pharmacol Sci**, vol.108, p.227 – 238, 2008.

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**, vol.15, p.9 -12, 2008.

AZMITIA, E. C. Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharm**, vol.21, n.2s, p.33S-45S, 1999.

AYDIN, C.; SONAT, F.; SAHIN, S.K.; CANGUL, I.T.; OZKAYA, G. Long term dietary restriction ameliorate swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol.47, p.24-31, 2009.

BAINS, J.S.; SHAW, C. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Research Reviews**, vol.25, p.335–358, 1997.

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. **Neurobiology of Aging**, vol.12, p.47-53. 1991.

BENOIT, C.; ROWE, W.B.; MENARD, C.; SARRET, P.; QUIRION, R. Genomic and proteomic strategies to identify novel targets potentially involved in learning and memory. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol.32, n.1, 2011.

BERCHTOLD, N.C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C.W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, vol.167, p.588–597, 2010.

BIRZNIECE, V.L.; BACKSTRÖM, T.; JOHANSSON, I.M.; LINDBLAD, C.; LUNGGREN, 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 Reviews**, vol.51, p.212-239, 2006.

BLUSTEIN, J.E.; McLAUGHLIN, M.; HOFFMAN, J.R. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. **Physiology & Behavior**, vol.89, p.582–586, 2006.

BOMPA, T. **Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento**. 4 ed. São Paulo: Phorte Editora, 2002.

BOUSQUET, M.; CALONA, F.; CICCHETTI, F. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, vol.10, p.453-463, 2011.

BRASZKO, J.; KAMINSKI, K.A.; HTYSZKO, T.; JEDYNAK, W.; BRZOSKO, S. Diverse effects of prolonged physical training on learning of the delayed non-matching to sample by rats. **Neuroscience Research**, vol.39, p.79–84, 2001.

BRONIKOWSKI, A.M.; CARTER, P.A.; SWALLOW, J.G.; GIRARD, I.A.; RHODES, J.S.; GARLAND Jr, T. Open-Field Behavior of House Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel-Running. **Behavior Genetics**, vol.31, n.3, 2001.

CETINKAYA, C.; SISMAN, A.R.; KIRAY, M.; CAMSARI, U.M.; GENCOGLU, C.; BAYKARA, B.; AKSU, I.; UYSAL, N. Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. **Neuroscience Letters**, vol.579, p.177-181, 2013.

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**, vol.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**, vol.1341, p.32–40, 2010

CONNOR, W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am J Clin Nutr**, vol.71 (suppl):171S–5S, 2000.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **TRENDS in Neurosciences**, vol.25, n.6, 2002.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C.; LORI-ANN, C. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **TRENDS in Neurosciences**, vol.30, n.9, 2007.

DA SILVA, T.M.; MUNHOZ, R.P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, A.; ANDEATINI, R.; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-2 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**, vol.111, p.351-359, 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**, vol.66, p.256–264, 2010.

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

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, vol.62, p.649-671, 2000.

DRUMOND, L.E.; GONÇALVES MOURÃO, F.A.; LEITE, H.R.; ABREU, R.V.; REIS, H.J.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S.; MASSENSINI, A.R. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. **Brain Research Bulletin**, vol.88, p.385–391, 2012.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol.58, p.39–46, 2004.

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; BRADFORD, A.; AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats, in anxiety, object recognition and object locations tasks. **Behavioural Brain Research**, vol.159, p.247-266, 2005.

ERICKSON, K.; VOSS, M.W.; PRAKASH, R.S.; BASAK, C.; SZABO, A.; CHADDOCK, L.; KIM, J.S.; HEO, S.; ALVES, H.; WHITE, S.M.; WOJCICKI, T.; MAYLE, E.; VIEIRA, V.; MARTIN, S.A.; PENCE, B.D.; WOOD, J.A.; McAULEY, E.; KRAMER, A. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **PNAS**, vol.108, n.7, p.3017–3022, 2011.

FEDOROVA, I.; HUSSEIN, N.; BAUMANN, M.; DI MARTINO, C.; SALEM Jr, N. An n-3 Fatty Acid Deficiency Impairs Rat Spatial Learning in the Barnes Maze. **Behavioral Neuroscience**, vol.123, n.1, p.196–205, 2009.

FERRAZ, A.C.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; SALES, 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**, vol.78, p.183-188, 2008.

FERRAZ, A.C.; DELATTRE, A.M.; ALMENDRA, R.G.; SONAGLIA, M.; BORGES, C.; ARAUJO, P.; ANDERSEN, M.L.; TUFIK, S.; LIMA, M.M.S.; Chronic n-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**, vol.219, p.116–122, 2011.

FURINI, C.R.G.; MYSKIW, J.C.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. New frontiers in the study of memory mechanisms. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, vol.35, p.173-177, 2013.

GARCIA-CAPDEVILA, S.; PORTELL-CORTÉS, I.; TORRAS-GARCIA, M.; COLL-ANDREU, M.; COSTA-MISERACHS, D. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. **Behavioural Brain Research**, vol.202, p.162–170, 2009.

GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, vol.130, p.21-27, 2001.

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**, vol.16, p.326–331, 2006.

GOMES DA SILVA, S.; DONA, F.; FERNANDES, M.J.S.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A.; ARIDA, R.M. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain & Development**, vol.32, p.137–142, 2010.

GOMES DA SILVA, S.; UNSAIN, N.; MASCO, D.H., TOSCANO-SILVA, M.; AMORIM, H.A.; ARAÚJO, B.H.S.; SIMÕES, P.S.R.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; MORTAR, 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**, vol.22, p.347–358, 2012.

GOMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews – Neuroscience**, vol.9, 2008.

HASHIMOTO, K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. Review **Psych Clin Neurosc**, vol.64, p.341–357, 2010.

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**, vol.168, p.130–137, 2010.

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

GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; MACHEFER, G.; CHEVANNE, M.; VINCENT, S.; SERGENT, O.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. **Eur J Appl Physiol**, vol.89, p.14–20, 2003.

HENNEBELLE, M.; CHAMPEIL-PETOKAR, G.; LAVIALLE, M.; VANCASSEL, S.; DENIS, I. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and chronic stress-induced modulations of glutamatergic neurotransmission in the hippocampus. **Nutrition Review**, vol.72, p.99–112, 2014.

HARKIN, A.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. **Clinical Neuroscience Research**, vol.3, p.253–262, 2003.

HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, vol.70, p.361–372, 2004.

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

KHABOUR, O.F.; ALZOUBI, K.H.; ALOMARI, M.A.; ALZUBIB, M.A. Changes in Spatial Memory and BDNF Expression to Concurrent Dietary Restriction and Voluntary Exercise. **Hippocampus**, vol.20, p.637–645, 2010.

KHABOUR, O.F.; ALZOUBI, K.H.; ALOMARI, M.A.; ALZUBIB, M.A. Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. **Brain Research Bulletin**, vol.90, p.19–24, 2013.

KENNARD, J.A.; WOODRUFF-PAK, D. A comparison of low- and high-impact forced exercise: Effects of training paradigm on learning and memory. **Physiology & Behavior**, vol.106, p.423–427, 2012.

LABELLE, V.; BOSQUET, L.; MEKARY, S.; BHERER, L. Decline in executive control during acute bouts of exercise as a function of exercise intensity and fitness level. **Brain and Cognition**, vol.81, p.10–17, 2013

LANGUILLE, S.; AUJARD, F.; PIFFERI, F. Effect of dietary fish oil supplementation on the exploratory activity, emotional status and spatial memory of the aged mouse lemur, a non-human primate. **Behavioural Brain Research**, vol.235, p.280–286, 2012.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; JORGENSEN, M.H.; MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain *n*-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progress in Lipid Research**, vol.40, p.1-94, 2001.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. Ed: Ateneu, 2004.

LICINIO, J.; DONG, C.; WONG, M-L. Novel Sequence Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Association With Major Depression and Antidepressant Treatment Response. **Arch Gen Psych**, vol.66, p.488-497, 2009.

LOU, S.J.; LIU, J.Y.; YANG, R.Y.; CHEN, P.J. Treadmill running enhances the ability of learning in young rats. **Sheng Li Xue Bao**, vol.58, p.365–369, 2006.

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

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neuroscience**, vol.27, n.10, p.589-94, 2004.

MARCELINO, T.B.; LONGONI, A.; KUDO, K.Y.; STONE, V.; RECH, A.; DE ASSIS, A.M.; SCHERER, E.B.S.; DA CUNHA, M.J.; WYSE, A.T.S.; PETTENUZZO, L.F.; LEIPNITZ, G.; MATTÉ, C. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young wistar rats. **Neuroscience**, vol.246, p.28–39, 2013.

MARLATT, M.W.; POTTER, M.C.; LUCASSEN, P.J.; PRAAG, H.V. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57Bl/6J mice. **Developmental Neurobiology**, vol.72, p.943-952, 2012.

MAROSI, K.; BORI, Z.; HART, N.; SÁRGA, L.; KOLTAI, E.; RADÁK, Z.; NYAKAS, C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience**, vol.226, p.21–28, 2012.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. Rev. **Neuropsychopharm**, vol.33, p.73-83, 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**, vol.31, p.12-26, 2007.

McCORMICK, C.M.; MATHEWS, I.Z. Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. **Prog Neuro-Psychopharmacol, Biol Psychiatry**, 2010.

McCORMICK, C.M.; THOMAS, C.M.; SHERIDA, C.S.; NIXON, F.; FLYNN, J.A.; MATHEWS, I.Z. Social Instability Stress in Adolescent Male Rats Alters Hippocampal Neurogenesis and Produces Deficits in Spatial Location Memory in Adulthood. **Hippocampus**, vol.22, p.1300–1312, 2012.

MELLO, P.B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol.80(2), p.301-309, 2008.

MOLTENI, R.; WU, A.; VAYNMAN, S.S.; YING, Z.; BARNARD, R.J.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise Reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, vol.123, p.429–440, 2004.

MOTOHASHI, K.; YAMAMOTO, Y.; SHIODA, N.; KONDO, H.; OWADA, Y.; FUKUNAGA, K. Role of heart-type fatty acid binding protein in the brain function. **Yakugaku Zasshi**, vol.129(2), p.191-195, 2009.

MYTILINEOU, C.; KRAMER, B.C.; YABUT, J.A. Glutathione depletion and oxidative stress. **Parkinsonism and Related Disorders**, vol.8, p.385–387, 2002.

NALIWAIKO, K.; ARAÚJO, R.L.F.; DA FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; MARTINS, E.F.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, vol.7, n.2, p.91–99, 2004.

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

PELUSO, M.A.M.; ANDRADE, L.H.S.G. Physical activity and mental health: the association between exercise and mood. **Clinics**, vol.60(1), p.61-70, 2005.

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

PRAAG, H.V.; SHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F.H. Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. **The Journal of Neuroscience**, vol.25(38), p.8680–8685, 2005.

PUDELL, C.; VICENTE, B.A.; DELATTRE, A.M.; CARABELLI, B.; MORI, M.A.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R.B.; ZANATA, S.M.; VISENTAINER J.; SANTOS Jr., O.O.; LIMA, M.M.S.; FERRAZ, A.C. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. **European Journal of Neuroscience**, vol.39, p.266–274, 2014.

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

RADÁK, Z.; CHUNG YOUNG, H.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, vol.44, p.153–159, 2008.

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**, vol.38, p.17-23, 2001.

RADÁK, Z.; TOLDY, A.; SZABO, Z.; SIAMILIS, S.; NYAKAS, C.; SILYE, G.; JAKUS, J.; GOTO, S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry International**, vol.49, p.387-392, 2006.

RADÁK, Z.; MARTON, O.; NAGY, E.; KOLTAI, E.; GOTO, S. The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. **Journal of Sport and Health Science**, vol.2, p.87-93, 2013.

REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **Faseb Journal**, vol.9, p.526-533, 1995.

SAUR, L.; BAPTISTA, P.P.A; SENNA, P.N.; PAIM, M.F.; NASCIMENTO, P.; ILHA, J.; BAGATINI, P.B.; ACHAVAL, M.; XAVIER, L.L. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Struct Funct**, vol.219, p.293–302 2014.

SESTAKOVA, N.; PUZSEROVA, A.; KLUKNAVSKY, M.; BERNATOVA, I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary Toxicology**, vol. 6(3), p.126–135, 2013.

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

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

STAZIAKI, P.V.; MARQUES, C.M.; DELATTRE, A.M.; DE PAULA CIONI, B.; RUFINO, M.; VILA DOS SANTOS, F.; LICKS, F.; MARRONI, N.P.; FERRAZ, A.C. Fish Oil has Beneficial Effects on Behavior Impairment and Oxidative Stress in Rats Subjected to a Hepatic Encephalopathy Model. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, vol.12, p.84-93, 2013.

STERLEMANN, V.; RAMMES, G.; WOLF, M.; LIEBL, C.; GANEA, K.; MULLER, M. B.; SCHMIDT, M. V. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. **Hippocampus**, vol.20, Issue 4, p.540–549, 2010.

TOLDY, A.; ATALAY, M.; STANDLER, K.; M. SASVÁRI, M.; J. JAKUS, J.; K. J. JUNG, K. J.; CHUNG, H. Y.; NYAKAS, C.; RADÁK, Z. The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol.20, p.974–981, 2009.

TRUDEAU, F.; SHEPHARD, R. J. Physical education, school physical activity, school sports and academic performance. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, vol.5, n.10, 2008.

TSAKIRIS, T.; ANGELOGIANNI, P.; TESSEROMATI, C.; TSAKIRIS, S.; TSOPANAKIS, C. Alterations in Antioxidant Status, Protein Concentration, Acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase Activities in Rat Brain after Forced Swimming. **Int J Sports Med**, vol.27, p.19–24, 2004.

UYZAL, N.; TUGYAN, K.; KAYATEKIN, B.M.; ACIKGOZ, O.;BAGRIYANIK, H.A.; GONEN, S.; OZDEMIR, D.; AKSU, I.; TOPCU, A.; SEMIN, I. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. **Neuroscience Letters**, vol.383, p.241–245, 2005.

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

VAYNMAN, S.S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. The Select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. **Neuroscience**, vol.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**, vol.34, p.199–211, 2009.

WU, A.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Dietary Omega-3 Fatty Acids Normalize BDNF Levels, Reduce Oxidative Damage, and Counteract Learning Disability after Traumatic Brain Injury in Rats. **Journal of Neurotrauma**, vol.21, n.10, 2004.

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

YANG, P.; EBBERT, J.O.; SUN, Z.; WEINSHILBOUM, R.M. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. **Journal of Clinical Oncology**, vol.24, n.11, 2006.

YOU DIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int. J. Devl Neuroscience**, vol.18, p.383-399, 2000.