

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Maria Luiza Gregolin Ramires

**Efeitos da atividade física sobre a memória e estresse
oxidativo plasmático e hipocampal de ratas na
senescência**

**ARAÇATUBA
2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Maria Luiza Gregolin Ramires

**Efeitos da atividade física sobre a memória e estresse
oxidativo plasmático e hipocampal de ratas na
senescência**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim

**ARAÇATUBA
2017**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Ramires, Maria Luiza Gregolin.

R173e Efeitos da atividade física sobre a memória e estresse
oxidativo plasmático e hipocampal de ratas na senescência /
Maria Luiza Gregolin Ramires. - Araçatuba, 2017
66 f. : il.; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

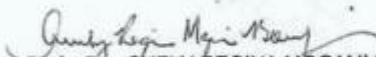
Orientadora: Profa. Suely Regina Mogami Bomfim

1. Atividade motora 2. Cognição 3. Antioxidantes
4. Hipocampo 5. Exercício 6. Memória 7. Estresse oxidativo
I. Título

CDD 612

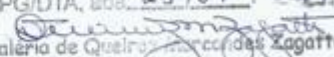
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA LUIZA GREGOLIN RAMIRES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA.

Aos 25 dias do mês de julho do ano de 2017, às 08:30 horas, no(a) Anfiteatro do CAOE (Câmpus - Rodovia), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM - Orientador(a) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP, Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP, Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA do(a) Curso de Medicina Veterinária / Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIA LUIZA GREGOLIN RAMIRES, intitulada *Efeitos da atividade física sobre a memória, estresse oxidativo hipocampal e plasmático de ratas na senescência*. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM


Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI


Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA

Confere com o original
SPG/DTA, aos 25/07/2017

Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto
Supervisor de Seção

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 16.05.1958, Birigui – SP

Filiação: Antonio Gregolin e Antonia Fracassi Gregolin

0412/1978: Curso de Graduação em Ciências Físicas, Biológicas e Matemática – Fundação Educacional de Penápolis – FUNEPE – SP.

2012/2007: Curso de Graduação em Psicologia – Faculdade da Fundação Educacional de Araçatuba – FAC-FEA – SP.

1012/2009: Curso de Especialização em Psicanálise: Curso Fundamental de Freud a Lacan – Universidade Anhanguera – UNIDERP - MS

2903/2014: Curso de Especialização em Psicologia do Trânsito – Faculdade de Educação, Ciências e Artes “Dom Bosco” de Monte Aprazível – SP.

2507/2017: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis – na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

,

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, amor e dedicação.

À Deus, por me conceder tempo e sabedoria na busca de meus objetivos.

Ao Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP pela oportunidade concedida para a realização do curso.

À Seção de Pós-Graduação - Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da FOA-UNESP - Araçatuba-SP, pelo acolhimento e contribuições.

À Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Araçatuba-SP, em especial aos colegas do Laboratório de Reparo Tecidual, pela acolhida e amizade.

À Profa. Dra. Ana Cláudia de Mello Stevanato Nakamune, responsável pelo laboratório de análises bioquímicas da FOA-UNESP, pelo acolhimento e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim pela orientação, compreensão e amizade dispensada durante o Curso.

Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Odair, Daniela e Marcos, Alessandra e Rodrigo, Fabiana e Luciana que me ajudaram a acreditar que os limites individuais são apenas obstáculos a serem superados continuamente em nossa vida.

Aos meus pais, que com muito sacrifício e persistência colocaram-me no caminho do saber.

A todos os meus amigos, que nas horas críticas me impulsionaram e me ensinaram que o amanhã se conquista hoje.

À Profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim, minha Orientadora, que, dotada de apurada sensibilidade no trato com seus semelhantes, tem possibilitado o desenvolvimento daqueles que a cercam.

Aos docentes do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis – da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, por suas contribuições à minha formação.

“Se não quiséssemos ser tão bons, seríamos muito melhores”.

Sigmund Freud

RAMIRES, MLG. Efeitos da atividade física sobre a memória e estresse oxidativo plasmático e hipocampal de ratas na senescência. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Há evidências que a prática regular de atividade física potencializa a memória, diminui o estresse oxidativo plasmático e hipocampal e a ansiedade na senescência. Neste trabalho foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com 13 meses de idade ao início do experimento, divididas em quatro grupos: um grupo controle (GC) e três grupos tratamento (GT1, GT2 e GT3), sendo 10 animais em cada grupo. O grupo controle foi mantido apenas sob observação. Aos grupos tratamento foram aplicados exercícios físicos e de memória, sendo que ao GT1, apenas exercícios de memória; ao GT2 escalada em escada, e ao GT3 ambos os exercícios. Os animais que foram submetidos à escalada em escada três vezes por semana durante três meses consecutivos e aos testes de memória, apresentaram melhor desempenho nas memórias de curto e longo prazo e de habituação, bem como menor ansiedade em teste de campo aberto. A baixa concentração de malonaldeído (MDA), o equilíbrio da superóxido dismutase (SOD) e o aumento da capacidade antioxidante total (Ferric Reducing Antioxidant Power- FRAP, foram observados nas amostras plasmáticas e hipocampais de ratas submetidas aos tratamentos. Concluiu-se que a prática de exercício físico regular associado a exercícios de memória melhorou as capacidades mnemônicas, diminuiu o estresse oxidativo e a ansiedade de ratas na senescência.

Palavras chave: Atividade motora, cognição, capacidade antioxidante, MDA, hipocampo.

RAMIRES, MLG. Effects of physical activity on memory, plasma and hippocampal oxidative stress of rats on senescence. [dissertation]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

There is evidence that regular physical activity enhances memory, decreases plasma and hippocampal oxidative stress, and anxiety in senescence. In this work, 40 rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), 13 months old at the start of the experiment, were divided into four groups: one control group (CG) and three treatment groups (GT1, GT2 and GT3), 10 animals in each group. The control group was kept under observation only. In the treatment groups, physical and memory exercises were applied, and to GT1, only memory exercises; to GT2 climbing stairs, and to GT3 both exercises. Animals that underwent ladder climbing three times a week for three consecutive months and memory tests showed better performance in short and long term memory and habituation as well as lower anxiety in the open field test. The low concentration of malonaldehyde (MDA), the balance of superoxide dismutase (SOD) and the increase in total antioxidant capacity (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) were observed in the plasma and hippocampal samples of rats submitted to treatments. Regular exercise practice associated with memory exercises improved mnemonic abilities, decreased oxidative stress and anxiety of rats in senescence.

Keywords: Motor activity, cognition, antioxidant capacity, MDA, hippocampus.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singleto

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

AAHPERD = American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance

ACh = acetilcolina

AE = atividade específica

AU = ácido úrico

DNA = ácido desoxirribonucléico

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EO = estresse oxidativo

ERO = espécies reativas de oxigênio

Fe^{2+} = íon ferroso

Fe^{3+} = íon férrico

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power

GABA = ácido gama-aminobutírico

GSH = glutathiona reduzida

H^+ = hidrogênio

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KCl = cloreto de potássio

LH = ácido graxo poli-insaturado

$\text{LOO}^{\cdot}$ = radical peroxila

MCD = memória de curta duração

MLD = memória de longa duração

MDA = malonaldeído

MgSO₄ = sulfato de magnésio

Mn = manganês

nm = nanômetro

O₂ = oxigênio molecular

O₂⁻ = ânion superóxido

OH· = radical hidroxila

OMS = Organização Mundial de Saúde

PET = Tomografia por emissão de pósitrons

PL = peroxidação lipídica

rpm = rotações por minuto

SOD = superóxido dismutase

TBA = ácido tiobarbitúrico

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

TPTZ = 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

EU = unidade enzimática

XD = xantina desidrogenase

XO = xantina oxidase

Zn = zinco

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Consumo médio de água (mL) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento. 35
- Figura 2. Consumo médio de ração (gramas) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento. 36
- Figura 3. Ganho de peso médio (gramas) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados semanalmente durante os três meses do experimento. 37
- Figura 4. Número de cruzamentos de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2. 39
- Figura 5. Número de elevações de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2. 39
- Figura 6. Quantidade de bolos fecais de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2. 40
- Figura 7. Tempos (segundos) de exploração dos objetos A e B (treino) e A e C (2 horas depois) para mensuração da MCD, dos grupos GT1 e GT3. 42
- Figura 8. Tempos (segundos) de exploração dos objetos A e B (treino) e A e D (24 horas depois) para mensuração da MLD, dos grupos GT1 e GT3. 42

- Figura 9. Diagrama de caixa com os valores de MDA do plasma para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 44
- Figura 10. Diagrama de caixa com os valores da FRAP do plasma para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 44
- Figura 11. Diagrama de caixa com os valores de: (a) ácido úrico e (b) albumina em função dos grupos GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 45
- Figura 12. Diagrama de caixa com os valores da FRAP do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 47
- Figura 13. Diagrama de caixa com os valores de MDA do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 47
- Figura 14. Diagrama de caixa com os valores da SOD do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física). 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Medidas descritivas do consumo de água (mL) para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.	35
Tabela 2.	Medidas descritivas do consumo de ração (gramas) para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.	36
Tabela 3.	Medidas descritivas do ganho de peso médio (gramas), para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados semanalmente durante os três meses do experimento.	37
Tabela 4.	Análise descritiva do teste de memória de habituação à exploração no campo aberto. Os dados são expressos como média e desvio padrão do número de cruzamentos, quantidade de elevações e de bolos fecais para os grupos GT1 (memória) e GT3 (memória + atividade física).	38
Tabela 5.	Análise descritiva do teste de reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como média e desvio padrão do número de explorações dos objetos A e B, A e C e A e D, respectivamente, para os grupos GT1 (memória) e GT3 (memória + atividade física)	41

Tabela 6.	Análise descritiva do plasma sanguíneo, médias e respectivos desvios padrão para as respostas MDA e FRAP em função dos grupos GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).	43
Tabela 7.	Análise descritiva do plasma, médias e respectivos desvios padrão para as variáveis ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (U/L), AST (U/L), creatinina (mg/dL), FA (U/L), PT (g/dL) e uréia (mg/dL) em função dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).	45
Tabela 8.	Análise descritiva do hipocampo, médias e respectivos desvios padrão para as variáveis MDA, FRAP e SOD em função dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo Geral.....	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Animais.....	28
4.2	Atividade Física.....	28
4.3	Testes de Memória.....	29
4.3.1	Campo Aberto.....	29
4.3.2	Exercício de Reconhecimento de Objetos.....	29
4.4	Coleta de amostras.....	30
4.5	Análises laboratoriais.....	31
4.5.1	Preparo do Homogenato.....	31
4.5.2	Determinação da Concentração de Proteínas.....	31
4.5.3	Determinação da Peroxidação Lipídica.....	31
4.5.4	Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT Frap).....	32
4.5.5	Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	32
4.5.6	Determinação do Perfil Bioquímico.....	32
4.6	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Consumo de Ração e Água pelas Ratas e Peso Corporal.....	34
5.2	Testes Comportamentais e de Memória.....	38
5.2.1	Teste de Memória de Habituação à Exploração no Campo Aberto.....	38
5.2.2	Teste de Reconhecimento de Objetos.....	41
5.3	Análises Bioquímicas para Estresse Oxidativo.....	43
5.3.1	Plasma Sanguíneo.....	43
5.3.2	Hipocampo.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49

7	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXOS.....	65
	ANEXO 1 Certificado de Aprovação do Comitê de Ética.....	66

1 INTRODUÇÃO TEÓRICA

O envelhecimento ou senescência (PAPALEO, 2007) pode ser conceituado como a deterioração estrutural e funcional dos sistemas fisiológicos em função da incapacidade de adaptação celular ao longo dos anos, proporcionando maiores riscos de lesões e doenças crônicas (LATA & ALIA, 2007; FARINATTI, 2002). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE-2010), na década de 40, a proporção de brasileiros com mais de 60 anos era cerca de 4% e a estimativa para esta população para 2020 é de 12%. Além disso, o número de idosos acima de 80 anos aumenta significativamente, constituindo um desafio para a medicina e políticas públicas, considerando-se o alto índice de doenças degenerativas do sistema nervoso central como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson (MACHADO, 2004).

A atividade física pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pela musculatura esquelética o qual resultará em gasto energético. O exercício físico é uma das formas de atividade física, dentre as quais compreende todo movimento corporal repetitivo, estruturado e planejado resultando em uma melhora ou manutenção de um ou mais componentes da aptidão física (CASPERSEN et al., 1985).

Durante o exercício físico, ocorrem diversas adaptações fisiológicas, sendo necessários ajustes cardiovasculares e respiratórios para compensar e manter o esforço realizado. Os seres vivos dependem do oxigênio para manter suas funções vitais, sendo que 95% do total é usado para formar energia por diferentes processos enzimáticos (COSTA, 2012). Entretanto, 5% do oxigênio participa da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). O exercício físico aumenta o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, causa o aumento da produção de ERO. A propósito, as ERO caracterizam-se como átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados em seu orbital mais externo, tornando-se altamente instáveis, susceptíveis ao pareamento. Para se estabilizar, as ERO cedem ou retiram elétrons de átomos ou moléculas na sua vizinhança tornando-os, por sua vez, em novas espécies, ocorrendo verdadeiras cascatas oxidativas. Em situações adversas, o aumento de ERO determina a incapacidade do organismo em inibir sua produção, associada a alterações estruturais celulares e quadros patológicos como aterosclerose, síndrome

da isquemia-reperfusão, doenças reumáticas, câncer, doenças pulmonares, além de envelhecimento, entre outros (ZANELLA et al., 2007; PEREIRA, 2013). Dentre as ERO conhecidas, as de maior destaque são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) e oxigênio singlete (1O_2).

Denomina-se estresse oxidativo o desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo. Dessa forma, o estresse oxidativo é definido como um aumento da produção de ERO resultando em danos em células, tecidos e órgãos (PEAKE & SUZUKI, 2004).

O exercício físico associado ao dano oxidativo está relacionado com o tipo e a intensidade do exercício (PINHO et al., 2006).

Na senescência (13 meses) e início da perimenopausa das ratas, instala-se gradativamente o processo de desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a ação das ERO, levando ao quadro de estresse oxidativo (JONES, 2006). Por meio da dieta, atividade física e hábitos saudáveis é possível prolongar o período de equilíbrio bem como regenerar células e tecidos danificados pelo estresse oxidativo (BOWLER, 1992). A atividade física reduz o estresse oxidativo por promover o aumento das enzimas antioxidantes e diminuir a peroxidação lipídica, minimizando a taxa de MDA que é um aldeído altamente tóxico e mutagênico ao organismo (HALLIWELL, 1991; DEANGELIS, 2007; RAMESH, 2012; POSADAS, 2009).

O estresse oxidativo é o responsável pelo envelhecimento. A produção exacerbada e contínua de ERO leva ao consumo das defesas antioxidantes orgânicas, assim, essas substâncias reagem com componentes celulares e teciduais, acarretando em peroxidação lipídica (PL) e danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) celular que favorece a apoptose (ZAMZAMI et al., 1996).

Alguns derivados da PL podem sofrer decomposição formando aldeídos, como o malonaldeído (MDA), mutagênico ao organismo e altamente tóxico (NIKI, 2012). O MDA pode interagir com biomoléculas, como proteínas e DNA, formando produtos, que se não reparados podem ocasionar vários processos patológicos ao organismo. O MDA é frequentemente utilizado como biomarcador de estresse oxidativo (RAMESH et al., 2012).

Os sistemas antioxidantes endógenos são divididos em enzimático e não enzimático são capazes de regenerar ou prevenir a oxidação do substrato oxidável (HALLIWELL, 1991; BARBOSA et al., 2010). Várias enzimas compõem o sistema

antioxidante enzimático; dentre elas, a enzima superóxido dismutase (SOD), considerada uma das mais importantes na linha de defesa contra as ERO (BOWLER et al., 1992; ZELKO et al., 2002; BARBOSA, 2010). O sistema antioxidante não enzimático extracelular, pode ser mensurado em plasma sanguíneo, sendo composto principalmente pelo ácido úrico, albumina e compostos obtidos pela alimentação como: vitaminas, polifenóis e outros (VASCONCELOS et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; FREITAS, 2010). Algumas atitudes comportamentais também podem aumentar as defesas antioxidantes do organismo como a prática regular de atividade física (TIRAPEGUI, 2006; LUCENA, 2010).

O ácido úrico que é um derivado do metabolismo das purinas, é produzido pela oxidação da hipoxantina e xantina pela xantina oxidase (XO) e xantina desidrogenase (XD). Atua como antioxidante devido a sua capacidade de quelar metais de transição e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes (GHISELLI et al., 2000).

Segundo Lucena (2010), outro importante antioxidante endógeno é a albumina, que também participa da linha de defesa do organismo. Proteínas plasmáticas como a albumina podem sofrer oxidação pela ação de ERO, também se constituindo numa forma de defesa do organismo, principalmente porque nos líquidos extracelulares o sistema de defesa antioxidante enzimático não possui grande participação na redução de espécies radicalares, uma vez que este sistema exerce suas funções principalmente dentro dos compartimentos celulares.

O método para determinação da capacidade antioxidante (FRAP) do plasma e hipocampo é comumente utilizado em função de sua confiabilidade e facilidade de execução (TIRAPELI, 2014).

Uma das hipóteses para o envelhecimento do sistema nervoso é a de que este é resultado do acúmulo passivo de alterações nos ácidos nucleicos das células. Um dos principais processos para estas alterações no DNA seria o acúmulo de moléculas danificadas por ERO (BARBOSA, 2010), os quais são formados através de complexas reações químicas que quebram as moléculas livres de oxigênio (O_2). Estas reações formam moléculas simples deste elemento químico que são altamente reativas e tendem a ligar-se com quaisquer outras moléculas que encontrem sendo prejudicial ao sistema nervoso, pois este sistema é altamente

vulnerável ao dano oxidativo (HAYFLICK, 1997; GIOVANNELLI, 2003; ARUOMA, 1998).

O aumento de ERO nas células do sistema nervoso pode ocorrer em função do alto consumo de oxigênio pelo cérebro, da dependência do metabolismo aeróbio de carboidratos, da complexa formação lipídica em suas membranas e a diminuição da capacidade de eliminar as moléculas de ERO, ou seja, a queda nos mecanismos antioxidantes, que talvez seja um dos fatores de maior influência (BERNHARDI, 2005). O acúmulo de ERO é responsável pela formação de placas neuríticas, pela aglomeração de pigmentos nas células e por determinadas ligações cruzadas capazes de afetar o DNA, que tendem a aumentar seu número com o passar dos anos por falta de atividades físicas. Estas alterações prejudicam a ligação entre várias proteínas como o colágeno, interferindo nos processos metabólicos pela obstrução da passagem de nutrientes e resíduos para dentro e fora da célula (HAYFLICK, 1997).

Algumas mutações sofridas por determinadas proteínas ao longo da vida, resultam por esgotar os genes responsáveis por determinados fenótipos, levando a degeneração morfofuncional do sistema nervoso (LENT, 2001).

Ainda segundo a teoria de alterações no DNA, (MORA & PORRAS, 1998), apontam para a teoria do encurtamento dos telômeros, que leva à conclusão de que em cada divisão celular poderia ocorrer uma perda de certa parte do DNA. Porém, esta teoria ainda não está clara no que se refere a sua associação com o envelhecimento.

O envelhecimento do sistema nervoso é resultado de programação genética, ou seja, pelo processo conhecido como apoptose (morte celular programada), processo que pode ser atenuado pela prática frequente de atividades físicas e exercícios de memória (MORA & PORRAS, 1998).

O cérebro dos idosos possui tamanho e peso cerca de 10 a 15% menores, giros mais finos e sulcos mais abertos e profundos, resultando em córtices menores comparados aos indivíduos jovens (LENT, 2001). O declínio do volume cerebral apresenta-se mais precocemente na mulher do que no homem em função da diminuição da produção do hormônio estrógeno a partir da menopausa. Em ratas, os níveis de estrógeno estão relacionados à densidade das espinhas dendríticas, ao

número de espinhas e sinápses; também estão associados à neuroproteção, ao crescimento e à função neural (CANÇADO & HORTA, 2002; BERNHARDI, 2005),

Para amenizar a passagem do tempo, o cérebro conta com um mecanismo compensador: a plasticidade neural, que é a capacidade adaptativa das estruturas e funções do sistema nervoso em função de interações com o ambiente interno e/ou externo, ou ainda como resultado de lesões (FERRARI, 2001). A plasticidade atua de maneira a contrabalançar a degeneração neural, ou seja, permite aos neurônios criar novas conexões, desenvolver-se criando novas sinápses, restaurando circuitos reduzidos ou rompidos; a plasticidade não parece ser influenciada pela idade, podendo ser estimulada em qualquer idade.

Neurônio é a unidade fundamental do tecido nervoso com a finalidade de receber, processar e enviar informações, sendo composto por três estruturas fundamentais: corpo celular, dendritos e axônio (BEAR, 2002). São células altamente excitáveis que se comunicam entre si pelas modificações do potencial elétrico de membrana dentro e fora da célula, que em repouso está entre -60 a -70mV. Através dos canais iônicos, os íons atravessam a membrana permitindo alterações deste potencial, transmitindo o impulso nervoso. Os neurônios se comunicam entre si e com outras células passando-lhes informações; os locais em que se efetuam estes contatos são chamados sinápses, que podem ser elétricas ou químicas (KANDEL et al., 2003).

Interessam ao propósito deste trabalho apenas as sinápses químicas por serem predominantes nas comunicações interneuronais, onde ocorre liberação de substâncias químicas, denominadas neurotransmissores ou mensageiros químicos, armazenados nas vesículas sinápticas dos neurônios pré-sinápticos. Quando este neurônio sofre um potencial de ação, as vesículas pré-sinápticas liberam o neurotransmissor na fenda sináptica (espaço que separa as membranas em oposição) que se liga aos receptores da membrana pós-sináptica, sendo que uma parte sofre recaptação pelos canais de recaptação da membrana pré-sináptica, ou degradação por enzimas específicas ainda na fenda sináptica. Do tronco encefálico há projeções longas de grupos celulares que são definidos pelos seus neurotransmissores. Conforme Kandel et al., (2003), “[...] *Através desses longos sistemas de projeção, o tronco encefálico mantém o nível de atividade necessário*

para a consciência sensória, as respostas motoras e o alerta relacionado com os estados comportamentais”.

Dentre as funções do sistema nervoso central, destacamos a memória que pode ser classificada como declarativa e não declarativa (ALBUQUERQUE, 2013; IZQUIERDO, 2013). Conceitualmente, é a capacidade de adquirir, armazenar, conservar e recuperar informações ao longo da vida (IZQUIERDO, 2011). O armazenamento das memórias não se concentra em uma localização específica do cérebro, mas em várias regiões, sendo interligadas por circuitos de memórias (GAZZANIGA & HEARTHERTON, 2005). As principais estruturas neurais responsáveis pelos processos de memória são os lobos temporais mediais através do hipocampo, amígdala e córtex entorrinal, córtex pré-frontal, cerebelo, septo medial e outras (IZQUIERDO, 2002; LENT, 2004).

Alguns neurotransmissores são responsáveis pela comunicação entre os neurônios nos processos de aquisição, consolidação e evocação das informações. Dentre eles destacam-se: o glutamato, o ácido amino-gama-butírico (GABA), dopamina, serotonina e acetilcolina (ACh) (GAZZANIGA & HEARTHERTON, 2005; NARVAES, 2013). A queda progressiva do comportamento cognitivo de roedores e os déficits colinérgicos relacionados à idade em animais normais que desenvolvem neurodegeneração (MOTA et al., 2014). Os exercícios de memória visam o aumento da qualidade de vida do indivíduo, buscando minimizar os efeitos do envelhecimento natural sobre o organismo e sobre a atividade do cérebro, exercitando-o e influenciando o seu funcionamento normal, promovendo a independência e funcionalidade por toda a vida do indivíduo (BIASOLI, 2007).

A atividade física regular provê vários benefícios ao organismo. Existem evidências substanciais de que o exercício pode elevar o humor em pessoas normais e apresentar efeitos antidepressivos em pacientes clinicamente deprimidos (DISHMAN, 1985; MONTEIRO, 2011). Tais efeitos correlacionam-se diretamente com os níveis de serotonina e outras monoaminas no encéfalo. Além disso, vários estudos corroboram em modelos animais que distintas modalidades de atividade física (endurance, modelo resistido, natação, etc.) são capazes de melhorar o humor (RANSFORD, 1982).

O exercício físico está relacionado a processos adaptativos, trazendo benefícios ao sistema nervoso em seres humanos, bem como em animais

experimentais. Sua prática traz benefícios à manutenção da integridade cerebrovascular, produz angiogênese e aumenta a densidade das conexões dendríticas, dentre outros efeitos benéficos como a manutenção de taxas normais de glicemia e colesterol principalmente (PYSH & WEISS, 1979). Esta opinião é corroborada por Rosa & Vaisberg (2002), sendo que o exercício físico regular contribui para manter a saúde, melhora a qualidade de vida e diminui a incidência de diversas doenças relacionadas ao estilo de vida moderno. A prática sistemática de exercícios físicos promove benefícios orgânicos, além daqueles relacionados diretamente com os sistemas corporais que o executam. Tanto em seres humanos como em animais experimentais, tem sido relatado que a realização de exercício físico resulta em importante impacto positivo para o organismo (MACEDO, 2009).

O exercício ativa cascatas moleculares e celulares que mantêm a plasticidade do cérebro, promove a vascularização do mesmo, a neurogênese, assim como mudanças funcionais na estrutura neuronal. A atividade física está associada à prevenção de doenças, manutenção do corpo forte e resistente, além da melhoria nas relações sociais devido à convivência em grupo, propiciadas pelo contato com outras pessoas de mesma idade durante o envolvimento com a prática. O exercício é essencial para manter a independência funcional em pessoas de todas as idades, mantendo e melhorando a força muscular, coordenação e equilíbrio, reduzindo o risco de quedas e fraturas e a sua prática regular é um meio para melhorar a qualidade de vida a curto e médio prazo (GONÇALVES et al., 2006).

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar os mecanismos fisiológicos decorrentes da prática de exercícios físicos. Dentre elas, destacam-se alterações nos níveis de neurotransmissores como a serotonina e acetilcolina, importantes para a preservação da memória em todas as idades; ativação da ação de neurotrofinas; aumento da vascularização, dos níveis das proteínas sinápticas sinapsinas e sinaptofisinas, do número de receptores glutamatérgicos, e estimulação da neurogênese hipocampal (VAN PRAAG, 2008). No entanto, o mecanismo de ação subjacente ao exercício físico ainda requer estudos adicionais. Por exemplo, foi mostrado que camundongos submetidos a 6,5 semanas de exercício voluntário em “roda de corrida” apresentaram benefícios sobre a transmissão sináptica (VAN PRAAG et al., 2005). Vaynman et al. (2006), observaram esses achados com apenas três dias de realização dessa atividade. O treinamento aeróbico de corrida

em esteira realizado por ratos durante o desenvolvimento (21 a 60 dias de idade) foi capaz de estimular a neurogênese hipocampal, mas não influenciou o processo epileptogênico na amígdala dos animais adultos. Assim, ainda há muito o que ser esclarecido quanto à extensão, intensidade e duração dos benefícios da atividade física sobre as funções cerebrais.

Remonta à antiguidade a necessidade de que o homem possuísse um bom condicionamento físico em função das longas caminhadas que realizava por ser nômade, pela busca de alimentos por meio da caça e pesca e também pelas lutas que travava pela posse de terras. Na Grécia antiga, o culto ao corpo era muito valorizado, motivo pelo qual novas técnicas de fortalecimento e embelezamento do corpo foram desenvolvidas (PITANGA, 2002). Na atualidade, com os avanços da tecnologia, dos fármacos e dos tratamentos alternativos, a prática de atividades físicas é uma constante para a maioria da população. Muitas pesquisas estão sendo realizadas em diversas áreas do conhecimento para demonstrar a importância e necessidade de tais práticas para a preservação da saúde e da vida.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a longevidade da população do planeta, inclusive no Brasil, está aumentando gradativamente em função dos avanços tecnológicos da medicina, da biologia, da farmacologia e principalmente das neurociências. Novas técnicas de imagens do sistema nervoso central como a ressonância magnética e Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) tem demonstrado áreas encefálicas responsáveis por diversas funções cerebrais, bem como suas áreas de associação e interconexões sinápticas. Por meio da plasticidade cerebral e neuromodulação, o encéfalo tem a capacidade de adaptar-se a novas condições de funcionamento, proporcionando melhor qualidade de vida e saúde aos seres humanos.

Um dos elementos de grande importância que proporciona um bom funcionamento cerebral e de uma de suas funções, a memória, são os neurotransmissores. Presentes nas sinapses químicas do sistema nervoso central e outros órgãos do corpo, os neurotransmissores principalmente a dopamina, serotonina, ACh e noradrenalina por suas vias garantem a eficácia da transmissão dos impulsos nervosos nas vias aferentes e eferentes de todo o corpo humano, principalmente no encéfalo. Outro fator importante contra a neurodegeneração tecidual encefálica é a redução do estresse oxidativo. Pela prática de atividades físicas controladas e monitoradas, estima-se que os danos causados ao encéfalo podem ser minimizados a médio e longo prazo.

Muitas pesquisas já foram realizadas com ratos e humanos para avaliar diversas funções cerebrais. A função memória já foi e é na atualidade uma das funções que mais desperta interesse na comunidade científica, se constituindo um desafio para as neurociências. O que se pretende com essa pesquisa é, através do trabalho sistemático de estimulação e de observação do comportamento de ratas e análise do estresse oxidativo da região do hipocampo e plasma sanguíneo, corroborar com os resultados já conhecidos pelos pesquisadores e, quiçá ter a possibilidade de apresentar novos vieses acerca do tema.

A presente pesquisa poderá proporcionar à comunidade científica o desenvolvimento de novas técnicas e habilidades em humanos, ao público em geral usuário de mecanismos para preservação da memória e lesionados cerebrais, a fim

de poderem usufruir de melhor qualidade de vida, e aos acadêmicos interessados nas pesquisas e estudos sobre memória.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar como a estimulação por meio de algumas práticas físicas e intelectuais em ratas na senescência pode atuar na prevenção, inibição ou retardamento da perda de memória, bem como diminuir o estresse oxidativo plasmático e hipocampal.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito da atividade física sobre o comportamento;
- Analisar o efeito da frequência da atividade física sobre a memória de curta duração (MCD) e de longa duração (MLD);
- Verificar a hipótese de que ratas na senescência submetidas a atividade física podem apresentar maior capacidade antioxidante plasmática.
- Estudar os efeitos da atividade física em animais senis sobre os índices de estresse oxidativo no plasma e hipocampo das mesmas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas do Biotério da Faculdade de Odontologia – FOA, UNESP, 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), variedade *Wistar* com oito meses de idade. Desde então, permanecendo no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA, UNESP, durante todo o período experimental. O Protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FOA-UNESP (processo FOA-00601-2016, ANEXO 1).

4.1. Animais

Foram utilizadas 40 ratas com 13 meses de idade ao início dos experimentos, divididas em quatro grupos: um grupo controle (GC) e três grupos tratamento (GT1, GT2 e GT3), sendo 10 animais em cada grupo. O grupo controle foi mantido apenas sob observação. Aos grupos tratamento foram aplicados exercícios físicos e de memória. O GT1 fez apenas exercícios de memória; o GT2 fez escalada em escada e o GT3 fez exercícios de memória + escalada em escada.

As ratas foram mantidas em biotério (cinco por caixa) com temperatura ambiente de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar entre $55 \pm 10\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas diárias. Os animais receberam ração e água *ad libitum*, com posterior avaliação do consumo de ambos (ROCHA, 2015). Semanalmente mensurou-se o peso corporal das ratas e diariamente o exame do ciclo estral de cada animal (MARCONDES et al., 2002; KERMATH & GORE, 2012).

4.2. Atividade física

As ratas dos grupos GT2 e GT3 foram treinadas para subir degraus de uma escada vertical, inclinada a 80° , medindo 1,10m de altura x 0,18m de largura, degraus de 2 cm, sendo que cada rata fez 6 escaladas, uma por vez alternadamente em grupos de cinco, 3 vezes por semana, durante 12 semanas. O tamanho da escada fez com que os animais realizassem de 8 a 12 movimentos por escalada. Este exercício corresponde a uma intensidade abaixo do limiar anaeróbico (GOBATTO et al., 2001).

4.3. Testes de memória

4.3.1. Campo Aberto

Para analisar a atividade exploratória e locomotora das ratas, bem como a memória de habituação, as ratas dos grupos GT1 e GT3 foram submetidas à tarefa de campo aberto (WALSH & CUMMINS, 1976). As ratas foram colocadas delicadamente no quadrante posterior esquerdo da arena de campo aberto, de tamanho 50 x 50 x 39 cm (comprimento x altura x profundidade), de paredes altas, feita de madeira compensada branca com uma parede frontal de vidro. O chão do campo aberto foi dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. O número de vezes que o animal cruzou as linhas pretas (número de cruzamentos, em inglês *crossings*) e o número de vezes que a rata se elevou sobre as patas traseiras (número de elevações, em inglês *rearings*) foram registradas por 5 minutos, tempo que cada rata permaneceu na caixa. Segundo protocolo de Barros et al. (2006), para testar a memória de habituação ao campo aberto, 24 horas depois os mesmos animais foram novamente colocados no campo para livre exploração por outros 5 minutos e os mesmos parâmetros foram mensurados para avaliar a habituação do animal ao ambiente.

4.3.2. Exercício de reconhecimento de objetos

Quando os ratos são apresentados a objetos familiares e novos, eles passam a maior parte do tempo explorando o novo objeto (CARPES & IZQUIERDO, 2013). Este comportamento típico tem sido utilizado para desenhar um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (ENNACEUR & DELACOUR, 1988; BEVINS, 2006). O teste de reconhecimento de objetos foi realizado na mesma caixa utilizada para o teste de campo aberto. Todos os animais dos grupos tratamento GT1 e GT3 foram habituados ao ambiente durante 3 dias consecutivos, tendo 5 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Os objetos compostos de vidro ou plástico, foram fixados à arena com fita adesiva. Os animais foram colocados na arena, contendo dois objetos de cores diferentes (rosa e vermelho) e formatos circulares com 5 cm de diâmetro (A e B), ao centro da caixa e a 9 cm de cada borda para livre exploração por 5 minutos. O teste

foi repetido 2 horas depois para avaliar a MCD e 24 horas depois do treino para testar a MLD. Nos testes, o objeto B foi substituído por outros: C (cor azul, com 5 cm de diâmetro), para MCD e D (cor marrom, também com cinco cm de diâmetro), para MLD e as ratas foram colocadas na arena por mais 5 minutos. As posições dos objetos (familiar e novo) foram as mesmas do treino e a arena foi limpa entre um teste e outro. A exploração ocorreu quando os animais cheiraram ou tocaram o objeto com o nariz ou as patas dianteiras. O tempo gasto explorando cada objeto foi marcado por um observador e foi expresso em total de tempo de exploração computado em segundos, permitindo determinar a razão de discriminação estabelecida a partir da proporção de tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar ($t_{\text{novo}}/t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}}$).

4.4. Coleta de Amostras

Para a coleta de sangue dos animais, os mesmos foram anestesiados com Tiopental (90mg/Kg), de acordo com MEYER et al. (2005) para punção cardíaca de 8 mL de sangue total, sendo acondicionado um mililitro em microtubo de polipropileno contendo ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (Na_2EDTA) a 10% e sete mililitros em tubo com heparina sódica (Labor import, Coréia do Sul), protegidos da luz para imediata obtenção do plasma por centrifugação (3600 rpm/10 minutos), sendo acondicionados em microtubos de polipropileno e mantidos a -80°C até o momento das análises laboratoriais. Em seguida, os animais foram eutanasiados por decaptação para a retirada dos hipocampus dos dois hemisférios cerebrais. Cada estrutura hipocampal (direita e esquerda) foi armazenada separadamente em microtubos de polipropileno, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e logo após a -80°C , assim mantidos até o momento das análises laboratoriais.

4.5 Análises laboratoriais

4.5.1 Preparo do homogenato

Cada hipocampo direito dos animais foi homogeneizado com solução de KCl a 1,15% m/v, pH 7,4, 1:10 tecido/solução em Potter a 2600 rpm durante 40 segundos e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C (CHEN et al., 2013; ENNACEUR, 1988). Os sobrenadantes foram retirados, acondicionados em microtubos de polipropileno e mantidos congelados a -20°C até o momento das análises.

4.5.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração total de proteínas foi determinada no plasma e hipocampo utilizando albumina bovina como padrão. Os reagentes foram Carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1M e CUSO₄. 5H₂O (Sulfato de cobre) 0,5% em citrato de sódio 1%. As absorbâncias foram determinadas em 625 nm e os resultados expressos em mg/mL (LOWRY, 1951).

4.5.3 Determinação da peroxidação lipídica

O método utilizado para mensuração da peroxidação lipídica do plasma e hipocampo foi as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Buege (1978) e Rosa (2015). Através da reação dos produtos de lipoperoxidação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (JIANG et al., 1991), sendo que uma das substâncias que reage ao TBA é o MDA. Para a reação, uma alíquota de 250 µL da amostra foi adicionada ao ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) e após centrifugação (1000 rpm, 10 minutos) foi coletado o sobrenadante e misturado ao TBA a 0,67% (m/v). A reação foi incubada a 100°C durante 15 minutos e posteriormente resfriada em água corrente até atingir a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm e os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.5.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT Frap)

Pelo método FRAP mensurou-se o poder antioxidante redutor total do plasma e hipocampo e foi avaliado baseado na redução do complexo pentilenotetrazol (Fe^{3+} -TPTZ). Esse complexo na presença de um antioxidante origina Fe^{2+} -TPTZ de coloração azul intensa. A reação ocorre em pH ácido (3,6), com o propósito de manter a solubilidade do ferro em uma absorbância máxima a 595 nm (HALLIWELL, 1995; TIRAPELI, 2014; BENZIE, 1996). Para a reação, uma alíquota de 18 μL da amostra foi adicionada ao meio contendo tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6), TPTZ (10 mmol/L) em HCl (40 mmol/L) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/L), (10:1:1), respectivamente. Foram efetuadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 595 nm, os resultados expressos em nmol/L e a curva padrão utilizada foi de sulfato ferroso.

4.5.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD no hipocampo foi quantificada utilizando-se pirogalol (SCOLARO, 2012; HALLIWELL, 1995), produto que em solução aquosa sofre auto-oxidação com extrema rapidez, proporcionando uma coloração amarelada na reação (SONI, 2014; MARKLUND, 1985). Esse processo é dependente da presença de O_2^- . Assim sendo, na presença de SOD o processo é inibido, haja vista que a enzima promove a dismutação do O_2^- . O meio de reação foi composto por tampão Tris (50 mmol/L, pH 8,2) e pirogalol (24 $\mu\text{mol/L}$) utilizando-se 20 μL de homogenato. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da auto-oxidação do pirogalol foi considerada como uma unidade enzimática (UE). Os resultados foram expressos em atividade específica (AE): AE(UE/mg de proteína) (TIRAPELI, 2014).

4.5.6 Determinação do perfil bioquímico

Todas as análises bioquímicas foram realizadas a 37°C em analisador bioquímico semi-automatizado (SB-190 CELM, Brasil), previamente calibrado com calibrador comercial (Calibra H, Labtest) e soro controle nível 1 (Qualitrol 1H), utilizando reagentes comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil).

Foi determinada a concentração plasmática de albumina pelo método de verde de bromocresol; ácido úrico pelo método enzimático de uricase e peroxidase; uréia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase); creatinina pelo método cinético (picrato alcalino); proteína total pelo método do biureto; aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ambas pelo método cinético UV-IFCC (Federação Internacional de Química Clínica) e fosfatase alcalina (FA) pelo método Bowers e Mc Comb modificado.

4.6 Análise Estatística

Para a análise de dados utilizou-se o software estatístico livre R, versão 3.4.1, utilizando-se as seguintes técnicas, segundo os autores (GIBBONS, 2011; SIEGEL 2006; MONTGOMERY, 2013; VIEIRA, 2010; NEMENYI, 1963):

1. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, para verificação ou não da distribuição normal dos dados obtidos a partir da escala de medida, e para identificar se as análises posteriores seriam realizadas a partir de estatística paramétrica ou não paramétrica. Uma vez constatado que os dados obtidos não seguiram uma distribuição normal, utilizou-se instrumentos de análise não paramétrica (descritos a seguir).
2. Estatísticas descritivas, com cálculo de médias, desvios-padrão e porcentagens para a descrição da amostra.
3. Testes paramétricos (teste t pareado e teste t) ou testes não paramétricos (teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney), para detectar possíveis diferenças significativas dentro e entre o grupo controle e o grupo tratamento, respectivamente.
4. Teste paramétrico (ANOVA e *post hoc* de Tukey) ou teste não paramétrico (teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Nemenyi), para detectar possíveis diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo de ração e água pelas ratas e peso corporal

Análise de dados

Os dados foram computados e analisados por meio do software estatístico livre R, versão 3.4.1. Foram utilizados testes não paramétricos para as análises estatísticas, após ter sido constatada a não normalidade dos dados para as duas medidas avaliadas: consumo de água e consumo de ração, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov (Água: K-S = 1,656; $p = 0,008$ e ração: K-S = 1,741; $p = 0,005$). Para o ganho de peso realizou-se testes paramétricos, por ter apresentado normalidade dos dados (K-S = 0,574; $p = 0,897$).

A estatística descritiva foi realizada com cálculo de médias, desvios-padrão, quartis, medianas, mínimos e máximos, e a geração de gráficos para avaliar as características destas três medidas. As médias das observações dos grupos (GC, GT1, GT2 e GT3) para o consumo de água e o consumo de ração foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As médias das observações para os mesmos grupos relativos ao ganho de peso foram comparadas pela análise de variância ANOVA. A homogeneidade das variâncias dos grupos foi verificada pelo teste de Levene. No caso de aceitação de homogeneidade, realizou-se o teste *post hoc* de Tukey, caso contrário, realizou-se o teste *post hoc* C de Dunnett, para verificar se haviam diferenças significativas entre os grupos.

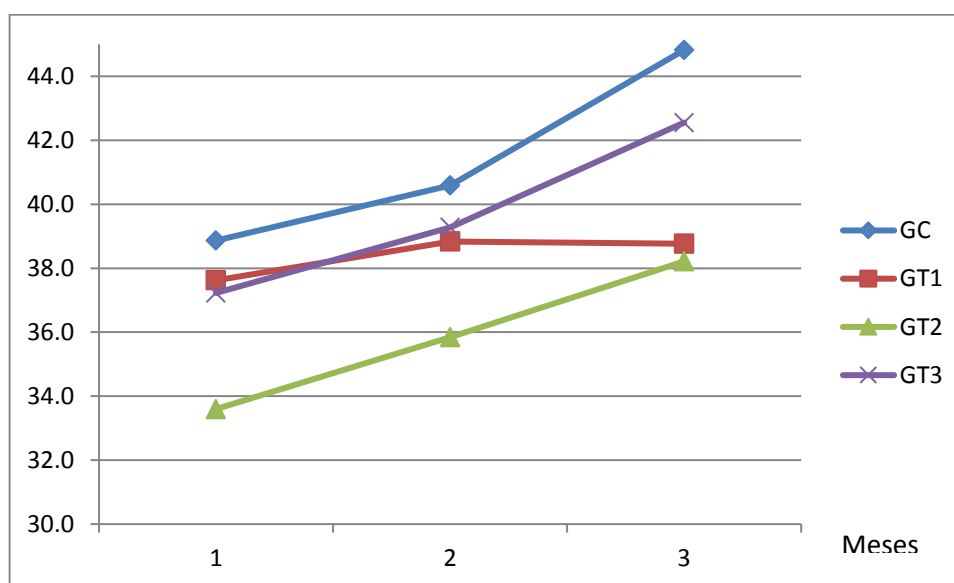
A Tabela 1 mostra que o consumo médio de água (em mL) foi maior nos grupos GC (Média = 41,51) e GT3 (Média = 39,76) e menor nos grupos GT1 (Média = 38,42) e GT2 (Média = 35,94). Além disso, a Figura 1 ilustra que todos os grupos aumentaram o consumo de água no decorrer do tempo, sendo mais acentuado do primeiro para o segundo mês com os grupos GC, GT3 e GT2. Cabe ressaltar que houve uma queda no consumo de água no GT1 do primeiro para o segundo mês.

Tabela 1. Medidas descritivas do consumo de água (mL) para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.

Grupos	Média	DP*	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Máximo
GC	41,51 ^a	6,38	22,30	37,08	40,90	45,88	56,00
GT1	38,42 ^b	6,24	24,00	36,00	37,75	39,50	64,50
GT2	35,94 ^c	7,02	22,30	33,00	34,70	37,45	66,00
GT3	39,76 ^d	6,03	24,70	37,30	40,00	42,00	64,50

*DP = Desvio Padrão

Figura 1. Consumo médio de água (mL) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.



Segundo o teste de Kruskal-Wallis verifica-se que há diferença significativa entre os grupos para o consumo de água ($KW = 34,207$; $p = 0,000$), isto é, o GT2 consumiu menos que o GT1, que por sua vez consumiu menos que o GT3 e, o que consumiu mais água foi o GC.

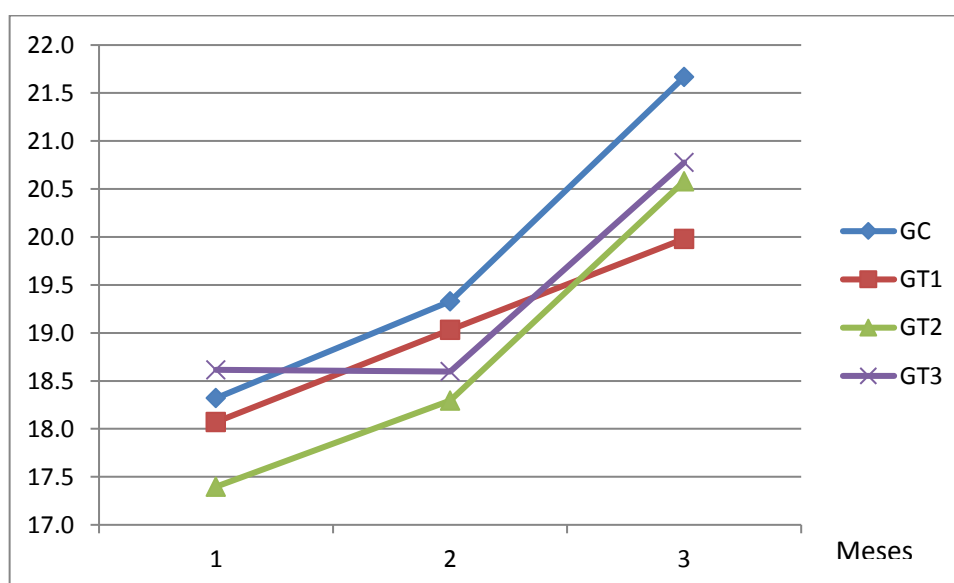
A Tabela 2 mostra que os consumos médios de ração (em gramas) por grupo foram ligeiramente maiores nos grupos GC (Média = 19,82) e GT3 (Média = 19,37) e um pouco menores nos grupos GT1 (Média = 19,05) e GT2 (Média = 18,80). A Figura 2 apresenta que o consumo médio de ração (em gramas) no primeiro mês foi um pouco maior nos grupos GT3, GC e GT1. No segundo mês os grupos GC e GT1 consumiram mais ração que os grupos GT3 e GT2. Já no terceiro mês, o grupo GC consumiu mais ração que os grupos GT3, GT2 e GT1. Além disso, todos os grupos aumentaram o consumo de ração no decorrer do tempo, sendo mais acentuado do segundo para o terceiro mês com os grupos GC, GT3 e GT2.

Tabela 2. Medidas descritivas do consumo de ração (gramas) para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.

Grupos	Média	DP*	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Máximo
GC	19,82 ^a	2,87	11,10	18,50	19,50	21,58	30,00
GT1	19,05 ^a	2,85	12,30	17,73	18,80	20,30	30,00
GT2	18,80 ^a	3,22	11,90	17,03	18,30	19,98	32,80
GT3	19,37 ^a	4,43	11,80	17,50	18,90	20,18	39,60

*DP = Desvio Padrão

Figura 2. Consumo médio de ração (gramas) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados em dias alternados durante os três meses do experimento.



Como os consumos médios de ração foram semelhantes durante o período de três meses, o teste de Kruskal-Wallis apresentou que não há diferença estatística significativa entre os grupos para o consumo de ração (KW = 6,565; $p = 0,087$).

A Tabela 3 mostra que as ratas do grupo GC ganharam mais peso (Média = 21,4 gramas) nos dois primeiros meses, em seguida, foram as ratas do grupo GT2 (19,8 gramas), depois as ratas do grupo GT3 (18 gramas) e, por último, as ratas do grupo GT1 (12,4 gramas). Cabe ressaltar que a média no grupo GT1 foi bem abaixo que os demais grupos, principalmente devido a queda do peso da Rata 4 (-16 gramas), que acabou se destacando na Figura 3 como um ponto discrepante.

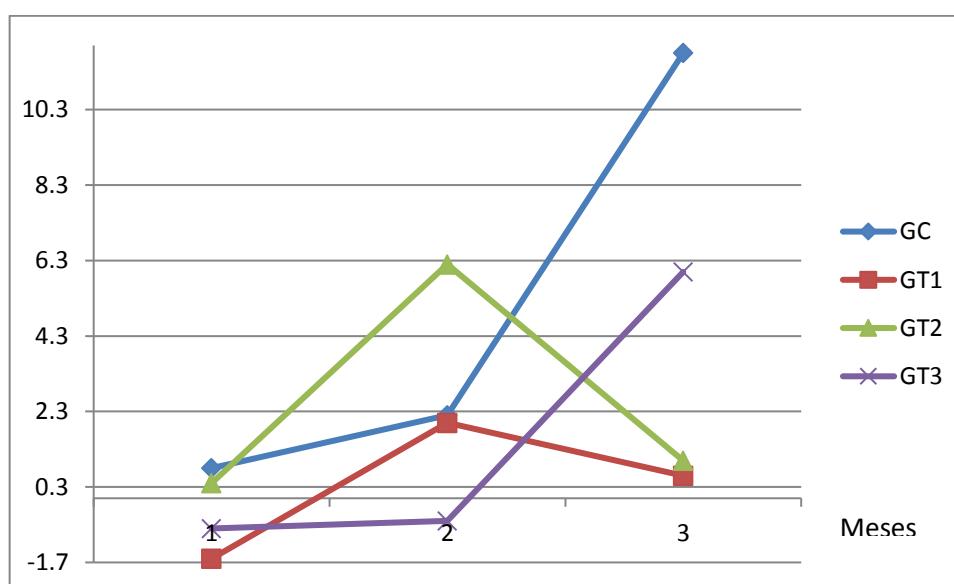
Tabela 3. Medidas descritivas do ganho de peso médio (gramas), para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados semanalmente durante os três meses do experimento.

Grupos	Média	DP*	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Quartil 3	Máximo
GC	21,40 ^a	13,37	04,00	12,00	17,00	34,50	46,00
GT1	12,40 ^a	16,35	-16,00	02,00	13,00	22,50	38,00
GT2	19,80 ^a	11,29	04,00	07,50	20,00	28,50	36,00
GT3	18,00 ^a	15,35	-02,00	06,00	15,00	27,00	48,00

*DP = Desvio Padrão

A Figura 3 mostra que o ganho médio de peso (em gramas) foi maior nos grupos GC e GT2 nos dois primeiros meses. No terceiro mês, os grupos GC e GT3 ganharam mais peso, em média. Além disso, as ratas de todos os grupos aumentaram o peso nos dois primeiros meses. No entanto, do segundo para o terceiro mês, apenas os grupos GC e GT3 apresentaram ganho de peso médio, os demais grupos apresentaram uma queda no ganho.

Figura 3. Ganho de peso médio (gramas) por grupo: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física), mensurados semanalmente durante os três meses do experimento.



Considerando os dados do ganho de peso não houve diferença significativa entre os grupos (Levene = 0,383; $p = 0,766$; $F = 0,76$; $p = 0,524$).

5.2 Testes comportamentais e de memória

5.2.1 Teste de memória de habituação à exploração no campo aberto

A Tabela 4 e as Figuras 4, 5 e 6 apresentam que a maior parte das ratas do GT1 efetuaram mais cruzamentos que as ratas do grupo GT3, indicando maior necessidade de locomoção no ambiente e maior índice de ansiedade. Além disso, mostram que todas as ratas do grupo GT3 diminuíram o número de cruzamentos no teste 2 em relação ao teste 1, comprovando que houve melhor controle da ansiedade. O GT3 apresentou mais elevações no teste 1 que o GT1 demonstrando maior poder exploratório e menos elevações no teste 2. O GT3 apesar de apresentar quantidade de bolo fecal superior em relação ao GT1 na realização do teste 1, esse número foi inferior na realização do teste 2 indicando também menor ansiedade. Diante dos resultados obtidos, observa-se para o GT3 que praticou escalada em escada regularmente 3 vezes por semana durante 3 meses consecutivos apresentou melhores resultados para MLD em relação ao GT1 que não praticou atividade física, pelo fato da diminuição dos índices de locomoção, elevação e bolos fecais do teste 2 em relação ao teste 1.

Tabela 4. Análise descritiva do teste de memória de habituação à exploração no campo aberto. Os dados são expressos como média e desvio padrão do número de cruzamentos, quantidade de elevações e de bolos fecais para os grupos GT1 (memória) e GT3 (memória + atividade física).

	GT1		GT3	
	Teste 1	Teste 2	Teste 1	Teste 2
Cruzamentos	48,00 ± 18,60 ^a	38,60 ± 18,30 ^b	43,20 ± 11,80 ^a	24,60 ± 09,00 ^b
Elevações	16,20 ± 06,78 ^a	09,90 ± 06,17 ^b	16,90 ± 04,77 ^a	07,70 ± 03,27 ^b
Bolos fecais	01,40 ± 01,80 ^a	00,70 ± 00,50 ^a	01,80 ± 02,20 ^a	00,50 ± 00,90 ^b

Figura 4. Número de cruzamentos de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2.

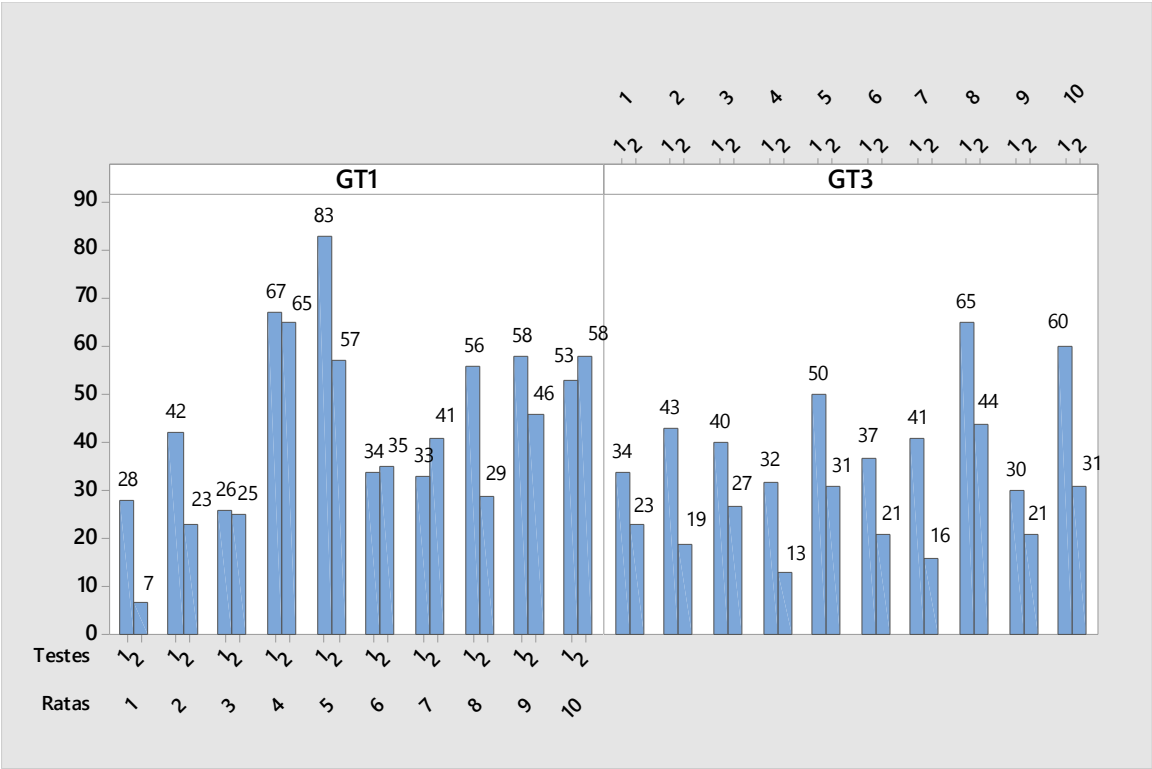


Figura 5. Número de elevações de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2.

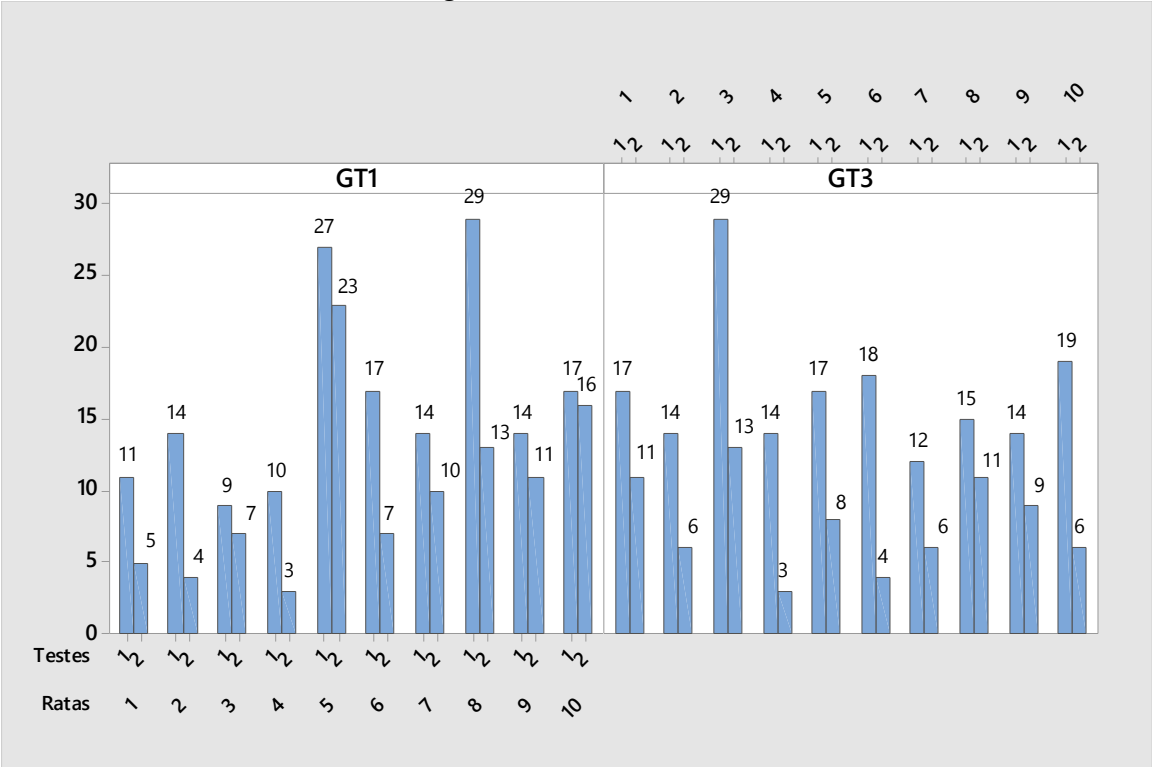
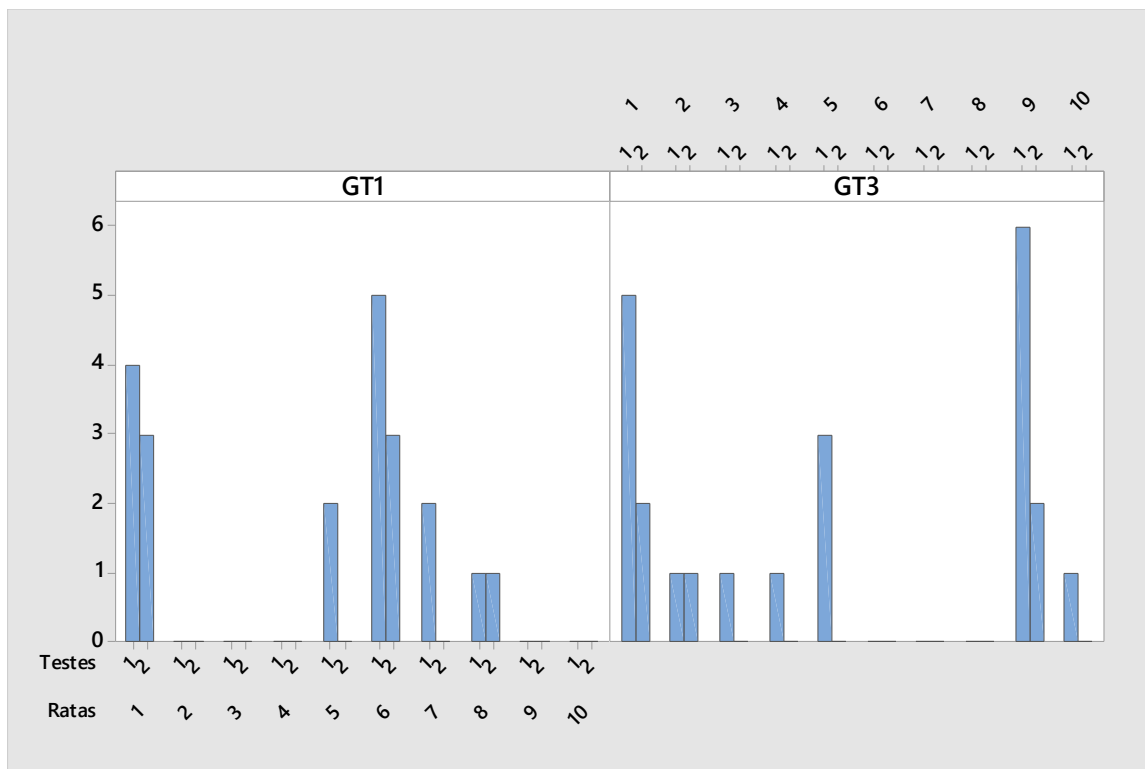


Figura 6. Quantidade de bolos fecais de cada uma das dez ratas nos dois grupos GT1 e GT3, segundo o teste 1 e o teste 2.



O teste de Shapiro-Wilk indicou que as respostas das variáveis cruzamentos ($P > 0.10$) e elevações ($P > 0.073$) possuem distribuição normal e a variável bolo fecal ($P = 0.032$) não possui distribuição normal.

O teste t (para as variáveis cruzamentos e elevações) e o teste de Mann-Whitney (para a variável bolo fecal) foram utilizados para comparar as médias entre os grupos GT1 e GT3. Os resultados indicaram que, para o teste 1, não houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis: cruzamentos ($P = 0.499$), elevações ($P = 0.792$) e bolo fecal ($P = 0.61$). Na comparação das médias dos grupos (GT1 e GT3), para o teste 2, houve diferença significativa entre os grupos somente para a variável cruzamento ($P = 0.049$), enquanto que as variáveis elevações ($P = 0.332$) e bolo fecal ($P = 0.89$), não mostraram diferença significativa entre os grupos. Logo, estes resultados apontaram que houve diferença entre GT1 e GT3 somente para a variável cruzamentos, comprovando que o grupo GT3 mostrou um controle de ansiedade superior ao GT1, efetuando menos cruzamentos no teste 2.

O teste t pareado (para as variáveis cruzamentos e elevações) e o teste de Wilcoxon (para a variável bolo fecal) foram utilizados para comparar as médias entre

os testes 1 e 2. Os resultados indicaram que, para o GT1, houve uma redução significativa do número de cruzamentos, quando foi realizado o Teste 2 ($P=0.05$); uma diminuição do número de elevações com o Teste 2 ($P=0.002$), mas não houve uma diferença significativa na quantidade de bolo fecal, quando foram aplicados os Testes 1 e 2 ($P=0.10$). Comparando as médias dos Testes 1 e 2 para o GT3, houve uma redução significativa nas três variáveis estudadas: cruzamentos ($P=0.000$), elevações ($P=0.000$) e bolo fecal ($P=0.036$).

O GT3 que praticou escalada em escada regularmente 3 vezes por semana durante 3 meses consecutivos apresentou melhores resultados para MLD em relação ao GT1 que não praticou atividade física.

5.2.2 Teste de reconhecimento de objetos

A Tabela 5 e as Figuras 7 e 8 apresentam os dados de exploração dos objetos A, B, C e D. Na comparação entre os grupos GT1 e GT3, o teste t indicou que o objeto A foi explorado igualmente estatisticamente ($P = 0,345$). Embora o GT1 (média = 66%) tenha explorado um pouco mais o objeto B que o GT3 (média = 54,7%), o teste t mostrou que não houve diferença significativa entre eles ($P = 0,345$). Quanto ao objeto C, o GT3 (média = 78%) não apresentou diferença significativa no índice de exploração com o GT1 (média = 68,8%, ($P = 0,219$)). Finalmente, quanto ao objeto D, embora tenha sido mais explorado pelo GT3 (média = 77,7%), não houve diferença significativa ($P = 0,371$) com o GT1 (média = 70,9%). Avaliando os resultados descritivos, o GT3 que praticou escalada em escada três vezes por semana durante 3 meses consecutivos apresentou melhores resultados em teste de reconhecimento de objetos para MCD e MLD (Figuras 7 e 8).

Tabela 5. Análise descritiva do teste de reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como média e desvio padrão do número de explorações dos objetos A e B, A e C e A e D, respectivamente, para os grupos GT1 (memória) e GT3 (memória + atividade física).

	GT1		GT3	
	A	B	A	B
Objetos A e B	33,96 ± 21,50	66,04 ± 21,50	45,32 ± 30,19	54,68 ± 30,19
2 horas depois	A	C	A	C
Objetos A e C	31,18 ± 20,28	68,83 ± 20,28	22,01 ± 10,33	77,99 ± 10,33
24 horas depois	A	D	A	D
Objetos A e D	29,13 ± 17,68	70,87 ± 17,68	22,26 ± 15,79	77,74 ± 15,79

Figura 7. Tempos (segundos) de exploração dos objetos A e B (treino) e A e C (2 horas depois) para mensuração da MCD, dos grupos GT1 e GT3.

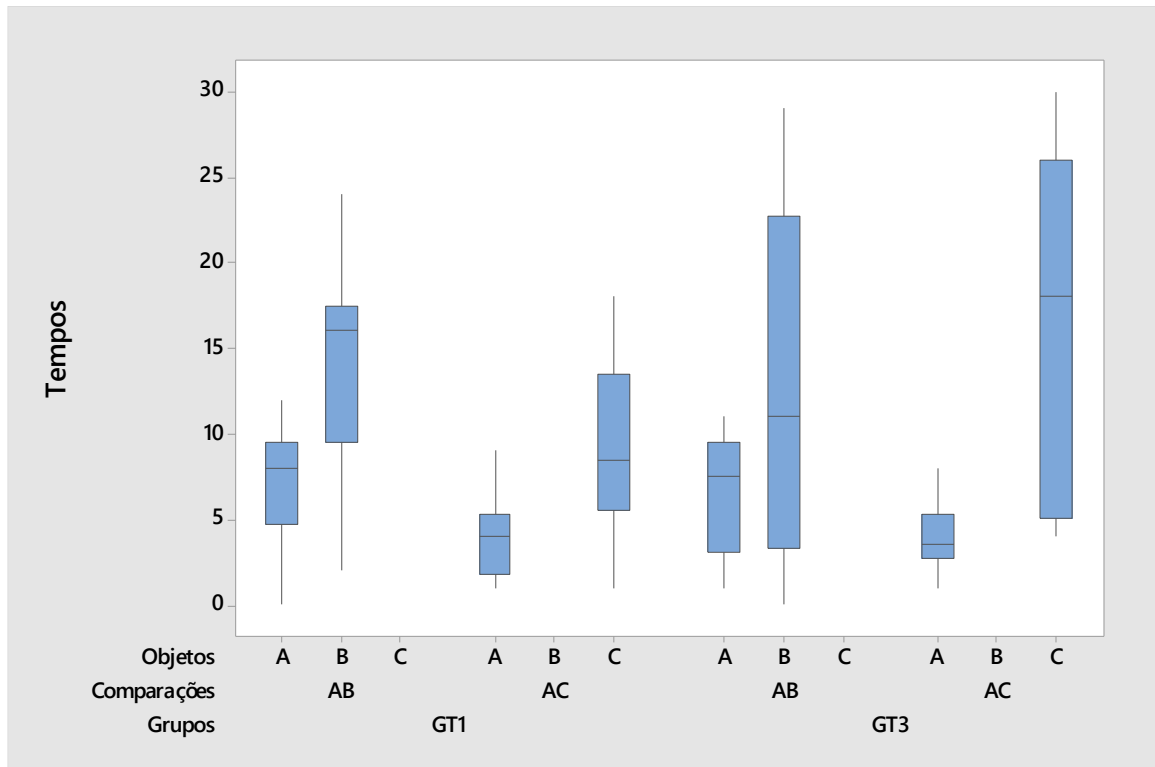
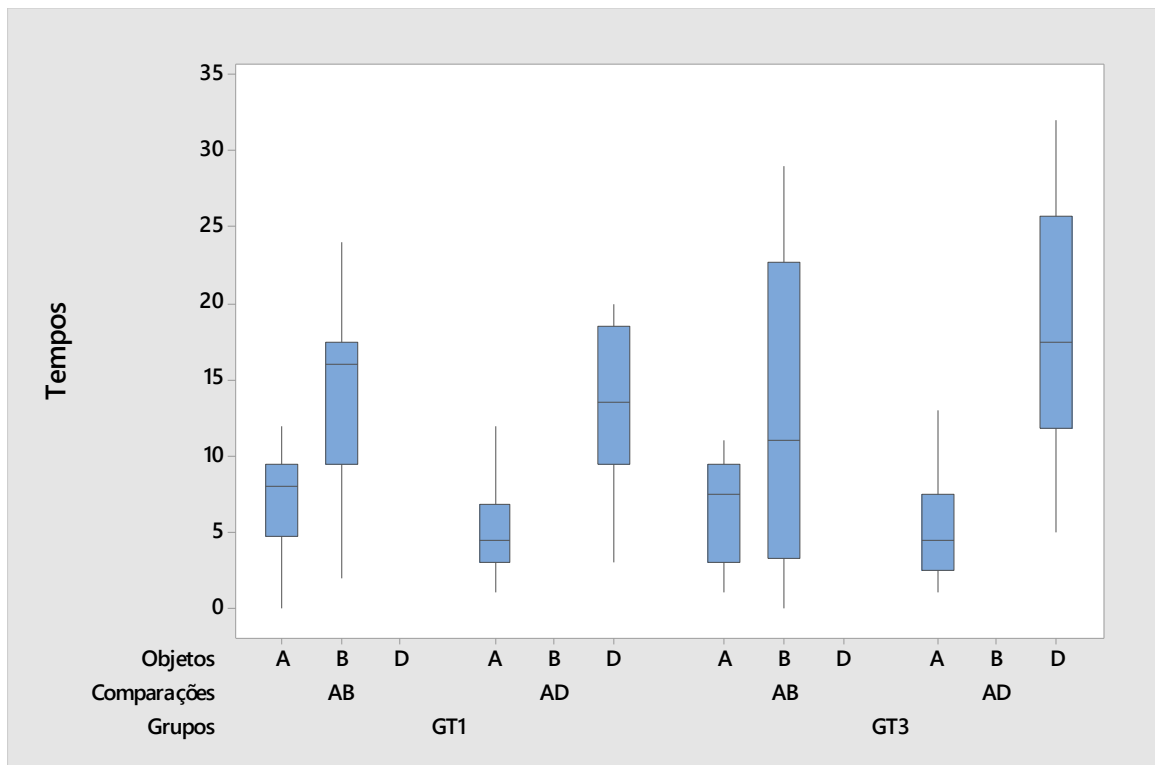


Figura 8. Tempos (segundos) de exploração dos objetos A e B (treino) e A e D (24 horas depois) para mensuração da MLD, dos grupos GT1 e GT3.



Embora o GT1 (média = 66,04%) explorou um pouco mais o objeto B que o GT3 (média = 54,68%), o teste *t* mostrou que não houve diferença significativa entre eles ($P = 0,345$). Quanto ao objeto C, o GT3 (média = 77,99%) explorou mais que o GT1 (média = 68,83%), porém, não houve diferença significativa no índice de exploração ($P = 0,219$). Finalmente, quanto ao objeto D, embora tenha sido mais explorado pelo GT3 (média = 77,74%), não houve diferença significativa ($P = 0,371$) com o GT1 (média = 70,87%). Avaliando os resultados descritivos, o GT3 que praticou escalada em escada três vezes por semana durante 3 meses consecutivos apresentou melhores resultados em teste de reconhecimento de objetos para MCD e MLD.

5.3 Análises bioquímicas para estresse oxidativo

5.3.1 Plasma sanguíneo

Para plasma sanguíneo é apresentado na Tabela 6 a média assim como os respectivos desvios padrão para as respostas MDA e FRAP de cada grupo. Também é apresentado nas Figuras 09 e 10 os box-plots para cada uma das respostas em função dos grupos. Na tabela observa-se que: para a resposta MDA a maior média é observada no GC; o GT3 apresentou maior média e também uma possível diferença em relação ao GC para a resposta FRAP.

Tabela 6. Análise descritiva do plasma sanguíneo, médias e respectivos desvios padrão para as respostas MDA e FRAP em função dos grupos GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

	GC	GT1	GT2	GT3
MDA(nmol/mg proteína)	36,89 ±34,29	25,17 ± 9,64	26,60 ±17,60	27,03 ±27,26
FRAP(nmol/L)	30,31 ± 8,66	34,77 ±12,37	36,71 ±12,39	43,20 ± 9,98

Figura 9. Diagrama de caixa com os valores de MDA do plasma para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

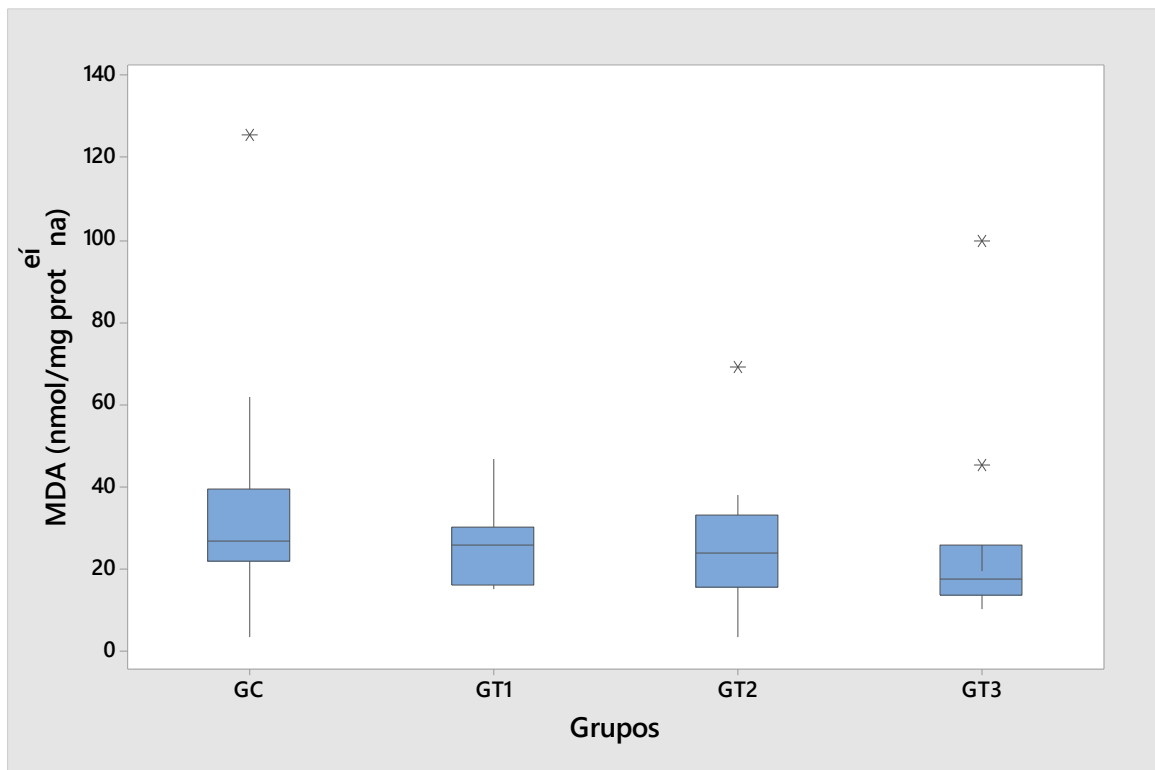
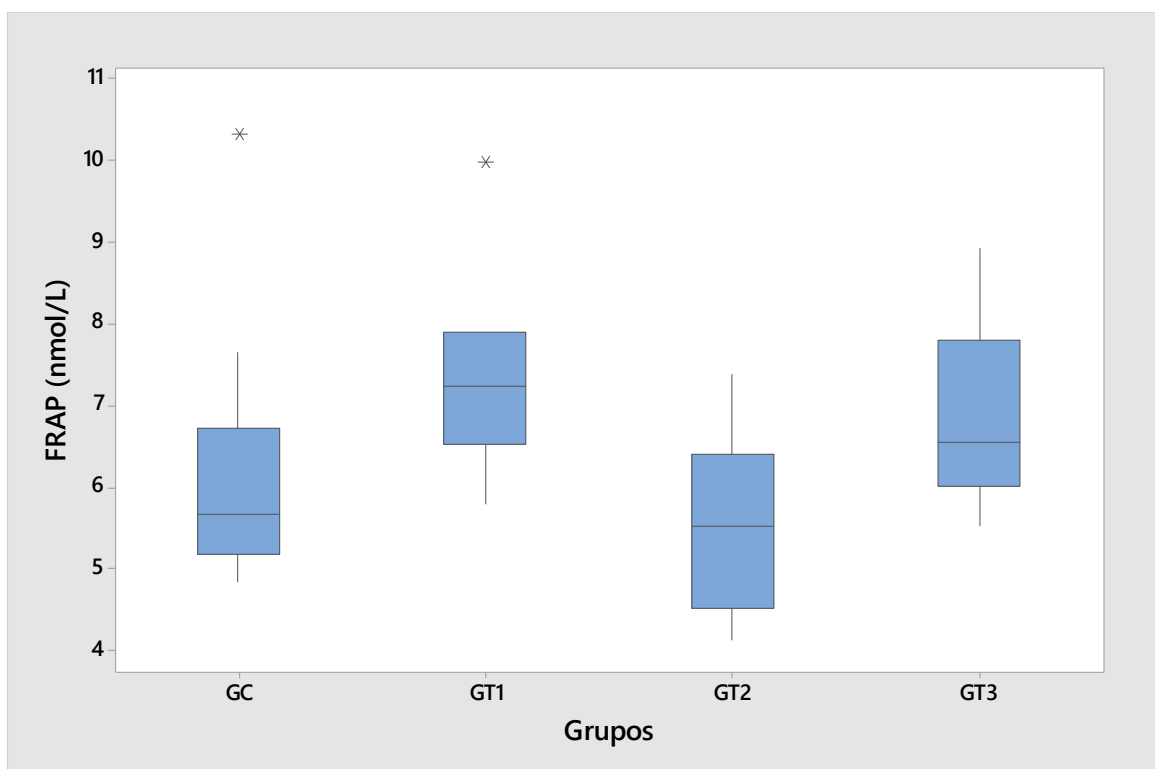


Figura 10. Diagrama de caixa com os valores da FRAP do plasma para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).



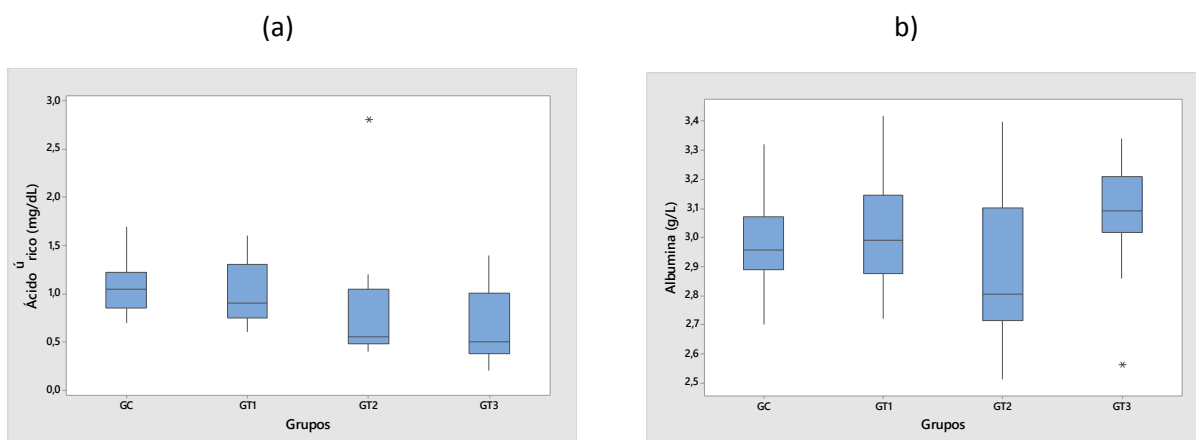
O teste de Shapiro-Wilk apresentou que as variáveis MDA e FRAP não possuem distribuição normal ($P < 0.001$). Na comparação das médias dos grupos (GC, GT1, GT2 e GT3) não houve diferença significativa entre os grupos para a variável MDA ($P = 0.35$) e houve diferença entre os grupos para a variável FRAP ($P = 0.006$). Utilizando o post hoc de Nemenyi para a variável FRAP, pôde-se concluir que o GC possui média estatisticamente menor que o grupo GT3 (Figura 10).

São apresentados na Tabela 7 as médias e desvios padrão para as respostas: ácido úrico, albumina, ALT, AST, Creatinina, FA, PT e uréia em função de cada grupo. Os box-plots para cada uma das respostas em relação a cada grupo são apresentados na Figura 11.

Tabela 7. Análise descritiva do plasma, médias e respectivos desvios padrão para as variáveis ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (U/L), AST (U/L), creatinina (mg/dL), FA (U/L), PT (g/dL) e uréia (mg/dL) em função dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

	GC	GT1	GT2	GT3
Ácido úrico (mg/dL)	$1,07 \pm 0,30$	$1,03 \pm 0,43$	$0,86 \pm 0,73$	$0,66 \pm 0,40$
Albumina (g/dL)	$2,98 \pm 0,18$	$3,01 \pm 0,20$	$2,88 \pm 0,28$	$3,07 \pm 0,22$
ALT (U/L)	$95,60 \pm 40,89$	$90,11 \pm 17,13$	$84,20 \pm 20,73$	$96,70 \pm 25,42$
AST (U/L)	$157,10 \pm 65,43$	$144,44 \pm 35,08$	$161,5 \pm 58,79$	$197,0 \pm 131,85$
Creatinina (mg/dL)	$0,64 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,05$
FA (U/L)	$171,60 \pm 40,29$	$154,2 \pm 44,57$	$167,00 \pm 38,23$	$209,22 \pm 52,59$
PT (g/dL)	$7,70 \pm 0,36$	$7,7 \pm 0,20$	$7,13 \pm 0,51$	$7,43 \pm 0,63$
Uréia (mg/dL)	$45,30 \pm 6,00$	$47,7 \pm 6,22$	$42,20 \pm 5,26$	$44,66 \pm 7,46$

Figura 11. Diagrama de caixa com os valores de: (a) ácido úrico e (b) albumina em função dos grupos GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).



Ao aplicar o teste de Shapiro-Wilk para as variáveis ácido úrico e albumina, os p -valores obtidos foram <0.001 e 0.741 respectivamente, concluindo então que apenas a variável albumina apresenta distribuição normal. Aplicando os testes de comparação de médias, foi possível concluir que o ácido úrico possui médias diferentes entre os grupos ($p=0.02$) e albumina não apresentou diferença significativa ($p=0.34$). Esses resultados também podem ser observados na Figura 11 painéis (a) e (b). Com o post hoc de Nemenyi, aplicado à variável ácido úrico, conclui-se que o GT3 é estatisticamente diferente do GC.

5.3.2 Hipocampo

Para análise do hipocampo é apresentado na Tabela 8 as médias e os respectivos desvios padrão para as variáveis FRAP, MDA e SOD em função de cada grupo (GC, GT1, GT2 e GT3). Observa-se que para a variável MDA, o GT3 apresentou menor valor e o GT2 maior valor para a média. Para a variável FRAP a maior média é observada no GT3 e a menor no GC. Por último, a variável SOD apresentou a maior média no GT1, resultados que podem ser observados nas Figuras 12 a 14, nas quais são apresentados os box-plots.

Tabela 8. Análise descritiva do hipocampo, médias e respectivos desvios padrão para as variáveis FRAP, MDA, e SOD em função dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

	GC	GT1	GT2	GT3
FRAP(nmol/L)	$2,78 \pm 0,79$	$3,19 \pm 1,13$	$3,37 \pm 1,13$	$3,97 \pm 0,91$
MDA(nmol/mgprotein)	$26,48 \pm 10,24$	$29,82 \pm 16,95$	$27,93 \pm 13,30$	$17,30 \pm 11,50$
SOD AE(UE/mgprotein)	$10,50 \pm 3,03$	$13,44 \pm 3,11$	$9,81 \pm 4,66$	$7,91 \pm 3,20$

Figura 12. Diagrama de caixa com os valores da FRAP do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

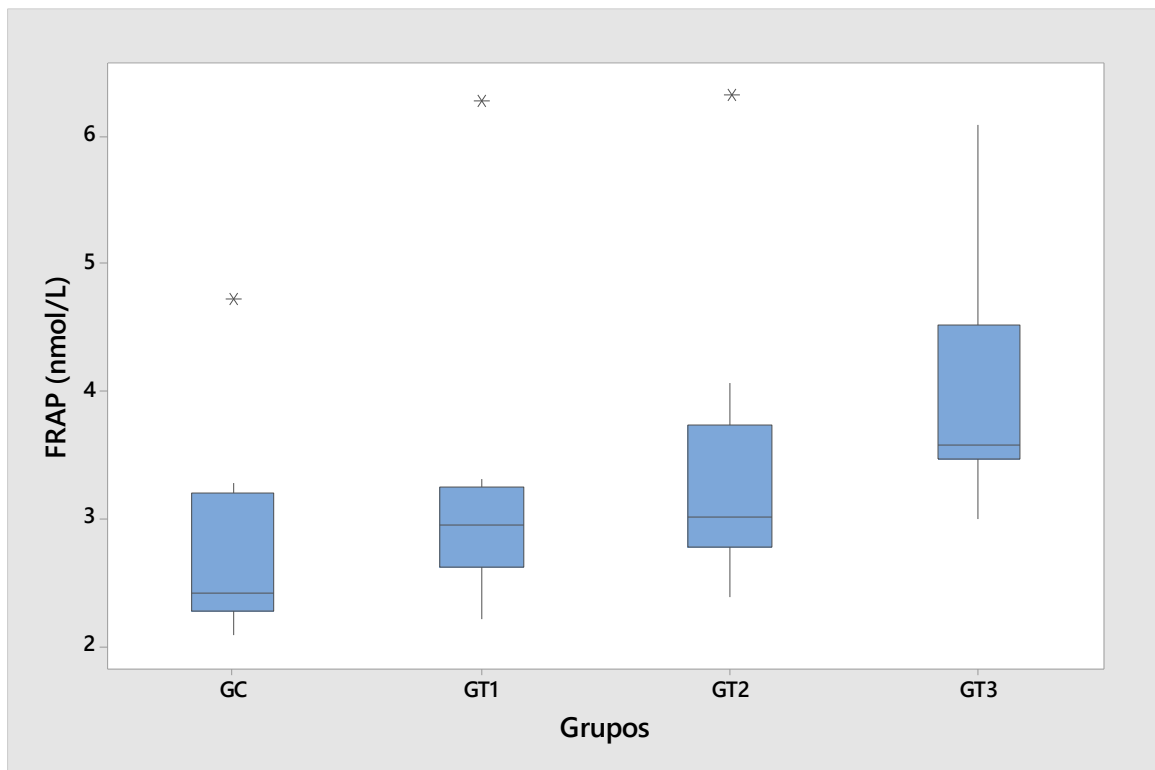


Figura 13. Diagrama de caixa com os valores de MDA do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).

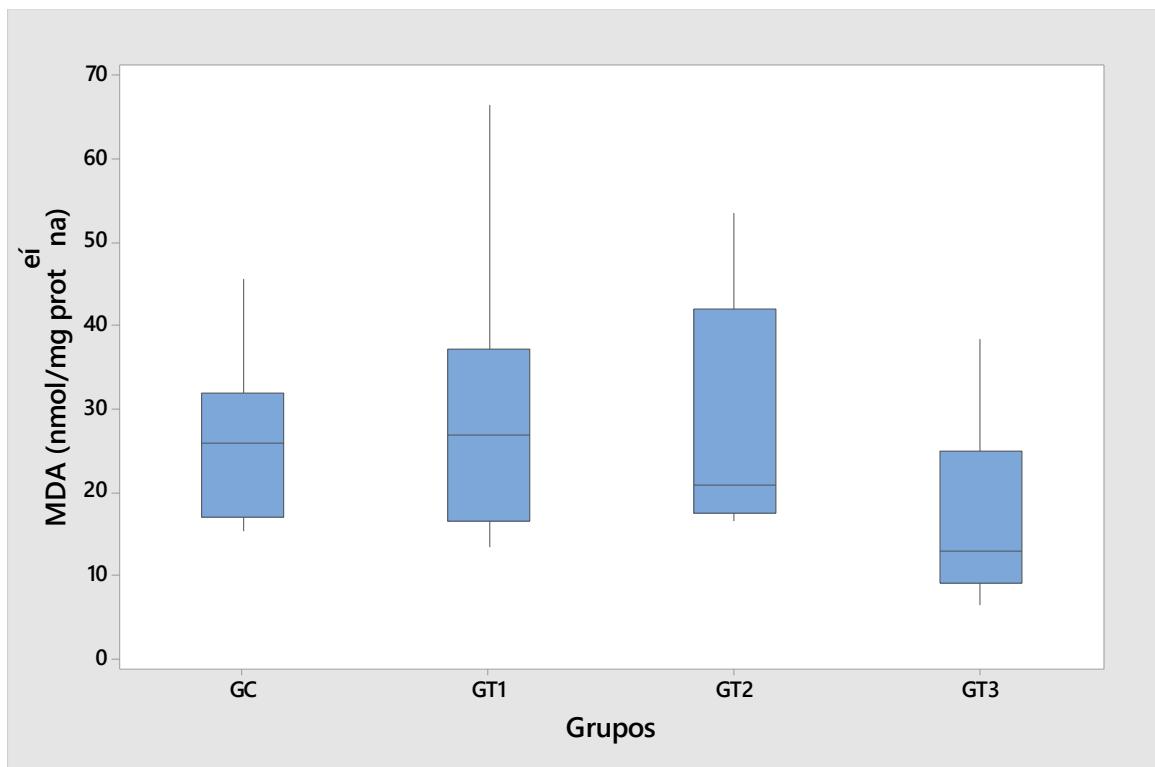
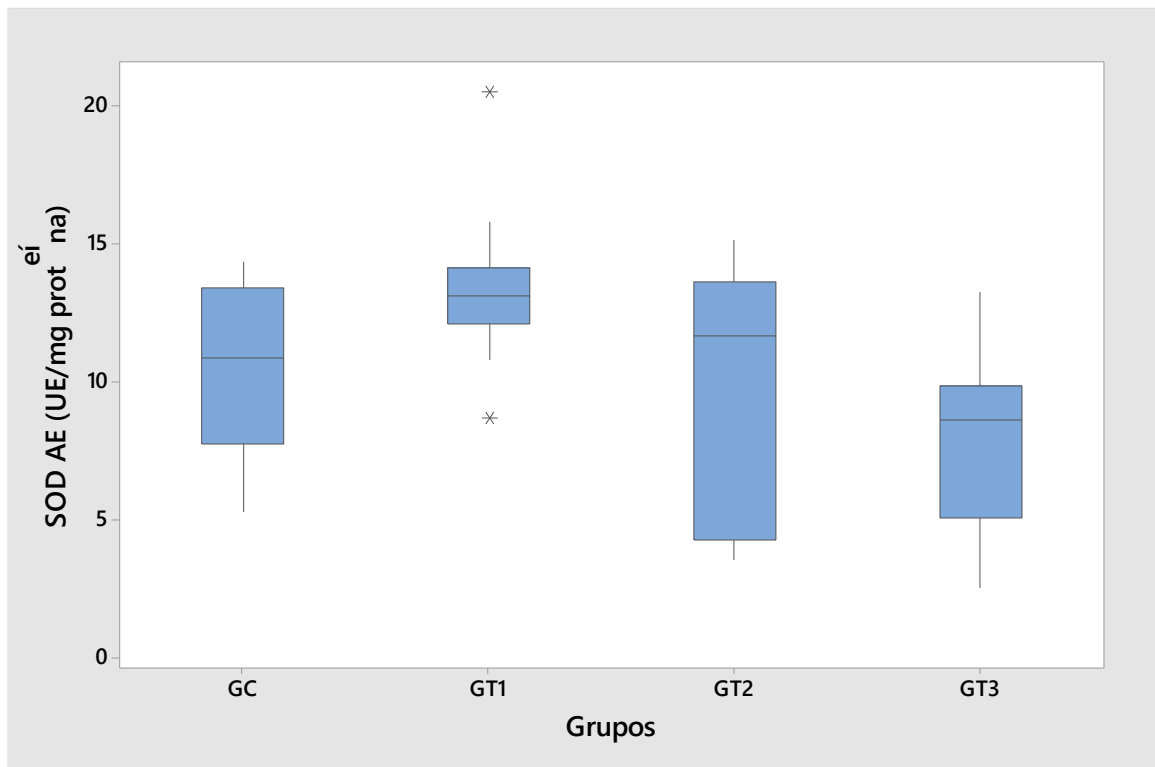


Figura 14. Diagrama de caixa com os valores da SOD do hipocampo para cada um dos grupos: GC (controle), GT1 (memória), GT2 (atividade física) e GT3 (memória + atividade física).



O teste de Shapiro-Wilk indicou que as respostas das variáveis MDA ($P < 0,001$) e FRAP ($P < 0,001$) não possuem distribuição normal e a variável SOD ($P = 0,189$) possui distribuição normal. Na comparação das médias dos grupos (GC, GT1, GT2 e GT3) houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis FRAP ($P = 0,01$) e SOD ($P = 0,01$) e não houve diferença entre os grupos para a variável MDA ($P = 0,09$). Utilizando o *post hoc* de Tukey para a variável SOD foi possível concluir que o GT1 possui média estatisticamente maior do que o GT3 (Figura 14). O *post hoc* de Nemenyi para a resposta FRAP, pôde-se concluir que o GC possui média estatisticamente menor que o GT3 (Figura 13).

6 Discussão

Esta pesquisa analisou a influência da atividade física moderada com a frequência de três dias semanais em ratas na senescência, semelhante ao recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) em humanos, para o bem-estar físico, social, intelectual e emocional de ratas na senescência (GARBER, 2011). Os animais destinados a escalar escada foram habituados até que todas as ratas realizassem o exercício de forma satisfatória e sem demonstrar índices elevados de ansiedade (BRYANT, 2008; KYRIOS, 2011).

Estudos sobre a prática regular de atividade física são numerosos em várias áreas do conhecimento, porém percebe-se certo descumprimento quanto a padronização da intensidade a níveis fisiológicos de tal atividade. A *American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance* (AAHPERD) desenvolveu uma bateria de testes específica para medir a aptidão funcional em idosos, composta de cinco testes motores (coordenação, resistência de força, flexibilidade, agilidade e equilíbrio dinâmico, resistência aeróbia geral) (ZAGO & GOBBI, 2003). Muitos indivíduos exercitam-se sem acompanhamento adequado ou em academias onde não são indicados os exercícios adequados a cada pessoa, desconsiderando-se as diferenças individuais.

O consumo de água (Tabela 1) e ração (Tabela 2), assim como o peso corporal (Tabela 3), apresentaram algumas oscilações durante o período experimental em função, talvez, do comportamento competitivo entre as ratas nas caixas.

Nos testes de memória de habituação à exploração no campo aberto (MLD) (CRUZ, 2010), os animais que praticaram atividade física apresentaram melhor desempenho, fato que comprova os dados da literatura (IZQUIERDO, 1998; PAREDES et al., 2009). A atividade física exerce grande impacto nas estruturas neurais aumentando as conexões sinápticas e espinhos dendríticos, principalmente no hipocampo (SQUIRE & KANDEL, 2011), uma das estruturas responsáveis pela consolidação da memória (IZQUIERDO, 2011; GAZZANIGA, 2005). No mesmo teste, o grupo submetido à escalada de escada e testes de memória (GT3), apresentou uma diminuição nos cruzamentos de 43,05% do teste 2 em relação ao teste 1, contra apenas 19,58% de diminuição apresentado pelo grupo que realizou

apenas testes de memória (GT1). Quanto ao número de elevações, o GT3 apresentou diminuição de 54,43% do teste 2 em relação ao teste 1, contra 38,88% de diminuição apresentado pelo GT1. Esses índices comprovam que os animais exercitados apresentaram melhor consolidação e evocação da MLD no teste 2 aplicado 24 horas depois do teste 1. Tais ratas possivelmente desenvolveram conexões neuronais mais abundantes pelas experiências obtidas com a atividade física e, ao serem submetidas à mesma tarefa de cruzamentos e elevações com intervalo de 24 horas apresentaram menor interesse pela tarefa memorizada.

Com relação ao comportamento emocional, houve diminuição mais acentuada do número de bolos fecais no teste 2 (50%) em relação ao teste 1 (72,22%) do GT3. Medo e ansiedade estão diretamente relacionados ao ambiente desconhecido e o fato do animal defecar em situações ansiogênicas significa que se sente desconfortável em tal condição (BRYANT, 2008; KYRIOS, 2011).

Pelo teste de reconhecimento de objetos, os animais demonstraram a capacidade de armazenar informações de curta e longa duração. A estimulação proporcionada pelo exercício físico (GT3) favoreceu que as ratas explorassem mais o objeto novo em relação ao objeto familiar tanto para o objeto C quanto para o objeto D. Supõe-se que novas conexões neuronais e mais numerosas (PYSH, 1979), se estabeleceram nesses animais em detrimento aos não exercitados (GT1) que apresentaram menor exploração do objeto novo em relação ao familiar. Estes dados refletem os resultados tanto para a MCD (teste 1), como para a MLD (teste 2) (COTMAN, 2002; IZQUIERDO, 2004; VAYMANN, 2005; ROSSATO, 2007).

Pelas análises do plasma, observou-se que o grupo de animais sedentários (GC) apresentou maior peroxidação lipídica e menor capacidade antioxidante (Fig. 7 e 8), fato que aponta para um estado de estresse oxidativo. Índices inversos foram observados para o GT3, mostrando que as duas atividades associadas promoveram um estado de equilíbrio entre a ação das ERO e as defesas antioxidantes (HALLIWELL, 1991; GARBER, 2003). Para os grupos submetidos a testes de memória (GT1) e escalada em escada (GT2), os resultados semelhantes sugerem que ambos os exercícios foram eficientes em manter o equilíbrio da peroxidação lipídica, ao passo que para o GT2 a FRAP foi maior indicando que o exercício físico provocou o aumento das defesas antioxidantes totais.

Os antioxidantes solúveis encontram-se no sangue circulante ou nos fluidos intersticiais. Podem agir neutralizando diretamente as ERO ou por intermédio da participação de sistemas enzimáticos. Dentre os principais destacam-se o ácido úrico e albumina (OLIVEIRA, 1999). Constatou-se que não houve diferença significativa quanto aos índices de albumina plasmática entre os grupos. Quanto ao ácido úrico, observou-se que a prática de atividade física e exercícios de memória não aumentaram os índices na intensidade aplicada. O aumento isolado na concentração do ácido úrico não pode ser considerado uma resposta específica da adaptação ao estresse oxidativo, posto que este é um produto final do ciclo das purinas. O ácido úrico, todavia, contribui significativamente para a redução do estresse oxidativo. De forma geral, o conjunto de alterações nos antioxidantes não enzimáticos pode promover aumento na capacidade total de antioxidantes, indicando uma adaptação ao treinamento físico (TIRAPÉGUI, 2007). Outras análises plasmáticas foram realizadas apenas para verificação da saúde dos animais como ALT, AST, creatinina, FA, PT e uréia.

Pelas análises bioquímicas do hipocampo, constatou-se que o GT3 que realizou o exercício de escalada em escada e testes de memória, apresentou menor peroxidação lipídica e maior capacidade antioxidante, ficando o nível de SOD intermediário pela sua não necessidade em função da manutenção de um estado fisiológico equilibrado. Esses resultados comprovam que a associação das duas atividades é mais eficiente no combate às ERO (MACEDO, 2009). O GT2 que apenas realizou escalada em escada apresentou peroxidação lipídica estatisticamente semelhante aos GC e GT1 (Fig. 13), porém a atividade física elevou a capacidade antioxidante do GT2 em relação aos dois grupos anteriores (Fig. 14).

A atividade física é importante em todas as idades, principalmente na fase adulta e no envelhecimento; potencializa a memória pela criação de novas conexões sinápticas, resulta em aumento das defesas antioxidantes endógenas, protegendo o organismo contra danos ao DNA, doenças graves e degenerativas (GARBER, 2011). Dentre elas pode-se citar o câncer, Alzheimer, doenças cardiovasculares e outras. Este estudo sugere que a prática regular de atividade física moderada é capaz de promover aumento da defesa antioxidante endógena, potencializar a memória de curto e longo prazo e reduzir o dano oxidativo.

7 Conclusão

Conclui-se que a prática isolada de atividade física não foi suficiente para diminuir o estresse oxidativo; mas a associação de exercícios de memória e atividade física diminuiu a peroxidação lipídica, aumentou as defesas antioxidantes e potencializou a memória de curta e longa duração em ratas senescentes.

Agradecimentos

Este trabalho teve como apoio financeiro a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil). Aos colaboradores que de alguma forma nos auxiliaram para a realização deste trabalho: Camila Otake Soares pela revisão do manuscrito, Francine Rodrigues Navarro, Luis Gustavo Narciso, Matheus Fujimura Soares, Pedro Luís Florindo e Rodrigo Antonio Fernandes pelo cuidado e auxílio no manejo e bem estar dos animais.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.S. Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos. Marília Silva de Albuquerque, Dissertação de Mestrado. USP-São Paulo, 2013.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **J Am Oil Chem Soc.** 75(2): 199-212, 1998.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DePAULA, S.O.; MININ, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr.** 23(4): 629-643, 2010.

BARROS, M.H.; MYERS, A.M.; VanDRIESCHE, S.; TZAGOLO, F.F.A. COX24 codes for a mitochondrial protein required for processing of the COX1 transcript. **J Biol Chem.** 281(6): 3743-3751, 2006.

BEAR, M.F. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** 2. edição. Porto Alegre: Artmed; 2002.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, **Anal Biochem.** 239(1): 70-76, 1996.

BERNHARDI, M.R. Envejecimiento: Cambios Bioquímicos y Funcionales del Sistema Nervioso Central. **Rev Chilena Neuro-Psiquiatria.** 43(4): 297-304, 2005.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory', **Nat Protoc.** 1(3): 1306-1311, 2006.

BIASOLI, M.C. Tratamento fisioterápico na terceira idade. **Rev Bras Med.** (64): 62-68, 2007.

BOWLER, C.; VAN, M.M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance, **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** (43): 83-116, 1992.

BRYANT, C.; JACKSON, H.; AMES, D. The prevalence of anxiety in older adults: methodological issues and a review of the literature, **J Affec Dis.** (109): 233-250, 2008.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation, **Met Enzymol.** (52): 302-310, 1978.

CANÇADO, F.A.X.; HORTA, M.L. **Cap. 13 – Envelhecimento cerebral** in FREITAS, E.V.; PY, L.; NERI, A.L.; CANÇADO, F.A.X.; GORZONI, M.L.; ROCHA, S.M. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 112-127, 2002.

CARDOSO, A.S. O processo de envelhecimento do sistema nervoso e possíveis influências da atividade física. **Rev Biol Saúde. UEPG:** Ponta Grossa, 13(3/4): 29-44, 2007.

CARPES, P.B.M.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract→nucleus paragigantocellularis→locus coeruleus→CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory, **Neurobiol Learn Mem.** (100): 56-63, 2013.

CASPERSEN, C.J.; POWELL, K.E.; CHRISTENSON, G.M. Physical Activity, Exercise and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research. **Public Health Reports,** 100(2): 126-131, 1985.

CHEN, S.; ASAKAWA, T.; DING, S.; LIAO, L.; ZHANG, L.; SHEN, J.; YU, J.; SHUGAN-SAN, S.K.C. Administration ameliorates perimenopausal anxiety and depression in rats, **Plos One** 8(8): 72428, 2013.

COSTA, M.S. O impacto da frequência do exercício físico sobre proteínas sinápticas e o comportamento de ratos durante a fase adulta e no envelhecimento. Tese de Doutorado, UFRG: Porto Alegre; 2012.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci.** (25): 295-301, 2002.

CRUZ, J.G.P. Efeitos do extrato de Ginkgo biloba (Egb 761) e da natação repetida sobre a memória, ansiedade e atividade motora de ratos. **Rev Farm Bás Aplicada.** 31(2): 149-155, 2010.

DEANGELIS, R.C.; TIRAPEGUI, J. **Fisiologia da nutrição humana:** aspectos básicos aplicados e funcionais, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DISHMAN, R.K. Medical psychology in exercise and sports. **Med Clin North Am.** (69): 123-43, 1985.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J.A. New one trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. **Behav Brain Res.** (31): 47-59, 1988.

FARINATTI, P.T.V. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico, **Ver Bras Med Esporte**, 8(4): 129-138, 2002.

FERRARI, E.A.M.; TOYODA, M.S.S.; FALEIROS, L.; CERUTTI, S.M. Plasticidade Neural: Relações com o comportamento e abordagens experimentais. **Psicol Teor e Pesq.** 17(2): 187-194, 2001.

FREITAS, R.M.; TOMÉ, A.R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Rev Psiquiát Clínica.** 37(3): 105-108, 2010.

GARBER, C.E. Effects of fatigue on physical activity and function in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, 60(7): 1119-24, 2003.

GARBER, C.E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M.R.; FRANKLIN, B.A.; LAMONTE, M.J.; LEE, I.M.; NIEMAN, D.C.; SWAIN, D.P. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, (43): 1334-1359, 2011.

GAZZANIGA, M.S.; HEARTHERTON T.F.. **Ciência Psicológica: mente, cérebro e comportamento**. 2.edição. Porto Alegre: Artmed; 2005.

GIBBONS, J.D.; CHAKRABORTI, S. Nonparametric statistical inference. 5.ed. Boca Raton: CRC 630 p., 2011.

GIOVANNELLI, L.; DECOROSI, F.; DOLARA, P.; PULVIRENTI, L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. **Brain Research**. 969(1-2): 244-247, 2003.

GOBATTO, C.A. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 130: 21-7, 2001.

GONCALVES, M.P.; TOMAZ, C.; SANGOI, C. Considerações sobre envelhecimento, memória e atividade física. **R Bras Ci e Mov**. 14(1): 101-108, 2006.

GUISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Rad Biol & Medicine**. 29(11): 1106-1114, 2000.

HALLIWELL, B. Electron transfer: switches in enzymes, **Nature**. 354(6350): 191-192, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 2. Ed., Clarendon Press, Oxford, 1995.

HAYFLICK, L. Mortality and immortality at the cellular level. **A review Bioch.** (Mosc) 62(11): 1180-1190, 1997.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. Disponível em www.planalto.gov.br/censo-2010.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; SOUZA, M.M.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ, **Nature** (393): 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed; 2002.

IZQUIERDO, I. **Questões sobre memória**. São Leopoldo: Unisinos; 2003.

IZQUIERDO, I. **Memória**, 2a. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I.; MYSKIW, J.C.; BENETTI, F.; FURINI, C.R.G. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes, **Rev USP-São Paulo**, (98): 9-16, 2013.

JIANG, Z.Y; WOOLLARD, A.C; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. 26(10): 853-6, 1991.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress, *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10) 1865-1879, 2006.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEI, T.M. **Princípios da Neurociência**. 4. edição. Barueri-SP: Manole, 1300 p. 2003.

KERMATH, B.A.; GORE, A.C. Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model, **Neuroendocrinology** 96(1): 1-12, 2012.

KYRIOS, M.; MOUDING, R.; NEDELJKOVIC, M. Anxiety disorders – assessment and management in general practice, **Aust Fam Physician**, (40): 370-374, 2011.

LATA, H.; ALIA L.W. Ageing: Physiological Aspects. **JK Science**. (9): 111-115, 2007.

LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M.K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior, **Biol Reprod**. 38(4): 780-789, 1988.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Ed. Atheneu; 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent, **J Biol Chem**. (193): 265-275, 1951.

LUCENA, C.F. Antioxidantes em exercícios aeróbios: papel do selênio e glutathione peroxidase. **Rev Mackenzie Educ Fís e Esp**. 9(1): 29-34, 2010.

MACEDO, U.B.O. Influência do hipoestrogenismo por ooforectomia na adaptação antioxidante em ratas Wistar exercitadas regularmente. [Dissertação] UFRN-Natal-RN, 2009.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2.edição. São Paulo: Atheneu, 2004.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations, **Braz.J.Biol**. 62(4a): 609-614, 2002.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation, In: Greenwald RA, ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press 243-247, 1985.

MELLO, P.B. Efeitos do exercício físico sobre diferentes tipos de memória em ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal. [Dissertação] UFRGS-Porto Alegre-RS, 2008.

MEYER, F.; IOSHII, S. O.; PATRIANI, A. H. Nefrectomia Parcial Videolaparoscópica: Modelo Experimental em Ratos. **Braz J Video-Sur.**, 3(4): 183-190, 2005.

MONTEIRO, H.M.C. Interação da L-arginina com o exercício físico durante o desenvolvimento do sistema nervoso: análise da depressão alastrante cortical em ratos jovens e adultos. Dissertação de Mestrado. UFPE. CCS. Nutrição, 2011.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**, 8.ed.Hoboken: John Wiley & Sons, 730 p., 2013.

MORA, F.; PORRAS, A. **Cap. 36 – Procesos Involutivos Del Sistema Nervioso in** DELGADO, J. M.; FERRÚS, A.; MORA, F.; RUBIA, F.J. Manual de Neurociência. Madri: Sintesis, p. 915-927, 1998.

MOTA, K.M.S.; PEREIRA, A.S.; RODRIGUES, M.E.O.S. Leituras compartilhadas, memória e envelhecimento. **Rev FAEEBA-Educ contempor**. Salvador, 23(41): 105-116, 2014.

NARVAES, R.F.; Comportamento agressivo e três neurotransmissores centrais: dopamina, gaba e serotonina – uma revisão sistemática dos últimos 10 anos. Tese de Doutorado. UFRG: Porto Alegre, 2013.

NEMENYI, P. Distribution-free multiple comparisons. Ph.D. thesis, Princeton University, 1963.

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products. **Febs Lett**. 586(21): 3767-70, 2012.

OLIVEIRA, C.P.M.S. Efeito da silimarina verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática e citoproteção e redução do estresse oxidativo. [Tese] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, P.L.L. Efeito das isoflavonas de soja nos epitélios mamário e endometrial de ratas ooforectomizadas, [Dissertação] UFMA São Luís, 2008.

PAPALÉO, N. M. **Tratado de gerontologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 3-14, 2007.

PAREDES, D.A. Neurotransmitter release during delay eyeblink classical conditioning: role of norepinephrine in consolidation and affect of age. **Rev Neurobiol Learn Memory**. 92(3): 267-282, 2009.

PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exerc Immunol Review**, (10): 129-141, 2004.

PEREIRA, A.A.F. Chá Mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2013.

PINHO, R.A.; ANDRADES, M.E.; OLIVEIRA, M.R.; PIROLA, A.C.; ZAGO, M.S.; SILVEIRA, P.C. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int**. (30): 848-53, 2006.

PITANGA, F.J.G. Epidemiologia, atividade física e saúde. **Rev Brasil Ciênc e Mov**. Brasília, 10(3): 49-54, 2002.

POSADAS, S.J.; CAZ, V.; LARGO, C.; GÂNDARA, B.; MATALLANAS, B.; REGLERO, G.; DeMIGUEL, E. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats, **Exp Gerontol**, 44(6-7): 383-389, 2009.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J.; Exercise induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol. Rev**. (88): 1243-1276, 2008.

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

RAMESH, T. Effect of fermented Panax ginseng extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. **Exp Gerontol.** 47(1): 77-84, 2012.

RANSFORD, C.P. A role for amines in the antidepressant effect of exercise: A review. **Med Sci Sports Exerc.** (14): 1-10, 1982.

ROCHA, L.S. Alteração da Disponibilidade de Alimento de Ratos WISTAR Segundo a Fase do Ritmo Circadiano: Um Estudo das Repercussões Comportamental, Fisiológica e Bioquímica Sanguínea, [Dissertação] UFPE-Recife-PE, 2015.

ROSA, J.M. Efeito da creatina no comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo β -amilóide 1-40 em camundongos [dissertação] Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, PPG em Bioquímica, 2015.

ROSA, L.F.P.B.C.; VAISBERG, M.W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev. Bras. Med. Esporte**, 8(4): Jul/Ago, 2002.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.M.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem**, (14): 36-46, 2007.

SCOLARO, B. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. **Oxid Med Cell Longev.** 2012:314758, 2012

SIEGEL, S.; CASTELLAN, J.R.; JOHN, N. **Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento**, 2.ed.Porto Alegre: Artmed, 448 p., 2006.

SONI, N.O. Antioxidant assay in vivo and vitro, **Internat Jornal of Phytopharmacology.** 5(1): 51-58, 2014.

SOUZA, J.N.; CHAVES, E.C. O efeito do exercício de estimulação da memória em idosos saudáveis. **Rev. Esc. Enferm. USP.** 39(1): 13-9, 2005.

SQUIRE, L.; KANDEL, E. Aprendizado das habilidades. **Rev viver mente sér.** (2): 50-55, 2011.

TIRAPGUI, J.; **Nutrition: fundamentals and current spect**s, 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

TIRAPGUI, J; CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev Bras Med Esporte.** 13(5): 336-342, 2007.

TIRAPELI, K.G. Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

VAN PRAAG, H.; SCHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F.H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J. Neurosci.**, (20): 2580-2590, 2005.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromol Med**, (10): 128-140, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; FRANÇA MOURA, J.B.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova.** 30(5); 1323-1338, 2007.

VAYNMAN, S.S.; YINA, D.; GOMEZ-PINILAA, F. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain Res.** (1070): 124-130, 2006.

VIEIRA, S. **Bioestatística: tópicos avançados**, 3.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 278p., 2010.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol Bull.** (83): 482-504, 1976.

ZAGO, A.S.; GOBBI, S. Valores normativos da aptidão funcional de mulheres de 60 a 70 anos. **R. Bras. Ci. e Mov.** 11(2): 77-86, 2003.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journ Experim Medic.** 183(4): 1533-1544, 1996.

ZANELLA, A.M.; SOUZA, D.R.S.; GODOY, M.F. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. **Arq Ciênc Saúde**, Abr-Jun; 14(2): 107-12, 2007.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and Ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.** 33(3): 337-349, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Preservação da memória: algumas práticas estimuladoras aplicadas em ratas"**, Processo FOA nº 00601-2016, sob responsabilidade de Suely Regina Mogami Bomfim apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Janeiro de 2018.

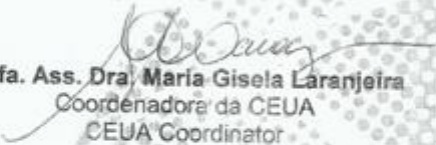
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Fevereiro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Memory preservation: some practical stimulatory applied in rats"**, Protocol FOA nº 00601-2016, under the supervision of Suely Regina Mogami Bomfim presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 02, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 02, 2018.



Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Coordenadora da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

