

EMERSON DA SILVA PEREIRA

**Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí
sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos**

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

EMERSON DA SILVA PEREIRA

**Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí
sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientadora:
Profa. Dra. Michele Schultz

**São Paulo
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVECCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PEREIRA, EMERSON

Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos / EMERSON PEREIRA; orientador Michele Schultz . -- São Paulo, 2019.

89 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Açaí. 2. Antocianina . 3. Exercício físico. 4. Memória . 5. Ansiedade. I. Schultz Michele , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pela compreensão e paciência durante todo esse trajeto. A todos os professores pelas experiências compartilhadas.

A todos os técnicos; Lucimara, André e Ricardo da EACH USP, que contribuíram para a execução de várias etapas deste estudo, em especial à Simone Aparecida Teixeira do laboratório do departamento de farmacologia do ICB I, pela ajuda em muitas etapas das análises moleculares do meu estudo. A Professora Dra. Soraia Katia Pereira Costa, por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar importante etapa do nosso trabalho, agradeço pela oportunidade e pela confiança. Ao Dr. Leandro Rodrigues, grande amigo, que desde o início me apoio e ajudou em vários momentos.

Aos colegas das escolas; Professor Paulo Américo Paganucci, Senador Luís Carlos Prestes e Instituto Educacional Luterano por toda paciência e compreensão durante esses anos, em que em muitos momentos estive ausente de muitas das minhas obrigações em função desse estudo.

Ao GENAF, que durante as reuniões do grupo pude trocar inúmeras experiências com todos os colegas e que certamente contribuíram com o meu estudo. Também, gostaria de agradecer a Daniela Perpetuo Miranda, por toda ajuda durante a realização de várias etapas do meu estudo.

A professora Fabiana Evangelista e seus alunos Cynthia Muller e Bruno Vecchiato pela parceria em compartilhar alguns equipamentos utilizados no estudo.

Por fim, mas não menos importante, a minha orientadora, Professora Dra. Michele Schultz, por sua tranquilidade inabalável, ensinamentos, desenvolvimento científico, paciência e por toda ajuda na elaboração deste trabalho. Seu apoio e ajuda tornaram isso possível, muito obrigado.

PEREIRA, E.S. Efeito do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

O exercício físico (EF) tem relação com melhora na qualidade de vida. Quando nos referimos ao sistema nervoso (SN), o EF diminui efeito lesivo causado por doenças, possibilitando a recuperação em menor tempo, além de contribuir com processos relacionados à melhora cognitiva e redução da ansiedade. Contudo, o EF pode elevar à formação de radicais livres (RL) que, em contato com o SN pode reduzir seu potencial protetor e terapêutico. Os flavonoides são compostos com ação antioxidante e entre eles estão as antocianinas, um dos mais importantes flavonoides com ação antioxidante e anti-inflamatória. O açaí possui grande quantidade de flavonoide podendo, portanto, em associação com EF, potencializar efeitos benéficos ao SN. O presente estudo investigou os efeitos do EF combinado com ingestão de polpa de açaí sobre o comportamento e eventos moleculares em ratos. Para tanto, 32 ratos machos com aproximadamente 120 dias de vida foram divididos em 4 grupos experimentais: i) Sedentário suplementado com açaí (SedA); ii) Sedentário (Sed); iii) Exercício (Exe) e iv) Exercício suplementado com açaí (ExeA). O protocolo de EF na esteira foi de 7 dias, sendo nos dois primeiros sessões de 30 minutos com velocidade de 14m/min. Do terceiro ao sétimo dia, apenas a duração foi aumentada para 1 hora. A suplementação com polpa de açaí foi feita por gavagem com dosagem de 500mg/Kg diluído em água e ocorreu uma hora antes do EF. Os animais sem suplementação (i e ii) receberam água. Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos, individualmente, aos testes de campo aberto (CA) para avaliar ansiedade e reconhecimento de objeto (RO) para avaliar a memória. Após os testes os animais foram eutanasiados sob anestesia e os tecidos do hipocampo e amígdala foram analisados. As proteínas BDNF, GDNF, GAP43 e GFAP foram analisadas por Western blot e a cinética da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD foi testada por imunoensaio. Os dados comportamentais e moleculares foram avaliados estatisticamente através do software Prisma. O peso corporal foi diferente entre os grupos sedA e Exe (0,0001). O teste de rearing (ansiedade) apontou diferenças entre os grupos SedA e ExeA quando comparados com Sed (0,0003). A micção diminuiu nos grupos SedA e ExeA (0,0121). Os grupos SedA e ExeA (0,0042) tiveram comportamentos diferentes no teste de RO em comparação com grupo Sed (0,0026). Houve aumento da atividade de GPx no hipocampo dos animais do grupo Exe em comparação com grupo Sed (0,0002) e, na amígdala, houve diferenças entre grupos Exe e ExeA quando comparados com Sed (0,0037). Houve efeito da administração de açaí sobre o BDNF maduro no hipocampo, levando à diferença na razão BDNF maduro e BDNF total entre os grupos SedA e ExeA em relação ao Sed (0,0107) e (0,0035). Não houve diferença entre os grupos nas análises das proteínas GDNF, GAP43 e GFAP. A associação de EF a açaí influenciou positivamente alguns parâmetros relacionados à ansiedade, denotando possível efeito ansiolítico. Houve ainda efeitos sobre atividade da enzima antioxidante GPx no hipocampo e amígdala, indicando que, possivelmente, essa possa ser uma das vias que recebeu influência do EF e açaí.

Palavras-chave: açaí, antocianina, exercício físico, ansiedade, memória, estresse oxidativo, neuroplasticidade.

ABSTRACT

Physical exercise (PE) is related to an improvement in the quality of life. When we refer to nervous system (NS), the PE reduce the harmful effect caused by diseases, allowing recovery in a shorter time, besides contributing with processes related to cognitive improvement and reduction of anxiety related events. However, EF can raise the formation of free radicals (FR) which, in contact with CN can reduce the protector and therapeutic potential. Flavonoids are compounds with antioxidant action such as anthocyanins, one of the most important flavonoids with antioxidant and anti-inflammatory activity. Açai has a large amount of this flavonoid and associated to PE can potencialize benefits to CN. The present study investigated the effects of PE combined with ingestion of açai pulp on behavior and molecular events in rats. For this, 32 male rats with approximately 120 days of life were divided into 4 experimental groups: i) Sedentary supplemented with açai (SedA); ii) Sedentary (Sed); iii) Exercise (Exe) and iv) Exercise supplemented with açai (ExeA). The PE protocol was 7 days of treadmill running. The first two sessions was 30 minutes of PE with speed of 14m / min. From the third to the seventh day only the duration was increased to 1 hour. Supplementation with açai pulp was made by gavage at a dosage of 500mg/kg diluted in water, one hour before EF. The animals without supplementation (i and ii) received water. After 24 hours of the last training session, the animals were individually submitted to the open field (OF) tests in order to evaluate anxiety and object recognition (OR) to evaluate memory. After the tests the animals were euthanized under deep anesthesia and the hippocampal and amygdala tissues were analyzed. The proteins BDNF, GDNF, GAP43 and GFAP were analyzed by Western Blot and the kinetics of the activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx and SOD by immunoassay. The behavioral and molecular data were statistically evaluated using the Prisma software. There was a difference in body weight between SedA and Exe groups (0.0001). The rearing evaluation was different SedA and ExeA when compared with Sed (0.0003). The miction reduced in SedA and ExeA groups 0.0121). The groups SedA and ExeA (0.0042) had had different behaviors in the OR test when compared to Sed (0.0026). There was increase in GPx activity in hippocampus in the Exe group and in the amygdala the activity was higher in Exe and ExeA groups than in Sed group (0.0002). We observed effect of the açai in the mature BDNF in the hippocampus, resulting in difference in the ratio mature BDNF/total BDNF in the SedA and ExeA in comparison with Sed (0.0107 and 0.0035). We did not found differences in GDNF, GAP43 and GFAP. The association of PE and açai influenced positively parameters related to anxiety behavior. There was effect over the antioxidant activity of GPx both in hippocampus and amygdala, indicating que, probably, this can be one of the pathways which can be influenced by the PE and açai.

Key words: acai, anthocyanin, exercise, anxiety, memory, oxidative stress, neuroplasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	-adenosina trifosfato
BDNF	-fator de crescimento derivado do cérebro
BSA	-albumina de soro bovino
CA	-campo aberto
CA	-corno de amon
CAT	-catalase
EDTA	-ácido etilenodiamino tetra-acético
EF	-exercício físico
EO	-estresse oxidativo
ER	-espécies reativas
ERN	-espécies reativas de nitrogênio
ERRO	-espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	-ferro
FeS	-sulfeto de ferro
GAP43	-proteína associada ao crescimento 43
GDNF	-fator de crescimento derivado da glia
GFAP	-proteína ácida fibrilar glial
GPx	-glutationala peroxidase
GR	-glutationala redutase
GSH	-glutationala reduzida
GSSG	-glutationala oxidase
H ₂ O ₂	-peróxido de hidrogênio
HRP	-peróxido de raiz forte
NaCl	-cloreto de sódio
NADP+	-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NADPH	-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGF	-fator de crescimento do nervo
NO	-óxido nítrico
NO ₂	-dióxido de nitrogênio
SN	-sistema nervoso

SNC	-sistema nervoso central
NT	-neurotrofinas
O ₂ -	-oxigênio molecular
OD	-o-dianisidina
OH ⁻	-hidroxila
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonila
p75NTR	- receptor de neurotrofina 75
RL	-radicais livres
RO	-reconhecimento de objetos
SDS	-dodecil sulfato de sódio
SOD	-superóxido dismutase
TBS t	-solução salina tris tamponada
TRIS HCl	-hidroximetil aminometano
XOD	-xantina oxidase
XTT	-sal de tetrazólio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da ação do sistema de defesa antioxidante.....	20
Figura 2- Estrutura básica do flavonoide com um núcleo central, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis fenólicos.....	21
Figura 3- Estrutura das antocianinas.....	22
Figura 4- Estrutura química das antocianinas encontradas no açaí.....	24
Figura 5- Concentração de antocianina.....	24
Figura 6- Representação dos eventos de formação de memória de curto e de longo prazo.....	26
Figura 7- Esteira adaptada na qual o protocolo de exercício físico agudo foi aplicado os grupos experimentais.....	35
Figura 8- (A) e (B) aparato utilizado para os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos.....	38
Figura 9- Painéis com indicação dos tecidos retirados para análise da atividade das enzimas antioxidantes e quantificação das proteínas por WB.....	40
Figura 10- Comparação do efeito da atividade física e da administração de açaí sobre a porcentagem do peso.....	47
Figura 11- Efeito do exercício físico e/ou dieta em traços relacionados a ansiedade durante o teste de CA.....	49
Figura 12- Efeito do exercício físico e / ou dieta na locomoção durante o teste de campo aberto.....	50
Figura 13- Efeito do exercício físico e / ou dieta na memória no teste de reconhecimento de objetos.....	51
Figura 14- Atividade das enzimas antioxidantes medidas pela decomposição do peróxido de hidrogênio no hipocampo.....	52
Figura 15- Atividade das enzimas antioxidantes medidas pela decomposição do peróxido de hidrogênio na amígdala	53
Figura 16- Os gráficos A, B, C e D ilustram as membranas representativas (Western blot) contendo bandas imunorreativas para BDNF, juntamente com o controle interno β -actina.....	54
Figura 17- Os gráficos A, B, C e D ilustram as membranas representativas (Western blot) contendo bandas imunorreativas para BDNF, juntamente com o controle interno β -actina.....	55
Figura 18- Os gráficos A, B e C ilustram as membranas representativas (Western blot) contendo bandas imunorreativas para GDNF, GAP 43 e GFAP no hipocampo para cada grupo, juntamente com o controle interno β -actina.....	56
Figura 19- Os gráficos A, B e C ilustram as membranas representativas (Western blot) contendo bandas imunorreativas para GDNF, GAP 43 e GFAP na amígdala para cada grupo, juntamente com o controle interno β -actina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos grupos experimentais.....	32
Tabela 2- Tabela com informações nutricionais da polpa de açaí fornecidas pela empresa colaboradora que doou a poupa.....	34
Tabela 3- Relação das especificações dos anticorpos utilizados para a avaliação da atividade das proteínas via WB.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Exercício físico e neuroplasticidade	13
1.2 Exercício Físico, Estresse Oxidativo e Radicais Livres	17
1.3. Mecanismos antioxidantes no SNC	19
1.4. Açaí	22
1.5. Memória e comportamento relacionado a ansiedade	25
1.5.1. Memória.....	25
1.5.2. Ansiedade.....	26
1.6. Exercício físico, açaí, memória e ansiedade	28
2. OBJETIVO GERAL	30
2.1. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Desenho experimental	31
3.2. Grupos experimentais	31
3.3. Administração do açaí	33
3.3.1. Composição nutricional da polpa liofilizada de açaí utilizada no estudo	33
3.4. Protocolo de exercício físico	35
3.5. Aparelho onde ocorreu o programa de atividade física	35
3.6. Programa de atividades	36
3.7. Testes comportamentais	36
3.7.1. Teste campo aberto (CA).....	36
3.7.2. Teste de reconhecimento de objetos (RO).....	37
3.8. Eutanásia dos animais e retirada dos tecidos	39
3.9. Avaliação proteica	40
3.10. Anticorpos utilizados para a avaliação das proteínas	42
3.11. Avaliação da atividade das enzimas antioxidante nos tecidos hipocampo e amígdala	42
3.11.1. Avaliação da atividade da catalase	42
3.11.2. Avaliação da atividade da SOD.....	44
3.11.3. Avaliação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	45

3.12. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1. <i>ganho de peso corporal</i>	47
4.2. <i>Efeito do açaí sobre o comportamento relacionado à ansiedade</i>	48
4.3. <i>Efeito da atividade física e/ou açaí na a exploração dos animais no teste de</i>	50
<i>campo aberto (CA).....</i>	50
4.4. <i>Efeito da atividade física e/ou açaí sobre a memória de curto prazo.....</i>	51
4.5. <i>Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no hipocampo.....</i>	52
4.6. <i>Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx na amígdala</i>	53
4.7. <i>Efeitos do exercício física e/ou açaí sobre proteínas relacionadas à</i>	54
<i>neuroplasticidade.....</i>	54
4.7.1. <i>Expressão proteica de BDNF no hipocampo.....</i>	54
4.7.2. <i>Expressão proteica de BDNF na amígdala</i>	55
4.8. <i>Expressão proteica de GDNF, GAP-43 e GFAP no hipocampo</i>	56
4.9. <i>Expressão proteica de GDNF, GAP 43 e GFAP na amígdala</i>	57
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO.....	69
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXO.....	88

1. INTRODUÇÃO

O exercício físico (EF) contribui para a melhora de processos metabólicos de forma profilática ou terapêutica, sendo importante para manutenção da saúde. O EF pode induzir a síntese de diversas proteínas envolvidas em processos antioxidativos, anti-inflamatórios, como também induzir processos neurogênicos e/ou neuroplásticos (Caspersen et al., 1985). Contudo, o estudo dos processos fisiológicos associados ao exercício físico se faz necessário, uma vez que muitas pesquisas evidenciam que a prática da atividade física pode aumentar os níveis de espécies reativas (ER) e isso pode causar danos para diversos tecidos, em especial o nervoso, por ser muito sensível a processos oxidativos causados pelo aumento de espécies oxidativas como H_2O_2 , NO, entre outros (Radak, 2006). Desse modo, o EF pode comprometer muitos processos biológicos, mesmo existindo mecanismos internos de combate a essas espécies reativas (Dringen, 2000).

Recentemente, são usados muitos compostos não farmacológicos no controle de processos celulares importantes. O açaí, um fruto muito comum e consumido em muitas regiões do país, tem sido procurado por apresentar, também, capacidade antioxidante, pois possui um importante pigmento com ação antioxidante. Sabendo do efeito antioxidante do açaí, parece que a suplementação com ele durante o exercício físico pode tanto diminuir os efeitos lesivos, quanto potencializar os efeitos benéficos ocasionados pela prática (Schauss et al., 2006).

1.1. Exercício físico e neuroplasticidade

Diversos estudos apontam a prática de EF como um importante mecanismo promotor de aspectos ligados à melhora na qualidade de vida. Entretanto, parte da população (em torno de 60%), possivelmente influenciada pelo estilo de vida atual,

não realiza o mínimo de EF recomendado, contribuindo para um estado de sedentarismo, segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2010). EF é definido como qualquer movimento muscular que resulte em gasto energético diferente do estado de repouso (Caspersen; Powell et al., 1985; Hallal et al., 2005).

De modo inversamente proporcional, com o avanço tecnológico, tem se constatado uma diminuição do interesse pela prática de EF e o aumento desse fenômeno tem graves consequências negativas a médio e longo prazo no que diz respeito a adaptações fisiológicas, que vai desde a perda de massa e funcionalidade muscular até a diminuição das capacidades cardiorrespiratórias, podendo, até mesmo, levar a alterações do sistema nervoso (SN; Boutcher, 2011).

Recentemente, vários estudos têm relacionado o EF a melhora no funcionamento do cérebro. Dessa forma, muitas evidências apontam para o conceito de que o EF traz benefícios para funções cognitivas e reduz processos de ansiedade, depressão e doenças neurodegenerativas (Cotman, 2007, Deslandes et al., 2009). Assim, a prática regular de EF age de modo preventivo e/ou terapêutico ao diminuir a chance de ocorrência de diversas doenças, entre elas as neurodegenerativas (Cechetti, 2008; Deslandes et al., 2009; Gomez Pinilla, 2011).

A prática regular de EF contribui no sentido de diminuir o efeito lesivo causado por diversas doenças e, até mesmo, contribuir para uma recuperação em menor tempo após algum dano e, portanto, vem sendo considerada importante para a neuroproteção (Stummer et al., 1994; Mora, 2013;). Também, por proporcionar aumento da expressão de diversos genes relacionados ao SN, aumento da capacidade de formação e consolidação da memória e aprendizado, sendo assim,

uma importante estratégia para diminuir processos relacionados a danos no SN (Zeigelboim et al., 2001; Cotman et al., 2007; Deslandes et al., 2009).

O EF pode promover diversas alterações em várias regiões do sistema nervoso central (SNC). Sabe-se que a prática de exercícios contribui para o aumento dos níveis de fatores neurotróficos em diversas regiões do encéfalo, entre elas, o hipocampo (Berchtold, 2005; Radak et al., 2006; Berchtold et al., 2010) estimulando a neuroplasticidade e aumento do número de neurônios (Vivar et al., 2012). As neurotrofinas (NT) são uma família de proteínas sequenciadoras do crescimento, diferenciação, sobrevivência de neurônios e células gliais (Lessmann e Brigadski, 2009). Fazem parte da família das neurotrofinas: fator de crescimento do nervo (NGF - nerve growth factor), neurotrofinas 3, 4, 5, 6 e 7 (NT3, NT4, NT5, NT6 e NT7) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - brain derived neurotrophic factor; Nilsson et al., 1998; Poo, 2001; Yamada et al., 2002).

O EF é um ativador da neuroplasticidade mediada pelo BDNF, em especial, o aeróbico. Dessa forma, o EF pode atuar de forma benéfica no SNC, pois indica melhora nos mecanismos de aprendizagem e memória após a prática de EF (Foster et al., 2011, Cassilhas et al., 2012, Teri et al., 2015). O EF, tem efeito sobre os mecanismos de aprendizagem e memória e diferentes protocolos têm sido utilizados para melhora dos processos citados (Berchtold et al., 2010; Pietrelli et al., 2012), com intensidade e duração moderada, pode aumentar os níveis de NT e há uma relação proporcional entre sua concentração e o exercício (Johnson e Mitchell, 2003; Bertchold et al., 2010). Dessa forma, o EF induz mecanismos que promovem a neuroproteção a neuroplasticidade a sinaptogênese a neurogênese entre outros processos importantes para o tecido nervoso. Contudo, os detalhes de como esse processo ocorre, ainda

precisam ser melhores entendidos (Molteni et al., 2002; Lista e Sorrentino, 2010; Stranahan e Mattson, 2012).

Também faz parte do grupo dos fatores neurotróficos, o fator de crescimento derivado da glia (GDNF) que apresenta efeito sobre os neurônios dopaminérgicos, os motores e algumas populações de neurônios sensitivos (Lin et al., 1993; Buj-Bello et al., 1995) com papel relacionado à processos de regeneração de fibras nervosas lesadas e sobrevivência e função de neurônios dopaminérgicos (Houenou et al, 1996; Chao, 2003).

Vários trabalhos demonstraram respostas relacionadas à proteção e à regeneração dos neurônios por ação de fatores neurotróficos entre eles GDNF. A síntese desses fatores aumenta após a lesão do tecido nervoso o que diminui a morte neuronal decorrente da lesão (Chao, 2003). Além dos fatores neurotróficos, existem outras proteínas com importantes funções no sistema nervoso. A proteína associada ao crescimento 43 (GAP 43) é codificada pelo gene GAP 43 e é expressa em cones de crescimento neuronal com atuação na plasticidade sináptica, regeneração axonal e processos cognitivos após a lesão nervosa e que é regulada positivamente após a lesão (Namgung e Routtenberg, 2000).

A proteína codificada por este gene foi denominada proteína de crescimento porque é expressa durante o desenvolvimento e regeneração axonal (Scheytt, 2015). Esta proteína é considerada um componente crucial de uma resposta regenerativa efetiva no sistema nervoso, portanto, desempenha um papel importante no desenvolvimento do encéfalo. Ainda, em estudos com camundongos, constataram que o aumento de GAP 43 apresentou melhora no aprendizado (Scheytt, 2015).

Uma outra proteína também presente no sistema nervoso é a Proteína acídica

Fibrilar da Glia (GFAP), um marcador imunistoquímico utilizado para identificação de astrócitos (Sofroniew e Vinters, 2010). A GFAP é um membro de uma família de proteínas dos filamentos intermediários, que servem, em grande parte, para as funções cito-arquitetônicas, como a manutenção da integridade do citoesqueleto astrocitário (Steffek et al., 2008).

As funções dos astrócitos ainda não são bem compreendidas e tanto efeitos benéficos como a formação da barreira física que protege as regiões do encéfalo do tecido lesado, que restringe a inflamação e protege os neurônios e outras células, sendo também, responsável pela maior parte dos aspectos do suporte metabólico, nutrição, regulação da concentração de íons e neurotransmissores, como prejudiciais, inibindo a regeneração axonal (Park et al., 2003; Sofroniew, 2005; Theodosis et al., 2008).

Por outro lado, muitos estudos indicam que a prática de EF eleva a formação de radicais livres (RL), entre outras espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode resultar em estresse oxidativo (EO; Bondy, 1993). Contudo, outras pesquisas, sugerem que EF diminui os níveis de RL, já que a sua prática promove a ativação de diversas enzimas antioxidantes (Powers, 1993). O EO (EO), resultante do alto consumo de oxigênio durante os exercícios, processo essencial para a geração de energia, mas que, como consequência, pode levar à produção de RL, compostos lesivos, especialmente para o tecido nervoso (Van Remen et al., 2003).

1.2. Exercício Físico, Estresse Oxidativo e Radicais Livres

Nos seres aeróbios, o oxigênio é convertido em água no interior das mitocôndrias durante a respiração celular. Apesar da maior parte do oxigênio ser metabolizado na mitocôndria, uma pequena parte não sofre o processo de redução, o

que implica no surgimento de ERO. A prática de EF leva à necessidade de uma grande demanda de energia e o organismo mobiliza uma série de mecanismos fisiológicos para a absorção de oxigênio. Porém, parte do oxigênio proveniente da respiração acaba se transformando em compostos reativos lesivos ao organismo (Cooper et al., 2002; Renz, 2003; Radak, 2006).

Existem evidências de diversos problemas ocasionados pelos RL como peroxidação de membrana lipídica, oxidação de ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas, mutações, envelhecimento, entre outras, que podem contribuir para o surgimento de doenças como a doença de Parkinson (Sies, 1991; Belló, 2002). Vários compostos são definidos como RLs, por exemplo, o oxigênio molecular (O_2), hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) entre outros. Esses compostos são classificados como ERO e espécie reativa de nitrogênio (ERN; Silveira, 2003).

Normalmente, ERO e ERN estão presentes no organismo, porém, em concentrações baixas, em função de mecanismos de defesa antioxidantes que normalmente são produzidos em resposta à presença de espécies reativas (ERs). Existem diferentes mecanismos de ação no combate às ERs. Estes podem ser diferenciados em enzimáticos e não enzimáticos que, de modo geral, agem com diferentes estratégias como remoção do oxigênio do meio, retiradas de metais envolvidos nos processos de formação das ERs, aumentando o volume de antioxidantes ou induzindo o reparo e a reconstituição das regiões danificadas (Koury et al., 2003). As enzimas antioxidantes parecem responder de forma positiva à atividade física, aumentando suas ações protetoras nos diversos tecidos em que haja ERs, produzidas durante o metabolismo, inclusive durante o EF em função do aumento do consumo de oxigênio (Osorio et al., 2003).

O SNC é particularmente vulnerável as ERs. O encéfalo consome boa parte de todo o oxigênio utilizado, sendo assim, consideráveis concentrações de ERO são formadas. Outro aspecto da vulnerabilidade se deve a quantidade de ácidos graxos presentes nas células nervosas, estes, são substratos para ataque de ER, além da alta concentração de ferro (Fe^{2+}) que pode acelerar a síntese de ER a partir de compostos produzidos endogenamente (Mitozo et al., 2011). Como a demanda de energia no encéfalo é alta, há necessidade de uma grande produção de adenosina trifosfato (ATP). Muitas enzimas presentes nas mitocôndrias dependem de sulfeto de ferro (FeS) para realização das reações de oxiredução e, conseqüentemente, a necessidade de Fe^{2+} por esse órgão também se eleva. Nos oligodendrócitos, a produção e manutenção de mielina e a produção de inúmeros neurotransmissores também dependem de Fe^{2+} . Assim, problemas na manutenção desse micronutriente pode levar a alterações na comunicação celular (Thompson, 2001). Essa grande quantidade de ferro pode favorecer a formação de ERO tornando as células nervosas mais suscetível a EO (Mitozo et al., 2011). A degradação de ERs nas células neuronais por mecanismo enzimático, acontece por diferentes vias que são dependentes da atividade de diferentes enzimas como CAT, GPx, entre outras (Mitozo et al., 2011).

1.3. Mecanismos antioxidantes no SNC

Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém, o SNC, em especial o encéfalo, é muito vulnerável à ERO em função do volume de oxigênio produzido durante os processos metabólicos especialmente durante a prática do EF (Reiter, 1995). O consumo de oxigênio pelo encéfalo representa aproximadamente 20% do consumo total de oxigênio que o corpo necessita e a grande demanda por oxigênio deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios para manter tanto o

potencial de membrana quanto o fluxo de neurotransmissores (Andersen, 2004). Isto significa que os neurônios dependem muito da eficiência das mitocôndrias e, quando há um desequilíbrio entre na atividade desta organela, ocorre a geração de ERs (Halliwell e Gutteridge, 2002). Portanto, o uso de alguns compostos pode potencializar o combate as ERs, evitando ou diminuindo os processos oxidativos e protegendo os neurônios (Dornas, 2009).

As enzimas de combate às ERs incluem as, superóxido dismutases (SOD), catalases (CAT), glutathiona peroxidases (GPx) entre outras (Gomes et al., 2012). O mecanismo de ação dessas enzimas se baseia em decompor as ERs, entre elas O_2^- , H_2O_2 , NO e NO_2 (Figura 1; Gomes et al., 2012).

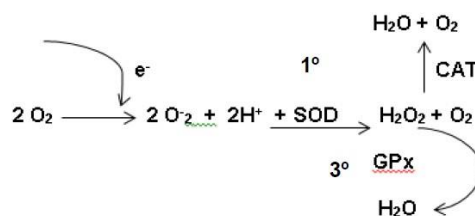


Figura 1. Esquema da ação do sistema de defesa antioxidante (adaptado de Galleguillos et al., 2010). A enzima SOD (1º) por meio da reação de dismutação produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido (O_2^-) enquanto as enzimas CAT (2º) e GPx (3º) agem sobre o H_2O_2 produzindo H_2O impedindo seu acúmulo. Mesmo não sendo um radical livre é muito lesivo para diversas estruturas celulares já que o excesso de H_2O_2 favorece a geração de hidroxila (OH^-) que é uma espécie reativa extremamente lesiva (Rover et al., 2001).

Já os mecanismos não enzimático de combate as ERs, são classificados em dois tipos: i) os hidrossolúveis, por apresentar maior afinidade com água, estes possuem maior ação no plasma sanguíneo, como a vitamina C e ii) os lipossolúveis, como os flavonoides, que apresentam maior ação nas membranas celulares por serem lipoproteicas (Mattson et al., 2002).

Os flavonoides são compostos encontrados tanto em hortaliças e frutas, quanto em diversos alimentos já passados por processos industriais. Esse grupo de

compostos possuem diversos benefícios para o organismo, crescimento e defesa, sendo a ação antioxidante e anti-inflamatória as de maior importância (Dixon et al., 1995). São conhecidos inúmeros flavonoides e sua composição básica consiste em quinze átomos de carbono organizados em três anéis (Figura 2) (Di Carlo et al., 1999).

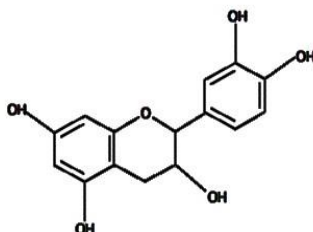


Figura 2. Estrutura básica do flavonoide com um núcleo central, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis fenólicos. A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é baseada em sua estrutura, principalmente nas hidroxilas pois são as doadoras de elétrons para a estabilidade da espécie reativa. Além disso, as hidroxilas ligadas aos carbonos C3 e C4 atuam aumentando a capacidade antioxidante (Di Carlo et al., 1999; Lien et al., 1999)

Os flavonoides são subdivididos nos grupos flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavononas, flavanas, isoflavonas, neoflavonóides, leucoantocianidinas, proantocianidinas e antocianidinas de acordo com a composição, organização e com relação ao grau de oxidação no anel central (Bravo, 1998). Diversos estudos indicam que a presença de um grupo hidroxila no terceiro anel central, conhecido por heterocíclico, confere grande efeito antioxidante (Pietta, 2000).

As antocianinas correspondem a um dos mais importantes flavonoides com ação antioxidativa e anti-inflamatória entre outros efeitos farmacológicos, motivo pelo qual, nos últimos anos, cresceu o interesse por esse composto. Esses flavonoides são pigmentos vegetais que conferem as cores que vão desde laranja até violeta e azul.

Eles são encontrados em várias regiões da planta, como caule, folhas, frutos entre outros (Andersen e Jordheim, 2006). A estrutura química das antocianinas é baseada em três cadeias cíclicas com quinze carbonos e os efeitos biológicos

antioxidantes das antocianinas dependem da sua estrutura química, tais como grau de glicosilação e o número de grupos hidroxilas (figura 3; López, et al., 2000). Os efeitos antioxidantes das antocianinas dependem tanto do grau de glicosilação quanto do número de hidroxilas (Kong, 2003).

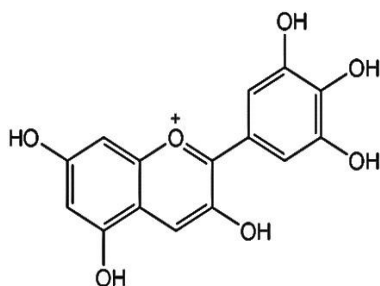


Figura 3. Estrutura das antocianinas. Consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio (López, et al., 2000)

1.4. Açaí

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), nativo da América Central e do Sul, é considerada a palmeira de grande produtividade da região amazônica, com seu fruto consumido como um alimento básico em certas regiões do Brasil, que é visto como o país que mais produz, consome e exporta o açaí e, cada vez mais, cresce o interesse por esse fruto em diversas capitais, não só do Brasil, mas do mundo, como Estados Unidos, Japão e Europa (Menezes et al., 2008).

Recentemente, o açaí, fruto dessa palmeira, ganhou grande atenção como um alimento funcional, devido aos seus benefícios relacionados a alta capacidade antioxidante e sua composição (Bonomo et al., 2014). Segundo Schauss et al. (2006) as antocianinas presentes no fruto, além de conferir a cor violeta característica, também correspondem aos maiores compostos fitoquímicos, com diversos efeitos neuroprotetores e com concentração em torno de 3,19mg/g de peso seco. Este valor é muito relevante quando comparado a outros frutos, já que a concentração de

antocianina no açaí é aproximadamente 10 vezes maior que em outros frutos com características semelhantes, como mirtilo e amora (Rogez, 2000). O extrato de açaí, rico em antocianinas, apresenta excelente fonte natural de composto antioxidante, tornando esse composto primordial para a regulação e manutenção celular (Halliwell, 2001; Hogan et al., 2010).

Os animais, por não conseguirem produzir esse importante composto, precisam consumi-los através da dieta. Frutas como uva, cacau, açaí entre outras são excelentes fontes de antocianinas (Bridle et al., 1997). Em razão do açaí possuir a capacidade de agir no combate aos radicais livres, alguns estudos consideram o açaí parte do grupo dos alimentos funcionais (Rocha et al., 2015). O alto teor de polifenóis o torna uma das principais frutas com potencial antioxidante, apresentando diversas propriedades associadas ao combate de doenças desencadeadas por radicais livres (Kang et al., 2010).

Moura e Resende, 2016, mostraram a presença significativa dos polifenóis em polpa de açaí, em que duas antocianinas, cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3rutinosídeo, foram encontradas em maior concentração. Em outro estudo, foram identificados seis tipos de antocianinas em amostra do fruto (Figura 4), entre as quais encontram-se: cianidina 3-glucosídeos; cianidina 3-rutinosídeo; cianidina-3sambubiosídeo; peonidina-3-rutinosídeo; pelargonidina-3- glucosídeos, e delphinidina-3-glucosídeos (Cedrim et al., 2018).

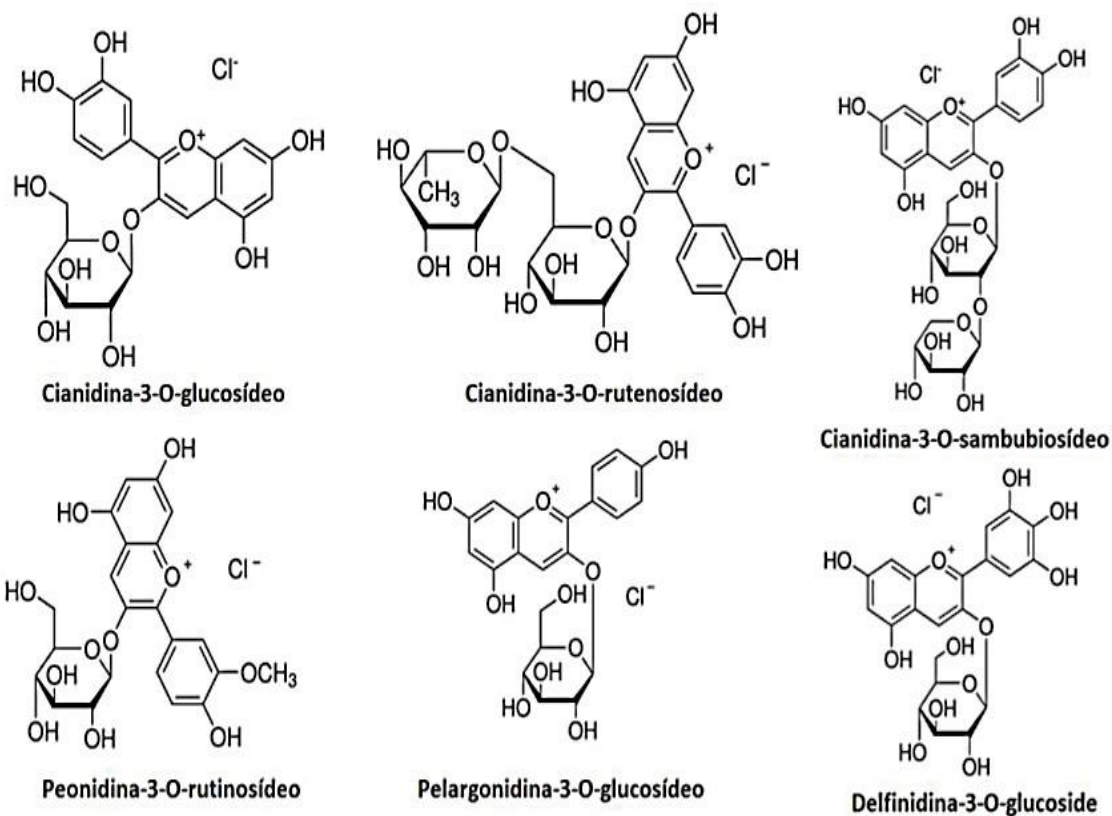


Figura 4. Estrutura química das antocianinas encontradas no açaí (Adaptado de Cedrim, 2018)

As diferenças na quantidade de antocianinas encontradas entre os diversos estudos (figura 5), deve-se, possivelmente, aos diferentes procedimentos utilizados para o preparo da polpa, condições climáticas, colheita, entre outros fatores que podem ter influenciado na quantidade dos polifenóis (Gordon et al., 2012; Cedrim et al., 2018).

Autores	Quantidade de Antocianinas
Coutinho et al. (2017)	12,05 a 24,98 mg/100 g
Fernandes et al. (2016)	36,38 mg/100 g
Silva et al. (2016)	62,58 a 135,15 mg/100 g
Rogez et al. (2011)	109 a 165 mg/100 g
Rufino et al. (2010)	111 mg/100 g
Pacheco-Palencia et al. (2009)	205,6 mg/100 g

Figura 5. Concentração de antocianina em seis trabalhos (Adaptado de Cedrim et al., 2018)

1.5. Memória e comportamento relacionado a ansiedade

1.5.1. Memória

A capacidade de reter eventos e fatos talvez seja a função mais surpreendente do cérebro. A memória representa o conjunto de mecanismos que operam no SNC para que se dê o aprendizado e esses processos definem a individualidade de cada um (Lee et al., 2005). Tais processos operam em sequência começando com a aquisição da memória que corresponde ao período durante a exposição da experiência. Posteriormente, estas informações são codificadas e armazenadas, o que caracteriza a fase de consolidação da memória na qual as informações podem ser acessadas, o que constitui a fase de evocação (McGaugh, 2002). As memórias podem ser classificadas utilizando-se diferentes critérios, como o tempo de retenção, considerando este critério, podem ser classificadas em memória de curto prazo, com duração de horas, mantendo a informação enquanto a memória de longo prazo está sendo formada. Memória de Curto Prazo tem função operacional ou de trabalho, ou seja, garante os processos de continuidade das tarefas diárias. Estudos mostram que a memória de curto prazo envolve regiões como o hipocampo, a amígdala, entre outras, sendo depois transferida para outras áreas como córtex parietal e temporal (Izquierdo, 1999).

A memória de longo prazo, que pode durar dias ou anos, garante o registro da experiência. A formação dessa memória requer alguns processos como: atenção, repetição entre outros (Izquierdo, 1999). Ainda, ela é dividida em declarativa e não declarativa. A memória declarativa compreende o que se pode evocado por palavras como lembranças de datas comemorativas, nomes de pessoas e/ou fatos históricos. A memória não-declarativa está relacionada a procedimentos e habilidades. Esta

memória é dividida em quatro categorias: memória de representação perceptual; memória de procedimentos; memória associativa e memória não-associativa, sendo as duas últimas associadas a comportamentos (figura 6) (Dalmaz e Netto, 2004).

As regiões do encéfalo mais envolvidas na memória são hipocampo, amígdala, córtex temporal entre outras. O hipocampo tem maior atuação nesse processo, ele é formado por duas regiões: o giro denteado e o Corno de Amon, sendo essa última subdividida nas regiões CA1, CA2 e CA3. O hipocampo desempenha um importante papel na formação de memórias de curto e longo prazo e muitas áreas do córtex interagem com ele propiciando novas memórias (Izquierdo, 1998). O aprendizado resulta da interação do indivíduo com o ambiente ou de representações internas (comparação com experiências vivenciadas) que possam possibilitar aquisição de novas informações (Dalmaz e Netto, 2004).



Figura 6. Representação dos eventos de formação de memória de curto e de longo prazo. (Adaptado de McGaugh, 2002).

1.5.2. Ansiedade

Todos têm inúmeros pensamentos e sentimentos, bem como interpretações e valores. Nosso comportamento reflete esses estados e que são fundamentais para lidarmos com diversas situações à nossa volta. Frequentemente, enfrentamos

sentimentos diversos e que, muitas vezes, causam-nos raiva, tristeza, ansiedade, e, conseqüentemente, o estresse. Existem inúmeras emoções e cada uma delas pode se tornar uma fonte potencial de estresse. A ansiedade é uma emoção que traz uma sensação de desconforto sempre que estamos em perigo e que pode gerar um comportamento de apreensão que, em alguns casos, permanece por um longo período, sendo geralmente acompanhada de alteração locomotora e autonômica, tais como taquicardia, transpiração e micção (Ramos et al., 1998).

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao campo aberto apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco o que pode ser relacionado à maior vigilância, apresentada também por indivíduos ansiosos (Blanchard et al., 2001). A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação de uma situação aversiva, de difícil controle e que pode gerar um comportamento de apreensão com provável alteração locomotora e autonômica, tais como taquicardia, transpiração e micção. A ansiedade tanto pode beneficiar quanto prejudicar, dependendo de sua intensidade, podendo até se tornar patológica. Quando esse fenômeno atinge o grau de patologia, pode ser incluída num grupo de distúrbios, definido como transtornos ansiosos (Ramos et al., 1997; Rodgers et al., 1997).

Em conjunto com o sistema nervoso simpático, a amígdala desempenha importante papel em aspectos relacionados a comportamentos relativos a situação ou condição aversiva o que pode gerar respostas que, eventualmente, podem ser ansiogênicas e, potencialmente, prejudiciais à processos ligados à memória (Lee et al., 2006).

A Amígdala é um aglomerado de núcleos neurais localizados no lobo temporal (Johnston, 1923). Considerada o centro de emoção no encéfalo, acredita-se que a amígdala desempenhe um papel - chave no planejamento comportamental baseado na integração de informação (Aggleton, 1993). Tem-se atribuído uma grande variedade de funções para o complexo amigdalóide, incluindo memória, atenção, interpretação do significado emocional dos estímulos sensoriais e gênese dos aspectos emocionais dos sonhos (Scott et al., 1997). A amígdala parece desempenhar um papel crítico no aprendizado sempre que este envolver o condicionamento a um reforço com valor emocional (Kim e Jung, 2006).

1.6. Exercício físico, açúcar, memória e ansiedade

A prevalência de indivíduos sedentários é alta em vários países e estudos epidemiológicos apontam que grande parte dos brasileiros não realizam recomendações mínimas de EF (Hallal et al., 2005). O sedentarismo induz inúmeras adaptações fisiológicas negativas como diminuição das capacidades funcionais e cognitivas decorrentes do aparecimento de doenças neurodegenerativas (Morrison, 2004). Recentemente, inúmeros estudos relacionam o EF com melhora do funcionamento do encéfalo, como aumento da atividade cognitiva, diminuição dos riscos de ansiedade e depressão (Deslandes et al., 2009). Entretanto, muitos estudos também mostram que a prática de EF eleva a formação de RL, o que pode resultar em estresse oxidativo (Bondy, 1993; Cooper et al., 2002; Radak, 2006). Sob condições normais, a produção de RL é balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante que pode ocorrer com a participação de enzimas ou compostos presentes em muitos alimentos (Sies, 1993). Nesse contexto, entre os alimentos com grande propriedade

antioxidantes está o açaí, que possui antocianinas um composto da família dos flavonoides com grande ação antioxidante e anti-inflamatória (Menezes et al., 2008).

O EF, apesar de gerar muitos benefícios, também eleva a formação de RL, composto extremamente prejudicial para o SNC, enquanto o açaí, composto com grande ação antioxidante, pode juntamente com mecanismos enzimáticos, aumentar as defesas do organismo contra os RL e, assim, proteger diversos tecidos, em especial o tecido nervoso contra danos oxidativos (Forman et al., 2004; Lima, 2007).

Sabe-se do efeito positivo do EF sobre o hipocampo e a amígdala, importantes áreas do encéfalo que apresentam relação com formação de memória e comportamentos relacionados à emoção, mas que, também, são muito sensíveis ao estresse oxidativo ocasionado em função do EF (Silveira, 2003; Mitozo et al., 2011).

Assim, o objetivo desse estudo se baseia em propor a adição do açaí a uma dieta como uma alternativa que poderá potencializar a proteção dessas regiões - hipocampo e amígdala - contra os RLs gerados durante o exercício físico e, dessa forma, potencializar os processos relacionados à formação de memória bem como diminuir comportamentos relacionados à ansiedade.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício físico combinado com ingestão de polpa de açaí sobre comportamento e eventos moleculares em ratos.

2.1. Objetivos específicos

- Verificar se existem ações combinadas da administração do açaí com exercício físico;
- Analisar efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre a memória;
- Analisar o efeito do exercício físico e/ou açaí sobre a ansiedade;
- Analisar efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre as enzimas SOD, CAT e GPx;
- Analisar efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre fatores de crescimento BDNF e GDNF;
- Analisar efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre GAP 43 e GFAP;
- Valorizar o açaí, um produto brasileiro, como um importante composto com efeitos benéficos sobre diversos eventos ligados ao sistema nervoso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho experimental

Os procedimentos experimentais foram submetidos, analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da EACH/USP sob o nº 002/2016 - anexo 1).

Foram utilizados 32 ratos machos Wistar 310 – 400g com aproximadamente 120 dias provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas (390 x 320 x 170mm³), forradas com maravalha, contendo quatro animais/caixa no Biotério de Experimentação do Conjunto Multidisciplinar de Pesquisa da EACH5/USP em condições padrão, aclimatizados (21±1°C) com ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, com água e ração (NUVILAB, ad libitum).

3.2. Grupos experimentais

Considerando a baixa variabilidade da população estudada, que se trata de animais que têm origem de um ambiente controlado, representa uma amostra mais homogênea (genética e sanitariamente) e, seguindo preceitos éticos que visem a otimização no uso de animais, consideramos que o número de 8 animais por grupo é suficiente para que os testes estatísticos sejam aplicados com segurança de resultados significantes.

O efeito da variável independente sobre as variáveis dependentes foi determinado após cálculo estatístico que considerou a análise do poder da amostra¹.

¹www.hedwig.m.gh.edu/sample_size/js/js_associative_quant.html

Para o cálculo foi utilizado o nível de significância de 5% (two-sided) para um número mínimo de 8 animais. O poder da amostra utilizado foi de 80%. Os desvios padrões para as variáveis dependentes e independentes não foram estabelecidos. O nível de significância atingido no cálculo será de 0,025 quando os desvios padrões das variáveis dependentes for de 1,91.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: i) Sedentários; ii) Sedentários + açaí; iii) Exercício + açaí e iv) Exercício. Conforme discriminado na tabela 1.

Descrição dos grupos experimentais

GRUPO	DESCRIÇÃO
Sedentário (Sed) (n = 8)	Permaneceu na esteira sem movimento, administração de água via gavagem
Sedentário + Açaí (SedA) (n = 8)	Permaneceu na esteira sem movimento, administração de açaí via gavagem
Exercício (Exe) (n = 8)	Treinado em esteira, administração de água via gavagem
Exercício + Açaí (ExeA) (n = 8)	Treinado em esteira, administração de açaí via gavagem

Tabela 1. Grupo sedentário (Sed), controle tratado com água, grupo sedentário (SedA), tratado com açaí, grupo exercício tratado com água (Exe) e grupo exercício (ExeA) tratado com açaí.

No primeiro, terceiro, quinto e sétimo dia do programa de treinamento, os animais foram pesados. A figura abaixo apresenta o cálculo de peso corporal que foi realizado para avaliar a influência do protocolo sobre a massa corporal dos animais.

$$\frac{2^{\circ} \text{ dia}(\text{Peso final} \times 100)}{1^{\circ} \text{ dia}(\text{Peso inicial})} - 100$$

3.3. Administração do açaí

Os animais dos grupos SedA e ExeA receberam via gavagem a suplementação com extrato de açaí (LIOFRUIT 100, LIOTÉCNICA tecnologia em alimentos, Embu das Artes, SP) 500mg/Kg diluídos em 1ml de água (Adaptado de El Morsy et al., 2015), enquanto os animais dos grupos Sed e Exe receberam 1ml de água. Os grupos receberam açaí e/ou água uma hora antes do protocolo de exercício físico com objetivo de diminuir o estresse causado pelo procedimento e garantir a absorção do açaí. Dessa forma, o início de protocolo de exercício se deu com o animal menos estressado com a manipulação o que poderia comprometer um dos objetivos da pesquisa, o de analisar possível efeito do suplemento sobre a ansiedade.

3.3.1. Composição nutricional da polpa liofilizada de açaí utilizada no estudo.

O açaí Liofruit 100 liofilizado foi obtido a partir de polpa de açaí orgânico, posteriormente foi submetido a congelamento. As tabelas a seguir apresentam características do produto.

Parâmetros físico-químicos

Sabor e Odor	Característicos
Aspecto	Pó de coloração roxa.
Reconstituição	Adicionar 86g de água a 14g de açaí liofilizado para obter açaí grosso natural.
Equivalência	1 kg de açaí liofilizado é equivalente a aproximadamente 7 kg de polpa de açaí grosso.
Umidade (%)	Máximo 2,5
Granulometria (%) ⁽²⁾	Partículas maiores que 1,4mm – Máx. 2 Partículas menores que 0,6mm – Mín. 50
Matérias Estranhas	Ausente

Parâmetros Microbiológicos

Contagem Total	UFC/g	5	0	1x10 ⁴	-
Coliformes Totais (35°C)	UFC/g	5	0	<10	-
Coliformes 45°C	UFC/g	5	0	<10	-
<i>E. coli</i>	UFC/g	5	0	<10	-
<i>Salmonella sp</i>	/25 g	5	0	Ausente	-
Bolores e Leveduras	UFC/g	5	0	500	-

Parâmetros Nutricionais (100g)

Valor calórico	541 kcal
Carboidrato	5g
Proteínas	9,8g
Gorduras totais	54g
Gorduras saturadas	15g
Gorduras monoinsaturadas	33g
Ácido Palmitolêico	2,7g
Ácido Oleico (Ômega 9)	30,3g
Gorduras polinsaturadas	5,1g
Ácido Linoleico (Ômega 6)	5,1g
Gorduras <i>trans</i>	0,0g
Fibra alimentar	27g
Sódio	64mg
Cálcio	345mg
Ferro	3,8mg
Vitamina A	<100 UI
Vitamina C	<1mg
Vitamina E	12,7mg
Potássio	715mg
Magnésio	174mg

Referências Gerais ⁽⁵⁾	Unidade	Valor de Referência
Antocianinas por HPLC	mg/100g	385
Capacidade Antioxidante (ORAC _{FL})	µmol eq. Trolox/100g	70.000
Polifenóis Totais	mg eq. Ácido Gálico/100g	3.300
Referências da safra de 2011-2012 ⁽⁶⁾	Unidade	Valor de Referência
Antocianinas por HPLC	mg/100g	296,8
Capacidade Antioxidante (ORAC _{FL}) ⁽⁷⁾	µmol eq. Trolox/100g	54.300
Polifenóis Totais	mg eq. Ácido Gálico/100g	3.472

Tabelas 2. Tabela com informações nutricionais da polpa de açaí fornecidas pela empresa colaboradora que doou a poupa.

3.4. Protocolo de exercício físico

O início do protocolo de exercício de cada grupo ocorreu durante o ciclo ativo dos animais, por volta das 11h00min e foi alternado entre os grupos, com intuito de evitar grande diferença de tempo e, conseqüentemente, de rendimento dos grupos.

Os ratos foram expostos a um programa de exercício físico em esteira ergométrica por um período de 7 dias. O protocolo de exercício físico consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos contendo pistas separadas por divisórias confeccionadas por material de polietileno (Figura 7) (Carro, et al., 2000).

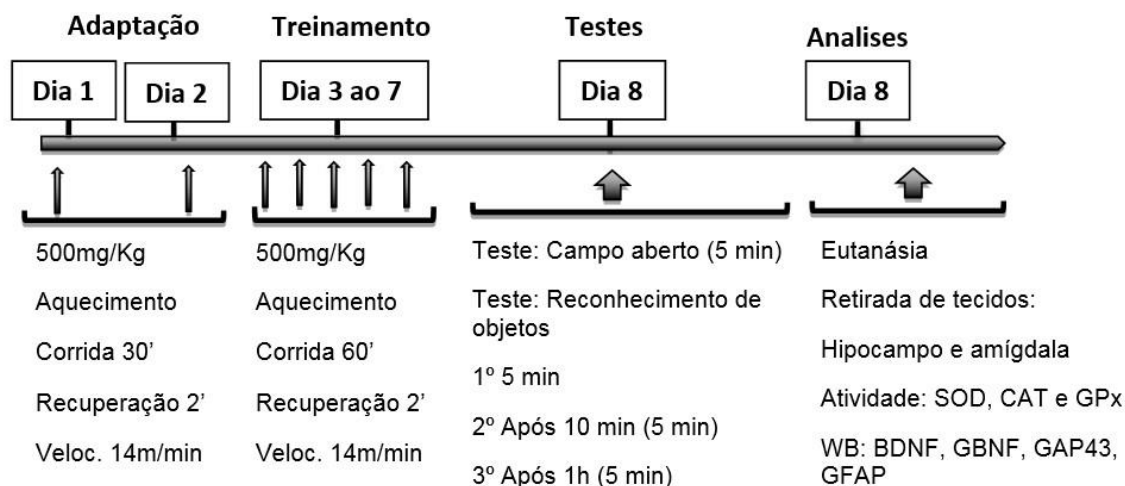
Está demonstrado na figura 8, o período de treinamento, com duração de 7 dias. Nos dois primeiros dias, a duração das sessões foi de 30 minutos por dia, com velocidade de 14m/min. A partir do terceiro dia apenas o tempo foi aumentado para 1 hora e a velocidade mantida até o final do treinamento. A inclinação da esteira ergométrica foi mantida a 0%, durante todo o período do treinamento. O protocolo foi adaptado do estudo de Carro e colaboradores (2000).

3.5. Aparelho onde ocorreu o programa de atividade física



Figura 7. Esteira adaptada na qual o protocolo de exercício físico agudo foi aplicado os grupos experimentais.

3.6. Programa de atividades



Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos, individualmente, aos testes comportamentais.

3.7. Testes comportamentais

Foram realizados testes para avaliação da memória e ansiedade. Quando os roedores são apresentados a ambientes e/ou objetos familiares e novos, eles passam a maior parte do tempo explorando o novo ambiente e/ou objeto. Este comportamento típico tem sido utilizado para determinar diferentes testes. Como exemplo, o teste campo aberto (CA) e o teste de reconhecimento de objetos (RO). Ambos podem ser realizados em um local cercado, evitando que o animal escape. O chão marcado com pequenos quadrados, o que permite a quantificação ou maior percepção da atividade locomotora, bem como outros comportamentos (Xavier, 1999).

3.7.1. Teste campo aberto (CA)

O teste de CA é interessante por ser de fácil observação e registro e, também, de fácil avaliação da atividade exploratória. Ao explorar um novo ambiente, o animal apresenta comportamentos que sugerem excitabilidade como levantar as patas

dianteiras (rearing), autolimpeza (grooming) e maior mobilidade. O campo aberto (Figura 8) utilizado para o teste consiste em uma arena de madeira retangular com 80 por 50 centímetros, paredes e chão brancos, sendo o chão, dividido por linhas pretas, formando 20 pequenos quadrados com aproximadamente 16cmx16cm. No início de cada teste os animais foram colocados na região central da arena e o comportamento foi avaliado durante 5 minutos. Essa avaliação incluiu quantificar os seguintes parâmetros: tempo gasto parado (freezing) e número de quadrados percorridos pelo animal (ambulação) contabilizado em segundos; número de bolos fecais (Xavier, 1999). Segundo (Hall, 1934) a defecação é um indicador do estado emocional do animal. Defecação intensa associado a baixa atividade locomotora sugere ansiedade do animal (figura 9A)

3.7.2. Teste de reconhecimento de objetos (RO)

O teste de RO foi realizado no mesmo local em que ocorreu o teste campo aberto. Neste teste, todos os animais foram habituados ao ambiente, tendo 5 minutos para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Os objetos (peças teste CA de brinquedo de diferentes formas e cores) foram fixados à arena. (figura 9B) Após o teste CA, os animais foram colocados na arena, contendo dois objetos semelhantes (a e b), para livre exploração por 5 minutos. O teste foi repetido aproximadamente, 1 hora depois para avaliar a memória de curta duração. No teste subsequente, uma hora depois, o objeto (a) foi substituído por outro (c) e o animal foi colocado na arena por mais 5 minutos. As posições dos objetos (familiar b e novo c) foram mantidos e a arena foi limpa com álcool 70% entre um teste e outro.

Consideramos a exploração quando os animais cheiraram ou tocaram os objetos com o nariz ou com as patas dianteiras. O tempo gasto explorando cada objeto

foi marcado e 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, conforme demonstrado a seguir:

$$\% \text{ de tempo gasto explorando objeto B: } \frac{\text{Tempo no objeto B (seg)}}{\text{Tempo objeto B (seg) + Tempo objeto C (seg)}} \times 100$$

$$\% \text{ de tempo gasto explorando objeto C: } \frac{\text{Tempo no objeto C (seg)}}{\text{Tempo objeto C (seg) + Tempo objeto A (seg)}} \times 100$$

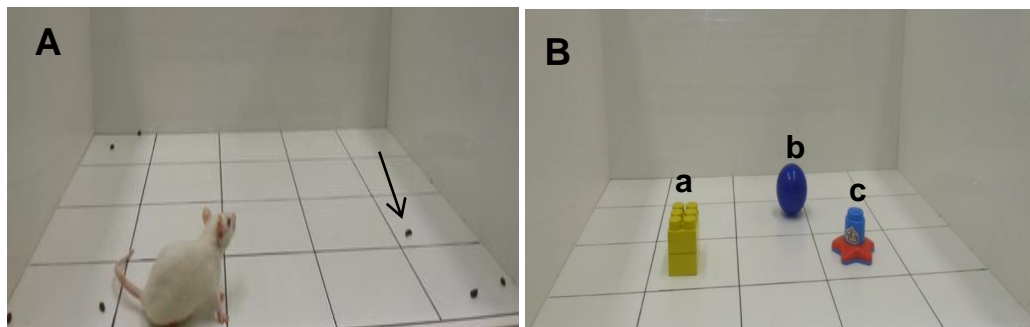


Figura 8. (A) aparato utilizado para os testes de campo aberto com presença de bolo fecal indicado pela seta e (B) reconhecimento de objetos com os objetos a, b e c utilizados no teste reconhecimento de objeto.

Essas medidas indicam a preferência em explorar um determinado objeto em detrimento do outro, em especial, considerando o objeto (c), quanto maior o índice de exploração desse objeto e menos do objeto (b), possivelmente tenha relação com lembrança do objeto (b), o que justifica o menor interesse por ele.

Em ambos os testes, cada animal foi avaliado individualmente e, ao final de cada sessão, o local foi limpo com álcool 70%, para eliminar odores produzidos pelo animal exposto anteriormente, dessa forma, diminuir a interferência no comportamento do próximo animal.

3.8. Eutanásia dos animais e retirada dos tecidos

No oitavo dia, logo após os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e cloridrato de xilazina (80 mg/kg e 8 mg/Kg, ip, respectivamente) e submetidos à decapitação.

Após eutanásia, foram extraídos os encéfalos para análise por biologia molecular (figura 10A). Hipocampo (figura 10C) e amígdala (figura 10D) que são relacionadas a memória e à ansiedade, foram dissecados e congelados à -80 °C para análise.

O método Western Blot foi utilizado para quantificação de proteínas nas amostras, utilizando-se anticorpos anti-BDNF, anti-GDNF, anti-GAP43 e Anti-GFAP e também, foi avaliada a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx.

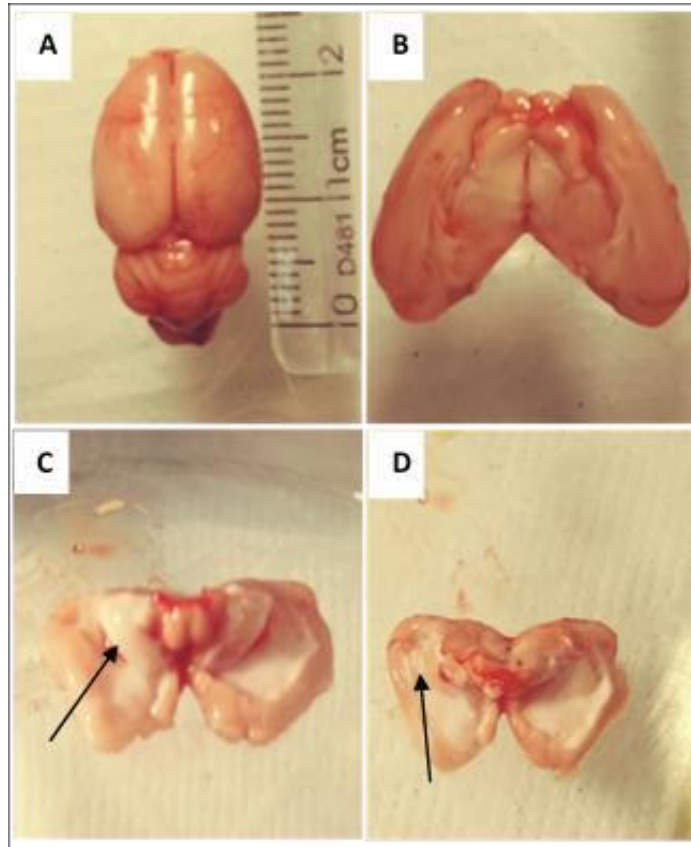


Figura 9. Painéis com indicação dos tecidos retirados para análise da atividade das enzimas antioxidantes e quantificação das proteínas por WB. Painel A vista dorsal do encéfalo; Painel B corte sagital do encéfalo com visualização de parte do hipocampo. Painel C seta apontando para hipocampo. Painel D seta apontando para amígdala.

3.9. Avaliação proteica

As amostras do hipocampo e da amígdala foram homogenizadas em 200 μ l de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoridro (PMSF) e coquetel de inibidores de protease (Sigma) e, em seguida, centrifugadas durante 5 minutos a 1000g e 4°C e os sobrenadantes foram separados. A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada através do método de Bradford (1976) e, em seguida, foram diluídas em tampão de Laemmli, 1970 (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 com SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001 % e 2-mercaptoetanol 5%) e após rápida centrifugação a 10,000 g (30 seg), as proteínas das amostras (15

mg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS – PAGE; Laemmli, 1970).

A separação das proteínas foi realizada em sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) com intensidade de corrente constante (25 mA), durante aproximadamente 2 horas e resultou em valores de voltagem variando entre 100 a 180 V. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas eletroforicamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando uma amperagem de 200 mA (voltagem ~50V) durante 1,5 hora. Após 6 lavagens subsequentes (~10 min) com tampão TBS t, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 3% de BSA dissolvido em tampão TBS-t pH 7.4 (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,1% de Tween-20) sob agitação constante durante 1 hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15 - 18 horas, a 4°C com anticorpos primários específicos (diluídos em tampão de bloqueio) conforme o quadro abaixo e após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) durante 2 horas em temperatura ambiente (vide quadro abaixo).

As membranas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens em TBS-t (6x por 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal West pico, Thermo Scientific, EUA). As imagens das bandas foram captadas no sistema ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EUA). A análise densitométrica das imagens das membranas foi realizada utilizando-se o software ImageJ (NIH). Os sinais do filme foram quantificados usando o software ImageJ. Os resultados obtidos foram normalizados pelo controle interno (β -actina ou α -tubulina) e expressos como porcentagem em relação ao grupo Sedentário.

Considerando que o BDNF apresenta algumas isoformas, também foi realizado o cálculo que considera a isoforma de BDNF em relação as demais (Pré – BDNF e Pró – BDNF).

3.10. Anticorpos utilizados para a avaliação das proteínas

Proteína	Anticorpo primário (clone, hospedeiro) Diluição, procedência	Anticorpo secundário (hospedeiro) Diluição, procedência
BDNF	Anti BDNF (policlonal, coelho) 1:1000, Santa Cruz, EUA	Anti Coelho (cabra) 1:4000, Bio Rad, EUA
GDNF	Anti GDNF (policlonal, cabra) 1:1000, Sigma, EUA	Anti cabra (burro) + HRP 1:5000, Sigma, EUA
GAP43	Anti GAP43 (monoclonal, camundongo) 1:1000, Sigma, EUA	Anti camundongo (cabra) + HRP 1:5000, Bio Rad, EUA
GFAP	Anti GFAP (policlonal, coelho) 1:2000, Sigma, EUA	Anti Coelho (cabra) 1:4000, Bio Rad, EUA
α-tubulina	Anti- α -tubulina (monoclonal, camundongo) 1:2000, Santa Cruz, EUA	Anti camundongo (cabra) + HRP 1:5000, Bio Rad, EUA
β-actina	Anti- β -actina (monoclonal, camundongo) 1:2000, Cell Signaling, EUA	Anti camundongo + (cabra) HRP 1:5000, Bio Rad, EUA

Tabela 3. Relação das especificações dos anticorpos utilizados para a avaliação da atividade das proteínas via WB.

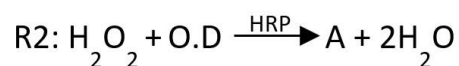
Avaliação da atividade das enzimas antioxidante nos tecidos hipocampo e amígdala

As amostras de hipocampo e amígdala foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM (1 g de tecido:10 ml de tampão). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10,000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi separado para os ensaios de atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx).

3.10.1. Avaliação da atividade da catalase

O método ocorre em duas etapas. A figura mostra na primeira reação (R1), a catalase contida na amostra dismuta o H₂O₂ (de concentração conhecida) em água e oxigênio molecular. Em seguida, na segunda reação (R2), o H₂O₂ remanescente é

determinado pela oxidação do reagente o-dianisidina (OD) em uma reação catalizada pela enzima peroxidase (HRP, de acordo com o método modificado de Fossati et al., 1980).



Primeiramente, uma curva padrão de H_2O_2 foi preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 nas concentrações: 8820, 4410, 2205, 1125, 882, 441, 221, 113, 88, 44, 22 e 11 μM .

Para a preparação dos brancos (controle) de cada amostra, uma alíquota de 50 μl de amostra foi incubada a 60°C por duas horas (para inativação da catalase).

A primeira reação foi realizada incubando-se 15 μL das amostras (brutas ou inativadas) com 250 μL de H_2O_2 10 mM em temperatura ambiente (durante 20 min para o hipocampo e 30 min para a amígdala, como previamente determinado. A reação foi interrompida com 250 μL de NaN_3 1 mM.

Em paralelo, 15 μl de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 foram incubados com 250 μL de H_2O_2 (nas diferentes concentrações da curva) com os respectivos tempos de incubação.

A segunda reação foi realizada em microplaca pipetando-se 20 μL do produto obtido na primeira reação com 200 μL de reagente contendo 0,167 mg/ml de OD e 0,095 $\mu\text{g/mL}$ de HRP em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0.

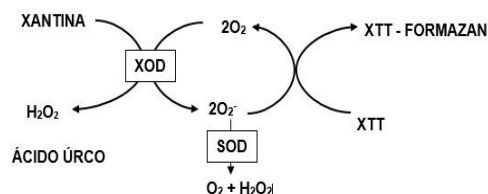
A velocidade de formação do produto de oxidação da OD foi registrada pelo aumento da absorbância a 460 nm, por meio de leituras coletadas em intervalos de 10

s durante 10 min. Os valores de atividade da catalase foram calculados a partir da velocidade máxima por minuto de cada reação corrigidas pelos respectivos valores dos brancos e extrapoladas na curva padrão de H_2O_2 .

O resultado foi expresso em U Catalase/mg de proteína sendo que, uma unidade de Catalase foi definida como a quantidade de H_2O_2 (em μmol) degradada por minuto.

3.10.2. Avaliação da atividade da SOD

O método baseia-se na formação do produto XTT-formazan (modificado de Ukeda et al., 1997). A figura mostra a reação entre Xantina, Xantina Oxidase (XOD), SOD, a formação de ânion superóxido, e a redução do reagente XTT pelo ânion superóxido para um produto XTT-formazan que absorve luz a 470 nm. A enzima SOD sequestra ânion superóxido e reduz a formação do produto XTT-formazan.

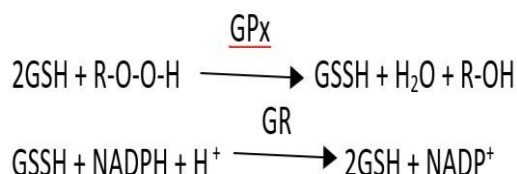


As reações foram realizadas em microplaca. Para a determinação da atividade da SOD, 10 μl de amostra diluída em tampão fosfato (1:20 para hipocampo e 1:30 para amígdala) foram adicionados a 260 μl de tampão carbonato de sódio 50 mM pH 10,2 contendo EDTA 3 mM, 10 μl de xantina 3 mM, 10 μl de XTT 0,75 mM e 10 μl de XOD 56,1 mU/ml. Em paralelo, determinou-se a geração máxima de formação de XTT-formazan de cada amostra inativada previamente por aquecimento em banho-maria durante 5 min.

A leitura foi realizada a 470 nm durante 20 min e o resultado expresso como USOD/mg prot. - Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de SOD capaz de transformar 1umol de O₂/min.

3.10.3. Avaliação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação associada a glutathiona redutase (GR). Como mostra o esquema da figura abaixo, a glutathiona oxidada (GSSG), produzida pela redução de hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para seu estado reduzido através da GR e NADPH (Flohé, 1984).



O substrato utilizado neste ensaio foi o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP⁺ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm à 37 °C.

Em uma microplaca de quartzo, 30 µL de amostra (sem diluição para hipocampo e diluídas 1:3 para amígdalas) foram incubados por 5 minutos à 37°C na presença de 145 µL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 contendo EDTA 0,1 M, 5 µL de glutathiona reduzida (GSH) 80 mM e 5 µL de glutathiona redutase (GR) 0,0096 U/µL. Em seguida foram adicionados 5 µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 10 µL de solução de NADPH 1,2 mM.

O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm por 10 minutos. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como µmol GSH/min/mg proteína.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferrone. As diferenças entre as médias foram avaliadas via programa estatístico (Graph Pad Prism, versão 5.0) Um nível de significância menor do que 5% foi utilizado em todas as análises comportamentais realizadas individualmente ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. ganho de peso corporal

Houve influência da administração do açaí apenas sobre peso na análise dos grupos (dieta, $p= 0.0001$; exercício, $p= 0,8275$)

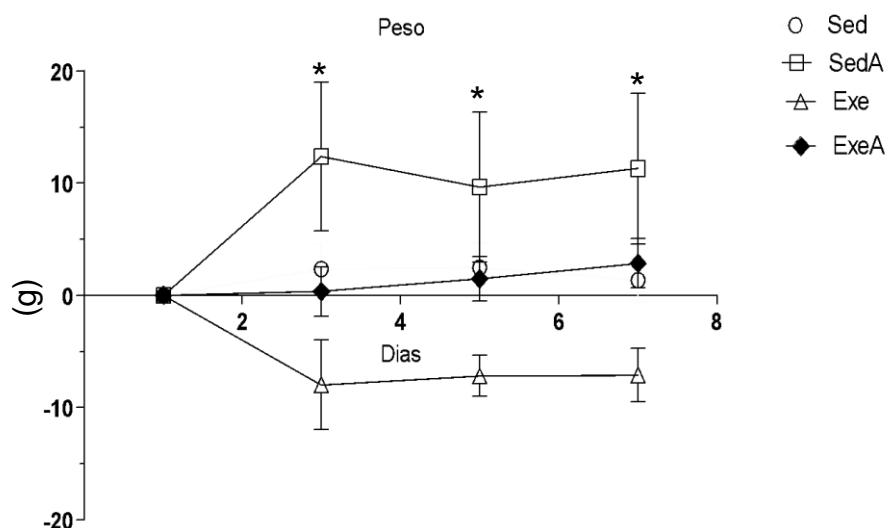


Figura 10. Gráfico da comparação do efeito da atividade física e da administração de açaí sobre ganho de peso corporal durante o protocolo experimental. Valores expressos em média \pm epm. O peso foi verificado no primeiro dia do protocolo de atividade física e suplementação e, posteriormente, nos dias 3, 5 e 7. * indica diferença entre SedA e Exe. Teste ANOVA de duas vias e pós teste Bonferroni ($p= 0,05$).

Na comparação entre os grupos experimentais, o grupo SedA teve maior ganho de peso em relação ao grupo Exe ($p= 0.0001$), possivelmente, em razão do alto teor calórico do açaí. Entre os grupos Sed e ExeA não houve alteração no peso corporal.

A atividade física realizada pelo grupo ExeA pode ter contribuído no sentido de aumentar a necessidade energética do grupo, com tudo, não houve perda de peso possivelmente e função do consumo de açaí favoreceu a manutenção do peso corporal durante o período avaliado (figura 10).

4.2. Efeito do açaí sobre o comportamento relacionado à ansiedade

Durante o teste do CA os seguintes comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados: contagem dos bolos fecais, levantar com apoio apenas das patas traseiras, autolimpeza (grooming), congelamento (freezing) e micção (figura 11).

Houve diferença entre os grupos Sed e SedA ($p=0,0003$) e entre Sed e ExeA ($p=0,0094$) no comportamento de levantar com apoio das patas traseiras (figura 11B). A avaliação da micção mostrou diferença entre os grupos SedA e ExeA ($p=0,0121$; figura 11E).

Não encontramos diferenças entre os grupos quando comparamos dados referentes aos bolos fecais, autolimpeza ou imobilidade (freezing).

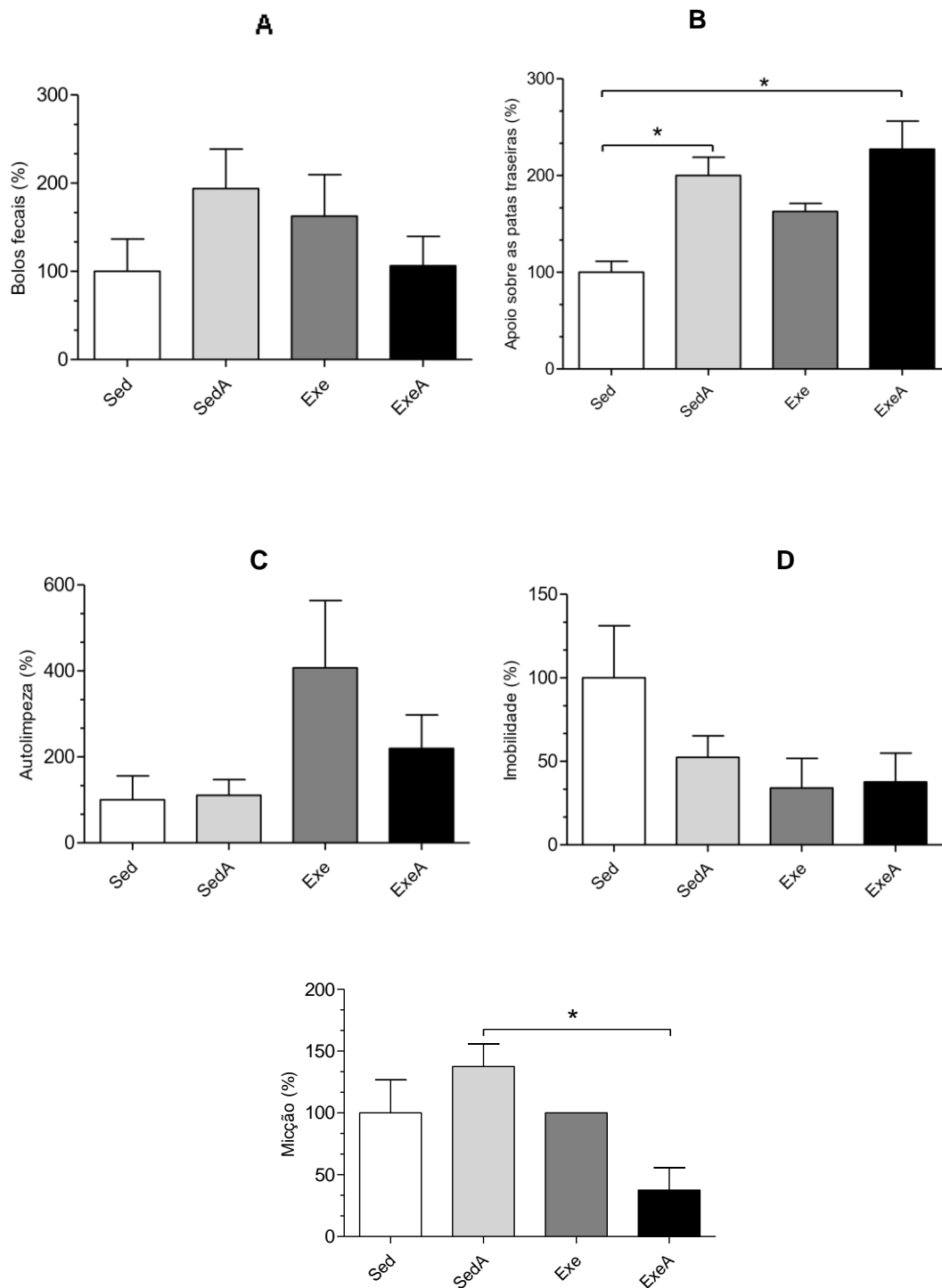


Figura 11. Gráficos dos efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre comportamentos relacionados à ansiedade durante o teste de CA. Houve diferença entre os grupos apenas nos comportamentos de apoio sobre as patas traseiras (B) e micção (E). Não houve diferenças na comparação entre dados referentes aos bolos fecais (A), autolimpeza (C) ou imobilidade (freezing, D). * = $p < 0,05$; ANOVA de uma via, pós teste Bonferroni.

4.3. Efeito da atividade física e/ou açai na a exploração dos animais no teste de campo aberto (CA)

Não houve diferença entre os grupos no comportamento de exploração do ambiente novo. Todos os grupos apresentaram comportamentos de exploração semelhante em toda a área destinada para o teste.

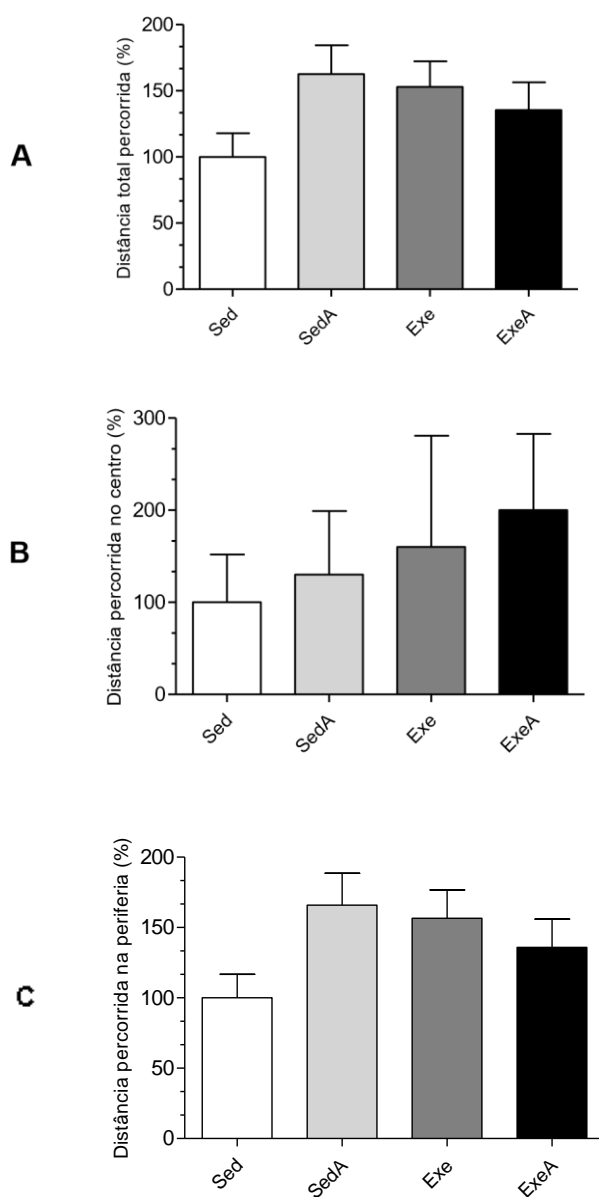


Figura12. Gráficos dos efeitos do exercício físico e / ou açai na locomoção durante o teste de CA. O gráfico A ilustra a locomoção total; o gráfico B o tempo despendido no centro do aparato; e o gráfico C o tempo na periferia do aparato. Os dados estão representados como média \pm epm (n=8).

4.4. Efeito da atividade física e/ou açaí sobre a memória de curto prazo

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar a memória de curto prazo, conforme descrito no item 3.7.2. Houve diferença no primeiro índice de reconhecimento do objeto B entre os grupos Sed e SedA ($p=0,0042$) e Sed e ExeA ($p=0,0026$). Porém, no segundo índice de reconhecimento não houve diferença entre os grupos, conforme ilustrado na figura 13. Neste teste, os animais entram em contato com dois objetos por um pequeno período e, posteriormente, os mesmos animais são colocados no aparato contendo um objeto familiar e um novo objeto. Nesse caso, considerando a característica exploratória dos animais, é avaliada a preferência pelo objeto novo. Portanto, a influência sobre a memória se caracteriza pela busca pelo novo objeto.

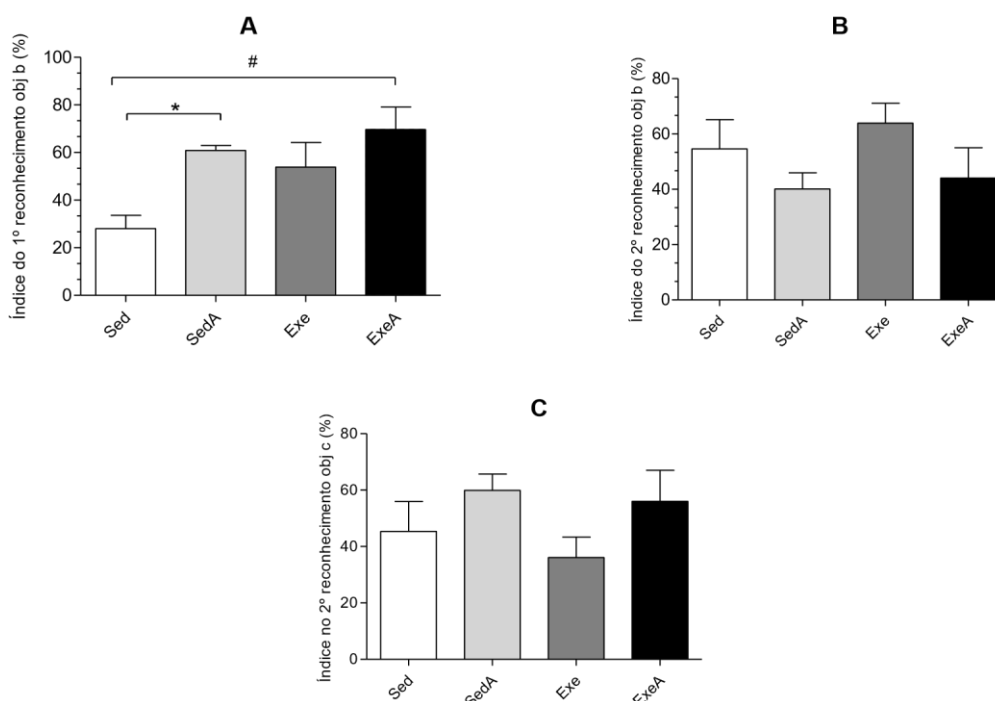


Figura 13. Gráficos dos efeitos do exercício físico e/ou açaí sobre a memória no teste de reconhecimento de objetos. O gráfico A ilustra o tempo despendido no objeto b no primeiro momento do teste em que os animais entram em contato com os dois objetos (a e b). O gráfico B ilustra o tempo despendido no objeto b no segundo contato dos animais com os objetos, dessa vez, b e c (objeto b em substituição ao objeto a). Já o gráfico C ilustra também o segundo contato com os dois objetos (b e c) e evidencia a preferência pelo objeto c (novo) em relação ao objeto b (familiar).

4.5. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no hipocampo

A atividade das enzimas SOD, CAT e GPx, envolvidas no processo de estresse oxidativo foi testada utilizando os métodos adaptados (Fossati., 1980; Flohé, 1984; Ukeda et al., 1997), conforme descrito no item materiais e métodos.

Houve aumento da atividade de GPx no hipocampo dos animais do grupo Exe em comparação ao do grupo Sed ($p= 0,0002$), demonstrando efeito do exercício físico. Não houve diferenças na atividade das outras enzimas testadas (figura 14).

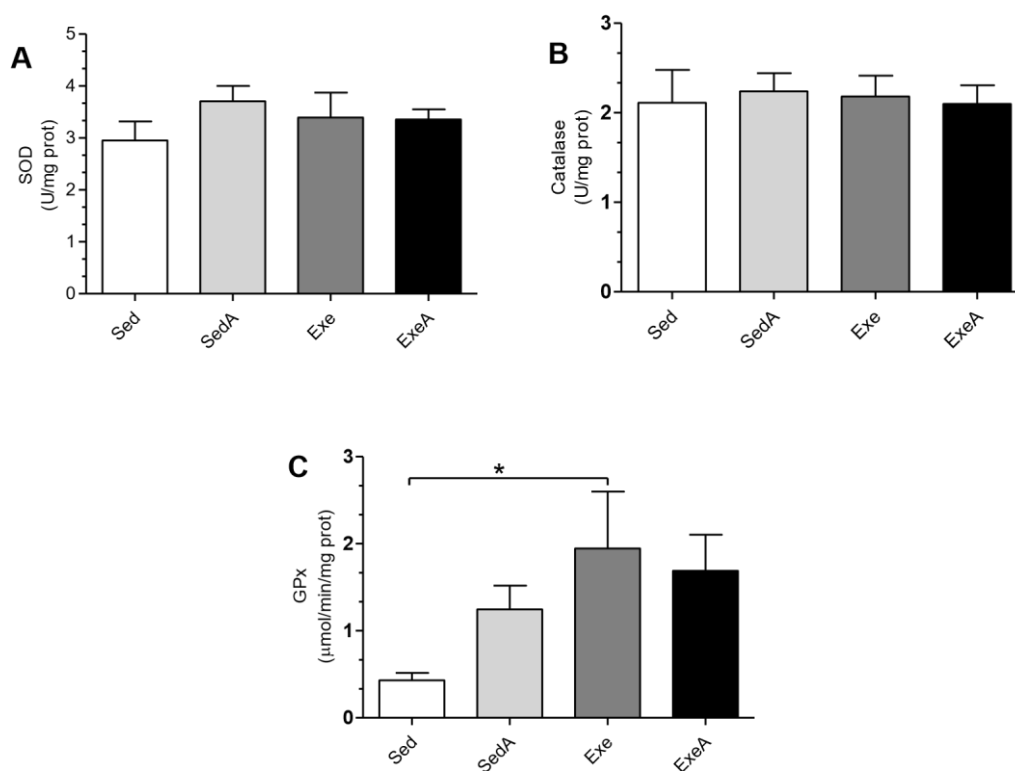


Figura 14. Atividade das enzimas antioxidantes medidas pela decomposição do peróxido de hidrogênio. Gráficos A, B e C ilustram a atividade das enzimas SOD, catalase e GPx no hipocampo, respectivamente, nos diferentes grupos. (* = $p < 0,05$; ANOVA de uma via e pós teste Bonferroni).

4.6. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx na amígdala

Já na amígdala, houve influência do exercício e do exercício combinado com açai sobre atividade da enzima catalase (figura 15B, $p=0,0037$).

Não houve diferenças na atividade de SOD ou GPx na amígdala (figura 15).

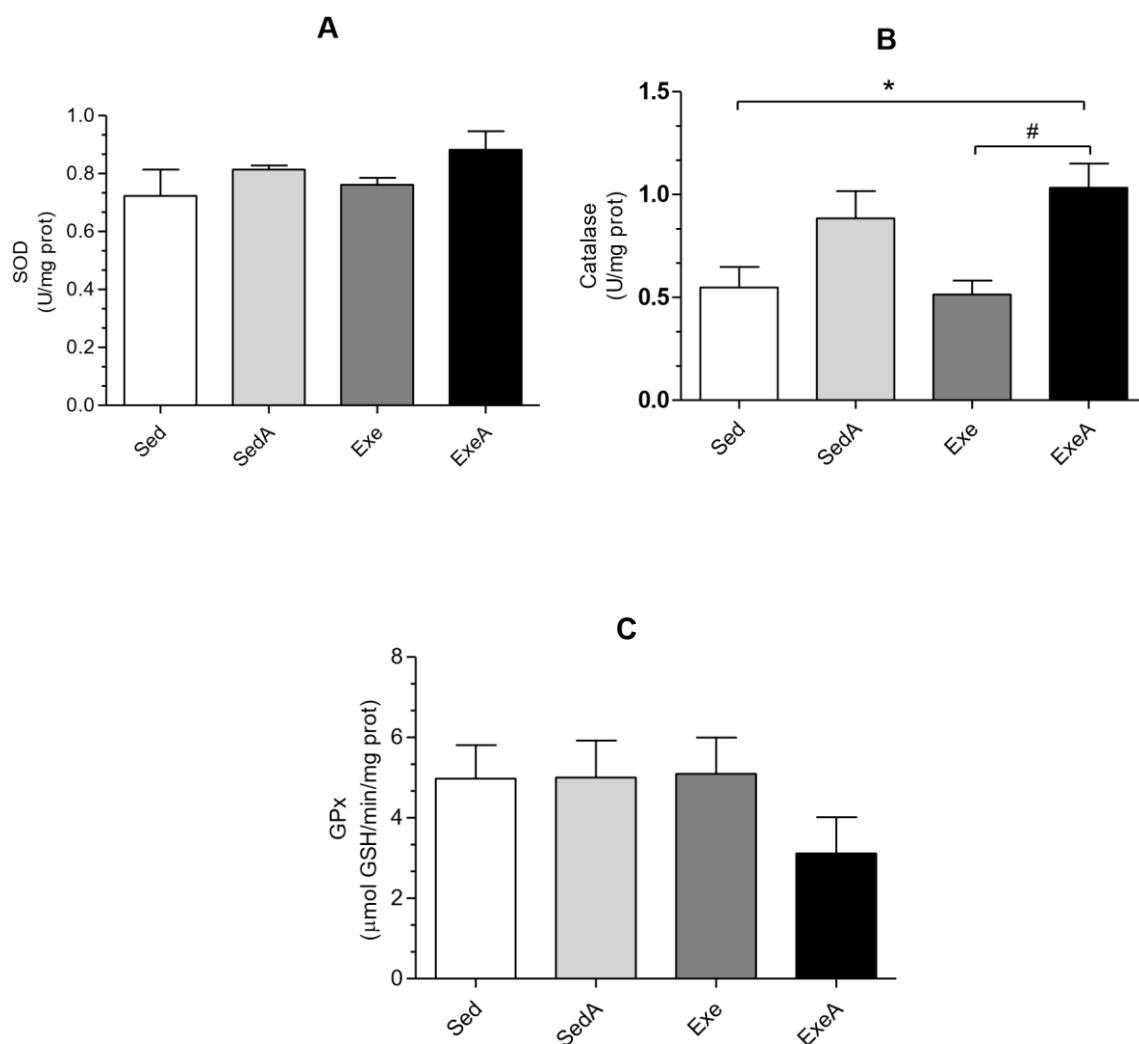


Figura 15. Atividade das enzimas antioxidantes medidas pela decomposição do peróxido de hidrogênio. Gráficos A, B e C ilustram a atividade das enzimas SOD, catalase e GPx na amígdala, respectivamente, nos diferentes grupos. (* = $p < 0,05$; ANOVA de uma via e pós teste Bonferroni).

4.7. Efeitos do exercício física e/ou açai sobre proteínas relacionadas à neuroplasticidade

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método Western Blot, conforme descrito anteriormente.

4.7.1. Expressão proteica de BDNF

Não encontramos efeitos do exercício e/ou açai sobre a expressão de próBDNF (33 kDa) ou de BDNF imaturo (23 kDa). No entanto, houve efeito da administração de açai sobre o BDNF maduro (14 kDa), uma vez que os grupos SedA e ExeA foram diferentes do grupo Exe (figura 16 C). Não houve diferença da comparação entre os grupos quando utilizamos a quantidade de BDNF maduro sobre o total (figura 16D).

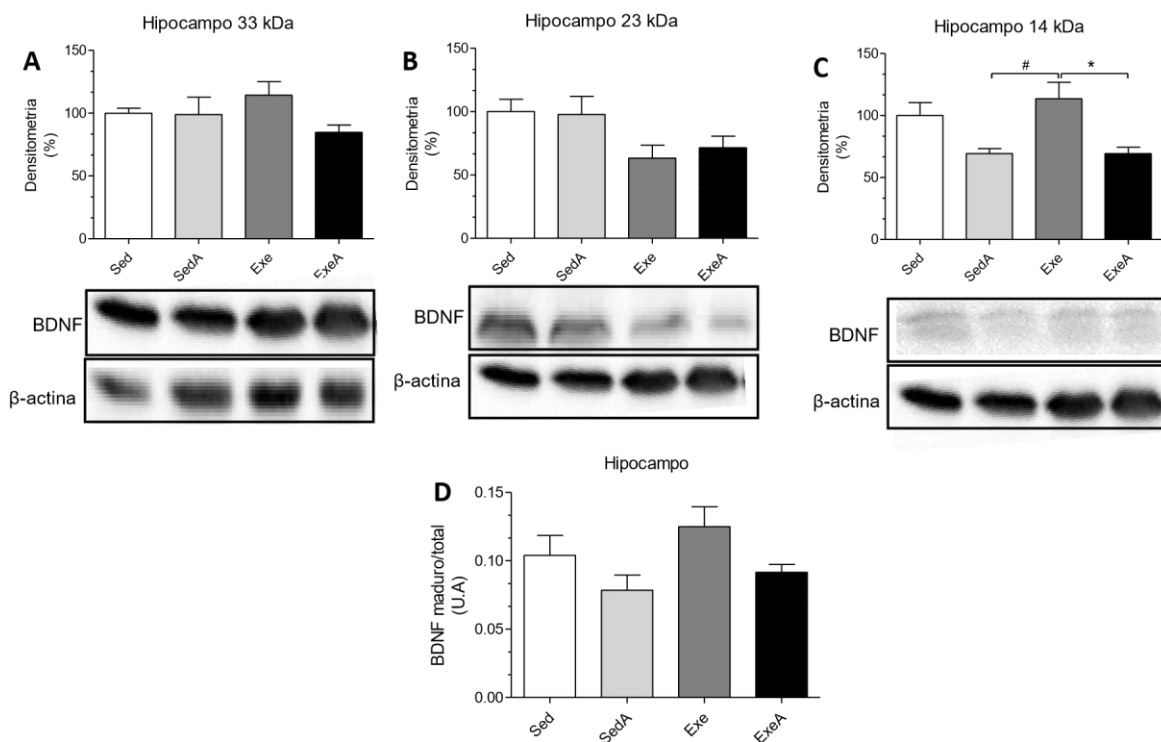


Figura 16. Médias±epm das análises densitométricas das quantidades de proteínas e as bandas imunorreativas para pró-BDNF (A), BDNF imaturo (B) e BDNF maduro (C) e o controle β -actina. O gráfico D ilustra a quantidade de BDNF maduro em razão do total. Houve influência do açai sobre o BDNF maduro (C). *= $p < 0,05$; ANOVA de uma via e pós teste Bonferroni.

4.7.2. Expressão proteica de BDNF

Não encontramos efeitos do exercício e/ou açaí sobre a expressão de próBDNF (33 kDa), BDNF imaturo (23 kDa) ou BDNF maduro (14 kDa). Houve diferença na razão BDNF maduro e BDNF total entre os grupos SedA e ExeA em comparação com o grupo Sed ($p=0,0107$; $p=0,0035$ figura 17D).

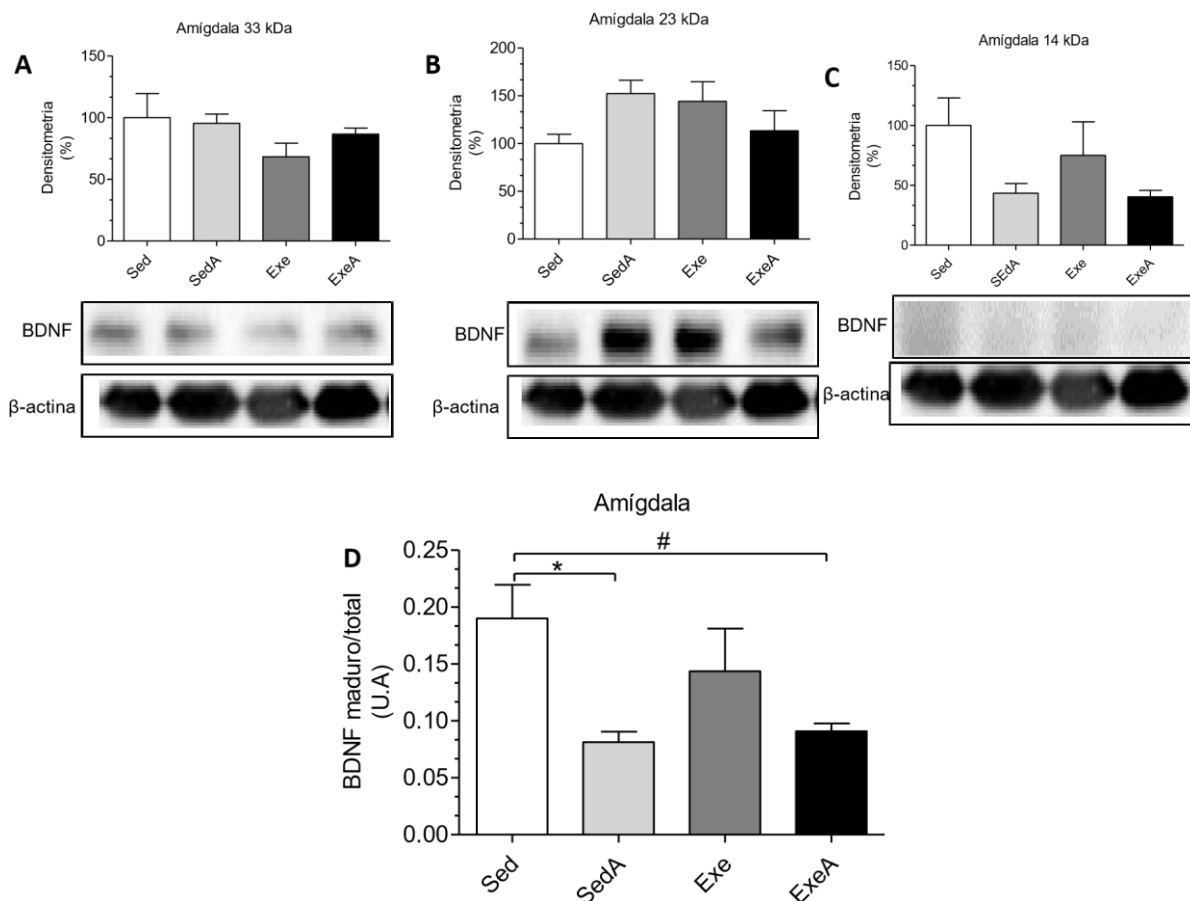


Figura 17. Médias \pm epm das análises densitométricas das quantidades de proteínas e as bandas imunorreativas para pró-BDNF (A), BDNF imaturo (B) e BDNF maduro (C) e o controle β -actina. O gráfico D ilustra a quantidade de BDNF maduro em razão do total. Houve influência do açaí sobre a razão BDNF maduro/total (D). ($p=0,0107$; $p=0,0035$) $\ast=p<0,05$; ANOVA de uma via e pós teste Bonferroni.

4.8. Expressão proteica de GDNF, GAP-43 e GFAP no hipocampo

Não encontramos efeitos do exercício e/ou açaí sobre a expressão GDNF, GAP-43 ou GFAP no hipocampo dos animais (figura 18).

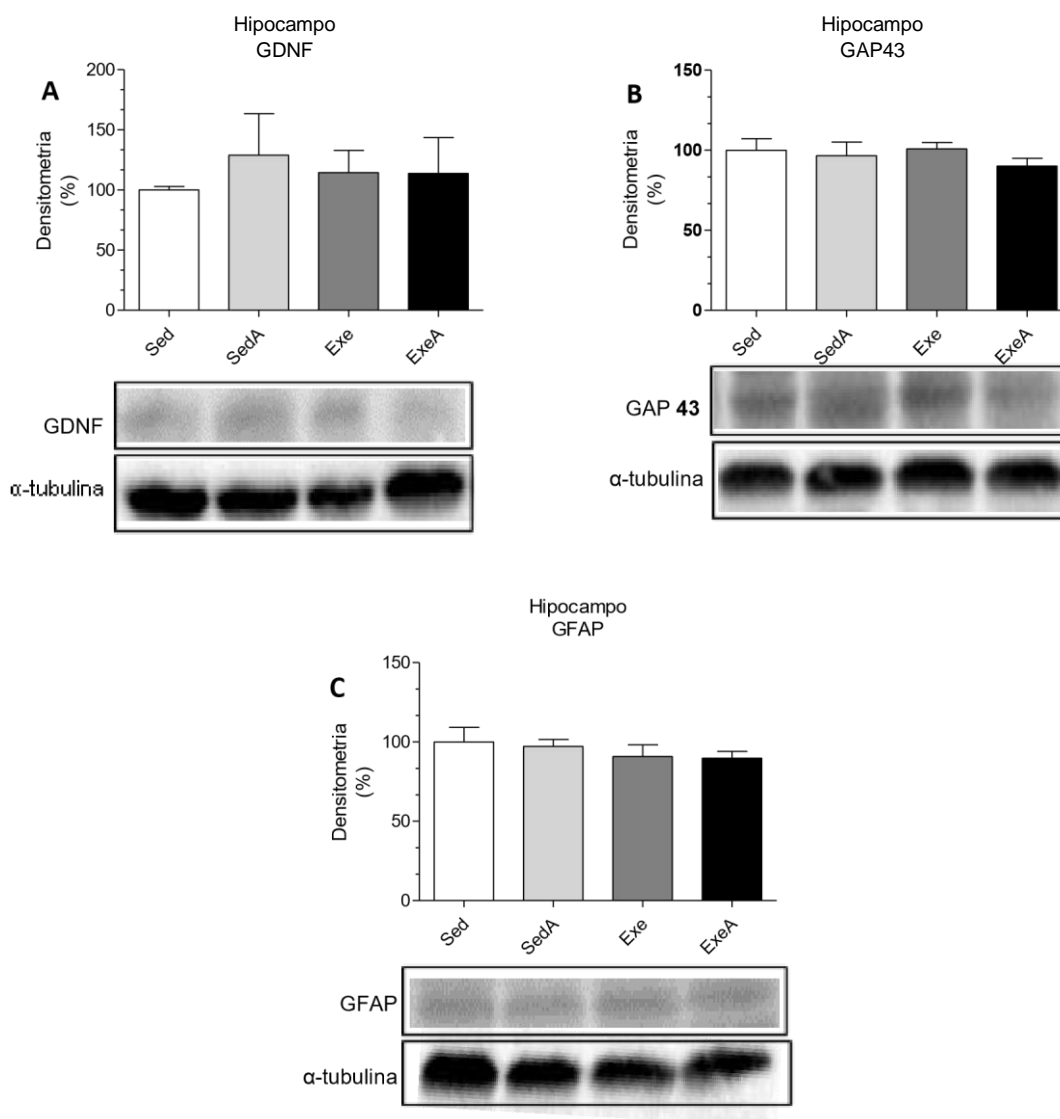


Figura 18. Médias \pm epm das análises densitométricas das quantidades de proteínas e as bandas imunorreativas para GDNF (A), GAP-43 (B) e GFAP (C) e o controle β -tubulina no hipocampo. Não houve diferenças entre os grupos.

4.9. Expressão proteica de GDNF, GAP 43 e GFAP na amígdala

Não encontramos efeitos do exercício e/ou açaí sobre a expressão GDNF, GAP-43 ou GFAP na amígdala dos animais (figura 19).

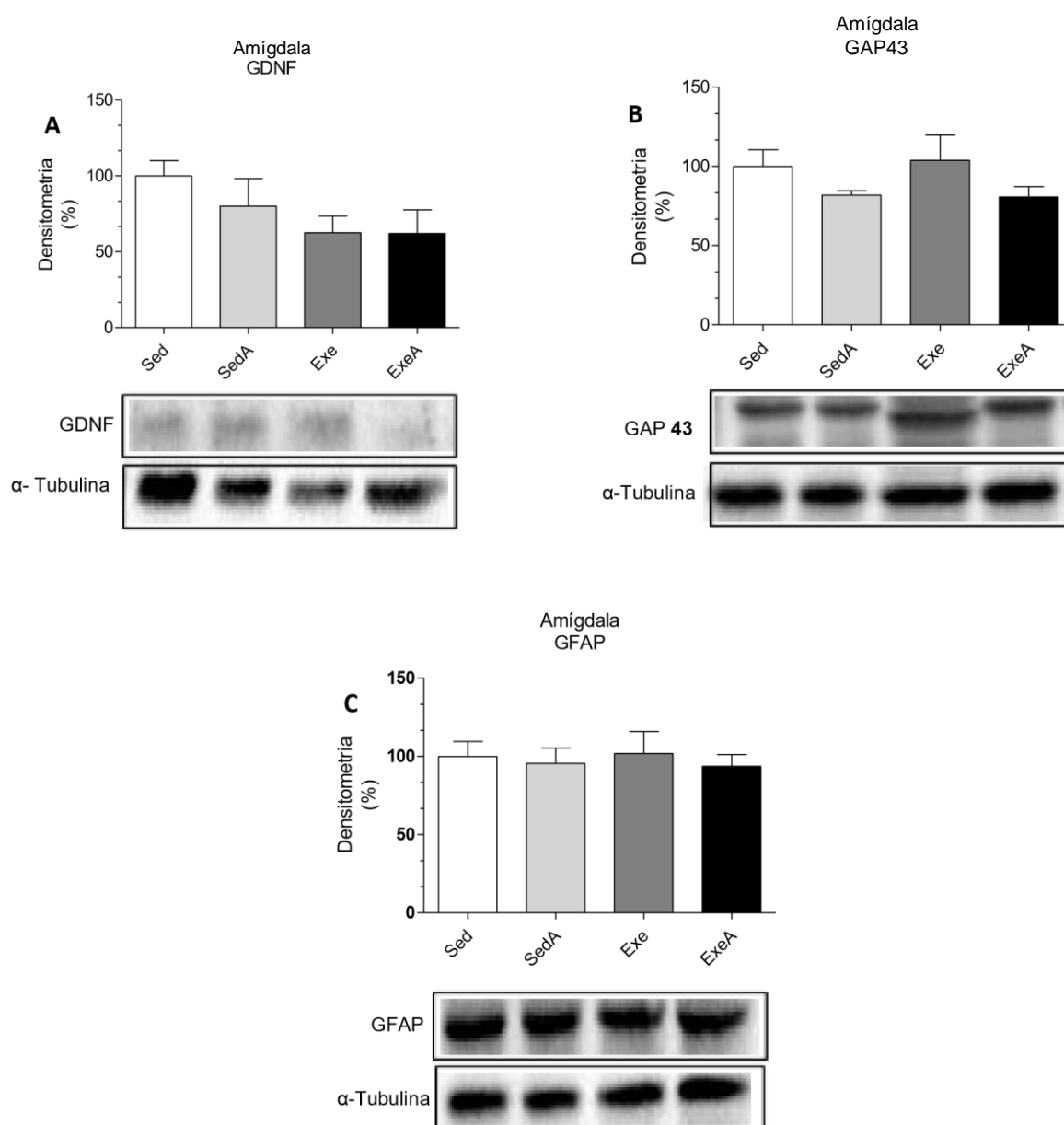


Figura 19. Médias \pm epm das análises densitométricas das quantidades de proteínas e as bandas imunorreativas para GDNF (A), GAP-43 (B) e GFAP (C) e o controle β -tubulina na amígdala. Não houve diferenças entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos combinados do exercício físico com polpa de açaí sobre processos relacionados à cognição, à ansiedade e eventos moleculares. Diversas pesquisas apontam inúmeros benefícios de hábitos de vida mais ativos associados a uma boa dieta alimentar, favorecendo tanto a prevenção quanto o tratamento de problemas cognitivos e emocionais (Cotman, 2007; Deslandes et al., 2009; Boutcher, 2011). O EF tem relação com melhoras em alguns fatores cognitivos, principalmente, aqueles relativos a tarefas mais elaboradas como formação de memória (Deslandes et al., 2009). Além disso, estudos demonstraram que o EF pode ter efeito ansiolítico, controlando os níveis de depressão e mediando os níveis de estresse (Colcombe e Kraemer, 2003; Netz et al., 2005).

O EF tem importante papel no sentido de retardar e, até mesmo, atenuar o processo de declínio de muitas funções biológicas, pois promove melhoras nas capacidades respiratória, cardíaca, resposta e força muscular (Cotman et al., 2007; Boutcher, 2011). Contudo, o EF deve ser regular e de acordo com o perfil de cada organismo (Marin-Neto et al, 1995).

O EF de modo geral contribui para uma maior interação social, o que favorece o aspecto emocional, resultando em um bom nível de bem-estar, contribuindo para melhora na qualidade de vida (Cardoso, 1992). Durante a realização de um programa de EF, ocorre liberação de hormônios como endorfina e dopamina, propiciando um efeito relaxante, contribuindo para o equilíbrio psicossocial do indivíduo (Marin-Neto et al, 1995).

O açaí é um fruto com alto teor de antocianina, um composto fenólico com importante ação fisiológica e grande importância econômica para o país. Tem despertado grande interesse na área da saúde em razão de seus efeitos ansiolíticos, antioxidantes e anti-inflamatório (Menezes et al., 2008). Em geral, os benefícios fisiológicos das antocianinas se devem à ação antioxidante através da eliminação de espécies reativas ou aumento da atividade ou expressão das enzimas antioxidantes endógenas (Talalay, 2008).

No estudo de Castro et al. (2014), camundongos submetidos por 12 semanas a uma dieta de ração formulada com 2% de polpa de açaí liofilizada e um protocolo de EF de 12 semanas, 5 dias por semana, com velocidade e duração que variaram até atingir na última semana 16m/min por 60 minutos, não resultou em diferença no peso corporal tanto em relação a dieta quanto ao protocolo de treinamento. No nosso estudo, houve diferença no ganho de peso corporal apenas entre os grupos SedA e Exe, o que aponta efeito apenas do EF, mas não da dieta sobre o peso, mesmo o açaí possuindo alto teor calórico. Os grupos Sed e ExeA apresentaram as menores variações de peso durante o protocolo de treinamento podendo, possivelmente, o açaí ter contribuído para reduzir a perda de peso durante o protocolo de treinamento, o que não ocorreu com o grupo Exe que apresentou a maior perda de peso entre os demais grupos, principalmente em relação ao grupo SedA.

No presente estudo, assim como no citado, a dieta, mesmo apresentando alto teor calórico, não interferiu no peso final dos animais. Ambos os estudos possuem protocolos de treinamento e suplementação com concentrações de açaí diferentes, bem como a forma de administração da polpa. O nosso estudo realizou um protocolo de EF de 7 dias com mesmo período de suplementação. Porém, a concentração da polpa foi maior e a forma de administrar foi via gavagem, o que diminui a chance de

um animal consumir menos composto que o outro. Shimizu (2014) submeteu, por 5 dias, camundongos a um protocolo de EF e que recebeu uma dieta calórica de 15% de glucose diluída em água pelo mesmo período do treinamento. Apesar do estudo citado utilizar uma outra fonte de composto calórico, também, não houve diferença no peso entre os grupos.

Os comportamentos relacionados a ansiedade são constituídos por um conjunto de alterações com pouca atividade motora ou imobilidade (freezing), baixos níveis de autolimpeza (grooming), exploração (rearing), aumento na micção e bolos fecais (Katz et al., 1981).

Vários estudos que utilizaram EF e/ou açaí como gatilhos responsáveis por gerar efeitos sobre comportamentos relacionados à ansiedade e memória, através dos testes CA e RO, apresentaram resultados semelhantes aos nossos (Halberstadt e Geyer, 2011; Gutierrez et al., 2014). Identificamos efeitos sobre comportamento relacionado à ansiedade entre os grupos Sed, SedA e ExeA no comportamento de se apoiar sobre as patas traseiras (rearing).

O teste do CA avalia o comportamento exploratório e a atividade geral em roedores (Hall, 1934). Esse teste baseia-se na aversão dos roedores a espaços abertos e a tendência em ficar protegidos e em locais fechados e escuros (Lamprea et al., 2008). Esse modelo comportamental permite avaliar efeitos de uma intervenção mecânica ou bioquímica (Prut e Belzung, 2003). Os grupos SedA e ExeA, que receberam açaí, exibiram menor comportamento ansiogênico no teste do CA em relação ao grupo Sed, o que indica menor estado de ansiedade (Halberstadt e Geyer, 2011; Gutierrez et al., 2014). Também constatamos efeito do EF sobre a micção, o grupo ExeA apresentou menos micção do que o grupo SedA o que indica menor estado de ansiedade quando se associou EF e açaí (Ramos e Mormede, 1998).

Os roedores têm como característica, explorar algo que seja novo para eles e, este comportamento típico tem sido utilizado em um teste comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias (Coyle et al., 2009). Lapmanee e colaboradores (2017), durante quatro semanas, submeteram ratos Wistar machos a um pré-tratamento anti-ansiedade e anti-depressivo com fármacos ou EF voluntário em roda, seguido por quatro semanas de estresse induzido por contenção. Tanto os pré-tratamentos com os fármacos quanto o EF foram eficientes na prevenção da ansiedade. Contudo, os fármacos foram mais eficazes em prevenir o comprometimento da memória induzida pelo estresse. Em nosso estudo, o EF associado ou não com açaí também não teve efeito sobre a memória.

No estudo realizado por Chen e colaboradores (2017), camundongos Thy1 - H machos (que expressam proteína fluorescente amarela em neurônios piramidais da camada cortical) foram divididos em grupo sedentário, grupo de estresse e estresse submetido a exercício, sendo os dois últimos preparados para modelo de estresse usando abordagem de contenção física. O exercício ocorreu em esteira, 1 hora por dia, com velocidade de 12m/min por 14 dias. Neste estudo, foi demonstrado a melhora da função de memória por meio do exercício. Em nosso estudo, durante a primeira exposição dos animais aos objetos, os grupos SedA e ExeA exploraram mais que o grupo Sed o objeto B, o mesmo usado na segunda exposição, aproximadamente uma hora depois. Por ser um objeto familiar, espera-se que os animais reconheçam-no na segunda exposição e com objetivo de avaliar a memória de curto prazo. Contudo, na segunda exposição, apesar dos grupos que receberam açaí explorarem menos o objeto familiar, o que indica que ficaram mais tempo no objeto novo, não houve

diferença estatística entre os grupos. Sendo assim, não podemos inferir que o EF ou açai teve efeito sobre a memória.

Santos e colaboradores (2018) investigaram os efeitos do açai na prevenção da obesidade, resistência à insulina e o desempenho cognitivo em camundongos. A polpa seca de açai (2%) foi adicionada a dieta normal e administrada por 10 semanas à 20 camundongos adultos que foram inicialmente divididos em quatro grupos; i) dieta normal, ii) dieta normal + açai, iii) dieta hiperlipídica, iv) dieta hiperlipídica + açai. Eles constataram que a suplementação da dieta com a polpa de açai preveniu o ganho de gordura visceral, a resistência à insulina e indicou efeito neuroprotetor, minimizando os déficits cognitivos em função do desempenho positivo no teste de reconhecimento de objetos. Talvez a diferença dos resultados obtidos nesse estudo dos nossos possa ter relação com o tempo de suplementação.

Em um estudo de Castro e colaboradores (2014) cujos efeitos do consumo de polpa de fruta açai isoladamente ou em combinação com exercício aeróbico, sobre o estado oxidativo e inflamatório hepático de camundongos com deficiência de ApoE foram avaliados, constatou-se que a dieta contendo 2% de polpa de açai por 12 semanas não afetou o estado oxidativo e inflamatório hepático de camundongos ApoE. No mesmo estudo verificou-se que o exercício aeróbico de intensidade moderada melhorou o estado oxidativo hepático, reduziu a expressão de mRNA do marcador inflamatório MCP-1 e diminuição da esteatose hepática, bem como área de lesão aterosclerótica. Segundo os autores, esses achados vão contra a hipótese que eles tinham de que uma combinação de uma dieta suplementada com polpa de açai e EF poderia potencializar os efeitos do consumo de polpa sobre os biomarcadores oxidativos e inflamatórios hepáticos. Mesmo os objetivos do estudo citado anteriormente sendo diferentes dos nossos, já que, Castro e colaboradores (2014)

investigaram os efeitos do consumo de polpa de açaí e/ou exercício aeróbico sobre o estado oxidativo e inflamatório hepático, de modo geral, também esperávamos que a combinação do EF com polpa de açaí apresentaria melhores resultados sobre aspectos ligados a efeito sobre o comportamento dos animais, já que EF e açaí podem favorecer o aumento das defesas neuroprotetoras do que EF ou açaí separadamente.

Carey e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia da polpa de açaí liofilizada em reverter déficits cognitivos relacionados à idade em ratos idosos. Os ratos foram suplementados por 8 semanas com 2% de polpa de açaí e, posteriormente, testados no labirinto aquático de Morris. Em seguida, o soro sanguíneo dos ratos foi utilizado para avaliar as respostas inflamatórias das células microgliais BV-2. Após 8 semanas de suplementação dietética com 2% de polpa de açaí, os ratos demonstraram melhora da memória no labirinto aquático em relação aos controles. Esses resultados divergem dos resultados encontrados em nosso estudo, assim como no estudo de Lapmanee e colaboradores (2017). Em nosso estudo, os ratos receberam a suplementação de açaí por apenas 7 dias, enquanto no estudo citado a suplementação ocorreu por 8 semanas. Pode ser que o tempo de suplementação seja fator importante a ser considerado e essa pode ser uma explicação para a ausência de resultados.

Naderi e colaboradores (2015) avaliaram a relação entre EF e diminuição do estresse oxidativo no coração e no sangue de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Ratos treinados foram submetidos por 6 semanas a exercício voluntário em roda e a análise da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx apontaram um aumento na atividade das mesmas em resposta ao aumento dos radicais livres. A CAT faz parte de um grupo de enzimas que atuam na eliminação de ERs. Essa proteína atua sobre o H_2O_2 , promovendo a catálise para formar água. Com o mesmo objetivo, a GPx também funciona como mecanismo de proteção contra EO,

removendo H_2O_2 e formando água (Ferrari et al., 1985). Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical O^- e de H_2O_2 para que não haja produção de radical hidroxil, que é uma ERO que causa grandes danos para diversas estruturas biológicas (Pal, 1994).

Em nosso estudo, verificamos a atividade das mesmas enzimas SOD, CAT e GPx no hipocampo e amígdala, no entanto, apenas houve aumento na atividade da GPx no hipocampo entre os animais do grupo Exe em relação aos animais do grupo Sed. Considerando que o EF aumenta ERO (Gutteridge e Halliwell, 1992) e, portanto, colocaria áreas do SN em certa vulnerabilidade bioquímica, a atividade dessas enzimas tem efeito neuroprotetor (Pal, 1994).

Farina e colaboradores (2009) demonstraram que a GPx responde ao aumento das ERs como mecanismo neuroprotetor e, esses dados se assemelham aos do nosso estudo, em que houve aumento da atividade da GPx na amígdala, indicando que pode ter havido aumento de ERO. O fato do grupo ExeA não ter apresentado tal aumento sugere que a combinação de EF e açaí pode ter atenuado eventos de EO no hipocampo. Mesmo efeito pôde ser observado na amígdala, onde ocorreu aumento da atividade da enzima CAT no grupo ExeA em relação aos grupos Sed e Exe. Os resultados apontam efeito antioxidante da CAT na amígdala entre os grupos citados anteriormente, o que vem ao encontro com os resultados do teste de CA em que houve efeito ansiolítico entre os grupos SedA e ExeA sobre o grupo Sed.

Santos e colaboradores (2018), ao analisarem a atividade das enzimas SOD e CAT e a quantificação de BDNF no hipocampo e soro, constataram que os grupos que receberam açaí, apresentaram maior atividade das enzimas antioxidantes e maior concentração de BDNF no hipocampo e soro o que explicaria o bom resultado cognitivo apresentado no teste de reconhecimento de objeto.

Em nosso estudo, quantificamos as três isoformas de BDNF (pré, pró e maduro), tanto no hipocampo quanto na amígdala, e encontramos diferença apenas entre os grupos SedA e ExeA em relação ao Exe. Grupo Exe apresentou maior concentração de BDNF maduro em relação aos outros dois no hipocampo. Dados semelhantes foram descritos por Gomez-Pinilla e colaboradores (2011) ao avaliarem a ação do exercício físico na regulação do BDNF no hipocampo. Contudo, em nosso estudo, não houve diferença na razão do BDNF maduro sobre o total, nem entre o BDNF pré e pró e esse resultado vai ao encontro com o obtido no teste de memória, já que também não teve diferença entre os grupos, apesar dos grupos SedA e ExeA apresentarem maior interesse em explorar o objeto novo no segundo reconhecimento. Tais achado divergem dos resultados apresentados no trabalho citado anteriormente (Santos et al., 2018).

Molteni et al. (2002) constatou que animais que realizaram 3 dias de EF apresentaram aumento do nível de mRNA, que codifica BDNF e também da proteína GAP43, importante para o crescimento de neuritos, liberação de neurotransmissores, aprendizagem e memória. Também, Berchtold et al. (2005) observou que animais exercitados apresentaram uma elevação significativa do nível de BDNF a partir da segunda semana de treino e esse aumento permaneceu após 90 do período de treino.

Já na amígdala, encontramos diferença entre os grupos SedA e ExeA em relação ao Sed, que apresentou maior concentração de BDNF. Tais resultados são diferentes dos encontrados no estudo de Santos et al (2018).

Em um estudo foi avaliada a eficácia do açaí na reversão de déficits cognitivos relacionados à idade em ratos idosos com 19 meses de idade que foram suplementados por 8 semanas com polpa de açaí a 2% ou dieta controle. Os ratos foram testados no labirinto aquático de Morris e depois foram avaliadas no soro

sanguíneo as respostas inflamatórias das células microgлияis BV-2. Os ratos que consumiram açaí demonstraram melhora da memória de trabalho e de referência no labirinto aquático de Morris, em relação aos demais (Carey et al., 2017). Esses resultados também são diferentes dos nossos, possivelmente, em razão da do tempo de administração do suplemento.

São inúmeros os trabalhos que avaliam e confirmam os efeitos do exercício físico sobre a cognição, enquanto que estudos o efeito do açaí sobre eventos cognitivos são poucos. Esses poucos estudos que demonstraram efeito positivo do açaí sobre a memória, em média, realizaram a suplementação por um período igual ou superior a 30 dias (Batista et al., 2017; Carey et al., 2017; Ereminas et al; Poulouse et al., 2017; Santos et al., 2018), diferentemente do nosso estudo em que a suplementação foi feita por 7 dias.

Os astrócitos são importantes células gлияis, atuam regulando a concentração de várias moléculas e neurônios, e sabe-se que participam ativamente do funcionamento sináptico (Haber et al., 2006). Ainda, essas células participam da plasticidade induzida por estímulos ambientais, como o EF com ou sem associação a compostos bioativos (Theodosis et al., 2008). Portanto, em nosso estudo, também quantificamos as proteínas GDNF, GAP43 e GFAP no hipocampo e amígdala e diferentemente de outros trabalhos, não encontramos diferenças entre os grupos em nenhum dos tecidos analisados.

Ribeiro (2013) investigou a Influência de um programa de 30 dias de EF sobre os níveis de fatores NTs no mesencéfalo e os resultados foram semelhantes aos nossos, indicando que o treinamento aeróbico não elevou os níveis de GDNF e, segundo a autora, estes dados obtidos em seu estudo não são confirmados pela literatura.

Lau e colaboradores (2011) constataram aumento do nível de GDNF após 18 semanas de exercício em esteira. Já em outros estudos, após 4 semanas de exercício de baixa intensidade em esteira, os autores também apontaram aumento dos níveis de GDNF em relação aos grupos não exercitados (Faherty et al., 2005; Zigmond et al., 2009; Tajiri et al., 2010). Diferentemente dos demais trabalhos em que o programa de treinamento físico foi igual ou superior a 4 semanas, o nosso protocolo de exercício físico foi de uma semana o que talvez explique a ausência de diferença entre os grupos.

Entretanto, com relação a proteína GAP43, Molteni e colaboradores (2004) constataram que neurônios do grupo da raiz dorsal apresentaram maior crescimento dos neuritos dos animais submetidos a um programa de exercício entre 3 a 7 dias em comparação aos animais sedentários.

Os neurônios dos animais exercitados apresentaram maior expressão de GAP-43 quando comparados com o grupo sedentário, o que indica uma relação positiva entre o EF e a expressão de GAP43. Apesar do nosso programa de EF também ter sido de 7 dias, nossos resultados divergem do resultado do estudo citado já que não houve diferença entre os grupos exercitados e sedentários e, mesmo entre os que receberam e os que não receberam açaí. Deve-se considerar que as áreas do SN avaliadas foram diferentes e isso pode explicar uma certa seletividade nos processos de neuroplasticidade que dependem da intensidade e duração do exercício, mas também da área estimulada. Outros trabalhos também apresentaram relação entre EF e expressão de GAP43 (Mizutani et al., 2013; Paddock et al., 2018). Além da relação do EF com a expressão de GAP43, estudos apontam que compostos bioativos como polifenóis também podem influenciar a expressão dessa proteína (Agrawal et al., 2015). Reutzel e colaboradores (2018), durante 6 meses, alimentaram camundongos

fêmeas com 12 meses de idade com uma mistura contendo polifenóis da azeitona purificados a partir de folhas de oliveira (dieta rica em flavonoides) ou dieta controle. Os camundongos alimentados com o composto apresentaram melhora na memória operacional espacial e maior expressão de GAP43 em comparação com grupo da dieta controle.

Saur (2013) investigou a imunorreatividade de GFAP para avaliar a, densidade e morfologia de astrócitos do hipocampo em resposta ao exercício físico. Os animais do grupo treinado foram submetidos a 4 semanas de EF diário em esteira durante 30 minutos por dia. Os resultados apontaram que o grupo exercício aumentou a densidade de astrócitos, o que demonstra a relação do EF com regulação da atividade neural e plasticidade. Esses dados não coincidem com os encontrados em nosso estudo, uma vez que não houve diferença entre os grupos treinados, que realizaram um programa de 7 dias e os grupos sedentários. Outros trabalhos confirmam os resultados obtidos pela autora (Jones et al., 1996; Gómez-Pinilla et al., 1998; Uda et al., 2006).

Silva e colaboradores (2014) avaliaram o efeito neuroprotetor da antocianina presente no açaí sobre a neurotoxicidade do manganês e os resultados indicam que, em determinadas concentrações, as antocianinas obtidas do açaí protegeram as células astrocíticas contra a neurotoxicidade do manganês, contudo, em concentrações elevadas, houve aumento dos efeitos oxidantes do elemento, gerando danos às células, o que sugere que existe uma quantidade nutricional ideal de antocianina para que tenha o efeito neuroprotetor esperado do composto.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados ainda não são conclusivos, sobretudo, em relação aos efeitos isolados ou em combinação do exercício físico com polpa de açaí sobre aspectos cognitivos. No entanto, mesmo não sendo estatisticamente significativo, pudemos constatar que os grupos SedA e ExeA apresentaram maior preferência em explorar um objeto novo no teste de memória o que sugere que reconhecem o outro objeto (familiar). Também, constatamos que a polpa de açaí liofilizada teve efeito ansiolítico sobre alguns parâmetros indicativos de ansiedade como rearing e micção.

Os ensaios de Western Blot e da cinética da atividade das enzimas antioxidantes apresentaram algumas diferenças entre os grupos, mas não suficientes para afirmar que exercício físico e/ou polpa de açaí possuem efeito protetor sobre o sistema nervoso central.

Os estudos de suplementação, com ou sem prática de exercício físico, têm conseguido demonstrar efeitos positivos sobre biomarcadores específicos relacionados à oxidação, como também relacionados à cognição e aspectos ligados a ansiedade. Entretanto, existem muitas divergências entre autores, quanto às condições dos indivíduos da amostra e também ao tipo de intervenção utilizada. Tais fatores dificultam a interpretação dos resultados deste e outros estudos. Contudo, ainda se tem poucos estudos sobre os reais benefícios do açaí importante fruto brasileiro. Em conclusão, os nossos resultados mostram efeito ansiolítico do açaí e/ou exercício físico sobre alguns comportamentos relacionados a ansiedade, mas também sobre algumas enzimas antioxidantes e proteínas relacionadas à neuroplasticidade.

7. PERSPECTIVAS

Futuros estudos são necessários para elucidar os mecanismos diretos e indiretos pelos quais o açaí atua no metabolismo, tanto em roedores quanto em outras espécies. Seria interessante para auxiliar nessa área, repetir o estudo com uma amostra maior e/ou o tempo de treinamento e suplementação. Outras perspectivas seria incluir outra modalidade de exercício físico ou outro composto com valor calórico ou de antocianina semelhante ao do açaí para melhor entendimento e eficácia do consumo da polpa de açaí combinada ou não com exercício físico sobre os resultados encontrados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nat Med.* 2004.

Andersen, OM., Jordheim, M., OM., Mark-ham, K. R., (Eds.), *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton 2006, pp. 471–551

Aggleton JP. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci.* 1993;16(8):328-33.

Agrawal R, Noble E, Tyagi E, Zhuang Y, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Flavonoid derivative 7,8-DHF attenuates TBI pathology via TrkB activation. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):862-72.

Belló, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. MARRONI, NP et al. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Porto Alegre: Editora Ulbra, p. 15-19, 2002.

Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):84-91.

Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience.* 2010;167(3):588-97.

Bondy, Stephen C., Lebel, Carl P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 14, n. 6, p. 633-642, 1993.

Bonomo, I. F.; Silva, d. N.; Boasquivis, P. F.; Paiva, F. A.; Guerra, J. F.; Martins, T. A.; Torres, á. G. J.; Paula, I. T.; Caneschi, W. L.; Jacolot, P.; Grossin, n.; Tessier, F.

J.; Boulanger, e.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L.; Oliveira, R. P. Açai (Euterpe oleracea Mart.) modulates oxidative stress resistance in Caenorhabditis elegans by direct and indirect mechanisms. PLoS One, v. 9, n. 3, p. e89933, 2014.

Boutcher, Stephen H. High-intensity intermittent exercise and fat loss. Journal of obesity, v. 2011, 2010.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976. 72:248-254.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Ver. 56:317-33. 1998.

Bridle, P; Timberlake, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. Food Chemistry. P: 103-109. 1997.

Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM. GDNF is an agespecific survival factor for sensory and autonomic neurons. Neuron. 1995;15(4):821-8.

Cadenas, Enrique; Davies, Kelvin JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology and medicine, v. 29, n. 3, p. 222-230, 2000.

Campos, Marcelo Cavalheiro de. O exercício físico e sua relação com o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a plasticidade sináptica: uma revisão bibliográfica. 2014.

Cardoso, J.R. Atividades físicas para a terceira idade. A terceira idade. 1992; 5 (4): 9-21.

Cardoso, L. M.; Novaes, R. D.; Castro, C. A.; Novello, A. A.; Gonçalves, R. V.; RicciSilva, M. E.; Ramos, H. J. O.; Eluzio, M. C. G.; Leite, J. P. V. Chemical

composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. *Nutrición Hospitalaria*, v. 32, n. 2, p. 702-709, 2015.

Carey AN, Miller MG, Fisher DR, Bielinski DF, Gilman CK, Poulouse SM, Shukitt-Hale B. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. *Nutr Neurosci*. 2017;20(4):238-245.

Carro, Eva, et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of neuroscience* 20.8 (2000): 2926-2933.

Caspersen, C. J.; Powell, K. E.; Christenson, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, v. 100, n. 2, p. 126-31, MarApr 1985.

Cassilhas, R. C., Lee, K. S., Fernandes, J., Oliveira, M. G. M., Tufik, S., Meeusen, R., & De Mello, M. T. (2012). Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience*, 202, 309-317.

Castro, C. D. P. N., Gil-Mohapel, J., & Brocardo, P. S. Exercício físico e neuroplasticidade hipocampal: Revisão de literatura. *vittalle-Revista de Ciências da Saúde*, 2017;29(2), 57-78.

Cechetti, Fernanda et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain research*, v. 1188, p. 182-188, 2008.

Cedrim, Paula Cavalcante Amélio Silva, Elenita Marinho Albuquerque Barros, and Ticiano Gomes do Nascimento. Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. *Brazilian Journal of Food Technology* 21 (2018).

Chao CC, Ma YL, Chu KY, Lee EH. Integrin alphav and NCAM mediate the effects of GDNF on DA neuron survival, outgrowth, DA turnover and motor activity in rats. *Neurobiol Aging*. 2003;24(1):105-16.

Chen HI, Lin LC, Yu L, Liu YF, Kuo YM, Huang AM, Chuang JI, Wu FS, Liao PC, Jen CJ. Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: the role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(4):489-96. Epub 2007 Sep 24.

Chen T, Cai MX, Li YY, He ZX, Shi XC, Song W, Wang YH, Xi Y, Kang YM, Tian ZJ. Aerobic exercise inhibits sympathetic nerve sprouting and restores β -adrenergic receptor balance in rats with myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9(5):e 97810.

Chennaoui, M.; Merino, D.; Lesage, J.; Drogou, C.; Guezennec, C.Y. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, vol.175, p. 113-21, 2002.

Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueri, T.; Wilson, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, v. 30, n. 2, p.280-285, 2002.

Cotman, C. W.; Berchtold, N. C.; Christie, L.-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences*, v. 30, n. 9, p. 464–72, set. 2007.

da Silva Santos V, Bisen-Hersh E, Yu Y, Cabral IS, Nardini V, Culbreth M, Teixeira da Rocha JB, Barbosa F Jr, Aschner M. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(7):390-404.

Dalmaz, C., Netto, C. A. (2004). A memória. *Ciência e Cultura (SBPC)*, São Paulo 56 (1), 30-31.

De Castro, Cynthia Aparecida et al. Aerobic exercise and not a diet supplemented with jussara açai (*Euterpe edulis Martius*) alters hepatic oxidative and inflammatory biomarkers in ApoE-deficient mice. *British Journal of Nutrition*, v. 112, n. 3, p. 285-294, 2014.

Deslandes A, Moraes H, Ferreira C, Veiga H, Silveira H, Mouta R, Pompeu FA, Coutinho ES, Laks J. Exercise and mental health: many reasons to move. *Neuropsychobiology*. 2009;59(4):191-8.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 1999;65(4):337-53.

Dixon, Richard A.; Paiva, Nancy L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.

Dornas, W. C., Oliveira, T. T. D., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F. D., & Nagem, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2009;28(3), 241-249.

Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, v. 62, n. 6, p. 649-671, 15 dez. 2000.

El Morsy, Engy M., Maha AE Ahmed, and Amany AE Ahmed. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. *Life sciences* 123 (2015): 35-42.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioural Brain Research*. 1988.

Faherty, C. J., Raviie Shepherd, K., Herasimtschuk, A., & Smeyne, R. J. (2005). Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Brain research. Molecular brain research*, 134(1), 170–9.

Farina M, Campos F, Vendrell I, Berenguer J, Barzi M, Pons S, Sunol C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci.* 2009; 112: 416-426.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera M, Albertini A, Visioli O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:937-45.

Ferreira, RS. Neuropatia sensorial periférica induzida pela cisplatina: estudo dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina e do efeito protetor do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em células PC12. 2018.

Forman, HJ, Fukuto, JM, Torres, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen and nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, Bethesda, v. 287, n.2,p.c246-56. 2004.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3, 5-dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem*, 26/2, 227-231, 1980.

Foster, Jane A.; Neufeld, Karen-Anne McVey. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.

Galleguillos, Marco & Lemaitre, Maximiliano & Letelier Muñoz, María Eugenia & Adarmes, Héctor. (2010). Estrés oxidativo y patogenia del daño articular en equinos. *Avances en Ciencias Veterinarias*. Gomes, Tânia, et al. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology* 118 (2012): 72-79.

Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci.* 2011;33(3):383-90.

Gordon, A.; Cruz, A. P.; Cabral, L. M.; Freitas, S. C.; Taxi, C. M.; Donangelo, C. M.; Mattietto, R. A.; Friedrich, M.; Matta, V. M.; Marx, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, v. 133, n. 2, p. 256-263, 2012.

Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, da Silva CR, de P Cognato G, Farias JG, Signor C, Morsch VM, Mazzanti CM, Bogo M, Bonan CD, Spanevello R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci.* 2014;96(1-2):7-17.

Gutierrez, J. M., Carvalho, F. B., Schetinger, M. R., Rodrigues, M. V., Schmatz, R., Pimentel, V. C., & Leal, C. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life sciences*, 2012;91(23-24), 1221-1228.

Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of *Free Radicals in Biology and Medicine*, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(1):93-5.

Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology.* 2011;61(3):364-81.

Hall, CS. Emotional Behavior in the Rat. In: *Defecation and Urination as a Measure of Individual Differences in Emotionality.* *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, p. 385- 403, 1934.

Hallal, P. C., Matsudo, S. M., Matsudo, V. K., Araújo, T. L., Andrade, D. R., & Bertoldi, A. D. Physical activity in adults from two Brazilian areas: similarities and differences. *Cadernos de Saúde Pública*, 2005;21, 573-580.

Halliwell B Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001.

Halliwell, B.; Gutteridge, JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press: UK, 2002

Hof PR, Morrison JH. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* 2004;27(10):607-13.

Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., & Zhou, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 2010;118(2), 208-214.

Houenou LJ, Oppenheim RW, Li L, Lo AC, Prevet D. Regulation of spinal motoneuron survival by GDNF during development and following injury. *Cell Tissue Res.* 1996;286(2):219-23.

Izquierdo, I, Izquierdo, LA., Barros, DM., Mello e Souza, T., de Souza, MD., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant' Anna, MK., Madruga, M., Medina, JH. (1998).

Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behavior Pharmacology* 9(5-6), 421-7.

Izquierdo, I. A., de Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Furini, C. R. G. Memória: tipos e mecanismos—achados recentes. *Revista USP*, 2013;(98), 9-16.

J. Kong, L. Chia, N. Goh, T. Chia, R. Brouillard, Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64(5), 923 2003.

Johnson RA, Mitchell GS. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res.* 2003;983(12):108-14.

Johnston JB. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol.* 1923; 35:337-481.

Kang, J.; LI, Z.; Wu, T.; Jensen, G. S.; Schauss, A. G.; Wu, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry*, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981;5(2):247-51.

Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(2):188-202.

Koury, Josely Correa; Donangelo, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de nutrição*, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an openfield. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(2):135-40.

Lapmanee S, Charoenphandhu J, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. *PLoS One.* 2017.3;12(11): e 0187671.

Lima, LMAVL, et al. O potencial econômico do açaí na mesorregião do Marajo. In: encontro latino americano de iniciação científica, 10. e encontro latino Americano de pós graduação. 6., 2007. São Jose dos Campos, anais, 2007

Lebmann, Volkmar; Brigadski, Tanja. Corrigendum to Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update [Neurosci. Res. 65 (2009) 11-22]. Neuroscience research, v. 65, n. 3, p. 316-317, 2009.

Lee, I., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2005). The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. Behavioral Neuroscience, 119, 145–163.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science. 1993;260(5111):1130-2.

Lista, I., and G. Sorrentino. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. Cellular and molecular neurobiology 30.4 (2010): 493-503.

Lopes, Renato Matos, et al. Flavonóides. Biotecnologia ciência & desenvolvimento 17 (2000).

MOS. Souza, M.S. Silva, M.E. Silva, R.P. Oliveira, M.L. Pedrosa, Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats, *Nutrition*, 26(7-8), 804 2009.

Marin-Neto, J. A., Maciel, B. C., Golfetti, R., & Martins, L. E. B. Atividades físicas: remédio cientificamente comprovado. A terceira idade, 1995; 10(6), 34-43.

Mattson, M. P.; Chan, S. L.; Duan, W. Modification of Brain Aging and Neurodegenerative Disorders by Genes, Diet, and Behavior. *Physiol.Rev.* v. 82, p.637-672. 2002.

McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25:456. (2002).

Menezes, EMS.; Torres, A. T.; Srur, AUS. Valor nutricional da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

Mitozo, P. A., de Souza, L. F., Loch-Neckel, G., Flesch, S., Maris, A. F., Figueiredo, C. P., ... & Dafre, A. L. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011;51(1), 69-77.

Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Katoh Y, Shimpo K. Functional recovery and alterations in the expression and localization of protein kinase C following voluntary exercise in rat with cerebral infarction. *Neurol Sci*. 2014;35(1):53-9.

Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur. J. Neurosci.*, 16 (2002), pp. 1107–1116.

Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(22):8473-8.

Moura, R. S.; Resende, Â. C. Cardiovascular and metabolic effects of açaí, an Amazon plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 68, n. 1, p. 19-26, 2016. <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000347>. PMID:26657713.

Naderi R, Mohaddes G, Mohammadi M, Ghaznavi R, Ghyasi R, Vatankhah AM. Voluntary Exercise Protects Heart from Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(2):231-6.

Namgung U, Routtenberg A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of a brain growth protein: regional differentiation and regeneration induction of GAP-43. *Eur J Neurosci.* 2000;12(9):3124-36.

Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P., & Ibáñez, C. F. Neurotrophin₇: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS letters*, 424(3), (1998). 285-290.

Osorio RA, Christofani JS, D'Almeida V, Russo AK, Piçarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;135(1):89-95.

Paddock N, Sheppard P, Gardiner P. Chronic Increases in Daily Neuromuscular Activity Promote Changes in Gene Expression in Small and Large Dorsal Root Ganglion Neurons in Rat. *Neuroscience.* 2018; 388:171-180.

Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.

Park JA, Choi KS, Kim SY, Kim KW. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(2):247-53.

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E. & Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neurosciences Methods.* 1985.

Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goñi R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety related behaviors in middleaged and old rats. *Neuroscience.* 2012;202:252-66.

Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products, Columbus,* v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

Poo, Mu-ming. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, n. 1, p. 24-32, 2001.

Powers, Scott K.; Ji, L. L.; leeuwenburgh, Christiaan. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 31, n. 7, p. 987-997, 1999.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 28;463(1-3):3-33.

Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., ... & Goto, S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry international*, 2006;49(4), 387-392.

Ramos, A, Mormède, P. Stress and Emotionality: Multidimensional and Genetic Approach. *Neuroscience and Behavioral Review*, v. 22, 1998.

Ramos, A; Berton, O; Pierre, M; Chauloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research* 1997; 85: 57-69.

Reiter, Russel J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB journal*, v. 9, n. 7, p. 526-533, 1995.

Renz, S. V. Oxidação e antioxidantes. www6.ufrgs.br/bioquímica/posgrad/BTA/oxid_antiox.pdf. Acesso em, v. 23, p. 04-09, 2003.

Reutzel M, Grewal R, Silaidos C, Zotzel J, Marx S, Tretzel J, Eckert GP. Effects of Long-Term Treatment with a Blend of Highly Purified Olive Secoiridoids on Cognition and Brain ATP Levels in Aged NMRI Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4070935.

Ribeiro, RM. Alterações comportamentais, estruturais e níveis de fatores neurotróficos e citocinas em modelo experimental de parkinsonismo: efeitos do exercício físico. (2013).

Rocha, S. M. B. M.; Oliveira, A. G.; Costa, M. C. D. Benefícios funcionais do açaí na prevenção de doenças cardiovasculares. *Journal of Amazon Health Science*, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2015.

Rodgers, R. J; Cao, B.J; Dalvi, A; Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Basilian Journal of Medical and Biological Research* 1997; 30: 289-304.

Rogez, Hervé. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: Edufpa, 2000.

Rover Jr L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*. 2001; 24(1): 112-9.

Royce, J.R., On the construct validity of open field measures. *Psychological Bulletin*, 84(6):1098–1106, 1977.

Sachdeva R, Theisen CC, Ninan V, Twiss JL, Houlé JD. Exercise dependent increase in axon regeneration into peripheral nerve grafts by propriospinal but not sensory neurons after spinal cord injury is associated with modulation of regeneration-associated genes. *Exp Neurol*. 2016;276:72-82.

Santos, NMD. Impacto do consumo de polpa de açaí para a prevenção do comprometimento cognitivo: Impact of açaí pulp consumption for the prevention of cognitive impairment. 2018. Barker PA. Whither proBDNF? *Nat Neurosci*. 2009;12(2):105-6.

Saur, Lisiani. Efeitos do exercício físico sobre a morfofisiologia dos astrócitos imunorreativos para a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) no hipocampo de ratos Wistar. (2013).

Schauss A, Wu X, Prior R, Ou B, Patel D, Huang D, Kababick J. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry *Euterpe ole-racea* Mart. (açai). *J Agric Food Chem* 2006.

Schauss, Alexander G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart.(acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006.

Scheytt S, Riediger N, Braunsdorf S, Sommer C, Üçeyler N. Increased gene expression of growth associated protein-43 in skin of patients with early-stage peripheral neuropathies. *J Neurol Sci*. 2015;355(1-2):131-7.

Scott SK, Young AW, Calder AJ, Hellawell DJ, Aggleton JP, Johnson M. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. *Nature*. 1997;385(6613):254-7.

Shimizu, William Akira Lima. Efeitos da administração aguda de glicose após atividade física sobre o comportamento relacionado à ansiedade, memória e neuroplasticidade. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2014.

Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med*. 91:31S-8S. 1991.

Silveira, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante a contração. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. v.48.n.6, 2003.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.

Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005;(5):400-7.

Steffek AE, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008;103(1-3):71-82.

Stranahan AM, Mattson MP. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(3):209-16.

Stummer, W., Weber, K., Tranmer, B., Baethmann, A., & Kempfski, O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*, 1994;25(9), 1862-1869.

Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra JT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata Takeda, FI, Furuta T, Date I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res.* 2010;1310:200-7.

Teri L, Gibbons LE, McCurry SM, Logsdon RG, Buchner DM, Barlow WE, Kukull WA, LaCroix AZ, McCormick W, Larson EB. Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease:290(15):2015-22.

Theodosis DT, Poulain DA, Oliek SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev.* 2008; 88(3):983-1008.

Thompson, K. J.; Shoham, S.; Connor, J. R. Iron and neurodegenerative disorders. Van Remen, H.; Hamilton, L.M.; Richardson, A. Oxidative damage to DNA and Aging. *Exerc. Sports Sci. Rev.* v.31, p.149-153, 2003.

Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenilamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthineoxidase, *Anal Biochem*, 1997;251: 206-209.

Vivar, C., Potter, M. C., Choi, J., Lee, J. Y., Stringer, T. P., Callaway, E. M., & Van Praag, H. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature communications*, 2012;3, 1107.

Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976. World Health Organization. Reproductive Health. Medical eligibility criteria for contraceptive use. World Health Organization, 2010.

Yamada, Kiyofumi, Makoto Mizuno, and Toshitaka Nabeshima. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life sciences* 70.7 (2002): 735-744. Zeigelboim, Bianca Simone, et al. "Alterações vestibulares em doenças degenerativas."

Zigmond, M. J., Cameron, J. L., Leak, R. K., Mirnics, K., Russell, V. a, Smeyne, R. J., & Smith, A. D. Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. *Parkinsonism & related disorders*, 15 Suppl 32009, S42-5.

9. ANEXO



EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

CARTA DE ACEITE

Declaro que o projeto "**Efeito do exercício físico combinado com polpa de açaí sobre eventos comportamentais e moleculares em ratos**", de autoria do **Pesquisador Emerson da Silva Pereira**, orientado pela **Professora Doutora Michele Schultz**, foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação da EACH/USP, e, tendo sido **APROVADO** em sua 30ª Reunião, realizada em 24OUT2016, recebeu o **Protocolo 002/2016**.

São Paulo, 24 de outubro de 2016

Prof.ª Dr.ª Fabiana de Sant'Anna Evangelista
Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação
EACH/USP