

**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 <sup>2+</sup>	-ferro
FeS	-sulfeto de ferro
GAP43	-proteína associada ao crescimento 43
GDNF	-fator de crescimento derivado da glia
GFAP	-proteína ácida fibrilar glial
GPx	-glutathione peroxidase
GR	-glutathione reductase
GSH	-glutathione reduzida
GSSG	-glutathione oxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-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 <sub>2</sub>	-dióxido de nitrogênio
SN	-sistema nervoso



SNC	-sistema nervoso central
NT	-neurotrofinas
O <sub>2</sub> -	-oxigênio molecular
OD	-o-dianisidina
OH <sup>-</sup>	-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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Exercício físico e neuroplasticidade</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Exercício Físico, Estresse Oxidativo e Radicais Livres</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3. Mecanismos antioxidantes no SNC</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4. Açaí</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5. Memória e comportamento relacionado a ansiedade</b> .....	<b>25</b>
1.5.1. Memória.....	25
1.5.2. Ansiedade.....	26
<b>1.6. Exercício físico, açaí, memória e ansiedade</b> .....	<b>28</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Desenho experimental</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2. Grupos experimentais</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3. Administração do açaí</b> .....	<b>33</b>
3.3.1. Composição nutricional da polpa liofilizada de açaí utilizada no estudo .....	33
<b>3.4. Protocolo de exercício físico</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5. Aparelho onde ocorreu o programa de atividade física</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6. Programa de atividades</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7. Testes comportamentais</b> .....	<b>36</b>
3.7.1. Teste campo aberto (CA).....	36
3.7.2. Teste de reconhecimento de objetos (RO).....	37
<b>3.8. Eutanásia dos animais e retirada dos tecidos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.9. Avaliação proteica</b> .....	<b>40</b>
<b>3.10. Anticorpos utilizados para a avaliação das proteínas</b> .....	<b>42</b>
<b>3.11. Avaliação da atividade das enzimas antioxidante nos tecidos hipocampo e amígdala</b> .....	<b>42</b>
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. ganho de peso corporal .....	47
4.2. Efeito do açaí sobre o comportamento relacionado à ansiedade .....	48
4.3. Efeito da atividade física e/ou açaí na a exploração dos animais no teste de .....	50
campo aberto (CA).....	50
4.4. Efeito da atividade física e/ou açaí sobre a memória de curto prazo.....	51
4.5. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no hipocampo.....	52
4.6. Avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx na amígdala .....	53
4.7. Efeitos do exercício física e/ou açaí sobre proteínas relacionadas à .....	54
neuroplasticidade.....	54
4.7.1. Expressão proteica de BDNF no hipocampo.....	54
4.7.2. Expressão proteica de BDNF na amígdala .....	55
4.8. Expressão proteica de GDNF, GAP-43 e GFAP no hipocampo .....	56
4.9. Expressão proteica de GDNF, GAP 43 e GFAP na amígdala .....	57
5. DISCUSSÃO .....	58
6. CONCLUSÃO.....	69
7. PERSPECTIVAS .....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXO.....	88