

**DANIELLE DUTRA PEREIRA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 E  
MELATONINA ASSOCIADOS A EXERCÍCIO FÍSICO  
MODERADO SOBRE PESO CORPORAL, PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS, MEMÓRIA, ATIVIDADE ELÉTRICA  
CORTICAL E MORFOMETRIA DO HIPOCAMPO EM  
RATOS WISTAR**

**RECIFE - PE  
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

DANIELLE DUTRA PEREIRA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 E MELATONINA  
ASSOCIADOS A EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO SOBRE PESO  
CORPORAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, MEMÓRIA, ATIVIDADE  
ELÉTRICA CORTICAL E MORFOMETRIA DO HIPOCAMPO EM RATOS  
WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em BIOCiência Animal da  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco como requisito final para  
obtenção do título de Doutor em  
BIOCiência Animal.

Área de concentração: Morfofisiologia Animal

Orientador: Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadora: Dra. Jeine Emanuele Santos da Silva

Recife - PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

P434e Pereira, Danielle Dutra.  
Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina  
associados  
a exercício físico moderado sobre peso corporal, parâmetros  
bioquímicos, memória, atividade elétrica cortical e morfometria  
do  
hipocampo em ratos Wistar / Danielle Dutra Pereira . – 2017.  
114 f. : il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto.  
Coorientador: Jeine Emanuele Santos da Silva.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência  
Animal,  
Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências.

1. Exercício físico 2. Hipocampo 3. Melatonina 4. Memória  
5. Ômega-3 I. Evêncio Neto, Joaquim, orient. II. Silva, Jeine  
Emanuele Santos da, coorient. III. Título

CDD

636.089

# DANIELLE DUTRA PEREIRA

Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado sobre peso corporal, parâmetros bioquímicos, memória, atividade elétrica cortical e morfometria do hipocampo em ratos Wistar

Tese defendida em 21 de fevereiro de 2017.

## **Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

Presidente

---

Prof. Dr. Vitor Caiaffo Brito

Centro Acadêmico do Agreste - UFPE

---

Profa. Dra. Belisa Duarte Ribeiro de Oliveira

Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES/UNITA

---

Profa. Dra. Jeine Emanuele Santos da Silva

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

---

Dra. Mariana Gomes do Rego

Programa Nacional de Pós Doutorado - UFRPE

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o centro da minha vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando, guiando às escolhas certas e me sustentando em Suas mãos para que eu não tropece em meio as adversidades e provações.

A meus pais, Joaz Urbano Pereira e Rute Dutra de Arruda, que proporcionaram minha educação. Em especial a minha mãe pelo amor incondicional, pelo exemplo de dedicação e perseverança, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Por muitas vezes ter deixado de lado seus sonhos para acreditar nos meus. Você é responsável por essa conquista e eu a amo muito.

A minha irmã Gabriela Dutra Pereira, meu cunhado Wellington Oliveira e meus sobrinhos Gabriel Dutra e Beatriz Dutra, que mesmo distante se fizeram presente em todos os momentos. A lembrança afetuosa e o abraço amoroso a cada reencontro fizeram com que eu chegasse até aqui.

A todos os meus familiares, em especial Humberto Lourenço, Terezinha Dutra, Roneide Dutra, Rosicleide Dutra, Rogger Marinho, Lucicleide Dutra, Kelly Marinho e Stephany Marinho, pelo respeito e carinho.

Ao Professor Dr. Joaquim Evêncio Neto, pela orientação e oportunidades de aprendizado a que me proporcionou, indo muito além da ciência.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Jeine Emanuele Santos da Silva, que além de ter contribuído com a sua preciosa orientação é minha amiga e irmã. Obrigada por sua colaboração preciosa desde a concepção deste trabalho, pela paciência e disposição em partilhar seus conhecimentos, esclarecendo muitas das minhas dúvidas e pelos incansáveis momentos dedicados a minha pesquisa.

Aos Professores Dr. Antônio Pedro Soares e Dr. George Chaves Jimenez, pelos primeiros incentivos a pesquisa, pela ajuda e pelos conselhos indispensáveis. Também pela amizade, pela dedicação e paciência dispensadas à minha pessoa.

Ao Professor Dr. Romildo Albuquerque Nogueira, professor por quem nutro grande admiração, pelos ensinamentos e pela orientação dedicada durante a época da graduação.

A Leandro Aguiar, Maria Edna, Laíse Souza, Wanessa Noadya, Mariana Rego e Jéssica Lima, por todos os momentos vivenciados, os quais, com toda certeza jamais serão esquecidos. O conhecimento e a ciência só têm sentido se compartilhado. Que bom que nós já aprendemos essa lição. Obrigada!

Aos amigos, Wedja Stephany e Gilberto Fialho, pela colaboração na parte experimental, que posso dizer ter sido a mais desafiadora etapa deste projeto. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, que dividiram os seus saberes, colaborando para a minha formação acadêmica e profissional. Aos amigos da pós-graduação pela amizade e por ajudar a tornar a vida acadêmica muito mais divertida.

A todos os Professores, Técnicos, Funcionários e amigos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos durante o curso.

## Resumo

No presente trabalho, buscou-se verificar os efeitos da suplementação de ratos Wistar com ômega-3 e melatonina, associados a prática de exercício físico sobre peso corporal, parâmetros bioquímicos, memória, atividade elétrica cortical e morfometria do hipocampo em ratos Wistar. Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*), as quais foram divididas em oito grupos experimentais (n= 5 animais/ grupo) de acordo com o tratamento: A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Os protocolos foram iniciados a partir dos 60 dias de idade e prosseguiu até o desmame da prole (165 dias de idade). A prole (n= 15 machos/ grupo) foi submetida ao mesmo protocolo das respectivas matrizes desde o desmame até os 70 dias de idade. A massa corporal aos 30 dias pós-natal (M30) dos animais do grupo B (42,47 g ± 1,23) apresentou-se menor do que a massa corporal dos grupos A (72,71 g ± 3,06), C (71,14 g ± 2,52), D (66,69 g ± 1,88), E (53,91 g ± 0,87), F (67,18 g ± 3,02), G (62,00 g ± 5,02) e H (58,18 g ± 2,62). Aos 60 dias pós-natal (M60) os grupos A (198,4 g ± 4,15), B (213,3 g ± 3,63) e C (208,8 g ± 6,11) apresentaram peso corporal maior do que os grupos F (161,5 g ± 6,37) e H (151,8 g ± 4,80), o grupo G (172,4 g ± 6,42) apresentou média menor em relação ao grupo B. Quanto à bioquímica sérica, a avaliação realizada aos 30 dias de idade da prole mostrou que o VLDL (79,08 mg/dL ± 12,89) e o triglicerídeo (395,4 mg/dL ± 64,43) do grupo F foi superior aos valores de VLDL (30,44 mg/dL ± 3,34) e triglicerídeo (152,2 mg/dL ± 16,9) do grupo B. Aos 60 dias os níveis de HDL do grupo F (77,13 g ± 13,32) foram superiores quando comparado ao grupo D (25,98 g ± 2,51). Para o VLDL e Triglicerídeo, o grupo F apresentou valor médio de VLDL de 56,00 mg/dL ± 4,40 e de Triglicerídeo de 280,00 mg/dL ± 22,00, enquanto que E apresentou média de 31,49 mg/dL ± 4,74 para VLDL e 157,4 mg/dL ± 23,68 para triglicerídeo, e D apresentou VLDL de 27,12 mg/dL ± 1,78 e triglicerídeo de 135,6 mg/dL ± 8,90. Em relação à glicemia, os grupos A (39,20 mg/dL ± 14,39), C (39,40 mg/dL ± 9,14) e F (20,60 mg/dL ± 4,57) mostraram-se diferentes quando comparados ao grupo H (155,6 mg/dL ± 16,80), e o grupo D (248,2 mg/dL ±

24,48) diferiu dos grupos A, B (95,60 mg/dL  $\pm$  14,39), C, E (131,4 mg/dL  $\pm$  28,95), F e G (40,75 mg/dL  $\pm$  9,30). Houve ainda diferença significativa entre o grupo E e o grupo F. Em relação à morfometria do hipocampo em M30, apenas o grupo D (24,24%  $\pm$  1,31) diferiu dos grupos A (19,68%  $\pm$  1,03) e G (19,00%  $\pm$  0,45), apresentando uma maior densidade neuronal. Em M60 o grupo B (22,63%  $\pm$  0,34) apresentou número de neurônios superior aos grupos A (19,68%  $\pm$  1,03), C (15,61%  $\pm$  0,58), E (20,50%  $\pm$  0,43), F (19,91%  $\pm$  0,42) e H (16,97%  $\pm$  0,40). Já no grupo C houve redução neuronal em relação aos grupos A, D (23,22%  $\pm$  0,46), E, F e G (21,14%  $\pm$  0,35). Quando observado o grupo D, este apresentou maior número de neurônios do que os grupos A, E, F e H. Por fim, os grupos A, E, F e G apresentaram maior densidade neuronal quando comparados ao grupo H. Para o teste de reconhecimento não houve diferença entre os tratamentos avaliados aos 30 e 60 dias de idade. O comportamento do espectro de potência evidenciou alteração da contribuição do ritmo beta entre todos os grupos experimentais, analisados pela Transformada de Fourier (TF), com valores de potência média de A= 0,52  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,09, B= 0,73  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,06, C= 1,30  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,03, D= 1,09  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,07, E= 0,77  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,05, F= 0,93  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,07, G= 1,12  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,06 e H= 0,75  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,09. Os animais do grupo A apresentaram menor média para a complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), mostrando maior auto-similaridade da atividade elétrica cortical. A análise de flutuação sem tendência (DFA) indicou modificação dessa atividade, com menor valor do expoente  $\alpha$  observado no grupo G. A suplementação com ômega-3 e melatonina, e a submissão a exercício físico moderado modificou o desenvolvimento corporal, perfil lipídico e morfometria do hipocampo. A atividade elétrica cortical mostrou variação na onda  $\beta$ , relacionada a processos cognitivos. Os métodos de análise de dinâmica linear e não linear utilizados - o espectro de potência, a complexidade de Lempel-Ziv e a análise de flutuação destendenciada (DFA) -, foram sensíveis para detectar alterações no comportamento dos padrões eletrocorticográficos dos animais dos grupos experimentais.

**Palavras-chave:** exercício físico, hipocampo, melatonina, memória, ômega-

## Abstract

In the present work, we sought to verify the effects of supplementation of Wistar rats with omega-3 and melatonin, associated with physical exercise on body weight, biochemical parameters, memory, cortical electrical activity and Hippocampal morphometry in Wistar rats. Rats (*Rattus norvegicus*) were used, which were divided into eight experimental groups (n= 5 animals/ group) according to the treatment: A - omega-3; B - melatonin; C - physical exercise; D - omega-3 and melatonin; E - omega-3 and exercise; F - melatonin and exercise; G-omega-3, melatonin and exercise; H - control. The protocols were started from 60 days of age and continued until weaning from offspring (165 days of age). The offspring (n= 15 males/ group) were submitted to the same protocol from the respective matrices from weaning to 70 days of age. The body mass in M30 of the animals of group B (42,47 g  $\pm$  1,23) was lower than the body mass of groups A (72,71 g  $\pm$  3,06), C (71,14 g  $\pm$  2,52), D (66,69 g  $\pm$  1,88), E (53,91 g  $\pm$  0,87), F (67,18 g  $\pm$  3,02), G (62,00 g  $\pm$  5,02) and H (58,18 g  $\pm$  2,62). At 60 days postnatal (M60) groups A (198,4 g  $\pm$  4,15), B (213,3 g  $\pm$  3,63) and C (208,8 g  $\pm$  6,11) presented higher body weight than the F (161,5 g  $\pm$  6,37) and H (151,8 g  $\pm$  4,80) groups, the G group (172,4 g  $\pm$  6,42) had lower mean values than the B group. As for serum biochemistry, the evaluation performed at 30 days of Age of offspring showed that VLDL (79,08 mg/dL  $\pm$  12,89) and triglyceride (395,4 mg/dL  $\pm$  64,43) in group F were higher than VLDL (30,44 mg/dL  $\pm$  3,34) and triglyceride (152,2 mg/dL  $\pm$  16,9) in group B. At 60 days the HDL levels of group F (77,13 mg/dL  $\pm$  13,32) were higher when compared to group D (25,98 mg/dL  $\pm$  2,51). For VLDL and Triglyceride, group F presented a mean VLDL value of 56,00 mg/dL  $\pm$  4,40 and Triglyceride of 280,00 mg/dL  $\pm$  22,00, while E presented a mean of 31,49 mg/dL  $\pm$  4,74 for VLDL and 157,4 mg/dL  $\pm$  23,68 for triglyceride, and D presented 27,12 mg/dL  $\pm$  1,78 for VLDL and of 135,6 mg/dL  $\pm$  8,90 for Triglyceride level. About in relation to glycemia, groups A (39,20 mg/dL  $\pm$  14,39), C (39,40 mg/dL  $\pm$  9,14) and F (20,60 mg/dL  $\pm$  4,57) showed different when compared to the H group (155,6 mg/dL  $\pm$  16,80), and D group (248,2 mg/dL  $\pm$  24,48) differed from the A, B (95,60 mg/dL  $\pm$  14,39), C, E (131,4 mg/dL  $\pm$  28,95), F and G (40,75 mg/dL  $\pm$  9,30). There was also a significant difference between group E and F. Regarding hippocampal morphometry in M30, only group D

(24,24%  $\pm$  1,31) differed from groups A (19,68%  $\pm$  1,03) and G (19,00%  $\pm$  0,45), presenting a higher neuronal density. In M60, group B (22,63%  $\pm$  0,34) presented a higher number of neurons than groups A (19,68%  $\pm$  1,03), C (15,61%  $\pm$  0,58), E (20,50%  $\pm$  0,43), F (19,91%  $\pm$  0,42) and H (16,97%  $\pm$  0,40). Already in group C neuronal reduction in relation to groups A, D (23,22%  $\pm$  0,46), E, F and G (21,14%  $\pm$  0,35). When group D was observed, Greater number of neurons than groups A, E, F and H. Finally, groups A, E, F and G showed higher neuronal density when compared to group H. For the recognition test there was no difference between the evaluated treatments at 30 and 60 days of age. The behavior of the power spectrum evidenced a change in the contribution of the beta rhythm among all the experimental groups, analyzed by the Fourier Transform (TF), with average power values of A= 0,52  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,09, B= 0,73  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,06, C= 1,30  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,03, D= 1,09  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,07, E= 0,77  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,05, F= 0,93  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,07, G= 1,12  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,06 and H= 0,75  $\mu\text{v}^2/\text{Hz}$   $\pm$  0,09. The animals of the A group presented a lower average for the complexity of Lempel-Ziv (CLZ), showing greater self-similarity of the cortical electric activity. The detrended fluctuation analysis (DFA) indicated a modification of this activity, with a lower  $\alpha$  exponent value observed in the G group. Supplementation with omega-3 and melatonin, and submission to moderate physical exercise modified body development, lipid profile and morphometry of the hippocampus. The cortical electric activity showed variation in the  $\beta$  wave, related to cognitive processes. The linear and nonlinear dynamics analysis methods used - the power spectrum, the complexity of Lempel-Ziv and the discontinuous flotation analysis (DFA) -, were sensitive to detect changes in the behavior of the electrocorticographic patterns of the animals of the experimental groups.

**Keywords:** exercise, hippocampus, melatonin, memory, omega-3

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1 O Sistema Nervoso .....	21
2.2 O cérebro: memória e desenvolvimento.....	23
2.3 Composição lipídica do cérebro .....	27
2.4 Ação dos ácidos graxos poliinsaturados (DHA e EPA) sobre o tecido nervoso .....	31
2.5 O papel dos AGPI e da melatonina no estresse oxidativo no tecido nervoso .....	34
2.6 A ação do exercício físico sobre o tecido nervoso .....	36
2.7 Atividade elétrica cerebral e sistemas caóticos .....	39
2.8 Métodos de análise linear e não-linear .....	42
2.8.1 Transformada de Fourier .....	42
2.8.2 Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) .....	43
2.8.3 Análise de Flutuação Destendenciada (DFA) .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 Objetivo geral .....	47
3.2 Objetivos específicos .....	47
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>48</b>
4.1 Local e instalações.....	48
4.2 Animais .....	48
4.3 Delineamento experimental.....	48
4.4 Suplementação com óleo de peixe .....	51
4.5 Administração da melatonina .....	51
4.6 Treinamento físico.....	51
4.7 Avaliação do ganho de peso .....	52
4.8 Provas laboratoriais .....	52
4.9 Teste de reconhecimento espontâneo de objetos.....	52
4.10 Implante de eletrodos e registro da atividade elétrica cortical.....	54
4.11 Eutanásia .....	55
4.12 Análise dos registros de ECoG .....	55
4.13 Análise morfométrica .....	55

4.14 Análise estatística .....	57
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico sobre parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória em ratos Wistar .....	1
<b>7. CAPÍTULO II.....</b>	<b>1</b>
Modulação da atividade elétrica cortical promovida pela suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico .....	1

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	.....	Ácido aracdônico
AG	.....	Ácidos graxos
AGE	.....	Ácidos graxos essenciais
AGPI	.....	Ácidos graxos poliinsaturados
AGPI-CL	.....	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
AL	.....	Ácido linoleico
ALA	.....	Ácido $\alpha$ -linolênico
ANOVA	.....	Análise de variância
BDNF	.....	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	.....	Corno de Amon
CLZ	.....	Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)
CTN	.....	Células tronco neurais
DFA	.....	Análise de Flutuação Destendenciada
DHA	.....	Ácido docosahexaenóico
EcoG	.....	Eletrocorticograma
EEG	.....	Eletroencefalograma
EO	.....	Estresse oxidativo
EPA	.....	Ácido eicosapentaenoico
ERO	.....	Espécies reativas de oxigênio
ERN	.....	Espécies reativas de nitrogênio
GD	.....	Giro denteado
GLUT	.....	Transportador de glicose
HDL	.....	Lipoproteínas de alta densidade
LDL	.....	Lipoproteína de baixa densidade
M30	.....	Trinta dias pós-natal

M60	.....	Sessenta dias pós-natal;
M70	.....	Setenta dias pós-natal.
NaCl	.....	Cloreto de sódio
NO	.....	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	.....	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	.....	radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	.....	Peroxinitrito
PE	.....	Fosfatidiletanolamina
SAR	.....	Sistema de Ativação Reticular
SN	.....	Sistema nervoso
SNC	.....	Sistema nervoso central
SNP	.....	Sistema nervoso periférico
TF	.....	Transformada de Fourier
TG	.....	Triglicerídeos totais
VLDL	.....	Lipoproteínas de muito baixa densidade
ω-3	.....	Ômega-3
ω-6	.....	Ômega-6
ZSV	.....	Zona subventricular
ZSG	.....	Zona subgranular

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sulcos e lobos do córtex cerebral humano. Adaptado de SCIENCE PHOTO LIBRARY ..... 22
- Figura 2. Circuito trissináptico do hipocampo, em cores diferenciadas as laminações do Corno de Amon, Giro denteado e vias componentes (Via Perfurante em cor cinza, Fibras Musgosas em azul e Colaterais de Schaffer em vermelho. Fonte: [http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus\\_schema\\_mittel.jpg](http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus_schema_mittel.jpg) ..... 25
- Figura 3. Representação esquemática dos tipos de memória declarativa: episódica e semântica. Adaptado de SHARMA; RAKOKZI; BROWN-BORG, 2010 ..... 26
- Figura 4. Estruturas dos ácidos alfa linolênico (a) e linoléico (b). A Cadeia ômega ( $\omega$ ) também é designada de n. A cadeia dos ácidos graxos também é enumerada a partir da carboxila, de acordo com a designação  $\Delta$  (delta), que é mais aplicada ao estudar as reações químicas que envolvem esses ácidos. Fonte: Arquivo pessoal ..... 29
- Figura 5. Metabolismo dos ácidos graxos das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6. Adaptado de INNIS, 2003 ..... 30
- Figura 6. Estrutura dos AGPI-CL. Adaptado de MORENO et al., 2012 ..... 30
- Figura 7. Estrutura da melatonina com destaque vermelho para grupamentos metoxi e amina (anfifilicidade) e em azul para os carbonos 2 e 3 do anel do pirrólico (antioxidante). MATOS, 2014 ..... 35
- Figura 8. Ondas cerebrais em ratos.  $\delta$  - ondas delta (1-4 Hz) - em sono profundo.  $\theta$  - ondas teta (4-8 Hz) - em sonolência ou estados emocionais alterados.  $\alpha$  - ondas alfa (8-12 Hz) - em vigília com relaxamento mental.  $\beta$  - ondas beta (12-30 Hz) - em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição. AGUIAR, 2015 ..... 40
- Figura 9. Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal; M80 – oitenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole ..... 51
- Figura 10. Teste de reconhecimento espontâneo de objetos. B - Objetos idênticos (A1 e A2). C - Objetos diferentes (A3 e B) ..... 53
- Figura 11. Preparo do animal para registro do ECoG. Fixação da cabeça do animal à base do estereotáxico, incisão da pele e implante dos eletrodos ..... 54
- Figura 12. Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD. B – Região

CA1. Os boxes em preto representam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade celular. C – Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais. Cresil violeta: 400X..... 56

## CAPÍTULO I

Figura 1. Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD. B – Região CA1. Os boxes em preto representam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade celular. C – Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais. Cresil violeta: 400X..... 16

Figura 2. Valores de peso corporal (média ± desvio padrão) dos animais avaliados aos trinta (M30) e aos sessenta (M60) dias de idade. A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 17

Figura 3. Perfil bioquímico sérico dos animais avaliados aos 30 dias de idade (M30). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Mediana ± intervalo interquartilico. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 17

Figura 4. Perfil bioquímico sérico dos animais avaliados aos 60 dias de idade (M60). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Mediana ± intervalo interquartilico. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )..... 18

Figura 5. Fotomicrografias do hipocampo de rato aos 30 dias de idade (M30). Neurônios piramidais da região CA1 (setas). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Cresil violeta: 400X..... 19

Figura 6. Fotomicrografias do hipocampo de rato aos 60 dias de idade (M60). Neurônios piramidais da região CA1 (setas). Neurônios piramidais da região CA1 (setas). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Cresil violeta: 400X..... 20

Figura 7. Teste de reconhecimento espontâneo de objetos nos momentos M30 e M60. A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle (p > 0,05) ..... 21

## CAPÍTULO II

Figura 1. Espectro de potência para um animal de cada grupo experimental. A energia de cada onda é calculada pela integral da área do intervalo de frequência correspondente das ondas: delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 16 Hz) e beta (16 – 20 Hz). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle..... 9

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional e níveis de garantia da ração Presence® ratos e camundongos.....	48
---	----

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Média da densidade de área (%) de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos avaliados aos trinta e sessenta dias de idade (M30 e M60, respectivamente).....	15
--	----

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Valores de potência média ( $\mu\text{V}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ ) das distintas ondas cerebrais.	10
---	----

Tabela 2. Valores obtidos para a Complexidade de Lempel-Ziv (média $\pm$ desvio padrão) e análise de flutuação sem tendência (média $\pm$ desvio padrão) dos registros do ECoG.....	12
---	----

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do cérebro é um processo que se inicia na fase embrionária, com a diferenciação das células progenitoras neurais, e prossegue após o nascimento. Os processos que contribuem para esse desenvolvimento vão desde eventos moleculares de expressão gênica até fatores ambientais. Esses diferentes níveis e tipos de processo interagem para dar suporte a uma série de eventos que determinam o desenvolvimento cerebral (STILES; JERNIGAN, 2010).

Os lipídios fornecidos na alimentação são determinantes para o crescimento e desenvolvimento neural, tornando-se o principal componente estrutural do cérebro, indispensável para a síntese das membranas celulares e para uma série de processos biológicos (UAUY; CASTILLO, 2003). Dessa forma, quantidades elevadas de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3, em especial o ácido docosahexaenóico (DHA) e o eicosapentaenóico (EPA), são essenciais para a sinaptogênese e a maturação dos nervos, apresentando importante papel no metabolismo e desempenho cognitivo (CHALON et al., 2001; VAN ELST et al., 2014).

Em contrapartida, as altas concentrações de AGPI das membranas neuronais torna o tecido cerebral muito vulnerável aos danos causados por radicais livres (DROGE, 2003). A melatonina, por meio de sua ação antioxidante, tem sido apontada como um importante agente neuroprotetor, com participação crucial na neurogênese (TAN et al., 2015; CHU et al., 2016), intervindo no metabolismo lipídico (SANCHEZ-HIDALGO; LU; TAN, 2007) e reduzindo os radicais livres (REITER; MANCHESTER; TAN, 2010). Além disso, a melatonina exerce ainda ação sobre as células-tronco neurais (CTN), aumentando a viabilidade, sobrevivência, proliferação e diferenciação destas (SOTTHIBUNDHU; PHANSUWAN-PUJITO; GOVITRAPONG, 2010).

O sistema nervoso de mamíferos parece estar sujeito também aos benefícios acarretados pelo exercício físico, o qual diminui a expressão de genes associados ao estresse oxidativo e aumenta a expressão de genes associados a plasticidade sináptica, à função mitocondrial e ao desenvolvimento dos espinhos dendríticos, evocando aprendizado e memória (STRANAHAN et al., 2008). Assim, a prática regular de exercício promove a neurogênese e melhora a atividade cerebral e a função cognitiva, exercendo efeito inclusive sobre a prole de animais treinados (LEE et al., 2006; FABEL; KEMPERMANN, 2008; CHANG et al., 2012).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação dos efeitos do ômega-3 e da melatonina associados ao exercício físico de intensidade moderada sobre parâmetros bioquímicos, memória, atividade elétrica cortical e morfometria do hipocampo em ratos wistar.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso (SN) é constituído pelo Sistema Nervoso Central (SNC), o qual é dividido em medula espinal e encéfalo e Sistema Nervoso Periférico (SNP), formado por nervos e gânglios. O encéfalo é o centro de controle de muitas funções corporais e apresenta-se subdividido em cérebro (telencéfalo e diencefalo), cerebelo e tronco encefálico - mesencéfalo, ponte e bulbo (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003). Os estímulos ambientais são recebidos pelos receptores sensoriais do SNP e direcionada para o SNC, onde é processada e resulta em respostas (HAINES, 2006).

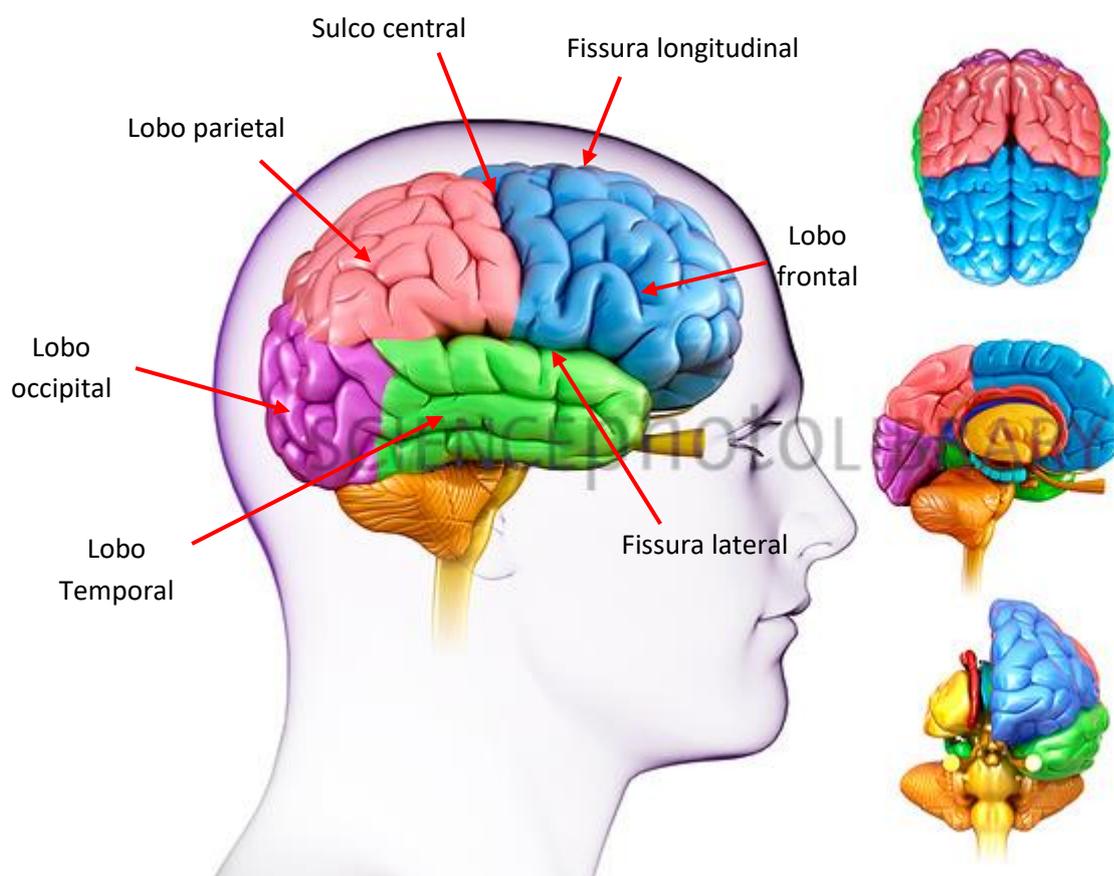
O cérebro encontra-se anatomicamente situado no interior da caixa craniana (LENT, 2004) e trata-se da maior estrutura do encéfalo, constituindo cerca de 80% da sua massa total (ABRAHAMS, 2003). Segundo Gartner e Hiatt (2007), é reconhecidamente a estrutura mais complexa do ser humano, formado por subsistemas especializados em tarefas específicas, sendo responsável pelo controle de funções orgânicas importantes, como armazenamento de memórias, concepção de pensamentos e geração de emoções.

A fissura longitudinal secciona incompletamente o cérebro em dois hemisférios (o esquerdo e o direito) interligados por uma larga faixa de fibras comissurais, denominadas corpo caloso, principal meio de união entre os hemisférios, comissura do fórnix e comissura anterior. Os hemisférios apresentam superfície enrugada, repleta de giros e sulcos, e são constituídos de uma fina camada externa de substância cinzenta, cuja espessura corresponde a aproximadamente 6 mm – o córtex cerebral, composto de corpos celulares de neurônios e responsável por funções neurais e psíquicas mais complexas (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2015).

O cérebro pode ser dividido ainda em cinco partes funcionalmente distintas, conhecidas como lobos cerebrais: lobo frontal, temporal, parietal, occipital e lobo da ínsula, que é o único que não se relaciona com nenhum osso do crânio por estar situado profundamente no sulco lateral (Fig. 1). Nas partes mais interiores do cérebro estão abrigados os núcleos basais, que trabalham simultaneamente ao córtex em algumas funções neurais (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

O tecido nervoso partilha de dois tipos celulares: os neurônios e as células da neuroglia. As células gliais são as mais abundantes (cerca de 10 a 50 vezes mais) e

apresentam a função de suporte estrutural aos neurônios, mantendo um microambiente apropriado, essencial para a função neuronal (HAINES, 2006). Estas células participam na formação da barreira hematoencefálica, fagocitam substâncias estranhas, produzem líquido cefalorraquidiano (LCR), e formam bainhas de mielina em torno dos axônios (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003). Também são essenciais no início do desenvolvimento do SNC, guiando os neurônios em desenvolvimento para as suas localizações corretas (HAINES, 2006).



**Figura 1.** Sulcos e lobos do córtex cerebral humano (Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY).

Os neurônios são as unidades estruturais fundamentais do sistema nervoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Possuem a capacidade de gerar e transmitir sinais elétricos a um nível elementar, comparado a bits de informação, os quais conseguem codificar sentimentos e pensamentos. Entretanto, por si só não podem realizar as complexas funções cerebrais, atuando em conjuntos específicos, denominados circuitos ou redes neurais (LENT, 2004).

O cérebro é sensível a inúmeros fatores que resultam em danos às redes neurais. De forma similar a outros tecidos, ele possui a capacidade de auto-reparação, ou mesmo uma compensação pela perda de neurônios e interrupções na arquitetura neural. Quando ocorre um desequilíbrio entre lesão neuronal e reparação, essa capacidade de plasticidade neuronal é prejudicada (BALL; BIRGE, 2002).

Os componentes básicos dos neurônios são semelhantes aos encontrados em qualquer outra célula do organismo - membrana plasmática, citoplasma, organelas e núcleo (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003; HAINES, 2006). Morfologicamente, são constituídos de um corpo celular, onde ocorre as reações metabólicas da célula; inúmeros dendritos ramificados; e um axônio composto de uma variedade de terminações axônicas (TORTORA; DERRICKSON, 2016). A ramificação dos neurônios é um atributo indispensável para a comunicação entre células, responsável pela recepção de sinais oriundos de outros neurônios através de contatos, denominados sinapses (HAINES, 2006).

O axônio, também conhecido como fibra nervosa, é responsável por conduzir o sinal de um neurônio a outro (TORTORA; DERRICKSON, 2016), apresentando na maioria das vezes, em seu prolongamento, a bainha de mielina, um recobrimento descontínuo, formado pelos oligodendrócitos, a qual age como isolante elétrico, aumentando a velocidade do impulso nervoso. A interface entre a bainha de mielina é o nó neurofibroso (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003; HAINES, 2006).

## **2.20 cérebro: memória e desenvolvimento**

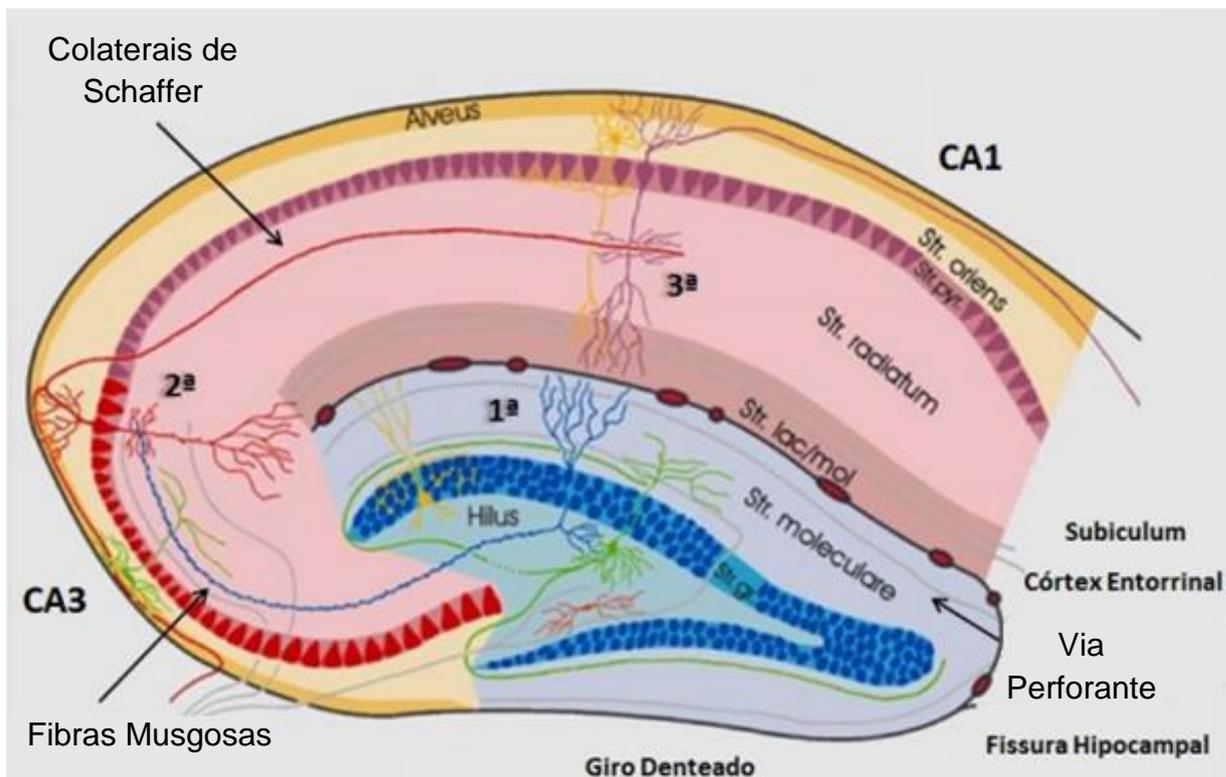
O potencial genético do desenvolvimento cerebral é determinado durante a embriogênese e início da vida pós-natal, momento no qual vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos figuram e interagem para a formação do encéfalo. Esse período é definido como a fase acompanhada dos processos de neurodesenvolvimento mais importantes: mielinização, organização de sistemas neurotransmissores, arborização dendrítica e gênese sináptica, observadas com maior intensidade no sistema visual e no hipocampo, locais com maior deposição de DHA (FERNANDES, 2007).

O hipocampo é uma das estruturas mais estudadas do SNC, a qual desempenha importante papel em diversas funções cerebrais, tais como aprendizagem, memória, análise do conhecimento, cognição e comunicação (COSAR

et al., 2008). Está bem estabelecido que a neurogênese nessa estrutura ocorre durante o desenvolvimento embrionário e persiste ao longo da vida adulta (DECIMO et al., 2012) na zona subgranular (ZSG) do giro denteado. A neurogênese na vida adulta também ocorre na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais (EHNINGER; KEMPERMANN, 2008). Alterações neste processo podem afetar o aprendizado e a memória dependentes do hipocampo (SIM et al., 2004).

O hipocampo compreende uma estrutura subcortical bilateral do lobo temporal, formado por duas regiões principais, o giro denteado (GD) e o Corno de Amon (CA), sendo este último anatômico e funcionalmente diferenciado em subcampos distintos denominados em CA1, CA2, CA3 e CA4 (CHERUBINI; MILES, 2015). As regiões hipocâmpais, embora anatomicamente separadas, estão interconectadas e apresentam populações distintas de neurônios, que expressam um perfil molecular único e podem explicar as diferenças na susceptibilidade aos mecanismos de disfunção da memória (SHERWOOD et al., 2011).

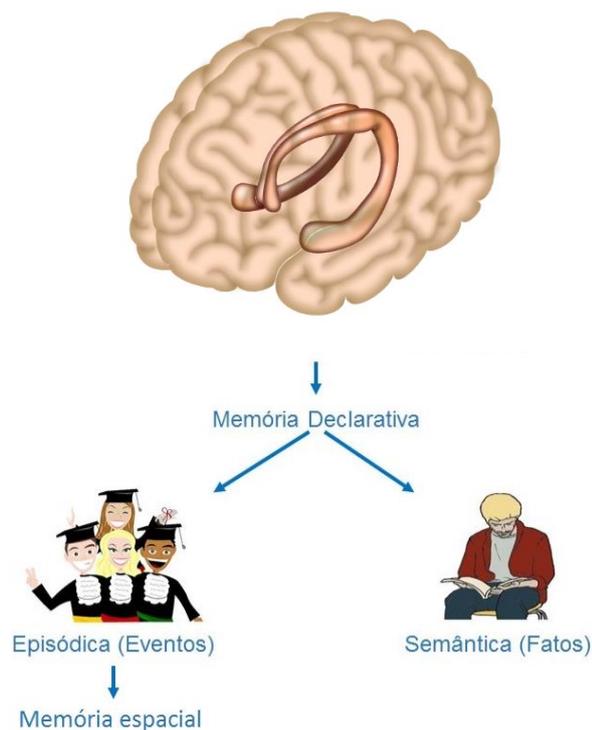
O CA juntamente ao GD, ao complexo subicular e ao córtex entorrinal constituem a formação hipocâmpal – um componente do sistema límbico - estabelecendo com essas estruturas, conexões dentre as quais se destaca o circuito trissináptico: os axônios oriundos de outras regiões corticais fazem sinapse com o córtex entorrinal, do qual partem aferências para o hipocampo, via feixes de axônios mediais e laterais (chamados via perforante), em direção às células granulares do giro denteado, cujos axônios estão situados na camada molecular. Do giro denteado projetam-se axônios de neurônios (denominados fibras musgosas) que se comunicam com neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo e por fim, projetam-se de CA3, neurônios glutamatérgicos (chamados de colaterais de Schaffer) que fazem conexões com neurônios da área CA1 do hipocampo (LANGSTON et al., 2010; AGGLETON; BROWN; ALBASSER, 2012) (Fig.2).



**Figura 2.** Circuito trissináptico do hipocampo, em cores diferenciadas as laminações do Corno de Amon, Giro Denteado e vias componentes (via perforante em cor cinza, fibras musgosas em azul e Colaterais de Schaffer em vermelho (Fonte: [http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus\\_schema\\_mittel.jpg](http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus_schema_mittel.jpg))

Funcionalmente, o hipocampo é a principal estrutura relacionada à formação da memória declarativa (SHARMA; RAKOCZY; BROWN, 2010). A memória se constitui da aquisição, consolidação e evocação de informações (ABEL; LATTAL, 2001) e é dividida, segundo sua natureza, em memória declarativa ou explícita, que pode ser declarada e relatada; operacional, que permite raciocínio rápido e planejamento de comportamento; e implícita ou não declarativa, que se constitui das capacidades, habilidades motoras ou sensoriais (LENT, 2004; IZQUIERDO, 2006). As memórias podem ser ainda divididas segundo seu tempo de retenção, como ultra-rápida, de curta duração e de longa duração (LENT, 2004).

A memória declarativa é associada ao conhecimento de fatos, lugares, pessoas e coisas e aos seus significados, a qual subdivide-se em memória episódica e semântica, associadas respectivamente, às lembranças pessoalmente experimentadas e lembranças tomadas independentes do contexto em que foram aprendidas (SHARMA; RAKOCZY; BROWN, 2010) (Fig. 3).



**Figura 3.** Representação esquemática dos tipos de memória declarativa: episódica e semântica (Fonte: SHARMA; RAKOKZI; BROWN-BORG, 2010).

Uma forma de memória episódica, a memória espacial, envolvida com a localização e movimentação dentro de um ambiente (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010), pode ser danificada após lesões no hipocampo (ASTUR et al., 2002) e tem sido avaliada em modelos experimentais por meio de diferentes tarefas comportamentais utilizadas para mensurar a efetividade de terapias cognitivas ou os mecanismos neurobiológicos e neuroanatômicos envolvidos no processo de aprendizado e memória (PIAZZA et al., 2010).

Essa memória envolve a habilidade de lembrar o arranjo espacial de um ambiente por meio da formação de um mapa no encéfalo. Dessa forma, permite saber a localização de objetos, de si mesmo, além de utilizar-se destas informações para possibilitar o movimento de um lugar para outro (BIRZNIECE et al., 2006).

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

A codificação de nova informação espacial dentro do hipocampo parece dependente do desenvolvimento de novas representações durante a exploração do ambiente. Quando o animal se move pela primeira vez em um novo ambiente, cerca de 50% dos neurônios piramidais de CA1 tornam-se mais ativos, e cada um destes é ativado em uma área restrita, conhecido como “local field” (KARLSSON; FRANK, 2008), que responde de forma seletiva e torna consistente a importância do hipocampo para a codificação da novidade espacial (CARR; FRANK, 2012). Nesse contexto, as células piramidais de CA1 são a origem das eferências primárias do circuito trissináptico hipocampal e peças fundamentais na formação de memórias declarativas, como parte de um circuito reverberante e funcionalmente ativo que envolve o córtex entorrinal, o GD e o CA3 (MENDES, 2014).

Depois que as memórias são consolidadas na região CA1, elas são armazenadas (dias, semanas ou anos) em outras regiões próximas ao hipocampo, tais como córtex entorrinal, sensorial e regiões pré-frontais e parietais (FURINI et al., 2013). Em âmbito celular, o armazenamento das memórias de longa duração está associado à expressão de genes, síntese de proteínas e formação de conexões neuronais, mediadas por níveis de proteínas tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (AGUIAR Jr et al., 2011).

### **2.3 Composição lipídica do cérebro**

Os componentes lipídicos apresentam importante papel na nutrição e no desenvolvimento humano (AHMED et al., 2009), constituindo a maior reserva energética corporal para crianças e recém-nascidos. Isso tem despertado o interesse pela qualidade dos lipídios fornecidos na alimentação infantil, uma vez que este é um fator determinante no crescimento, no desenvolvimento visual e neural, e na manutenção da saúde (UAUY; CASTILLO, 2003).

No tecido nervoso, os lipídios são o principal componente estrutural, fazendo deste o segundo tecido em concentração lipídica no organismo, correspondendo a mais da metade do peso seco do cérebro (INNIS, 2008), o que compreende aproximadamente 600g lipídios/kg (CORREIA, 2003).

Os fosfolipídios de membrana destacam-se entre os lipídios no cérebro. Entre este grupo, a fosfatidiletanolamina (PE) é a mais abundante (BOURRE, 2009). Na fração de PE das membranas, o ácido docosahexaenóico (DHA) corresponde a

aproximadamente 25% (em peso) dos ácidos graxos totais no córtex cerebral (GUESNET; ALESSANDRI, 2011).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) representam um terço do valor total de lipídios no tecido nervoso (SWINGLER, 2008). A composição dos lipídios deste tecido é única em relação ao seu teor de DHA e AGPI, quando comparada a outros tecidos corporais (BRENNAN; CARLSON, 2014).

Os ácidos graxos (AG) são essenciais para o funcionamento do cérebro e transmissão de impulsos neurais (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000), apresentando papel importante no metabolismo encefálico, influenciando o desempenho cognitivo, a acuidade visual, o metabolismo de neurotransmissores e o desenvolvimento neural (CHALON et al., 2001). A deficiência destes pode afetar o desenvolvimento e comportamento sensorial e motor em roedores; e prejudicar o processo de mielinização que pode provocar déficits sensoriais em diversos sistemas, como visão, audição, paladar e olfato, bem como provocar atraso no crescimento em neurônios do hipocampo (BORBA et al., 2010).

Quando todos os átomos de carbono (exceto os dois últimos na cadeia) nos AG, encontram-se ligados a átomos de hidrogênio, a gordura é dita saturada. Quando dois átomos de carbono adjacentes na cadeia estão ligados a apenas um hidrogênio, uma dupla ligação (insaturação) ocorre entre os pares de carbono, o ácido graxo é dito insaturado (FAROOQUI, 2009).

Os AGPI podem ser divididos em diferentes famílias, entre as quais duas são as mais importantes: ômega-3 ( $\omega$ -3), e ômega-6 ( $\omega$ -6). Estas são estruturalmente classificadas de acordo com o número de carbonos presentes na cadeia de hidrocarbonetos; as diferentes posições e quantidade de duplas ligações ao longo da cadeia; e, a proximidade da primeira dupla ligação com o grupamento metil (ômega) terminal (BOTHAM; MAYES, 2007). As famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 apresentam cadeias de 18 a 22 átomos de carbono (CORRÊA, 2003) e insaturações separadas apenas por um carbono metilênico (MARTIN et al., 2006).

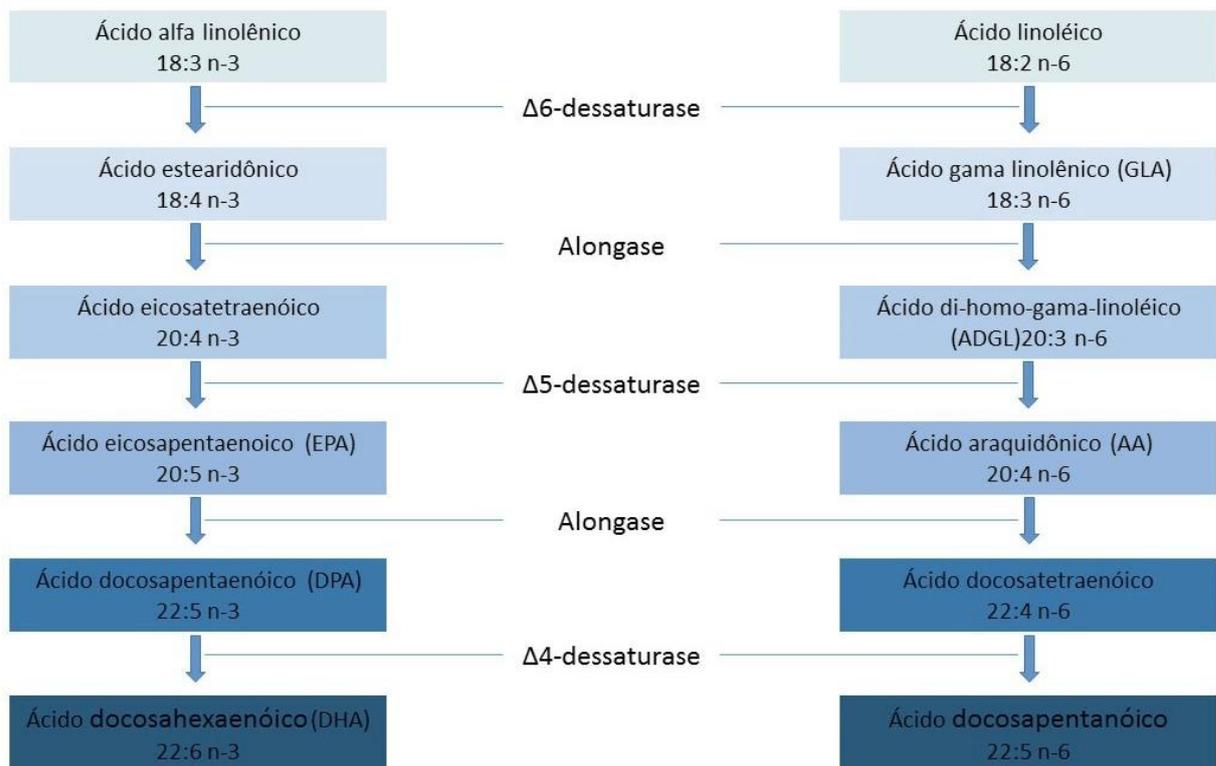
Os ácidos graxos da família  $\omega$ -6 apresentam a primeira insaturação entre o sexto e sétimo átomo de carbono e são derivados do AG essencial linoléico (AL; 18:2 n-6). A família  $\omega$ -3 é derivada do ácido graxo essencial  $\alpha$ -linolênico (ALA; 18:3 n-3), apresentando a primeira insaturação entre o terceiro e quarto átomo de carbono (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000) (Fig. 4).



**Figura 4.** Estruturas dos ácidos alfa linolênico (a) e linoléico (b). A Cadeia ômega ( $\omega$ ) também é designada de n. A cadeia dos ácidos graxos também é enumerada a partir da carboxila, de acordo com a designação  $\Delta$  (delta), que é mais aplicada ao estudar as reações químicas que envolvem esses ácidos (Fonte: Arquivo pessoal).

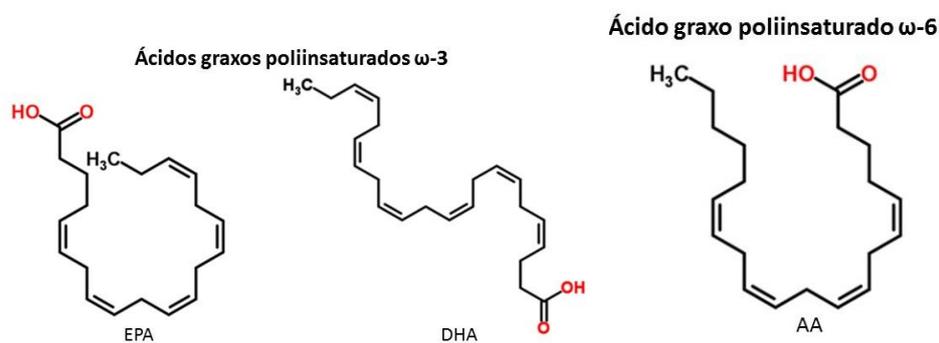
Os ácidos graxos AL e ALA são necessários para manter as membranas celulares sob condições normais, bem como as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). São denominados ácidos graxos essenciais (AGE) por não serem sintetizados pelo organismo dos mamíferos, devido a ausência das enzimas  $\Delta$ -15 e  $\Delta$ -12 dessaturases, que convertem AG saturados em precursores das séries  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 (INNIS, 2003; AHMED et al., 2009), sendo obtidos através da dieta (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013; VAN ELST et al., 2014). Portanto, a alimentação é um fator chave que influencia a estrutura e função do sistema nervoso (BOURRE, 2009).

Uma vez ingeridos, os AGE são metabolizados por ação de um conjunto de enzimas hepáticas, nos quais novos carbonos e insaturações são adicionados à cadeia carbônica original, produzindo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL) da mesma família (INNIS, 2009). As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração cis (MARTIN et al., 2006; BRENNAN et al., 2009; RAPOPORT; IGARASHI; GAO, 2010;) (Fig. 5).



**Figura 5.** Metabolismo dos ácidos graxos das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 (Fonte: INNIS, 2003).

Dentre os AGPI de cadeia longa, o ácido araquidônico (AA; 20:4 n-6), sintetizado a partir do AL, e os ácidos eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3) e docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3), formados a partir do ALA (VAN ELST et al., 2014) são altamente concentrados no cérebro (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013) (Fig. 6), o que torna evidente a necessidade de quantidades elevadas desses AGPI para a sinaptogênese e a maturação dos nervos (VAN ELST et al., 2014).



**Figura 6.** Estrutura dos AGPI-CL (Fonte: MORENO et al., 2012).

Os ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia, não ocorrendo, portanto, interconversão das duas famílias (FAROOQUI et al., 2007). Assim, embora essas enzimas tenham

maior afinidade pelos ácidos da família  $\omega$ -3, a conversão do ácido alfa-linolênico em AGPI-CL é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoléico na dieta (EMKEN; ADLOF; GULLEY, 1994). A razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 assume dessa forma, grande importância (MARTIN et al., 2006).

Na espécie humana, os tecidos que têm a capacidade de biossintetizar EPA e DHA são o fígado, as gônadas, e em menor escala, o cérebro e o tecido adiposo; e o fazem em velocidade lenta, principalmente quando a dieta é rica em ácido linoléico (HAAG, 2003; SMALL et al., 2004; SHERWOOD et al., 2011). No entanto, apenas 10 - 15% do ALA é convertido em EPA (CORRÊA, 2003) e 1% em DHA (WILLIAMS; BURDGE, 2006), sendo essa fração insuficiente para suprir as necessidades do organismo (CORRÊA, 2003) e para o desenvolvimento neural ótimo (SALEM et al., 1996).

Esta taxa de interconversão muito baixa de ômega-3 foi relacionada a três fatores principais: alta relação  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, quantidades em excesso de AG trans na dieta e deficiências de cofatores enzimáticos, tais como deficiência de zinco (HOBBELN; SALEM, 2001). Isso torna a ingestão desses ácidos graxos imprescindível para a manutenção de uma condição saudável (MARTIN et al., 2006).

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

#### **2.4 Ação dos ácidos graxos poliinsaturados (DHA e EPA) sobre o tecido nervoso**

O DHA e o EPA atuam nas propriedades físico-químicas da membrana tais como fluidez, permeabilidade e viscosidade (STONEHOUSE, 2014). O estado físico da membrana neuronal é crítico no controle de transferência de informações neuronais, isto é, não deve ser muito rígido nem demasiado fluido para a troca iônica entre os meios intra e extracelulares. O DHA também modula as propriedades do núcleo hidrofóbico da bicamada da membrana, o que confere um elevado grau de flexibilidade e interação direta com as proteínas da membrana, exercendo assim um

impacto na velocidade de transdução de sinal, neurotransmissão e formação de jangadas lipídicas (*lipid rafts*) (CUNNANE et al., 2009). Além disso, apresenta importante função no crescimento axonal e dendrítico (ALSINA; VU; COHEN-CORY, 2001). Dessa forma, um nível adequado deste ácido graxo é necessário para manter a integridade da membrana e função dos neurônios (BOURRE, 2009).

Uma importante função do DHA se dá contra a redução neuronal e sináptica, através da regulação dos níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (RAO et al., 2007), membro da família dos neurotróficos que mantém a neurogênese (LISTA e SORRENTINO, 2010), sobrevivência, manutenção, função (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2015), e regeneração neuronal (ERNST et al., 2006). O BDNF é expresso no hipocampo, no hipotálamo e córtex cerebral (BEILHARZ, MANIAM; MORRIS, 2015), mostrando-se de suma importância para a sinaptogênese e neurogênese, especialmente no hipocampo, estrutura com alta plasticidade (KRAMER et al., 2005).

O DHA e o EPA exercem ainda, efeitos imunomoduladores e são precursores de uma classe de moléculas lipídicas bioativas, referidas como mediadores pró-resolução especializados, que possuem propriedades antiinflamatórias bem caracterizadas (SERHAN, 2014). Estes mediadores podem também exercer efeitos neuroprotetores, uma vez que a molécula D1, um mediador pró-resolução especializado derivado de DHA, regula positivamente a expressão de genes anti-apoptóticos tal como Bcl-2 (LUKW et al., 2005).

Os AGPI, DHA e EPA, são componentes importantes envolvidos na neurogênese (BAZINET; LAYE, 2014), garantindo o desenvolvimento adequado do cérebro, sendo contribuidores críticos para a estrutura celular e função no sistema nervoso (FIRLAG et al., 2013). Estudos desenvolvidos em modelos animais, relacionando alterações nutricionais e função cerebral, mostraram que dietas privadas ou pobres em AGPI  $\omega$ -3 estão diretamente relacionadas com redução no tamanho encefálico (YAVIN; HIMOVICH; EILAM, 2009), redução nas amplitudes de potenciais de ação, prejuízo de memória e acuidade visual reduzida (CHUNG et al., 2008; YAMASHIMA, 2008), corpos celulares menores, reduzida arborização e menor densidade de receptores em neurônios destas áreas cerebrais (AHMAD et al., 2002).

Em contrapartida, dietas com ácidos graxos, especialmente AGPI, têm se mostrado eficaz no aumento da aprendizagem e memória, e na prevenção de déficit de memória em várias condições experimentais (LIM et al., 2005). Os mecanismos

pelos quais AGPI modulam as propriedades intrínsecas aos neurônios, no entanto, permanecem desconhecidas (YANG et al., 2012).

A incorporação de DHA é mais significativa em áreas cerebrais como hipocampo e córtex pré-frontal, nas quais apresentam uma alta densidade e variedade de receptores, bem como maior frequência de excitação (NALIWAYKO, 2009). Os AGPI  $\omega$ -3 são capazes de aumentar a síntese e liberação de neurotransmissores como a serotonina e dopamina, modulando efetivamente a funcionalidade neuronal (KODAS et al., 2004; CHALON, 2006) e cascatas bioquímicas envolvidas nos eventos de desenvolvimento, plasticidade e neuritogênese (HAAG, 2003; LOGAN, 2003).

Tuzun et al. (2012) verificaram que a suplementação materna com altas doses de  $\omega$ -3 (1000 mg/kg DHA, 400 mg/kg EPA) diminuiu significativamente a apoptose em hipocampo e córtex pré-frontal de neonatos expostos a hiperóxia, quando comparada a suplementação com baixas doses de  $\omega$ -3 (250 mg/kg DHA, 100 mg/kg EPA), onde se observou uma contagem neuronal mais baixa e morte celular por apoptose mais elevada nas referidas regiões do cérebro, sugerindo que a suplementação materna com  $\omega$ -3 pode proteger o cérebro em desenvolvimento contra a lesão hiperóxica.

A deficiência dos AGPI  $\omega$ -3 durante o desenvolvimento cerebral altera o fenótipo da micróglia e a mobilidade no cérebro pós-natal (MADORE et al., 2014), e tem sido correlacionada com anormalidades de comportamento em várias espécies animais (LENZI; TELES; GUZMÁN, 2011), assim como em déficits na memória aversiva de longa duração, estando relacionada com a redução dos níveis de DHA e BDNF, e aumento do ácido docosapentaenóico (DPA  $\omega$ -6) no hipocampo de ratos (BACH, 2012).

Estudos com animais demonstraram que dietas com altos níveis de AL e baixos níveis de ALA, utilizadas como fonte exclusiva de lipídios durante a gravidez e lactação resultam em déficits visuais, cognitivos e comportamentais na prole. Estas dietas consistentemente induziram déficits funcionais de eletrorretinograma, respostas reflexas, aprendizagem, comportamento e desenvolvimento motor em comparação com animais suplementados com  $\omega$ -3 (BRENNAN, 2011).

O óleo de peixe é uma fonte rica de  $\omega$ -3, incluindo EPA e DHA (TAVAZZI et al., 2008; YAMAGISHI et al., 2008). Sua suplementação durante o período embrionário e pós-natal pode influenciar positivamente a incorporação de ácidos

graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 pelo cérebro, proporcionando um melhor desenvolvimento deste órgão e das funções a ele relacionadas (FIRLAG et al., 2013).

## **2.5 O papel dos AGPI e da melatonina no estresse oxidativo no tecido nervoso**

Questões referentes à relação dos AGPI  $\omega$ -3 com o estresse oxidativo têm sido abordadas na literatura (SMAOUI et al., 2006). A insaturação dos AGPI favorece a ação dos radicais livres, com conseqüente aumento da lipoperoxidação. Estudo realizado por Erdogan et al. (2004), com suplementação de AGPI  $\omega$ -3, relatou aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

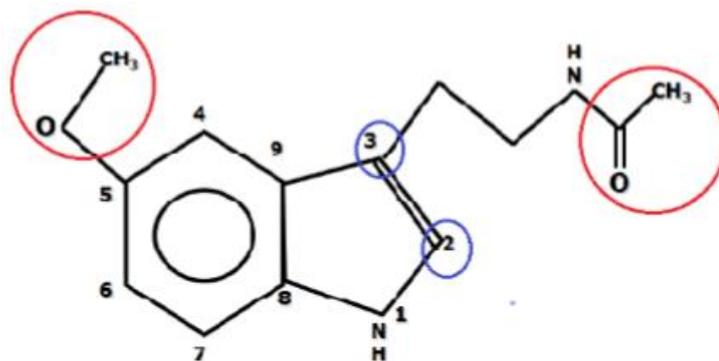
Dentre os radicais livres estão os ERO como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ), e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO) e pelo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007). Estas espécies são moléculas que possuem elétrons não pareados no seu orbital mais externo, o que as torna extremamente reativas e com grande capacidade de combinar-se inespecificadamente com diversas moléculas da estrutura celular (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Os radicais livres resultam em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos que prejudicam o funcionamento celular normal, num processo chamado estresse oxidativo (EO), o qual ocorre quando se observa um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007).

Evidências demonstram que quantidades elevadas de radicais livres, bem como uma deficiência de mecanismos antioxidantes são fatores que contribuem para problemas neurocognitivos e neurodegenerativos, em razão do aumento da apoptose celular hipocampal decorrente de estresse oxidativo, com conseqüente implicação no processo de neurogênese (MANDA; REITER, 2010).

Vários estudos têm apontado para o efeito neuroprotetor da melatonina, através da sua ação na redução de radicais livres (TAN et al., 2015; REITER; MANCHESTER; TAN, 2010); da sua capacidade de estimular uma série de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (TAN, 2010); da sua atuação no aumento da atividade de outros oxidantes (MAYO et al., 2003); e da interação de seus metabólitos com ERO e ERN, resultando na diminuição dos mesmos (PEYROT; DUCROIG, 2008; CHATTORAJ et al., 2009).

A poderosa função antioxidante da melatonina se dá devido a esta possuir um anel indol aromático rico em elétrons, atuando como um doador, reduzindo e reparando radicais eletrolíticos (MARTINEZ et al., 2005), apresentando os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico, capacidade redutora (CARPENTIERI et al., 2012) (Fig. 7).



**Figura 7.** Estrutura da melatonina com destaque vermelho para grupamentos metoxi e amina (anfifilicidade) e em azul para os carbonos 2 e 3 do anel do pirrólico (antioxidante) (Fonte: MATOS, 2014).

Devido a ação antioxidante bem documentada (PEYROT; DUCROIG, 2008; CHATTORAJ et al., 2009), a melatonina tem mostrado efeito benéfico acentuado contra a disfunção mitocondrial cerebral decorrente da idade. A lipofilicidade desta permite a sua interação com as membranas mitocondriais (REBRIN et al., 2005) e o seu acúmulo em altas concentrações (COSTA et al., 1997). Dessa forma, pode facilmente proteger as membranas mitocondriais do cérebro contra o ataque de radicais livres, estabilizando-as (LEON et al., 2005) e promovendo a homeostase. Associado a inibição das vias de morte celular mitocondrial, o fato da melatonina praticamente não apresentar toxicidade, mesmo em altas doses (LOPEZ et al., 2009), tem apoiado seu uso no tratamento de distúrbios neurodegenerativos (TUNEZ et al., 2004).

Na neurogênese, a melatonina exerce uma função crucial (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011; SARLAK et al., 2013; CHU et al., 2016), intervindo no metabolismo lipídico (SANCHEZ-HIDALGO; LU; TAN, 2007) e eliminando os radicais livres (PEYROT; DUCROIG, 2008); exerce ação sobre as CTN, aumentando a proliferação (SOTTHIBUNDHU; PHANSUWAN-PUJITO; GOVITRAPONG, 2010), a viabilidade, a sobrevivência e a diferenciação destas células em tecido cerebral embrionário (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2009), formando neurônios em maior

quantidade e em menor proporção astrócitos. Esse papel sobre as CTN pode ocorrer em razão do aumento da expressão de neurotrofina (KONG et al., 2008).

Em estudo realizado, Rennie; De Butte; Pappas (2009) constataram que a pinealectomia causa um decréscimo no número de neurônios piramidais no hipocampo de ratos adultos. Tal fato pode ser revertido após a reposição de melatonina na água de beber dos animais. Crupi et al. (2011) relataram que a administração exógena estimulou o nascimento, a sobrevivência e a diferenciação de novos neurônios no giro denteado hipocampal de ratas ovariectomizadas.

A melatonina colabora para a maturação e complexidade dos dendritos dos novos neurônios (ZHANG et al., 2011), facilitando a sua integração à circuitos pré-existentes (BENITEZ-KING, 2006). O mesmo foi observado com a administração intraperitoneal dessa indolamina em ratos (8mg/kg), na qual houve ainda, um aumento da polimerização dos microtúbulos e do volume total da camada de células granulares hipocampais (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011). A melatonina também promoveu a polimerização dos microtúbulos, a neuritogênese e a formação de espinhas dendríticas in vitro (BELLON et al., 2007). Dessa forma, a administração crônica de melatonina produz efeitos positivos sobre o desempenho cognitivo (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011; TOCHARUS et al., 2014).

## **2.6 A ação do exercício físico sobre o tecido nervoso**

A prática regular de atividade física associada a uma dieta balanceada tem sido considerada importante para uma vida saudável (CRUZAT et al., 2007). A plasticidade cerebral (mudanças cerebrais estruturais, celulares e moleculares) é essencial para a manutenção da saúde e a atividade física pode influenciar positivamente nestes fatores (COTMAN; BERCHTOLD, 2002).

Os benefícios do exercício físico estendem-se aos aspectos neurocognitivos (CHANG et al., 2012). A sua prática regular promove neurogênese hipocampal em mamíferos adultos (FABEL; KEMPERMANN, 2008); induz plasticidade sináptica (CHRISTIE et al., 2008); melhora a memória e aprendizado (CREER et al., 2010); facilita a recuperação após injúria cerebral (GRIESBACH; GOMEZ-PINILHA; HOVDA., 2007); melhora a atividade cerebral e a função cognitiva (BAKER et al., 2010).

A intensidade do exercício pode determinar os efeitos que o mesmo pode causar na memória (BLUSTEIN; McLAUGHLIN; HOFFMAN, 2006). Os mecanismos

pelos quais o exercício produz benefícios no cérebro provavelmente envolvem mudanças na plasticidade sináptica. Diversas adaptações orgânicas ocorrem frente à exigência metabólica durante o estado de atividade corporal aumentado, ativando as cascatas moleculares e celulares que aumentam a sensibilidade cerebral a insulina, melhoram a vascularização e o metabolismo energético e aumentam a neurogênese e sinaptogênese (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016).

O exercício físico também parece ser capaz de modular mecanismos de neurotransmissão cerebral e sinalização neurotrófica (COTMAN; BERCHTOLD, 2002), diminuir a expressão de genes associados ao estresse oxidativo e aumentar a expressão de genes associados a plasticidade sináptica, à função mitocondrial e ao desenvolvimento dos espinhos dendríticos, evocando aprendizado e memória (STRANAHAN et al., 2008).

Estudiosos têm sugerido alguns mecanismos responsáveis por mediar os efeitos do exercício sobre as funções cognitivas. Para a síntese, ação e metabolismo de neurotransmissores, é indispensável o aporte de quantidades adequadas de substratos. Acredita-se que ao promover a vascularização cerebral (PEREIRA et al., 2007) e aumentar o fluxo sanguíneo (VAN DER BORGHT et al., 2009), o exercício aumentaria conseqüentemente, a quantidade fornecida de oxigênio, substratos energéticos e neurotrofinas otimizadas (CLARCK et al., 2009), proporcionando a melhora da função cognitiva. Outra hipótese afirma que a prática de exercício físico aeróbio poderia aumentar a atividade de enzimas antioxidantes no SNC, aumentando a capacidade de defesa contra os danos provocados por ERO (RADAK et al., 2001).

Ainda demonstrando o efeito antioxidante do exercício físico, Schneider et al. (2005) encontraram uma maior atividade eritrocitária da enzima glutaciona peroxidase em triatletas treinados comparados a indivíduos não treinados. A maior atividade dessa enzima está de acordo com diversos estudos que mostram adaptação do sistema de defesa enzimático (MASTALOUDIS; LEONARD; TRABER, 2001). Observou-se também uma capacidade antioxidante total plasmática aumentada após o exercício em esteira rolante em indivíduos treinados e não treinados (SCHNEIDER et al., 2005).

Os dados na literatura mostram que exercício físico exerce um efeito neuroprotetor em casos de lesão hipocampal, aumentando a expressão de fatores neurotróficos que atuam na manutenção da função cerebral, na promoção da plasticidade neural (COTMAN; BERCHTOLD, 2002) e na estrutura sináptica (TONG

et al., 2001). Dentre os fatores neurotróficos, estudos tem mostrado elevado índice na quantidade de RNAm do BDNF em decorrência do exercício físico (RADAK et al., 2006). Esta proteína exerce ação sobre a sobrevivência neuronal, diferenciação, plasticidade sináptica, memória, síntese de neurotransmissores e modulação do metabolismo neuronal no hipocampo de ratos (GRIESBACH; GOMEZ-PINILLA; HOVDA, 2007)

O exercício promove a neurogênese em diversas regiões do cérebro (PAREDES et al., 2016). Dentre estas, maior ênfase tem sido dada sobre os efeitos do exercício físico sobre o hipocampo (BERCHTOLD; CASTELLO; COTMAN, 2010). Esta estrutura sofre significativas alterações quando o indivíduo é submetido ao treinamento físico regular, independente da modalidade deste (KANNAGARA et al., 2009).

Segundo Fuss et al., (2010) o hipocampo é o local do cérebro mais altamente afetado pela corrida em roedores, havendo um aumento da neurogênese no GD. A um nível macroscópico, verificou-se que o volume de matéria cinzenta do hipocampo aumentou após a corrida em ratos (FUSS et al., 2014). Um aumento no volume do hipocampo também foi encontrado após exercício em seres humanos (DEMIRAKCA et al., 2014). Portanto, o exercício físico parece mobilizar uma cascata de eventos moleculares que culmina na formação de novas células neuronais na região do hipocampo, com conseqüente aumento da plasticidade sináptica e melhora nos processos de aprendizagem e memória (COTMAN; BERCHTOLD, 2007), principalmente no aprendizado espacial (TONG et al., 2001).

Além de aumentar o número de células neuronais, o exercício físico regular também possui influência sobre a morfologia destas, acelerando a maturação (ZHAO et al., 2006), o que leva a crer que os benefícios podem ter caráter qualitativo (VAN PRAAG, 2008). Um exemplo disso é o número aumentado de espinhas dendríticas em decorrência do exercício físico (GLASPER et al., 2010).

Sugere-se que o SN dos mamíferos permaneça sujeito à ação dos benefícios acarretados pelo exercício físico por pelo menos 75% do tempo de vida total destes, o que significa um período considerável para retardar ou prevenir déficits cognitivos (BLACKMORE et al., 2009). Estes benefícios parecem se estender também a prole dos animais treinados, como foi observado por LEE et al. (2006), no qual ratas foram submetidas a natação durante o período gestacional. Neste trabalho foi constatado que a prole destes animais apresentava uma maior expressão gênica de BDNF e um

número maior de células em processo de proliferação na região hipocampal. Estudos também relatam que crianças que participam de atividade aeróbia ou *fitness* têm capacidades cognitivas aumentadas (CHADDOCK et al., 2011).

A influência do exercício físico e seus efeitos benéficos sobre o cérebro vêm sendo investigados, havendo, no entanto, divergência tanto em relação ao modelo ou tipo de atividade física quanto ao benefício ou não do mesmo às funções cerebrais (DING et al., 2004). Estudos tem evidenciado que diferentes protocolos de corrida em esteira, natação e exercício voluntário (corrida em roda) podem melhorar a memória em roedores no teste de Water Maze (PIETRELLI et al., 2012), reconhecimento de objetos (HOPKINS; NITECKI, BUCCI, 2011) e esQUIVA inibitória (KIM et al., 2010).

Segundo Moreno et al. (2004), a interação com a água é um meio privilegiado para experimentar novas sensações e novos comportamentos motores, além de estimular os diversos sentidos. Na área psicomotora, a natação como forma de atividade física propicia benefícios devido ao fato da água favorecer experiências diversas, mesmo antes do bebê começar a andar, o que acelera seu desenvolvimento motor. Este tipo de atividade apresenta-se como uma intervenção econômica e eficiente sobre os diferentes parâmetros fisiológicos (MEDEIROS et al., 2004).

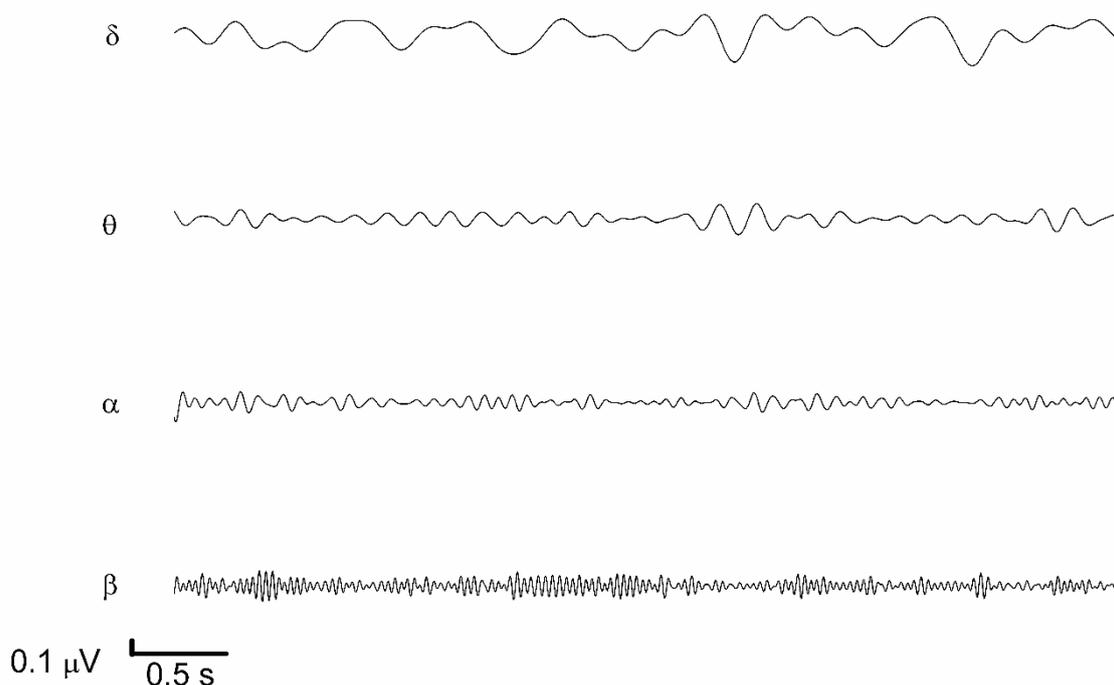
A natação (frequência de 5x por semana, duração de 60 minutos, carga de 5% do peso corporal por 6 semanas) tem se mostrado eficiente para melhorar a aptidão física de ratos (GOMES et al., 2006). Tendo em vista o benefício dos exercícios nos aspectos físicos, sugere-se que protocolos com intensidade semelhante ao do autor acima, sejam úteis em trazer melhoras aos aspectos cognitivos (SANTOS, 2014).

Estudos tem demonstrado que o exercício físico pode promover alterações nos ritmos cerebrais, evidenciando a influência deste sobre a ativação e função neuronais, podendo levar a várias alterações na plasticidade cerebral. Esta mudança eletrofisiológica poderia representar o rearranjo de sistemas diferentes como consequência de exercício (CHEN et al, 2011; SOYA et al., 2011; HOQUE; MONDAL; 2015;

### **2.7 A Atividade elétrica cerebral e sistemas caóticos**

A atividade elétrica cerebral apresenta alguns padrões de ondas, chamados ritmos cerebrais, cuja morfologia e intensidade são determinadas pelo grau de excitação do cérebro no Sistema de Ativação Reticular (SAR) (WEBSTER, 2010). Este registro pode ser decomposto em faixas distintas de frequência (Fig. 8): Delta (1 - 4

Hz), são associadas com estágio de sono profundo, podendo indicar doenças cerebrais em uma pessoa adulta acordada (AZEVEDO, 2005); Teta (4 - 8 Hz), encontradas em estado de sonolência, sono leve ou estados emocionais alterados, sendo para algumas pessoas, encontrado na região frontal quando a pessoa realiza atividades mentais, tais como a solução de problemas; alfa (8 - 12 Hz), ocorre em pessoas acordadas, sobre as regiões posteriores do cérebro, com maior voltagem sobre as áreas occipitais, sendo melhor observado com os olhos fechados e sob condições de relaxamento físico e inatividade mental, e bloqueado ou atenuado por atenção, principalmente visual, e esforço mental; beta (12 - 30 Hz), observada em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição; e gama (30 - 70 Hz), que ocorrem principalmente durante estados comportamentais que envolvem expectativas como na atenção, na motivação e na excitação (KUNICKI, 2011).



**Figura 8.** Ondas cerebrais em ratos.  $\delta$  - ondas delta (1-4 Hz) - em sono profundo.  $\theta$  - ondas teta (4-8 Hz) - em sonolência ou estados emocionais alterados.  $\alpha$  - ondas alfa (8-12 Hz) - em vigília com relaxamento mental.  $\beta$  - ondas beta (12-30 Hz) - em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição (Fonte: AGUIAR, 2015).

A atividade cerebral, por estar relacionada a uma série de fatores, comporta-se como parte de um sistema dinâmico determinístico não-linear, o qual ao longo dos

últimos anos, tem sido estudado sobre o ponto de vista da teoria do caos. Um sistema dinâmico determinístico tem o seu estado em um instante dependente de seu estado num instante precedente.

A não-linearidade de um sistema, por sua vez, diz respeito à imprevisibilidade dos efeitos de pequenas mudanças nas condições iniciais de suas variáveis. Outra questão é a impossibilidade de compreensão do sistema pelo estudo de partes isoladas (superposição). Assim, ao contrário dos sistemas lineares, a resposta total não pode ser conhecida simplesmente pelo somatório das partes constituintes (proporcionalidade e superposição). Estes sistemas têm sensibilidade extraordinária para as condições iniciais, o que os torna inerentemente imprevisíveis em longo prazo (SAVI, 2006).

Além disso, a estrutura de uma resposta caótica é muito rica, fazendo com que o comportamento caótico possua uma grande flexibilidade, sendo interessante para sistemas que necessitam apresentar uma reação rápida a determinadas perturbações. Isto é característico de sistemas naturais onde o caos e diversos mecanismos regulatórios fornecem uma flexibilidade incomum (SAVI, 2005).

Neste contexto, o termo caótico teria uma conotação positiva, refletindo uma situação fisiológica, na qual o organismo processa a informação mais rapidamente e pode ter uma maior variedade de respostas às mudanças abruptas do meio na qual está inserido (WANG et al., 2010). Por outro lado, a perda da complexidade do sistema (ou a ausência do caos) pode refletir uma condição patológica, onde o sistema perde sua complexidade vital (FERREIRA, 2010).

A atividade cerebral pode ser mensurada por meio do registro do eletrocorticograma (ECoG). Essa técnica invasiva envolve a medição de sinais elétricos utilizando eletrodos que são implantados subduralmente na superfície do cérebro e fornece a dinâmica espaço-temporal de curta duração (<1cm/<1ms) com uma elevada relação sinal-ruído, e menor susceptibilidade a artefatos que o eletroencefalograma (EEG) (HILLS et al., 2012).

## 2.8 Métodos de análise linear e não-linear

A descrição ou análise de sistemas caóticos através de modelos ou técnicas não-lineares é mais efetiva do que os lineares. Contudo, as dificuldades inerentes ao estudo dos problemas não-lineares, e o sucesso da mecânica linear em diversas áreas do conhecimento incentivaram cada vez mais o estudo de modelos lineares e bem comportados (SAVI, 2006).

Os processos caóticos podem ser descritos no domínio do tempo ou no da frequência. Neste contexto, pode-se efetuar a análise de uma série temporal em um espaço apropriado. A técnica de transformada de Fourier, pela qual obtemos o espectro de potência (MACIVER; BLAND, 2014), estabelece uma relação entre uma série em um determinado intervalo de tempo (domínio do tempo) e como certas frequências contribuem para esta série (domínio da frequência). Trata-se de um método de análise linear (SAVI, 2006).

Entretanto, a descrição de fenômenos naturais a partir de modelos lineares fica sempre restrita a uma pequena região, não permitindo a correta compreensão de diversos aspectos a ela associada. Dessa forma, métodos de dinâmica não linear foram propostos para descrever os processos caóticos, tais como a Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e Análise de Flutuação Destendenciada (Detrended Fluctuation Analysis - DFA) (HUANG et al., 2014; LIANG et al., 2014).

### 2.8.1 Transformada de Fourier

Segundo o teorema de Fourier, todo sinal oscilatório pode ser decomposto em vários outros sinais senoidais com diferentes frequências. É o que acontece com o ECoG, um sinal complexo que pode ser decomposto em sub-ritmos e representados no domínio da frequência. Depois de decomposto o sinal, pode-se calcular a potência média de cada faixa de frequência. A utilização desse teorema torna possível a decomposição de um sinal periódico  $f(t)$  nas suas componentes frequenciais com a somatória de termos senos e cossenos harmonicamente relacionados na forma da seguinte expressão:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (1)$$

A Transformada de Fourier (TF) torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa série temporal. A TF é calculada a partir da decomposição do sinal complexo oscilatório em suas frequências

componentes. A função  $F(\nu)$  é a transformada de Fourier da função temporal  $f(t)$ , que representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal  $f(t)$ ; passando uma informação no tempo para o domínio da frequência. Então,  $F(\nu)$  representa o grau de participação das componentes frequenciais da função  $f(t)$  (WELCH, 1967).

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um registro do ECoG pode ser calculado como segue:

$$\bar{E}_\omega = \frac{\int_{\nu_s}^{\nu_e} |F(\nu)|^2 d\nu}{\int_{\nu_s}^{\nu_e} d\nu} \quad (2)$$

onde  $F(\nu)$  é a Transformada de Fourier do sinal  $f(t)$ , aqui representado pelo ECoG. O  $\bar{E}_\omega$  é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência  $\omega = [\nu_s, \nu_e]$ , aqui representado pelos diferentes ritmos  $\nu_s$  até  $\nu_e$ . Ao contrário do que se observa nos sinais periódicos comuns, que apresentam espectro de potência com picos em frequências bem definidas, nos sistemas caóticos o espectro de potência apresenta bandas largas (MACHADO et al., 2012).

### 2.8.2 Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ)

Utilizada para analisar dados através da compressão da sua sequência via recorrência de padrões (LEMPEL; ZIV, 1976), a CLZ é uma metodologia que possibilita a quantificação dos padrões distintos de uma série. O registro da atividade cerebral obtida no ECoG apresenta característica de caoticidade e autosimilaridade (AGUIAR; PESSOA; NOGUEIRA, 2014), tornando possível o cálculo da complexidade da série temporal utilizando o método de Lempel-Ziv (ABÁSULO et al., 2014).

Antes de calcular a CLZ é necessário transformar a série temporal em uma sequência binária. Nos sistemas biológicos a sequência binária mais adequada é composta por 0 e 1. A sequência binária é gerada a partir da comparação de cada ponto da série temporal com a média  $m$  de todos os pontos da série. Se o valor do ponto for superior ao da média ele passa a ser representado por 1, se esse valor for

inferior ao da média ele passa a ser representado por 0. Dessa forma se obtém uma sequência (P) composta por 1's e 0's (ABOY et al., 2006):  $P = S_{(1)}, S_{(2)}, \dots, S_{(n)}$ , onde:

$$S_i = \begin{cases} 0, & \text{se } S_i < \text{média} \\ 1, & \text{se } S_i > \text{média} \end{cases}$$

O algoritmo de Lempel-Ziv é implementado da seguinte maneira:

1. A sequência original  $P$  é dividida em subsequências de tamanhos menores, denominadas  $S$  e  $Q$ , com o objetivo de verificar se a subsequência  $Q$  pode ser reconstruída a partir de cópias da subsequência  $S$ .
2. Determina-se uma subsequência  $S$  reconstruída a partir de  $P$ , que será fixa até que os termos da sequência  $Q$  não possam mais ser simplesmente copiados de  $S$ . Neste momento se insere um novo termo em  $S$ , em que cada nova subsequência  $S$  é limitada por um termo inserido:  $S = s_1, s_2, \dots, s_r$ , onde  $s_r$  é o termo inserido e  $Q = s_{r+1}, s_{r+2}, \dots, s_n$ .
3. Após a inserção de um termo, o próximo passo é definir  $Q = s_{r+1}$  e verificar se o esse termo pode ser copiado do vocabulário  $(SQ\pi)$ . Este vocabulário é formado pela concatenação de  $Q$  e  $S$ . O símbolo  $\pi$  indica que o último termo deve ser removido. Caso o termo  $Q = s_{r+1}$  pertença ao vocabulário  $(SQ\pi)$ , o próximo termo a ser testado será  $Q = s_{r+1}, s_{r+2}$  e assim sucessivamente até que  $Q$  não possa mais ser construído a partir de uma cópia de  $S$ . Nesse momento se insere um novo termo em  $S$  e  $Q$  voltará a ser  $Q = s_{r+1}$ , partindo do novo termo inserido.

Quanto maior for o número de termos de  $Q$  que podem ser copiados de  $S$ , maior será a auto-similaridade da série e menor a sua complexidade, ou seja, mais próxima de 0 será a CLZ. Por outro lado, quanto maior for o número de termos inseridos, maior será a complexidade da série, o que se refletirá numa CLZ mais próxima de 1 e mais aleatório será o comportamento do sinal. A CLZ, como postulado por Aboy et al. (2006) é definida pela seguinte equação:

$$CLZ = \frac{c(n) \log_k n}{n} \quad (3)$$

onde  $c(n)$  é o número de dígitos inseridos,  $n$  é o tamanho do sinal e  $k$  o número de símbolos diferentes na sequência (no caso binário,  $k = 2$ ).

### 2.8.3 Análise de Flutuação Destendenciada (DFA)

As séries temporais fisiológicas tais como o ECoG mostram comportamento altamente irregular, caracterizado por não-estacionaridade e não-linearidade, com flutuações que ocorrem em todas as escalas de tempo. Métodos derivados da física estatística aplicados em sinais fisiológicos sob condições saudáveis e patológicas, mostram que sob condições saudáveis, as flutuações nos sinais fisiológicos exibem correlação de lei de potência de longo alcance e que certos estados patológicos podem causar alterações na propriedade de correlação desta escala invariante (PENG et al., 1995; GOLDBERGER et al., 2002).

A Análise de Flutuação Destendenciada (do inglês *Detrended Fluctuation Analysis* - DFA) é um método desenvolvido para a correlação de séries temporais não estacionárias. Foi introduzido por Peng para a análise de sequências gênicas (PENG et al., 1994) e tem sido aplicado em diversos fenômenos como a variabilidade cardíaca (PENG et al., 1995) e o eletroencefalograma (PAN et al., 2004). Esta técnica permite a detecção da autossimilaridade em séries temporais não estacionárias e também evita falsas detecções de correlações de longo alcance, que são artefatos de tendência incorporados no sinal (HU et al., 2004).

O método apresenta uma modificação da análise da raiz quadrática média da caminhada aleatória, e baseia-se na análise de flutuações dos dados após a retirada das tendências das séries temporais. Dessa forma, o EEG é integrado a séries auto-similares. Para isso, obtém-se a série integrada a partir da série temporal original  $x_i$  com  $i = 1, 2, 3, \dots, N$  através da expressão 4:

$$y(L) = \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \quad (4)$$

onde  $\bar{x}$  é a média dos valores de  $x_i$  e  $k$  é um número inteiro.

Em seguida,  $y(k)$  é dividida em intervalos de comprimento igual a  $N$ , onde  $L$  é o número de intervalos. Desta forma, a série temporal é dividida em diferentes intervalos de escalonamento (caixas), e uma regressão linear é ajustada para cada caixa de comprimento  $L$ . A ordenada do segmento linear representa a tendência local no intervalo de tamanho  $n$ , denotada como  $y_n(L)$ . Essa tendência é removida

subtraindo-se o valor de  $y_n(L)$  do valor da série integrada  $y(L)$ . A função que caracteriza o tamanho das flutuações para o tamanho  $n$  dos intervalos usados para remover a tendência é dado pela expressão:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{L=i}^N [y(L) - y_n(L)]^2} \quad (5)$$

Esse cálculo é repetido para vários tamanhos do intervalo  $n$  para determinar a relação entre as flutuações  $F(n)$  e o tamanho do intervalo ( $n$ ). A flutuação média em processos auto-similares, segue uma lei de potência com o  $n$ :

$$F(n) \sim n^\alpha \quad (6)$$

O expoente de auto-similaridade  $\alpha$  pode ser calculado usando o coeficiente angular da reta obtida por regressão linear do gráfico duplo log de  $F(n)$  versus  $\log n$ . O parâmetro de auto-similaridade  $\alpha$  da série integrada é relacionado com a função de correlação da série original da seguinte forma: Se  $\alpha = 0,5$  a série é dita não correlacionada com valores anteriores, os valores representados significam caminhadas aleatórias, indica ruído branco;  $0,5 < \alpha < 1$  indica correlações de longo alcance persistentes, ou seja, valores grandes têm maior probabilidade de serem seguidos por valores grandes;  $\alpha = 1$  correspondente ao ruído  $1/f$ ; para  $0 < \alpha < 0,5$ , existe uma correlação de longo alcance anti-persistentes, ou seja, valores grandes têm maior probabilidade de serem seguidos por valores pequenos; o caso  $\alpha > 1$  apresenta correlação no sinal, contudo não segue a forma de uma lei de potência;  $\alpha = 1,5$  indica ruído Browniano que representa a integração do ruído branco (PENG et al., 1995).

O método de DFA permite uma distinção confiável entre diferentes tipos de sinais, com base na variação dos parâmetros de escala, o que pode ser importante para a compreensão da origem do ECoG e para saber se o processo é gerado por mecanismos estocásticos ou caóticos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados ao exercício físico de intensidade moderada sobre peso corporal, perfil lipídico e glicêmico, memória, atividade elétrica cortical e morfometria do hipocampo em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado sobre o desenvolvimento corporal e perfil bioquímico sérico de ratos avaliados aos 30 e 60 dias de idade;
2. Verificar a interferência da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico, sobre a morfometria do hipocampo de ratos aos 30 e aos 60 dias de idade;
3. Avaliar o estado da memória de reconhecimento de curta e longa duração em ratos suplementados com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico aos 30 e aos 60 dias de idade;
4. Verificar alterações nos padrões eletrocorticográficos em ratos adultos jovens, suplementados com ômega-3 e melatonina e submetidos a exercício físico avaliados aos 70 dias de idade.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Local e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Histologia e no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Dois Irmãos, Recife – PE.

### 4.2 Animais

Foram utilizados 160 *Rattus norvegicus*, variedade Albinus, linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local no qual realizou-se os ensaios biológicos. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação (ração comercial Presence®) *ad libitum* (Tab. 1). Do total de animais, 40 eram fêmeas (F0) e 120 eram machos (F1).

**Tabela 1.** Composição nutricional e níveis de garantia da ração Presence® ratos e camundongos.

Componente	Percentual
Umidade (Max)	13,0%
Proteína Bruta (Min)	23,0%
Extrato Etéreo (Min)	4,0%
Matéria Fibrosa (Max)	5,0%
Matéria Mineral (Max)	10,0%
Cálcio (Max)	1,3%
Fósforo (Min)	0,85%

Fonte: SP Rações (Disponível em <http://www.spracoes.com.br/produto/presence-ratos-e-camundongos/153>).

### 4.3 Delineamento experimental

Os animais (F0) foram divididos em oito grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento.

Grupo A – Ômega-3;

Grupo B – Melatonina;

Grupo C – Exercício físico;

Grupo D – Ômega-3 e melatonina;

Grupo E – Ômega-3 e exercício físico;

Grupo F – Melatonina e exercício físico;

Grupo G – Ômega-3, melatonina e exercício físico;  
Grupo H – Controle.

Aos 120 dias de idade as ratas foram colocadas em acasalamento por 15 dias. Após o período de gestação obteve-se a geração F1, a qual foi analisada em momentos distintos, conforme organograma (Fig. 9). Os protocolos em F0 foram iniciados a partir dos 60 dias de idade e prosseguiu até o desmame da prole (165 dias de idade).

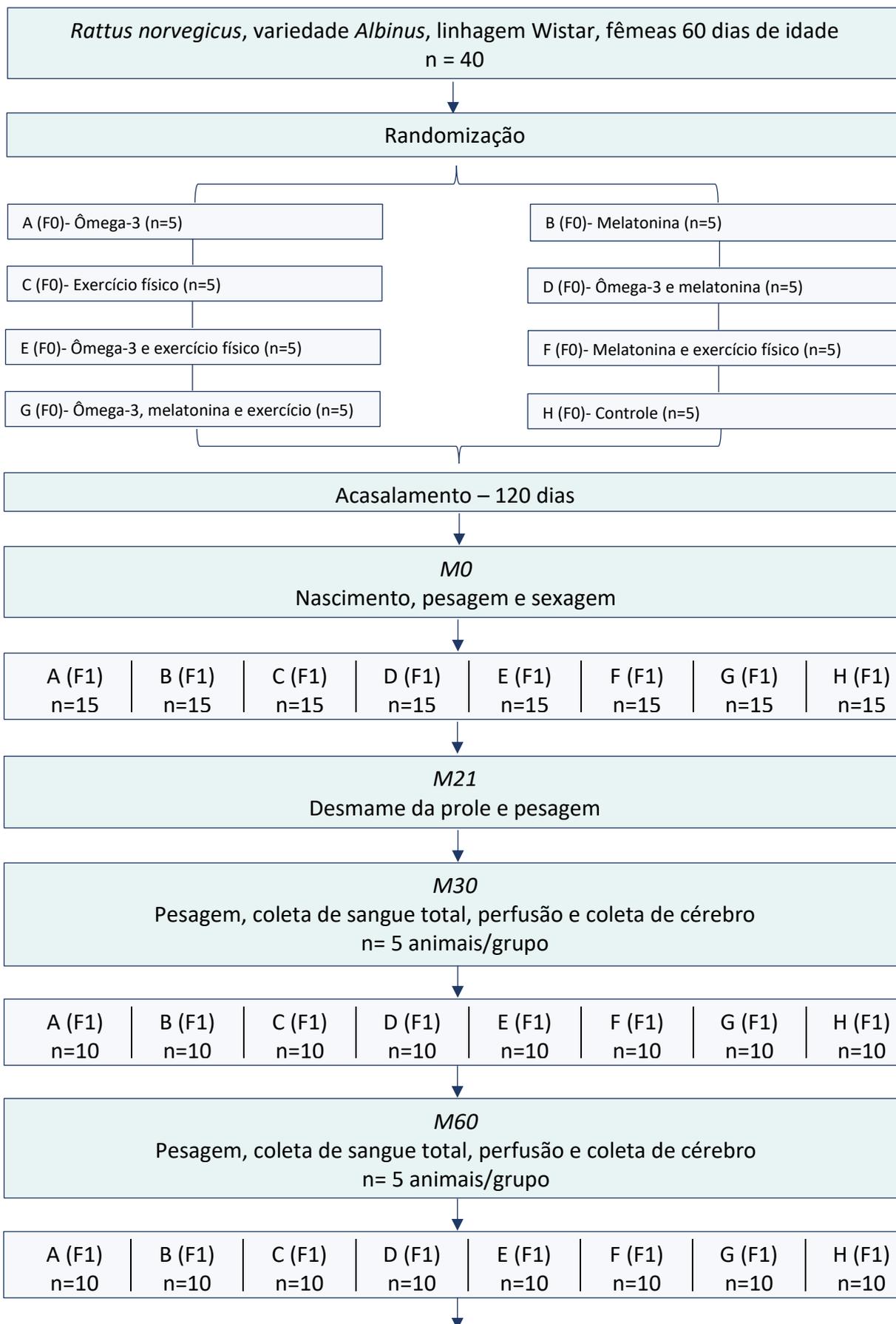
No primeiro momento (M0), realizou-se a sexagem dos animais da F1 e aqueles excedentes a um total de 3 filhotes machos foram eutanasiados até 12 horas após o nascimento. Os animais restantes (n = 3 filhotes/ mãe) foram amamentados até o 21º dia (M21), quando foram desmamados de suas mães e passaram a receber água e alimentação *ad libitum*.

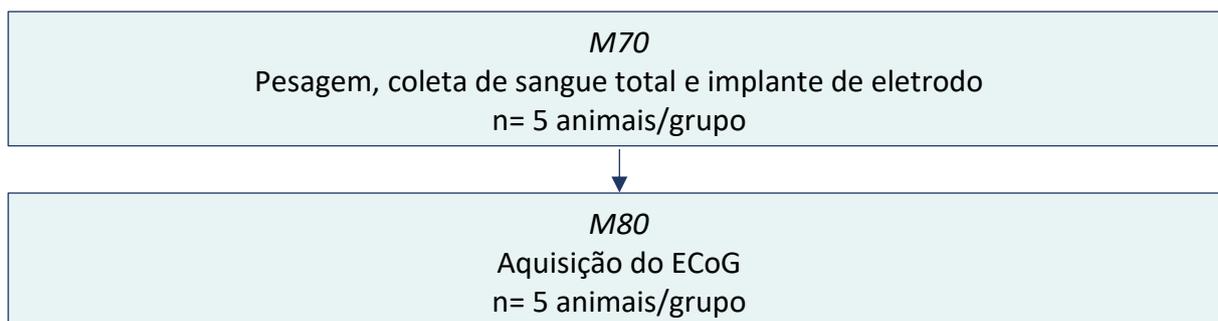
Aos 30 e 60 dias de idade (M30 e M60, respectivamente) os animais da geração F1 foram pesados em balança analítica para avaliação do peso corporal. Cinco animais de cada grupo foram escolhidos ao acaso e anestesiados com associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (MASSONI, 2011).

Na sequência os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de exsanguinação por punção cardíaca, com coleta de sangue total para análise do perfil bioquímico sérico dos animais (Item 4.8).

Posteriormente, realizou-se a perfusão dos animais com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e com formaldeído a 10% em tampão fosfato (pH 7,4) para coleta dos cérebros, os quais foram submetidos posteriormente ao procedimento histológico.

Aos 70 dias de idade (M70), os demais animais (n = 5 animais/ grupo) foram pesados e anestesiados para procedimento de implante de eletrodo. Aos 80 dias de idade, após cicatrização da ferida cirúrgica, foi feita a aquisição do registro do ECoG.





**Figura 9.** Organograma mostrando as etapas do delineamento experimental. M0 – pós-natal imediato; M21 – 21 dias pós-natal; M30 – trinta dias pós-natal; M60 – sessenta dias pós-natal; M70 – setenta dias pós-natal; M80 – oitenta dias pós-natal. F0 – Matrizes; F1 – Prole.

#### 4.4 Suplementação com óleo de peixe

A suplementação com  $\omega$ -3 foi realizada por meio de cápsulas de óleo de peixe Naturalis® (1000mg) contendo 180 mg EPA e 120 mg DHA) administrado por meio de gavagem (BRAGA et al., 2007).

Esse procedimento foi realizado com as matrizes (F0) desde os 60 dias de idade até o período final da amamentação. A prole (F1) também recebeu o mesmo tratamento desde o desmame até o período da eutanásia. Os animais do grupo controle receberam, por gavagem, solução fisiológica de NaCl 0,9%.

#### 4.5 Administração da melatonina

A melatonina foi administrada em F0 desde os 60 dias de idade até o desmame da prole. Em F1, realizou-se a administração desde o fim da amamentação (21º dia) até o momento da eutanásia. A dose utilizada foi de 0,5mg/kg de peso corporal, entre as 18:00 e 19:00 horas (SUBRAMANIAN et al., 2007), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1 ml de NaCl a 0,9%, contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu injeções diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (REDINS; REDINS; NOVAES, 2000).

#### 4.6 Treinamento físico

O exercício moderado de natação foi realizado em tanque de 38 centímetros de diâmetro e 70 centímetros de profundidade, com capacidade para 80 litros, com água mantida em temperatura controlada de 31°C  $\pm$  1°C. A sessão de treino teve duração de 60 minutos, realizada numa frequência de cinco dias por semana (SAAD et al., 2002). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao meio aquoso durante cinco dias consecutivos, em que o tempo das sessões foi

aumentado gradualmente até atingir o estipulado no protocolo. Do 1º ao 4º dia de adaptação, os animais permaneceram no tanque por 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente. No 5º dia, foi repetido o mesmo tempo realizado no dia anterior (60 minutos) o qual foi utilizado até o fim do experimento.

Os animais de F0 foram submetidos ao treinamento físico a partir dos 60 dias de idade até o fim da amamentação e os de F1 iniciaram o protocolo a partir do desmame até a eutanásia.

#### **4.7 Avaliação do ganho de peso**

A variação de peso corporal foi avaliada até o fim do período experimental, por meio de pesagem em balança analítica. As matrizes foram avaliadas a partir dos 60 dias de idade até o final da gestação e a prole foi avaliada desde o nascimento até a realização da eutanásia, por meio de pesagem ao nascer e ao 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dia.

#### **4.8 Provas laboratoriais**

As provas laboratoriais foram realizadas no analisador bioquímico bioplus 200f, através de kit da Doles Reagentes, para as seguintes variáveis: glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos. Seguindo orientação do fabricante, o cálculo para obtenção do LDL-colesterol e VLDL-colesterol foi realizado mediante fórmula de Friedewald; Levi; Fredrickson (1972), para valores de triglicerídeos < 400 mg/dL:

$$LDL = ColT - HDL - (Trig/5)$$

#### **4.9 Teste de reconhecimento espontâneo de objetos**

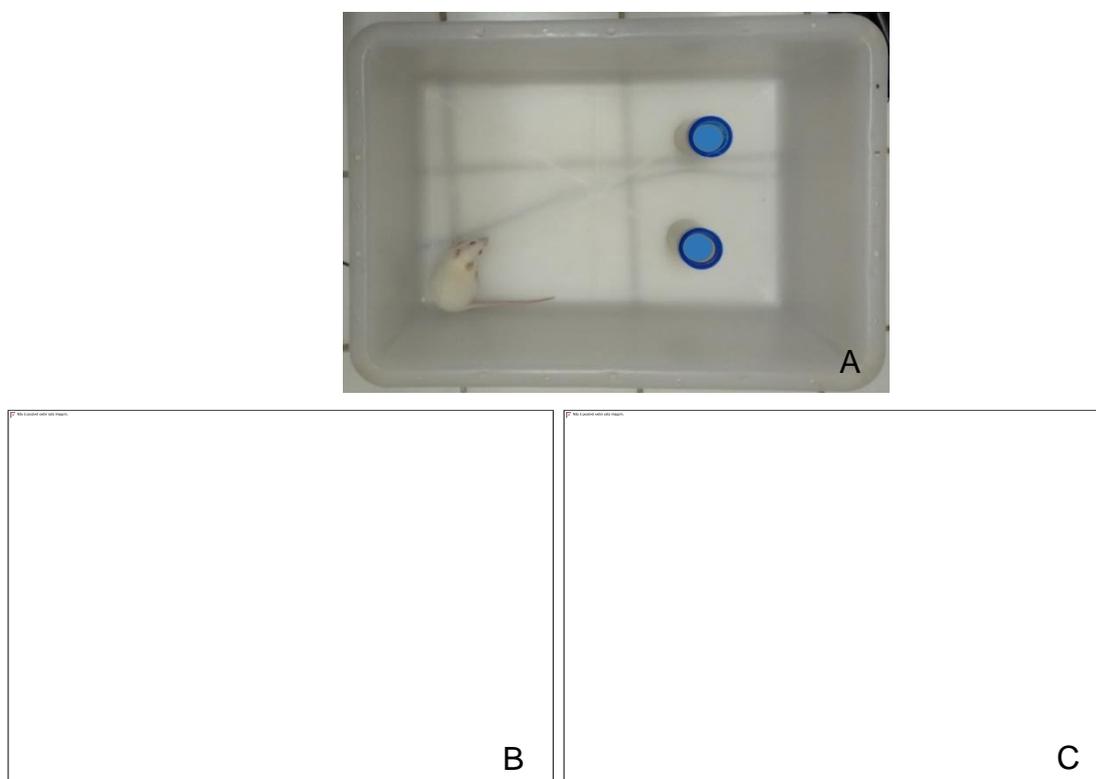
Para o teste de reconhecimento espontâneo de objetos (TREO), foi utilizada uma arena de teste (dimensões 65x45x45 cm) em cor neutra e opaca, e objetos em triplicata, de volume em torno de 200 ml e suficientemente pesados para não serem deslocados.

Como pré-testagem, os animais foram submetidos a 2 sessões de habituação ao aparato do teste, com duração de 3 minutos cada e sem objetos, 24 horas antes do teste. Na sessão de treinamento, 2 objetos idênticos (A1 e A2), foram colocados em cantos opostos da arena, separados por espaço suficiente para exploração de todas as suas faces (Fig. 10). O animal foi posicionado na região mediana da arena,

de costas para os objetos e pôde explorá-los livremente durante 3 minutos. A exploração foi definida como dirigir o nariz a uma distância menor ou igual a 2 cm do objeto, ou tocá-lo com o nariz. Na sequência, o mesmo foi retornado à sua gaiola-moradia.

Após 2 minutos do primeiro ensaio, os objetos da arena foram trocados por um idêntico aos anteriores, que foi chamado de A3 e por um objeto novo chamado B. Após intervalo de tempo pré-determinado (24 horas), o rato foi novamente colocado na arena de testagem por 3 minutos de forma a explorar a nova dupla de objetos (A3 e B), na denominada sessão de reteste.

A exploração global dos objetos é a soma dos tempos de exploração de A1+A2 na sessão de treino e de B+A3 no reteste. A habituação foi aferida pela diferença da exploração entre a sessão de treino e o reteste ( $[A1+A2]-[B+A3]$ ). A simples medida de reconhecimento ou discriminação foi a diferença entre o tempo gasto na exploração do novo estímulo (B) e o tempo gasto na exploração do estímulo familiar (A3), ou seja,  $B-A3$ . Entretanto, para minimizar a influência dos níveis totais de exploração, foi calculada a diferença no tempo de exploração dividida pelo tempo de exploração total:  $B-A3/B+A3$  (ENNACEUR et al., 2005).



**Figura 10.** Teste de reconhecimento espontâneo de objetos. B - Objetos idênticos (A1 e A2). C - Objetos diferentes (A3 e B).

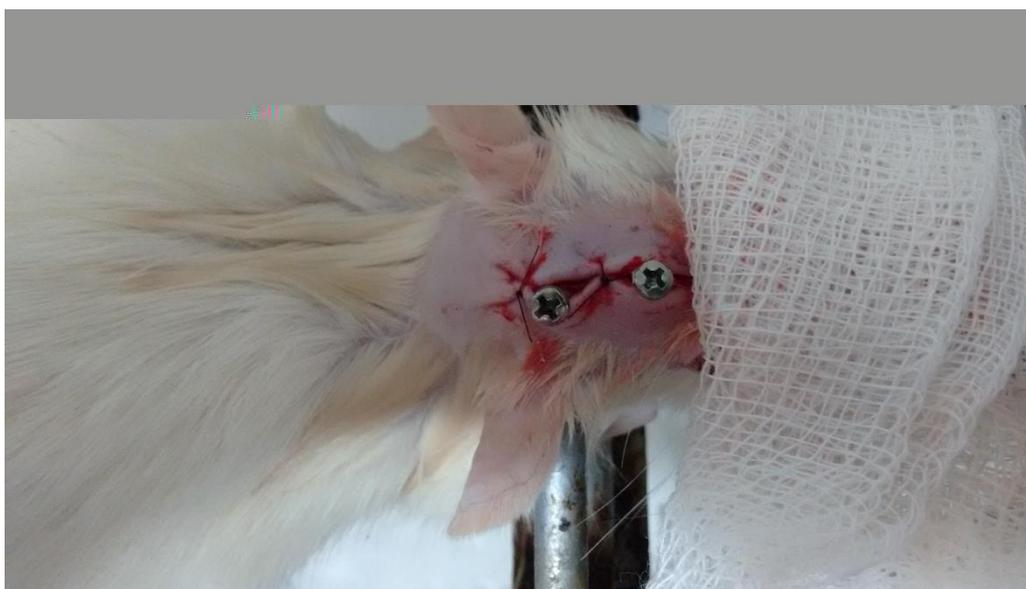
#### 4.10 Implante de eletrodos e registro da atividade elétrica cortical

Aos 70 dias de idade, os animais foram pesados em balança analítica e anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL da solução para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (MASSONI, 2011). A temperatura corporal foi controlada em torno de  $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$  com aquecedor elétrico posicionado sob o animal.

Com a cabeça do animal fixada à base de um estereotáxico, realizou-se uma pequena incisão na pele e foi removido parte do periósteo (Fig. 11). Posteriormente, trepanou-se um orifício circular com aproximadamente 3 mm de diâmetro sobre o hemisfério esquerdo na região parietal no córtex sensorio-motor cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma.

Neste orifício foi posicionado um eletrodo em aço inoxidável e outro eletrodo, do mesmo tipo, foi implantado sobre o osso frontal (eletrodo de referência), numa adaptação para o método descrito por Nascimento et al. (2010).

Aos 80 dias de idade, após cicatrização da ferida cirúrgica, foi feita a aquisição do registro do ECoG. Para cada animal registrou-se 10 a 15 minutos da atividade cerebral com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 pontos por segundo. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday, a qual foi mantida fechada, evitando-se a interferência de estímulos sonoros e luminosos (AGUIAR; PESSOA; NOGUEIRA., 2014).



**Figura 11.** Preparo do animal para registro do ECoG. Fixação da cabeça do animal à base do estereotáxico, incisão da pele e implante dos eletrodos.

#### **4.11 Eutanásia**

Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram anestesiados com associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (MASSONI, 2011). Na sequência os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de exsanguinação por punção cardíaca, com coleta de sangue total para análise do perfil bioquímico sérico dos animais.

Posteriormente, realizou-se a perfusão dos animais com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e com formaldeído a 10% em tampão fosfato (pH 7,4) para coleta dos cérebros, os quais foram submetidos posteriormente ao procedimento histológico.

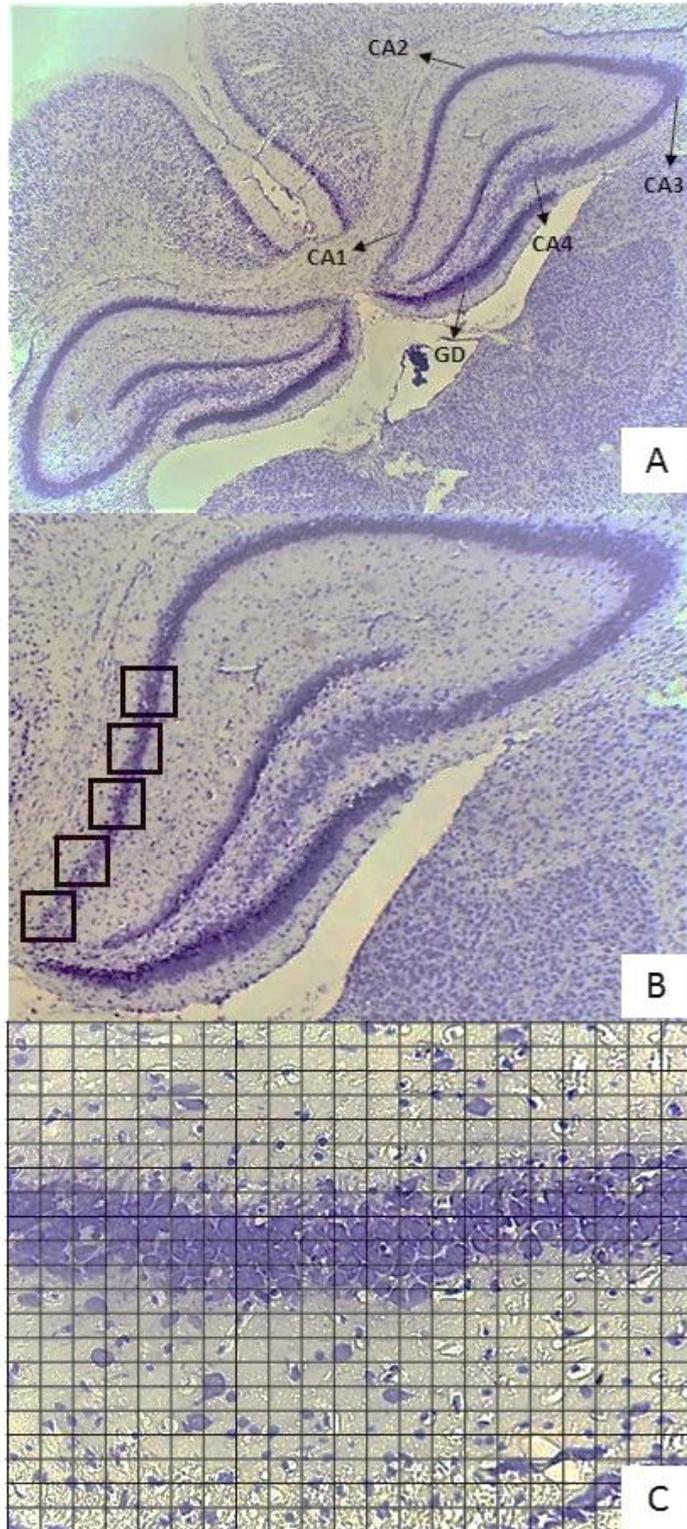
#### **4.12 Análise dos registros de ECoG**

Os registros do ECoG foram segmentados em janelas de dois minutos. Esses segmentos foram importados para o programa Matlab 7.8 (2009) para análise do DFA, da Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), do espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG.

#### **4.13 Análise morfométrica**

Os cérebros foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Secções de 4 $\mu$ m em plano coronal do hipocampo foram obtidas utilizando-se micrótomo rotativo Leica®. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas, corados com Cresil violeta e cobertos com lamínulas de vidro. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em objetiva de 40X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação morfométrica da região CA1 do hipocampo.

Foram delimitadas aleatoriamente quinze áreas em cada corte histológico e com auxílio de uma grade (21 x 21) realizou-se a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo, bilateralmente, obtendo-se a média para cada corte histológico (Fig. 12). Esses dados permitiram conhecer a densidade relativa da área (%) de neurônios na referida região em ratos com idade de trinta e sessenta dias. A densidade de área na região CA1 do hipocampo foi calculada como descrito em Fernandes e Polacow (2005).



**Figura 12.** Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD. B - Região CA1. Os boxes em preto representam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade celular. C - Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais. Cresil violeta: 400X.

#### **4.14 Análise estatística**

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn. Todos os testes foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.1.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABÁSULO, D.; MORGADO DA SILVA, R.; SIMONS, S.; TONONI, G.; CIRELLI, C.; VYAZOVSKIY, V. V. Lempel-Ziv complexity analysis of local field potentials in different coarse-graining techniques. *IFMBE Proceedings*, v. 41, p. 706–709, 2014.
- ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 11, p.180-187, 2001.
- ABOY, M.; HORNERO, R.; ABASOLO, D.; ALVAREZ, D. Interpretation of the Lempel-Ziv Complexity Measure in the Context of Biomedical Signal Analysis. *EEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 53, n. 11, p. 2282-2288, 2006.
- ABRAHAMS, P. *Atlas do corpo Humano: Um Guia Completo do Funcionamento do Corpo*. 1. Ed. Lisboa: Editorial Estampa, 2003.
- AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W.; ALBASSER, M. M. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate- early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, v. 50, n. 13, p. 3141-3155, 2012.
- AGUIAR Jr, A. S.; CASTRO, A. A; MOREIRA, E. L.; GLASER, V.; SANTOS, A. R. S; TASCA, C.I.; LATINI, A.; PREDIGER, R.D.S. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 132, p. 560–567, 2011.
- AGUIAR, L. Á. D. A. *Correlação de longo alcance no eletrocorticograma como um bioindicador de exposição cerebral à radiação ionizante*. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- AGUIAR, L. A. A.; PESSOA, D. T.; NOGUEIRA, R. A. Epilepsy & Behavior NEW roscience 2013-Posters Abstracts. *Epilepsy & Behavior*, v. 38, p. 181, 2014.
- AHMAD, A.; MURTHY, M.; GREINER, R. S.; MORIGUCHI, T.; SALEM, N. A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutritional Neuroscience*, v. 5, n. 2, p. 103-113, 2002.
- AHMED, S. U.; REDDY, K. K.; SWATHY, S. L.; SINGH, S. K.; KANJILAL, S.; PRASAD, R. B. N.; PANDEY, A. Enrichment of  $\gamma$ -linolenic acid in the lipid extracted from *Mucor zychae* MTCC 5420. *Food Research International*, v. 42, p. 449-453, 2009.

ALSINA, B.; VU, T.; COHEN-CORY. S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, v. 4, p. 1093–1101, 2001.

ASTUR, R. S.; TAYLOR, L. B.; MAMELAK, A. N.; PHILPOTT, L.; SUTHERLAND. R. J. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioral Brain Research*, v. 132, p. 77-84, 2002.

AZEVEDO, A. P. *Estudo do sinal eletroencefalográfico (EEG) aplicado a interfaces cérebro computador com uma abordagem de reconhecimento de padrões*. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

BACH, S. A. *A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 altera o perfil lipídico hipocampal e reduz o conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos: implicações sobre a formação da memória aversiva*. 2012. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BAKER, L. D.; FRANK, L. L.; FOSTER-SCHUBERT, K.; GREEN, P. S.; WILKINSON, C. W.; MCTIERNAN, A.; PLYMATE, S. R.; FISHEL, M. A.; STENNIS WATSON, G.; CHOLERTON, B. A.; DUNCAN, G. E.; MEHTA, P. D.; CRAFT, S. Effects of Aerobic Exercise on Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology*, v. 67, p. 71–79, 2010.

BALL, L. J.; BIRGE, S. J. Prevention of brain aging and dementia. *Clinics in Geriatric Medicine*, v. 18, p. 485-503, 2002.

BAZINET, R. P.; LAYE, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, p. 771–785, 2015.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neuroscience exploring the brain*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Diet-Induced Cognitive deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. *Nutrients*, v. 7, p. 6719-6738, 2015.

BELLON, A., ORTIZ-LOPEZ, L., RAMIREZ-RODRIGUEZ, G., ANTON-TAY, F., AND BENITEZKING, G. Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. *Journal of Pineal Research*, v. 42, p. 214–221, 2007.

BENITEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research*, v. 40, p. 1–9, 2006.

BERCHTOLD, N. C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C. W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, v. 167, n. 3, p. 588-597, 2010.

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

BLACKMORE, D. G.; GOLMOHAMMADI, M. G.; LARGE, B.; WATERS, M. J.; RIETZE, R. L. Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. *Stem Cells*, v. 27, p. 2044-2052, 2009.

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

BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; PEREIRA DA SILVA, R.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. *Nutritional Neuroscience*, v. 13, n. 3, 2010.

BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Biossíntese dos ácidos graxos e eicosanóides. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. *Harper Bioquímica Ilustrada*. 27. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

BOURRE, J. M. Brain lipids and ageing. *Food for the Ageing Population*, v. 1, p. 219–251, 2009.

BRAGA, D. K.; OLIVEIRA, F. M.; SILVA, A. C.; SILVA, G.; MURADAS, R. F.; GUSMÃO, L. J. MARTINS, T. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, v. 27, n. 3, p. 275-282, 2007.

BRENNA, J. T. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Maternal & child nutrition*, v. 7, n. 2, p. 59–79, 2011.

BRENNA, J. T.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *Journal of human evolution*, v. 2014, p. 1–8, 2014.

BRENNA, J. T.; SALEM-JÚNIOR, N.; SINCLAIR, A. J.; CUNNANE, S. C. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL. alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in

humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 80, p. 85–91, 2009.

CARPENTIERI, A.; DIAZ DE BARBOSA, G.; ARECOA, V.; LOPEZA, M. P.; TALAMONI, N. T. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, v. 65, p. 437-444, 2012.

CARR, M. F.; FRANK, L. M. A single microcircuit with multiple functions: state dependent information processing in the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 22, n. 4, p. 704-708, 2012.

CHADDOCK, L.; PONTIFEX, M. B.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F. A review of the relation of aerobic fitness and physical activity to brain structure and function in children. *Journal of the International Neuropsychological Society*, v. 17, p. 975-985, 2011.

CHALON, S.; VANCASSEL, S.; ZIMMER, L.; GUILLOTEAU, D.; DURAND, G. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*, v. 36, p. 937- 944, 2001.

CHANG, Y. K; LABBAN, J. D.; GAPIN, J.; ETNIER, J. The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. *Brain Research*, v. 1453, n. 250, p. 87-101, 2012.

CHATTORAJ, A.; LIU, T.; ZHANG, L. S.; HUANG, Z.; BORJIGIN, J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 10, n. 4, p. 237-43, 2009.

CHEN, W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W. J. Role of physical exercise in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, v. 4, p. 403–407, 2016.

CHEN, Z.; RESNIK, E.; MCFARLAND, J. M.; SAKMANN, B.; MEHTA, M. R. Speed Controls the Amplitude and Timing of the Hippocampal Gamma Rhythm. *PLOS One*, v. 6, p. e21408, 2011.

CHERUBINI, E.; MILES, R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neurociensce*, v. 9, p. 19, 2015.

CHRISTIE, B. R.; EADIE, B. D.; KANNAGARA, T. S.; ROBILLARD, J. M.; SHIN, J.; TITTERNESS, A. K. Exercing our brains: how physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Neuromolecular Med*, v. 10, p. 47-58, 2008.

CHUNG, J. W.; NOH, E. J.; ZHAO, H. L.; SIM, J. S.; HÁ, Y. W.; SHIN, E. M.; LEE, E. B.; CHEONG, C. S.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory activity of prosapogenin methyl ester

of platycodin D via nuclear factor-kappaB pathway inhibition. *Biological and Pharmacological Bulletin*, v. 31, n. 11, p. 2114-2120, 2008.

CHU, J.; TU, Y.; CHEN, J.; TAN, D.; LIU, X.; PI, R. Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 420, p. 169–179, 2016.

CLARCK, P. J.; BRZEZINSKA, W. J.; PUCHALSKI, E. K.; KRONE, A. D.; RHODES, J. S. Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus*, v. 19, p. 937-950, 2009.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 7, p.171S-5S, 2000.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. *A célula: Uma abordagem molecular*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CORRÊA, A. P. A. *Fracionamento de óleo de peixe com dióxido de carbono supercrítico*. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSAR, M.; SONGUR, A.; SAHIN, O.; UZ, E.; YILMAZ, R.; YAGMURCA, M.; OZEN, O. A. The neuroprotective effect of fish n-3 fatty acids in the hippocampus of diabetic rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 11, p. 161-167, 2008.

COSTA, E. J.; SHIDA, C. S.; BIAGGI, M. H.; ITO, A. S.; LAMY-FREUND, M. T. How melatonin interacts with lipid bilayer: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Letters*, v. 416, p. 103-106, 1997.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Neuroscience*, v. 25, p. 295-301, 2002.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Physical activity and the maintenance of cognition: learn from animal models. *Alzheimer's & Dementia*, v. 3, p. 30-37, 2007.

CREER, D. J.; ROMBERG, C.; SAKSIDA, L. M.; VAN PRAAG, H.; BUSSEY, T. J. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, p. 2367–2372, 2010.

CRUPI, R.; MARINO, A.; CUZZOCREA, S. N-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. *Current medicinal chemistry*, v. 20, n. 24, p. 2953–63, 2013.

CRUPI, R.; MAZZON, E.; MARINO, A.; LA SPADA, G.; BRAMANTI, P.; SPINA, E.; CUZZOCREA, S. Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. *Journal of Pineal Research*, v. 51, p. 353–360, 2011.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; BORGES, M. C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 13, n. 5, 2007.

CUNNANE, S. C.; PLOURDE, M.; PIFFERI, F.; BARBERGER-GATEAU, P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research*, v. 48, n. 5, p. 239–256, 2009.

DECIMO, I.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; FUMAGALLI, G. Neural stem cell niches in health and diseases. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, p. 1755–1783, 2012.

DEMIRAKCA, T.; BRUSNIAK, W.; TUNC-SKARKA, N.; WOLF, I.; MEIER, S.; MATTHÄUS, F.; ENDE, G.; SCHULZE, T. G.; DIENER, C. Does body shaping influence brain shape? Habitual Physical activity is linked to brain morphology independent of age. *World Journal of Biological Psychiatry*, v. 15, p. 387-396, 2014.

DING, Y.; LI, J.; LUAN, X.; DING, Y. H.; LAI, Q.; RAFOLS, J. A.; PHILLIS, J. W.; CLARCK, J. C.; DIAZ, F. G. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neutrophin. *Neuroscience*, v. 124, n. 3, p. 583-591, 2004.

DROGE, W. Oxidative stress and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 543, p. 191-200, 2003.

EHNINGER, D.; KEMPERMANN, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, v. 331, p. 243–250, 2008.

EMKEN, E. A.; ADLOF, R. O.; GULLEY, R. M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1213, n. 3, p. 277-88, 1994.

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

ERDOGAN, H.; FADILLIOGLU, E.; OZGOCMEN, S.; SOGUT, S.; OZYURT, B.; AKYOL, O.; ARDICOGLU, O. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, v. 71, p. 148-152, 2004.

ERNST, C.; OLSON, A. K.; PINEL, J. P.; LAM, R. W.; CHRISTIE, B. R. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 31, p. 84-92, 2006.

FABEL, K.; KEMPERMANN, G. Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Medicine*, v. 10, p. 59-66, 2008.

FAROOQUI, A. A. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling and association with neurological disorders. *Neuroscientist*, v. 4, p. 392-407, 2009.

FAROOQUI, A. A.; ONG, W-Y.; HORROCKS, L. A.; CHENC, P.; FARROQUI, T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: The battle of the titans. *Brain Research Review*, v.56, p. 443-471, 2007.

FERNANDES, F. S. *A semente de linhaça (Linum usitatissimum) como fonte de ácido graxo omega-3 durante a gestação, lactação e crescimento no desenvolvimento cognitivo de ratos*. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FERNANDES, K.; POLACOW, M. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v. 9, n. 2, p. 235–241, 2005.

FERREIRA, M. T. *Métodos lineares e não-lineares de análise de séries temporais e sua aplicação no estudo da variabilidade da frequência cardíaca de jovens saudáveis*. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biometria) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual de Paulista, São Paulo.

FIRLAĞ, M.; KAMASZEWSKI, M.; GACA, K.; ADAMEK, D.; BAŁASIŃSKA, B. The neuroprotective effect of long-term n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in the cerebral cortex and hippocampus of aging rats. *Folia Neuropathology*, v. 51, n. 3, p. 235-242, 2013.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVI, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, v. 18, p. 499-502, 1972.

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

FUSS, J.; BEM ABDALLAH, N. M.; HENSLEY, F. W.; WEBER, K. J.; HELLWEG, R.; GASS, P. Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. *PloS One*, v. 5, n. e12769, 2010.

FUSS, J.; BIEDERMANN, S. V.; FALFÁN-MELGOZA, C.; AUER, M. K.; ZHENG, L.; STEINLE, J.; HÖRNER, F.; SARTORIUS, A.; ENDE, G.; WEBER-FAHR, W.; GASS, P. Exercise boosts hippocampal volume by preventing early age-related gray matter loss. *Hippocampus*, v. 24, p. 131-134, 2014.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Color textbook of histology*. 3. ed. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2007.

GLASPER, E. R.; LLORENS-MARTIN, M. V.; LEUNER, B.; GOULD, E.; TREJO, J. L. Blockade of insulin-like growth factor-I has complex effects on structural plasticity in the hippocampus. *Hippocampus*, v. 20, p. 706–712, 2010.

GOLDBERGER, A. L.; AMARAL, L. A.; HAUSDORFF, J. M.; IVANOV, P. C.; PENG, C. K.; STANLEY, H. E. Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.1, p.2466-72, 2002.

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

GRIESBACH, G. G.; GOMEZ-PINILHA, F.; HOVDA, D. A. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *Journal of Neurotrauma*, v. 24, p. 1161-1171, 2007.

GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*, v. 93, n. 1, p. 7–12, 2011.

HAAG, M. Essential Fatty Acids and the Brain. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 48, p.195-203, 2003.

HAINES, D. Biologia celular dos neurônios e da glia. In: \_\_\_\_\_. *Neurociência Fundamental para aplicações básicas e clínicas*. 3. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 17–39.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4. Ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HILL, N. J.; GUPTA, D.; BRUNNER, P.; GUNDUZ, A.; ADAMO, M.A.; RITACCIO, A.; SCHALK, G. Recording Human Electrocorticographic (ECoG) Signals for Neuroscientific Research and Real-time Functional Cortical Mapping. *Journal of Visualized Experiments*, v. 64, e3993, 2012.

HOBBELN, J. R.; SALEM JÚNIOR, N. Omega-3 Fatty Acids and Psychiatric Disorders: Current Status of the field. *Fatty acids: physiological and behavioral functions*, p. 311-330, 2001.

HOPKINS, M. E.; NITECKI, R.; BUCCI, D. J. Physical exercise during adolescence adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, v. 194, p. 84-94, 2011.

HOQUE; A.; MONDAL, S. Acute aerobic exercise effects on brain wave pattern of player and non- player: A pilot study. *International Journal of Physical Education, Sports and Health*, v. 1, n. 4, p. 54 – 56, 2015.

HUANG, R.; DU, S.; CHEN, Z.; SHOU, Y. Study on nonlinear dynamic characteristic indexes of epileptic electroencephalography and electroencephalography subbands. *Journal of biomedical engineering*, v. 31, n. 1, p. 18–22, 2014.

HU, K.; IVANOV, P.; CHEN, Z.; CARPENA, P, STANLEY, H. E. Effects of trends on detrended fluctuation analysis. *Physic Letters A*, v. 329, p. 130-135, 2004.

INNIS, S. M.; FRIESEN, R. W.; Essential n-3 fatty acids among pregnant women and early visual maturation in term infants. *Americam Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, p. 548-557, 2008.

INNIS, S. M. Omega-3 Fatty Acids and Neural Development to 2 Years of Age: Do We Know Enough for Dietary recommendations? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, v. 48, p. S16–S24, 2009.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long chain polyunsaturated fatty acids. *Jounal Pediatric*, v. 143, p. 1–8, 2003.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica: texto e atlas*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANNAGARA, T. S.; WEBBER, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. Stress Differentially regulates the effects of voluntary exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of mice. *Hypocampus*, v. 19, p. 889-897, 2009.

KARLSSON, M. P.; FRANK, L. M. Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. *Journal Neuroscience*, v. 28, n. 52, p. 14271-14281, 2008.

KIM, D. H.; KIM, T. W.; KIM, S. E.; SHIN, M. S.; KIM, K. M.; BAEK, S. S. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis. *Physiology Behavior*, v. 101, n. 5, p. 660-665, 2010.

KODAS, E.; GALINEAU, L.; BODARD, S.; VANCASSEL, S.; GULLOTEAU, D.; BESNARD, J. C.; CHALON, S. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, p. 695-702, 2004.

KONG, X.; LI, X. CAI, Z.; YANG, N.; LIU, Y.; SHU, J.; PAN, L.; ZUO, P. Melatonin Regulates the Viability and Differentiation of Rat Midbrain Neural Stem Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 28, n.4, p. 569–579, 2008.

KRAMER, A. F.; COLCOMBE, S. J.; MCAULEY, E.; SCALF, P. E.; ERICKSON, K. L. Fitness, aging and neurocognitive function. *Neurobiology of Aging*, v. 26, n. 1; p. 124-127, 2005.

KUNICKI, A. C. B. *Dinâmica do sistema córtico-hipocampal durante o condicionamento contextual de medo*. 2011. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Paulo.

LANGSTON, R. F.; STEVENSON, C. H.; WILSON, C. L.; SAUNDERS, I.; WOOD, E. R. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural Brain Research*, v. 215, p. 275-291, 2010.

LEE, H.; KIM, H.; LEE, J.; KIM, Y.; YANG, H.; CHANG, H.; LEE, T.; SHIN, M.; LEE, M.; SHIN, M. S.; PARK, S.; BAEK, S.; KIM, C. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain & Development*, v. 18, p. 147-154, 2006.

LEMPEL, A.; ZIV, J. On the complexity of finite sequences. *IEEE Transactions on Information Theory*, v. 22, n. 1, p. 75–81, 1976.

LEON, J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of Pineal Research*, v. 38, p. 1-9, 2005.

LENT, R. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência*. 2. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

LENZI, A.; TELES, B.; GUZMÁN, S. Influence of omega-3 fatty acids from the flaxseed (*Linum usitatissimum*) on the brain development of newborn rats. *Nutricion Hospitalaria: Organo de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, v. 26, n. 5, p. 991–996, 2011.

LIANG, Z.; WANG, Y.; REN, Y.; LI, D.; VOSS, L.; JAMIE, S.; XIAOLI, S. Detection of burst suppression patterns in EEG using recurrence rate. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 295070, 2014.

LIM, G. P.; CALON, F.; MORIHARA, T.; YANG, F.; TETER, B.; UBEDA, O.; SALEM, N.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 12, p. 3032-3040, 2005.

LISTA, I.; SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 30, p. 493-503, 2010.

LOGAN, A. C. Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. *Alternative Medicine Review*, v. 8, n. 4, p. 410-425, 2003.

LOPEZ, A.; GARCIA, J.A.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, L.C.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *Journal of Pineal Research*, v. 46, p. 188-198, 2009.

LUKW, W. J.; GUI, J. G.; MARCHESELLI, V. L.; BODKER, M.; BOTKJAER, A.; GOTLINGER, K.; SERHAN, C. N.; BAZAN, N. G. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 2774-2783, 2002.

MACHADO, B. S.; KUNICK, A. C. B.; MORYA, E.; SAMESHIMA, K. Spectral characteristics of the hippocampal LFP during contextual fear conditioning. *Einstein*, v. 10, n. 2, p. 140-4, 2012.

MACIVER, M. B.; BLAND, B. H. Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 8, p. 203, 2014.

MADORE, C.; NADJAR, A.; DELPECH, J. C.; SERE, A.; AUBERT, A.; PORTAL, C.; JOFFRE, C.; LAYE, S. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain, Behaviour and Immunity*, v. 41, p. 22-31, 2014.

MANDA, K.; REITER, R. J. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Process in Neurobiology*, v. 90, p. 60-68, 2010.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINEZ, G. R.; ALMEIDA, E. A.; KLITZKE, C. F.; ONUKI, J.; PRADO, F. M.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. Measurement of melatonin and its metabolites:

importance for the evaluation of their biological roles. *Endocrine*, v. 27, p. 111-118, 2005.

MASSONI, F. *Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, p. 911-922, 2001.

MATOS, R. A. *Efeitos da melatonina pineal sobre a neurogênese de ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio*. 2014. 22 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; LOPOZ-BURILLO, S.; REITER, R. J. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*, v. 37, p. 543-553, 2003.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 12, p. 1909-1917, 2004.

MENDES, C. C. S. *Influência da atividade mastigatória e do ambiente sobre o aprendizado espacial e o padrão da atividade exploratória em modelo murino senil*. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.

MORENO, C.; MACÍAS, A.; PRIETO, A.; CRUZ, A.; GONZÁLEZ, T.; VALENZUELA, C. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels. *Frontiers in Physiology*, v. 3, p. 245, 2012.

MORENO, J. A.; DEL CASTILLO OBESO, M.; PENA, L. *Manual de actividades acuáticas: para bebés y niños de hasta seis años*. Barcelona: Paidós Iberica, 2004.

NALIWAIKO, K. *Suplementação crônica com óleo de peixe. Alterações morfológicas e bioquímicas no hipocampo de ratos wistar podem explicar o efeito antidepressivo do óleo de peixe?* 2009. 81 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NASCIMENTO, R. S.; ARAÚJO, L. H. G. D.; MORAES, R. B.; BARBOSA, C. T. F.; GUEDES, R. C. A.; NOGUEIRA, R. A.; STOSIC, T. Analysis of signal fluctuations of Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. v.389, n.9, p.1869–1873, 2010.

PAN, C. P.; ZHENG, B.; WU, Y. Z.; WANG, Y.; TANG, X. W. Detrended fluctuation analysis of human brain electroencephalogram. *Physics Letters A*, v. 329, p. 130-135, 2004.

PAREDES, M.; SORRELLS, S.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; AND ALVAREZ-BUYLLA, A. Brain size and limits to adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, v. 524, p. 646–664, 2016.

PENG, C. K.; BULDYREV, S. A.; HAVLIN, S.; SIMONS, M.; STANLEY, H. E.; GOLBERGER, A. L. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical Review Letters*, v. 49, p. 1685-1689, 1994.

PENG, C. K.; HAVLIN, S.; STANLEY, H. E.; GOLDBERGER, A. L. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*, v. 5, p. 82– 87, 1995.

PEREIRA, A. C.; HUDDLESTON, D. E.; BRICKMAN, A. M.; SOSUNOV, A. A.; HEN, R.; MCKHAN, G. M.; SLOAN, R.; GAGE, F. H.; BROWN, T. R.; SMALL, S. A. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 5638-5643, 2007.

PEYROT, F.; DUCROIG, C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Pineal Research*, v. 45, p. 235-246, 2008.

PIAZZA, F. V.; PINTO, G. V.; TROTT, G.; MARCUZZO, S.; GOMEZ, R.; FERNANDES, M. C. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, v. 217, p. 16-20, 2010.

PIETRELLI, A.; LOPEZ-COSTA, J.; GONI, R.; BRUSCO, A.; BASSO, N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*, v. 202, p. 252-266, 2012.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International*, v. 38, p. 17-23, 2001.

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

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; KLEMPI, F.; BABU, H.; KING, G. B.; KEMPERMANN, G. Melatonin modulates cell survival of neww neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, p. 2180-2191, 2009.

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; ORTIZ-LOPEZ, L.; DOMINGUEZ-ALONSO, A.; BENITEZ-KING, G. A.; KEMPERMANN, G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Journal of Pineal Research*, v. 50, p. 29–37, 2011.

RAO, J. S.; ERTLEY, R. N.; LEE, H. J.; DEMAR JUNIOR, J. C.; ARNOLD, J. T., RAPOPPORT, S. I.; BAZINET, R. P. N-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal córtex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism, *Molecular Psychiatry*, v. 12, p. 36-46, 2007.

RAPOPORT, S. I.; IGARASHI, M.; GAO, F. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 82, p. 273–276, 2010.

REBRIN, I.; ZICKER, S.; WEDEKIND, K. J.; PAETAU-ROBINSON, I.; PACKER, L.; SOHAL, R. S. Effect of antioxidant- enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 39, p. 549-557, 2005.

REDINS, G. M.; REDINS, C. A.; NOVAES, J. C. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. *Brazilian Journal Biology*, v. 61, n. 4, p. 679-684, 2000.

REITER, R. J.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Current Neuropharmacology*, v. 8, p. 194–210, 2010.

RENNIE, K.; DE BUTTE, M.; PAPPAS, B. A. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research*, v. 47, n. 4, p. 313-317, 2009.

SAAD, P. C. B.; GUIMARÃES, A.; DAL PAI, V.; KROLL, L. B. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 8, n. 4, 2002.

SALEM, N.; WEGHER, B.; MENA, P.; AND UAUY, R. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, p. 49-4, 1996.

SALVADOR, H.; HENRIQUES, J. A. P. *Radicais livres e a resposta celular ao Estresse oxidativo*. 1. Ed. Canoas: Editora da Ulbra, 2004.

SANCHEZ-HIDALGO, M.; LU, Z.; TAN, D. X. Melatonin inhibits fatty acid induced triglyceride accumulation in ROS 17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 292, p. 2208-2215, 2007.

SANTOS, F. V. *Avaliação comportamental e bioquímica dos efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 e do exercício físico não voluntário em ratos wistar*. 2014. 96 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Universidade Federal do Ceará, Curitiba.

SARLAK, G.; JENWITHEESUK, A.; CHETSAWANG, B.; GOVITRAPONG, P. Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. *Journal of Pharmacological Sciences*. v. 123, p. 9–24, 2013.

SAVI, M. A. Chaos and Order in Biomedical Rhythms. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, n. 2, p. 157-169, 2005.

SAVI, M. A. *Dinâmica não-linear e caos*. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. p. 304.

SCHNEIDER, C. D.; BARP, J.; RIBEIRO, J. L.; BELLÓ-KLEIN, A.; OLIVEIRA, A. R. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol*, v. 30, p. 6, p. 723-34, 2005.

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. Encéfalo e nervos cranianos. In: SEELEY, R. *Anatomia & Fisiologia*. 6. Ed. Loures: Lusociência, 2003. p. 443–473.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, v. 510, p. 92-101, 2014.

SHARMA, S.; RAKOKZI, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, v. 87, p. 521-536, 2010.

SHERWOOD, C. H. C.; GORDON, A. D.; ALLEN, J. S.; PHILLIPS, A. K.; ERWIN, J. M.; HOF, P. R.; HOPKINS, W. D. Aging of the cerebral cortex differs between humans and chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 13029-13034, 2011.

SMALL, A. S.; CHAWLA, K. M.; BUONOCORE, M.; RAPP, P. R.; BARNES, A. C. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 7181-7186, 2004.

SMAOUI, M.; KOUBAA, N.; HAMMAMI, S.; ABID, N.; FEKI, M.; CHAABA, R.; ATTIA, N.; ABID, M.; HAMMAMI, M. Association between dietary fat and antioxidant status of Tunisian type 2 diabetic patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, v. 74, p. 323-329, 2006.

SOTTHIBUNDHU, A.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; GOVITRAPONG, P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *Journal of Pineal Research*, v. 49, n. 3, p. 291-300, 2010.

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

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. *Neuropsychology review*, v. 20, n. 4, p. 327 – 348, 2010.

SOYA, H.; OKAMOTO, M.; MATSUI, T.; LEE, M.; INOUE, K.; NISHIKAWA, S.; SOYA, S.; FUJIKAWA, T.; RANDEEP, R.; CHANG, H.; NISHIJIMA, T. Brain Activation via Exercise: Exercise conditions leading to neuronal activation & hippocampal neurogenesis. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, v. 15, n. 1, p. 1 - 10, 2011.

STONEHOUSE, W. Does Consumption of LC Omega-3 PUFA Enhance Cognitive Performance in Healthy School-Aged Children and throughout Adulthood? Evidence from Clinical Trials. *Nutrients*, v. 6, n. 7, p. 2730–2758, 2014.

STRANAHAN, A. M.; LEE, K.; BECKER, K. G.; ZHANG, Y.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B.; CUTLER, R. G.; MATTSON, M. P. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of aging memory by running in aged mice. *Neurobiology of Aging*, v.31, p. 1937-1949, 2008.

SUBRAMANIAN, P.; MIRUNALINI, S.; PANDIPERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; CARDINALI, D. P. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 571, p. 116-119, 2007.

SWINGLER, D. Omega-3 fatty acids and mood Rhodes University, South Africa Abstracts. *Journal of Affective Disorders*, v. 107, p. S21–S52, 2008.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; ESTEBAN-ZUBERO, E.; ZHOU, Z.; REITER, R. J. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules*, v. 20, p. 18886–18906, 2015.

TAN, D. X. Melatonin and brain. *Current Neuropharmacology*, v. 8, n. 3, p. 161, 2010.

TAVAZZI, L.; MAGGIONI, A. P.; MARCHIOLI, R.; BARLERA, S.; FRANZOSI, M. G.; LATINI, R.; LUCCI, D.; NICOLOSI, G. L.; PORCU, M.; TOGNONI, G.; GISSI, H. F.

Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. V. 372, p. 1223–1230, 2008.

TOCHARUS, C.; PURIBORIBOON, Y.; JUNMANEE, T.; TOCHARUS, J.; EKTHUWAPRANEE, K.; GOVITRAPONG, P. Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation via ERK signaling pathway through melatonin receptor. *Neuroscience*, v. 275, p. 314–321, 2014.

TONG, L.; SHEN, H.; PERREAU, V. M.; BALAZS, R.; COTMAN, C. W. Effects of exercise on gene – expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiology of disease*, v. 6, n. 8, 1046-1056, 2001.

TORTORA, G. J.; DERRYCKSON, B. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 14<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

TUNEZ, I.; MONTILLA, P.; DEL CARMEN MUNOZ, M.; FEIJOO, M.; SALCEDO, M. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *Journal of Pineal Research*, v. 37, p. 252-256, 2007.

TUZUN, F.; KUMRAL, A.; OZBAL, S.; DILEK, M.; TUGYAN, K.; DUMAN, N.; OZKAN, H. Maternal prenatal omega-3 fatty acid supplementation attenuates hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, v. 30, n. 4, p. 315–23, jun. 2012.

UAUY, R.; CASTILLO, C. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *Journal of Nutrition*, v. 133, n. 9, p. 2962S-2972S, 2003.

VAN ELST, K.; BRUINING, H.; BIRTOLI, B.; TERREAUX, C.; BUITELAAR, J. K.; KAS, M. J. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 45, p. 369–378, 2014.

VAN DER BORGHT, K.; KOBOR-NYAKAS, D. E.; KLAUKE, K.; EGGEN, B. J. L.; NYAKAS, C.; VAN DER ZEE, E. A.; MEERLO, P. Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus*, v. 19, p. 928-936, 2009.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Medicine*, v. 10, p. 128 – 140, 2008.

WANG, X.; MENG, J.; TAN, G.; ZOU, L. Research on the relation of EEG signal chaos characteristics with high-level intelligence activity of human brain. *Nonlinear biomedical physics*, v. 4, n. 1, p. 2, 2010.

WEBSTER, J. G. *Medical Instrumentation: Application and Design*. 4. ed. John Wiley & Sons, 2010.

WELCH, P. D. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms. *IEEE Transactions on Information Theory*, v. 15, n. 2, p. 70–73, 1967.

WILLIAMS, C. M.; BURDGE, G. C. Long-chain n-3 PUFA: plant v marine sources. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 65, p. 42–50, 2006.

YAMAGISHI, K.; ISSO, H.; DATE, C.; FUKUI, M.; WAKAI, K.; KIKUCHI, S.; INABA, Y.; TANABE, N.; TAMAKOSHI, A. Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 52, n. 12, p. 988-996, 2008.

YAMASHIMA, T. A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Progress in neurobiology*, v. 84, n. 2, p. 105-115, 2008.

YANG, R. H.; WANG, F.; HOU, X. H.; CAO, Z. P.; WANG, B.; XU, X. N.; HU, S. J. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids improves learning performance of diabetic rats by regulating the neuron excitability, *Neuroscience*, v. 212, p. 93-103, 2012.

YAVIN, E.; HIMOVICHI, E.; EILAM, R. Delayed cell migration in the developing rat brain following maternal omega-3 alpha linolenic acid dietary deficiency. *Neuroscience*, v. 162, p. 1011–1022, 2009.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, v. 18, n. 45, p. 383-399, 2000.

ZHANG, X. J.; LIU, L. L.; JIANG, S. X.; ZHONG, Y. M.; YANG, X. L. Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*, v. 177, p. 12–22, 2011.

ZHAO, C.; TENG, E. M.; SUMMERS, R. G. JR.; MING, G. L.; AND GAGE, F. H. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 3–11, 2006.

# Artigo I

**Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado sobre peso corporal, parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória em ratos Wistar**

**Effects of omega-3 supplementation and melatonin associated with physical exercise on biochemical parameters, hippocampus morphometry and memory in Wistar rats**

Artigo redigido de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado sobre peso corporal, parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória em ratos Wistar

Danielle D. Pereira<sup>2</sup>, Jeine E. S. Silva<sup>2</sup> e Joaquim Evêncio-Neto<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**-Pereira D.D., Silva J.E.S. & Evêncio-Neto J. 2017. [Effects of omega-3 supplementation and melatonin associated with physical exercise on biochemical parameters, hippocampus morphometry and memory in Wistar rats] Efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico sobre parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória em ratos Wistar. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-000, Brazil. E-mail: [evencioneto@bol.com.br](mailto:evencioneto@bol.com.br)

The aim of this paper was to evaluate body weight, biochemical parameters, hippocampal morphometry and memory of Wistar rats submitted to omega-3 supplementation and melatonin associated with physical exercise. Rats (*Rattus norvegicus*) were used, which were divided into eight experimental groups (n= 5 animals/ group) according to the treatment: A - omega- 3; B - melatonin; C - physical exercise; D - omega-3 and melatonin; E - omega-3 and exercise; F- melatonin and exercise; G-omega-3, melatonin and exercise; H - control. The protocols were started from 60 days of age and continued until weaning from offspring (165 days of age). The offspring (n = 10 males / group) were submitted to the same protocol from their respective matrices from weaning to 60 days of age. The body mass in M30 of the animals of group B (42,47 g ± 1,23) was lower than the body mass of groups A (72,71 g ± 3,06), C (71,14 g ± 2,52), D (66,69 g ± 1,88), E (53,91 g ± 0,87), F (67,18 g ± 3,02), G (62,00 g ± 5,02) and H (58,18 g ± 2,62). At 60 days postnatal (M60) groups A (198,4 g ± 4,15), B (213,3 g ± 3,63) and C (208,8 g ± 6,11) presented higher body weight than the F (161,5 g ± 6,37) and H (151,8 g ± 4,80) groups, the G group (172,4 g ± 6,42) had lower mean values than the B group. As for serum biochemistry, the evaluation performed at 30 days of Age of offspring showed that VLDL (79,08 mg/dL ± 12,89) and triglyceride (395,4 mg/dL ± 64,43) in group F were higher than VLDL (30,44 mg/dL ± 3.34) and triglyceride (152,2 mg/dL ± 16,9) in group B. At 60 days the HDL levels of group F (77,13 mg/dL ± 13,32) were higher when compared to group D (25,98 mg/dL ± 2,51). For VLDL and Triglyceride, group F presented a mean VLDL value of 56,00 mg/dL ± 4,40 and Triglyceride of 280,00 mg/dL ± 22,00, while E presented a mean of 31,49 mg/dL ± 4,74 for VLDL and 157,4 mg/dL ± 23,68 for triglyceride, and D presented 27,12 mg/dL ± 1,78 for VLDL and of 135,6 mg/dL ± 8,90 for Triglyceride level. About in relation to glycemia, groups A (39,20 mg/dL ± 14,39), C (39,40 mg/dL ± 9,14) and F (20,60 mg/dL ± 4,57) showed different when compared to the H group (155,6 mg/dL ± 16,80), and D group (248,2 mg/dL ± 24,48) differed from the A (39,20 mg/dL ± 14,39), B (95,60 mg/dL ± 14,39), C (39,40 mg/dL ± 9,14), E (131,4 mg/dL ± 28,95), F (20,60 mg/dL ± 4,57) and G (40,75 mg/dL ± 9,30). There was also a significant difference between group E and F. Regarding hippocampal morphometry in M30, only group D (24,24% ± 1,31) differed from groups A (19,68% ± 1,03) and G (19,00% ± 0,45), presenting a higher neuronal density. In M60, group B (22,63% ± 0,34) presented a higher number of neurons than groups A (19,68% ± 1,03), C (15,61% ± 0,58), E (20,50% ± 0,43), F (19,91% ± 0,42) and H (16,97% ± 0,40). Already in group C neuronal reduction in relation to groups A, D (23,22% ± 0,46), E, F and G (21,14% ± 0,35). When group D was observed, Greater number of neurons than groups A, E, F and H. Finally, groups A, E, F and G showed higher neuronal density when compared to group H. For the recognition test there was no difference between the evaluated treatments at 30 and 60 days of age.

INDEX TERMS: Exercise, hippocampus, melatonin, memory, omega-3.

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [evencioneto@bol.com.br](mailto:evencioneto@bol.com.br)

**RESUMO.**-O objetivo deste trabalho foi avaliar peso corporal, parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória de ratos Wistar submetidos à suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico. Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*), as quais foram divididas em oito grupos experimentais (n= 5 animais/ grupo) de acordo com o tratamento: A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Os protocolos foram iniciados a partir dos 60 dias de idade e prosseguiu até o desmame da prole (165 dias de idade). A prole (n = 10 machos/ grupo) foi submetida ao mesmo protocolo das respectivas matrizes desde o desmame até os 60 dias de idade. A massa corporal aos 30 dias pós-natal (M30) dos animais do grupo B (42,47 g ± 1,23) apresentou-se menor do que a

massa corporal dos grupos A (72,71 g ± 3,06), C (71,14 g ± 2,52), D (66,69 g ± 1,88), E (53,91 g ± 0,87), F (67,18 g ± 3,02), G (62,00 g ± 5,02) e H (58,18 g ± 2,62). Aos 60 dias pós-natal (M60) os grupos A (198,4 g ± 4,15), B (213,3 g ± 3,63) e C (208,8 g ± 6,11) apresentaram peso corporal maior do que os grupos F (161,5 g ± 6,37) e H (151,8 g ± 4,80), o grupo G (172,4 g ± 6,42) apresentou média menor em relação ao grupo B. Quanto à bioquímica sérica, a avaliação realizada aos 30 dias de idade da prole mostrou que o VLDL (79,08 mg/dL ± 12,89) e o triglicérido (395,4 mg/dL ± 64,43) do grupo F foi superior aos valores de VLDL (30,44 mg/dL ± 3,34) e triglicérido (152,2 mg/dL ± 16,9) do grupo B. Aos 60 dias os níveis de HDL do grupo F (77,13 g ± 13,32) foram superiores quando comparado ao grupo D (25,98 g ± 2,51). Para o VLDL e Triglicérido, o grupo F apresentou valor médio de VLDL de 56,00 mg/dL ± 4,40 e de Triglicérido de 280,00 mg/dL ± 22,00, enquanto que E apresentou média de 31,49 mg/dL ± 4,74 para VLDL e 157,4 mg/dL ± 23,68 para triglicérido, e D apresentou VLDL de 27,12 mg/dL ± 1,78 e triglicérido de 135,6 mg/dL ± 8,90. Em relação à glicemia, os grupos A (39,20 mg/dL ± 14,39), C (39,40 mg/dL ± 9,14) e F (20,60 mg/dL ± 4,57) mostraram-se diferentes quando comparados ao grupo H (155,6 mg/dL ± 16,80), e o grupo D (248,2 mg/dL ± 24,48) diferiu dos grupos A (39,20 mg/dL ± 14,39), B (95,60 mg/dL ± 14,39), C (39,40 mg/dL ± 9,14), E (131,4 mg/dL ± 28,95), F (20,60 mg/dL ± 4,57) e G (40,75 mg/dL ± 9,30). Houve ainda diferença significativa entre o grupo E e o grupo F. Em relação à morfometria do hipocampo em M30, apenas o grupo D (24,24% ± 1,31) diferiu dos grupos A (19,68% ± 1,03) e G (19,00% ± 0,45), apresentando uma maior densidade neuronal. Em M60 o grupo B (22,63% ± 0,34) apresentou número de neurônios superior aos grupos A (19,68% ± 1,03), C (15,61% ± 0,58), E (20,50% ± 0,43), F (19,91% ± 0,42) e H (16,97% ± 0,40). Já no grupo C houve redução neuronal em relação aos grupos A, D (23,22% ± 0,46), E, F e G (21,14% ± 0,35). Quando observado o grupo D, este apresentou maior número de neurônios do que os grupos A, E, F e H. Por fim, os grupos A, E, F e G apresentaram maior densidade neuronal quando comparados ao grupo H. Para o teste de reconhecimento não houve diferença entre os tratamentos avaliados aos 30 e 60 dias de idade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Exercício físico, hipocampo, melatonina, memória, ômega-3.

## INTRODUÇÃO

No período perinatal, processos fisiológicos como hiperplasia, hipertrofia, mielinização e migração neuronal ocorrem com velocidade máxima (Batista de Oliveira et al. 2012). Observa-se um rápido desenvolvimento e o cérebro se torna mais vulnerável às demandas do ambiente (Rocha de Melo et al. 2006). O nível de neurogênese em indivíduos adultos também é positiva e negativamente modulado pelas condições ambientais (Ming & Song 2005). A combinação de vários estímulos pode aumentar a neurogênese e a sobrevivência dos neurônios (Schaeffers 2013).

A capacidade de neurogênese é um importante aspecto para a manutenção da saúde cognitiva de um organismo (Aimone & Gage 2011). O hipocampo é uma das estruturas mais estudadas do SNC, a qual desempenha importante papel na aprendizagem e memória (Cosar et al. 2008). Está bem estabelecido que a neurogênese nessa estrutura, durante o desenvolvimento embrionário apresenta maior intensidade (Rakic et al. 2009), e persiste ao longo da vida adulta (Decimo et al. 2012).

O hipocampo é formado por duas regiões principais, o giro denteado (GD) e o Corno de Amon (CA), sendo este último anatômico e funcionalmente diferenciado em subcampos distintos denominados em CA1, CA2, CA3 e CA4 (Cherubini & Miles 2015). As células piramidais de CA1 são a origem das eferências primárias do circuito trissináptico hipocampal e peças fundamentais na formação de memórias declarativas, como parte de um circuito reverberante e funcionalmente ativo que envolve o córtex entorrinal, o GD e o CA3 (Aggleton 2012).

A nutrição adequada durante a fase inicial da vida é um fator essencial para assegurar o desenvolvimento do cérebro (Rocha de Melo et al. 2006). Da mesma forma, uma alimentação racional que supra as necessidades do organismo e as propriedades preventivas de alguns nutrientes é determinante de um estilo de vida saudável para as pessoas de diferentes grupos etários (Viana 2002). Grande destaque tem sido dado aos AGPI  $\omega$ -3 DHA e EPA, os quais atuam nas propriedades físico-químicas da membrana celular, tais como fluidez, permeabilidade e viscosidade (Stonehouse 2014), e apresentam importante função no crescimento axonal e dendrítico (Alsina et al. 2001). O DHA e o EPA são componentes importantes envolvidos na neurogênese (Bazinet & Laye 2015), garantindo o desenvolvimento adequado do cérebro. Sua contribuição é crítica para a estrutura celular e função no sistema nervoso (Firlag et al. 2013). Esses ácidos graxos  $\omega$ -3 têm se mostrado eficaz no aumento da aprendizagem e memória, e na prevenção de déficit de memória em várias condições experimentais (Lim et al. 2005).

Associada a uma dieta balanceada, a prática regular de atividade física tem se mostrado importante na promoção da saúde (Cruz et al. 2007) e seus benefícios estendem-se aos aspectos neurocognitivos (Chang et al. 2012). O exercício físico promove a vascularização e o metabolismo energético; aumenta a neurogênese e a sinaptogênese (Chen et al. 2016); e melhora a memória, o aprendizado (Creer et al. 2010), a atividade cerebral e a função cognitiva (Baker et al. 2010). Entretanto, a intensidade do exercício pode determinar os efeitos que o mesmo pode causar na memória (Blustein et al. 2006). Há indícios de que o exercício físico moderado protege as células

hipocampais do dano isquêmico (Scopel et al. 2006), estando estritamente ligado a melhoras cognitivas (McMorris 2011). Paradoxalmente, o exercício físico intenso é caracterizado por um quadro de fadiga sistêmica, podendo resultar em declínio do desempenho cognitivo, em tarefas que exijam atenção, memória e aprendizado (Tomporowski 2013).

Na neurogênese, a melatonina também exerce um papel crucial (Chu et al. 2016), agindo sobre as células-tronco neurais (CTN), aumentando a proliferação (Sotthibundhu et al. 2010), a viabilidade, a sobrevivência e a diferenciação destas células (Ramirez-Rodriguez et al., 2009), formando neurônios em maior quantidade e, em menor proporção os astrócitos (Kong et al. 2008). A melatonina colabora para a maturação e complexidade dos dendritos dos novos neurônios (Zhang et al. 2011), facilitando a sua integração à circuitos pré-existentes (Benitez-King 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado sobre peso corporal, parâmetros bioquímicos, morfometria do hipocampo e memória em ratos Wistar.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* (40 fêmeas da família F0 e 80 machos da família F1), variedade Albinus, linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local no qual realizou-se os ensaios biológicos. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação (ração comercial Presence®) *ad libitum*.

Os animais (F0) foram divididos em oito grupos experimentais ( $n = 5$  animais/ grupo) de acordo com o tratamento: A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Os protocolos foram iniciados a partir dos 60 dias de idade e prosseguiu até o desmame da prole (165 dias de idade). A prole ( $n = 10$  machos/ grupo) foi submetida ao mesmo protocolo das respectivas matrizes desde o desmame até os 60 dias de idade.

A suplementação com  $\omega$ -3 foi realizada por meio de cápsulas de óleo de peixe Naturalis® (1000mg) contendo 180 mg EPA e 120 mg DHA) administrado por meio de gavagem (Braga et al. 2007). A melatonina foi administrada na dose de 0,5mg/kg de peso corporal, entre as 18:00 e 19:00 horas (Subramanian et al. 2007), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1 ml de NaCl a 0,9%, contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu injeções diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (Redins et al. 2000) e solução fisiológica de NaCl 0,9% por meio de gavagem.

O exercício moderado de natação foi realizado em tanque com água mantida em temperatura controlada de  $31^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . A sessão de treino teve duração de 60 minutos, realizada numa frequência de cinco dias por semana (Saad et al. 2002). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao meio aquoso durante cinco dias consecutivos, em que o tempo das sessões foi aumentado gradualmente até atingir o estipulado no protocolo. Do 1º ao 4º dia de adaptação, os animais permaneceram no tanque por 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente. No 5º dia, foi repetido o mesmo tempo realizado no dia anterior (60 minutos) o qual foi utilizado até o fim do experimento.

Aos 30 e 60 dias de idade (M30 e M60, respectivamente) os animais da geração F1 foram pesados em balança analítica para avaliação do peso corporal. Cinco animais de cada grupo foram escolhidos ao acaso e anestesiados com associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (Massoni 2011).

Na sequência os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de exsanguinação por punção cardíaca. Os dados para perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL) e glicêmico séricos foram obtidos em amostras de sangue (0,5 mL) coletadas em tubos sem anticoagulante, com auxílio do aparelho Bioplus 200P®.

Posteriormente, realizou-se a perfusão dos animais com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e com formaldeído a 10% em tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros foram coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70% ao P.A.), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Secções de 4 $\mu\text{m}$  em plano coronal do hipocampo foram obtidas utilizando-se micrótomo rotativo Leica®. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas, corados com Cresil violeta e cobertos com lamínulas de vidro. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz Leica® em objetiva de 40X, com auxílio do software ImageJ® para avaliação morfométrica da região CA1 do hipocampo.

Foram delimitadas aleatoriamente quinze áreas em cada corte histológico e, com auxílio de uma grade (21 x 21) de 441 pontos, realizou-se a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo, bilateralmente, obtendo-se a média para cada corte histológico (Fig. 1). Esses dados permitiram conhecer a densidade relativa da área (%) de neurônios na referida região em ratos com idade de trinta e sessenta dias. A densidade de área na região CA1 do hipocampo foi calculada como descrito em Fernandes e Polacow (2005).

Para o teste de reconhecimento espontâneo de objetos (TREO), foi utilizada uma arena de teste (dimensões 65x45x45 cm) em cor neutra e opaca, e objetos em triplicata, de volume em torno de 200 ml e suficientemente pesados para não serem deslocados. No primeiro ensaio, 2 objetos idênticos (A1 e A2), foram colocados em cantos opostos da

arena, separados por espaço suficiente para exploração de todas as suas faces. O animal foi posicionado na região mediana da arena, de costas para os objetos e pôde explorá-los livremente durante 3 minutos. No segundo ensaio, os objetos da arena foram trocados por um idêntico aos anteriores, que será chamado de A3 e por um objeto novo chamado B. Após intervalo de tempo pré-determinado (24 horas), o rato foi novamente colocado na arena de testagem por 3 minutos de forma a explorar a nova dupla de objetos (A3 e B), na denominada sessão de reteste. A simples medida de reconhecimento ou discriminação foi a diferença entre o tempo gasto na exploração do novo estímulo (B) e o tempo gasto na exploração do estímulo familiar (A3), ou seja, B-A3 (Ennaceur et al. 2005).

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn. Todos os testes foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.1 com nível de significância de  $\alpha < 0,05$ .

## RESULTADOS

Como principais resultados, observou-se que nos momentos M30 e M60, os diferentes tratamentos interferiram no metabolismo, resultando em alteração do ganho de peso (Fig. 2). O valor médio referente à massa corporal em M30 dos animais do grupo B ( $42,47 \text{ g} \pm 1,23$ ) apresentou-se menor do que a massa corporal dos grupos A ( $72,71 \text{ g} \pm 3,06$ ), C ( $71,14 \text{ g} \pm 2,52$ ), D ( $66,69 \text{ g} \pm 1,88$ ), E ( $53,91 \text{ g} \pm 0,87$ ), F ( $67,18 \text{ g} \pm 3,02$ ), G ( $62,00 \text{ g} \pm 5,02$ ) e H ( $58,18 \text{ g} \pm 2,62$ ). Quando comparados ao grupo E, os grupos A, C, D e F apresentaram um maior valor médio de peso corporal. Os grupos A e C apresentaram peso médio maior do que o grupo H.

Em M60, os grupos A ( $198,4 \text{ g} \pm 4,15$ ), B ( $213,3 \text{ g} \pm 3,63$ ) e C ( $208,8 \text{ g} \pm 6,11$ ) apresentaram peso corporal maior do que os grupos F ( $161,5 \text{ g} \pm 6,37$ ) e H ( $151,8 \text{ g} \pm 4,80$ ), havendo também uma redução do peso do grupo G ( $172,4 \text{ g} \pm 6,42$ ) em relação ao grupo B.

A avaliação dos animais para os níveis de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e glicose no momento M30 são mostrados na figura 3. O tratamento das matrizes e da prole modificou apenas os parâmetros de VLDL e triglicerídeo no momento M30 de análise dos dados ( $p < 0,05$ ). O VLDL ( $79,08 \text{ mg/dL} \pm 12,89$ ) e o triglicerídeo ( $395,4 \text{ mg/dL} \pm 64,43$ ) do grupo F apresentaram diferença significativa quando comparado aos valores de VLDL ( $30,44 \text{ mg/dL} \pm 3,34$ ) e triglicerídeo ( $152,2 \text{ mg/dL} \pm 16,9$ ) do grupo B.

Em relação ao momento M60, os protocolos experimentais resultaram em modificações do perfil lipídico sérico entre os tratamentos (Fig. 4). O resultado do HDL mostrou que o grupo F ( $77,13 \text{ mg/dL} \pm 13,32$ ) apresentou uma diferença significativa quando comparado ao grupo D ( $25,98 \text{ mg/dL} \pm 2,51$ ).

Quando realizados os testes de VLDL e triglicerídeo, observou-se que o grupo F diferiu dos grupos E e D, apresentando valor médio de VLDL de  $56,00 \text{ mg/dL} \pm 4,40$  e de Triglicerídeo de  $280,00 \text{ mg/dL} \pm 22,00$ , enquanto que E apresentou o valor médio de  $31,49 \text{ mg/dL} \pm 4,74$  para VLDL e  $157,4 \text{ mg/dL} \pm 23,68$  para triglicerídeo, e D apresentou VLDL de  $27,12 \text{ mg/dL} \pm 1,78$  e triglicerídeo de  $135,6 \text{ mg/dL} \pm 8,90$ .

No teste glicêmico, os grupos A ( $39,20 \text{ mg/dL} \pm 14,39$ ), C ( $39,40 \text{ mg/dL} \pm 9,14$ ) e F ( $20,60 \text{ mg/dL} \pm 4,57$ ) mostraram-se diferentes quando comparados ao grupo H ( $155,6 \text{ mg/dL} \pm 16,80$ ), e o grupo D ( $248,2 \text{ mg/dL} \pm 24,48$ ) diferiu dos grupos A, B ( $95,60 \text{ mg/dL} \pm 14,39$ ), C, E ( $131,4 \text{ mg/dL} \pm 28,95$ ), F e G ( $40,75 \text{ mg/dL} \pm 9,30$ ). Houve ainda diferença significativa entre o grupo E e o grupo F.

Os dados referentes à morfometria do hipocampo para os diferentes tratamentos podem ser observados no quadro 1. A análise permitiu verificar que a suplementação com ômega-3 e melatonina, e a submissão a exercício físico, interferiu no número de neurônios da região CA1 do hipocampo, avaliada pela densidade de área em diferentes idades (M30 e M60) para os tratamentos realizados. No momento M30, apenas o grupo D ( $24,24\% \pm 1,31$ ) diferiu dos grupos A ( $19,68\% \pm 1,03$ ) e G ( $19,00\% \pm 0,45$ ), apresentando uma maior densidade neuronal (Fig. 5).

Os tratamentos realizados alteraram o comportamento da população de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo da prole aos sessenta dias de idade. O grupo B ( $22,63\% \pm 0,34$ ) apresentou número de neurônios superior aos grupos A ( $19,68\% \pm 1,03$ ), C ( $15,61\% \pm 0,58$ ), E ( $20,50\% \pm 0,43$ ), F ( $19,91\% \pm 0,42$ ) e H ( $16,97\% \pm 0,40$ ). Já no grupo C observou-se uma menor população neuronal em relação aos grupos A, D ( $23,22\% \pm 0,46$ ), E, F e G ( $21,14\% \pm 0,35$ ). Quando observado o grupo D, este apresentou maior número de neurônios do que os grupos A, E, F e H. Por fim, os grupos A, E, F e G apresentaram maior densidade neuronal quando comparados ao grupo H (Fig. 6).

A suplementação com ômega-3 e melatonina e a submissão a exercício físico não interferiu no teste de reconhecimento espontâneo de objetos (TREO) (Fig. 7).

## DISCUSSÃO

Em nosso estudo os animais apresentaram variação de peso em decorrência do tipo de tratamento os quais foram submetidos. No momento M30, os animais que receberam melatonina exógena exclusivamente (grupo B) apresentaram menor massa corporal quando comparados ao grupo controle e a todos os outros tipos de tratamento utilizados. Os animais tratados com ômega-3 e submetidos a natação (grupo E) também apresentaram peso corporal menor do que os animais suplementados apenas com ômega-3 (grupo A), submetidos apenas a natação (grupo C) e tratados com melatonina e submetidos a natação (grupo D). Os animais do grupo A e do grupo C mostraram peso superior aos animais do grupo controle. EM M60, os animais dos grupos suplementados com ômega-3 (grupo A), tratados com melatonina (grupo B) e submetidos a exercício físico (grupo C) apresentaram peso corporal maior do que o grupo tratado com melatonina e submetido a exercício físico (grupo F) e o grupo controle (grupo H).

Assim como houve aumento no peso corporal dos animais suplementados com ômega-3 no momento M30 e M60, um estudo realizado por Águila et al. (1997) mostrou que a média do peso corporal dos animais do grupo tratado com óleo de canola, rico em ômega-3, foi 11,8% maior que a do grupo controle. Esse efeito do  $\omega$ -3 sobre o peso corporal pode ser explicado por estudo que relata que os ácidos graxos estão envolvidos na adipogênese e, as dietas ricas em AGPI, podem modular a expressão de proteínas no tecido adiposo, podendo atuar como reguladores transcricionais de alguns genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (Queiroz et al. 2009).

Em nossos achados, no entanto, o grupo E que foi suplementado com óleo de peixe associado ao treinamento físico, apresentou efeito contrário ao grupo A, no que se refere ao peso corporal em M30. A redução no peso corporal dos animais no grupo E pode estar associada a realização de exercício físico. Estudo recente relata que o ganho de peso de animais submetidos a natação foi modificado em relação ao grupo controle, sendo observada diferença já na segunda semana de treinamento. A diferença de peso entre animais treinados e sedentários crescia conforme o treinamento progredia (Raquel 2013). A literatura aponta que o aumento da capacidade aeróbica está associado inversamente ao acúmulo de gordura. De acordo com metanálise feita por Saavedra et al. (2011) a melhoria do condicionamento aeróbico desencadeia uma série de estímulos fisiológicos que potencializam a captação de oxigênio e o uso dos ácidos graxos como fonte de energia, o que reduz os depósitos de gordura corporal e diminui os índices de obesidade.

Estudo desenvolvido por Ando et al. (2013) evidenciou um aumento do uso de gordura como substrato energético 24 horas após a prática de exercício aeróbico contínuo ou intermitente. Entretanto, a magnitude do uso de gordura nas 24 horas subseqüentes à prática foi maior nos indivíduos submetidos ao treinamento intermitente, o que sugere que a intensidade, apesar da relevância das cargas de volume, pode ser um importante fator que modula o grau de dispêndio energético. Dessa maneira, sugere-se que atividades fracionadas ao longo do dia, com maior intensidade e menor volume, possam causar maior impacto sobre o gasto energético diário.

Em contrapartida, relatos apontam que a prática de exercício físico regular pode levar a modificações da composição corporal, aumentando a massa muscular e reduzindo a gordura corporal, o que pode ter acontecido com o grupo C no momento M60. Os dados de estudo realizado por Pellizzon et al. (2002) mostram que ratos alimentados com dieta normolipídica e treinados com natação por seis semanas apresentaram-se mais pesados que ratos com dieta hiperlipídica também treinados, supondo que o exercício frequente de natação foi capaz de elevar a massa muscular dos animais com dieta normolipídica. Esses resultados mostram-se semelhantes aos apontados em nosso estudo, no qual o grupo E que recebeu óleo de peixe e foi submetido a exercício físico, apresentou peso corporal menor do que os animais do grupo C treinados e submetidos a dieta normal, no momento M30 e M60.

No momento M30, o peso corporal médio do grupo B mostrou-se inferior quando este foi comparado aos demais grupos. Esse achado pode estar associado ao uso da melatonina, assim como apontado em investigação realizada por Rasmussen et al. (2001), no qual demonstrou que a administração diária de melatonina em ratos machos de meia-idade alimentados com dieta hipercalórica diminuiu o peso corporal, suprimiu a deposição de gordura visceral e restabeleceu níveis de leptina e insulina. De acordo com Cipolla-Neto (2014), a melatonina regula aspectos biológicos dos adipócitos que influenciam o metabolismo energético, lipídeos e peso corporal como, por exemplo, lipólise, diferenciação dos adipócitos e captação dos ácidos graxos, apresentando um efeito antiobesogênico.

Na análise do perfil bioquímico, obteve-se diferença significativa apenas nos parâmetros do VLDL e do triglicerídeo dos animais tratados com melatonina exógena e submetidos a natação (grupo F) em relação aos animais tratados apenas com melatonina (grupo B), no momento M30. No momento M60 os diferentes tipos de tratamento resultaram em diferença significativa no valor do HDL sérico dos animais do grupo F quando comparados aos animais suplementados com ômega-3 e tratados com melatonina (grupo D). Os valores do VLDL e do triglicerídeo, também apresentaram diferença significativa entre o grupo F quando comparado aos animais suplementados com ômega-3 e tratados com melatonina (grupo D) e animais suplementados com ômega-3 e submetidos a natação (grupo E). Para os valores de glicose, os animais do grupo D mostraram valores superiores aos dos animais de todos os outros grupos experimentais, exceto ao grupo controle, que também apresentou valores altos em relação aos animais suplementados

com ômega-3 (A), submetidos a exercício físico (grupo C) e tratados com melatonina e submetidos a natação (grupo F). Os animais do grupo E também apresentaram diferença nos níveis glicêmicos quando comparados ao grupo F.

Esses resultados nos valores do triglicérideo podem ser explicados pela redução das frações de VLDL, minimizando dessa forma, a produção hepática de triglicérideo, pela possível redução de ácidos graxos livres. O alto valor do HDL do grupo F em M60 pode ser decorrente do exercício físico. Estudos mostraram que o exercício físico é eficaz em elevar os níveis de HDL em até 25% (Escalante et al. 2012), sendo essa elevação observada em função da frequência e intensidade do exercício aeróbico (Kraus et al. 2002). Tal evento advém do estímulo à lipoproteína lipase, considerando-se que a geração de partículas de HDL é um processo inerente ao metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides (Despres et al. 1999), bem como da redução no catabolismo da apolipoproteína A-I e diminuição da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (Ferguson et al. 1998).

No entanto, o papel do exercício sobre a elevação da concentração plasmática de HDL parece estar condicionado a diversos fatores, tais como: melhora na resistência à insulina, redução de peso corporal e trigliceridemia, sexo, idade, perfil lipídico prévio e polimorfismos genéticos de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo das HDL (Arderin et al. 2004). Tais fatores são responsáveis pela grande variabilidade da resposta do colesterol HDL frente ao exercício físico.

Assim como observado em nosso estudo entre os grupos experimentais, pesquisa aponta que a suplementação com AGPI  $\omega$ -3 não é capaz de modificar os níveis de HDL (Moore et al. 2006). Estudo realizado por Pedersen et al. (2003), no entanto, aponta aumento nestes níveis. Quando analisados colesterol total e LDL, grande parte dos estudos não observa diferença significativa entre grupos suplementados com  $\omega$ -3 e grupos submetidos a dieta normal (Surette et al. 2004). Entretanto, os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 no colesterol total, HDL e LDL ainda são controversos. Ademais, pesquisa realizada acerca do impacto da suplementação de ômega-3 nas subfrações da LDL também mostrou-se inconsistente (Oelrich et al. 2013).

Nossos resultados estão em concordância com estudo prévio que demonstra que a suplementação com ácidos graxos  $\omega$ -3 provoca alterações lipídicas favoráveis no soro e nos tecidos. O achado mais consistente é a redução na concentração sérica de triglicérides e ácidos graxos livres no estado pós-prandial (Micallef & Garg 2008). Os resultados observados neste estudo são semelhantes àqueles demonstrados recentemente por Skulas-Ray et al. (2011), que observaram redução de 27% nas concentrações de triglicérides após a ingestão por 60 dias de 3,4 g de ácidos graxos ômega-3 por indivíduos saudáveis com hipertrigliceridemia moderada. Oelrich et al. (2013), também demonstraram diminuição de 26% das concentrações de triglicérides após a ingestão de 4 g de EPA e DHA durante 3 meses por indivíduos hipertriglicéridêmicos.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a redução nas concentrações séricas de triglicérideo observadas com a suplementação de EPA e DHA. Essa redução pode ser atribuída à modulação dos fatores de transcrição nucleares (PPAR $\alpha$  - "Peroxisome proliferator-activated receptor alfa", PPAR $\gamma$  - "Peroxisome proliferator-activated receptor gama", SREBP-1c - "Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c"), que controlam a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de triglicérides (Duda et al. 2009).

A melhor evidência, no entanto, para explicar o decréscimo da concentração de triacilglicerol é a redução da lipogênese hepática ocasionada pela inibição direta da atividade de enzimas hepáticas relacionadas com a síntese de ácidos graxos, como ácido graxo sintase, glicose-6- fosfato desidrogenase e lipase triacilglicerol (Iritani et al. 1998) e com o aumento da atividade de enzimas relacionadas com a oxidação dos ácidos graxos, como a enzima carnitina palmitoil transferase hepática (Yoshida et al. 1999). Existe uma relação dose-resposta entre os níveis de triacilgliceróis e o consumo de ácidos graxos  $\omega$ -3, quanto maior o consumo, maiores os benefícios na redução desses níveis (Etherton et al. 2002).

Os nossos achados indicam a elevação dos valores da glicose nos ratos submetidos a suplementação com óleo de peixe. Esses resultados encontram semelhanças àqueles descritos por Mori et al. (2000), os quais observaram aumento significativo da insulina de jejum e tendência em elevar os valores da glicose de jejum em homens hiperlipêmicos após a ingestão de óleo de peixe. Outros pesquisadores também relataram que os pacientes com diabetes tipo 2, os quais haviam consumido esses ácidos graxos, diminuíram a pressão sanguínea e a concentração de triacilgliceróis; porém, houve aumento da concentração de glicose de jejum (Woodman et al. 2002).

O metabolismo glicêmico é diretamente proporcional às dosagens dos ácidos graxos  $\omega$ -3. O mecanismo mais provável para explicar os efeitos adversos desses AGPI no controle glicêmico seria um aumento na produção da glicose no fígado, que pode ser relacionado com o aumento do fluxo dos precursores hepáticos da gliconeogênese (Woodman et al. 2002).

A elevação da glicose sérica observada em grupos submetidos a dietas com ômega-3, como os grupos D e E, pode estar relacionada ainda, a sobrecarga de ácidos graxos que resulta em hipertrofia do tecido adiposo. Esse fato associa-se com a produção de citocinas inflamatórias que podem desencadear hiperglicemia e resistência a insulina (Lima-Leopoldo et al. 2013).

Uma outra hipótese entre a relação de altos níveis glicêmicos e AGPI pode estar associada ao estresse oxidativo. A insaturação dos AGPI favorece a ação dos radicais livres, consequentemente aumentando a lipoperoxidação. Estudo realizado por Pedersen et al. (2003), relata que a suplementação de AGPI  $\omega$ -3 tem sido associada ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio – (ERO). Uma correlação entre a hiperglicemia e o aumento da peroxidação lipídica tem sido relatada (Peerapatdit et al. 2006).

Em nosso estudo, quando se compara os grupos em que houve a administração de melatonina ao grupo D, sugere-se que de alguma forma que a melatonina pode ter exercido papel na redução da glicose dos outros grupos, exceto neste último. Exercendo o óleo de peixe, importante influência na ação glicêmica da melatonina, quando administrado juntamente a esta.

A razão do grupo E apresentar nível glicêmico elevado em comparação ao grupo F, pode estar atrelada a ausência da administração exógena da melatonina. Como observado por Picinato et al. (2002), a melatonina exerce papel no controle dos ritmos circadianos envolvidos na regulação da homeostase da glicose, demonstrando um forte ritmo de 24 horas na secreção de insulina. Estudo aponta que a ação da melatonina sobre o perfil glicêmico pode estar associada ao seu efeito na melhora da captação de glicose, por aumentar sensibilidade a insulina, promovendo alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT-4 (Zanquetta et al. 2003).

De acordo com os resultados obtidos, os grupos C, E, F e G apresentaram baixos índices glicêmicos em relação ao grupo D, assim como os grupos C e F apresentaram menor taxa de glicose quando comparados ao grupo controle. Esses achados parecem ser resultantes do aumento da eliminação de glicose nos músculos que estão realizando trabalho, levando a diminuição das concentrações de glicose no sangue (Goodyear & Kahn, 1998). Esse mecanismo de transporte de glicose no músculo esquelético ocorre independente da insulina, que apresenta sua secreção reduzida pelas células  $\beta$ -pancreáticas em função da atividade simpática. O aumento do gasto energético pela musculatura esquelética em decorrência do exercício físico, promove um aumento da relação intracelular AMP: ATP, que por sua vez estimula a via AMPK (adenosina monofosfato quinase), promovendo a translocação das vesículas contendo GLUT-4 e resultando na facilitação do transporte de glicose para o músculo, de maneira semelhante à da insulina (Musi et al. 2001).

No entanto, o mecanismo de transporte de glicose através da via de sinalização da AMPK não parece ser o único mecanismo responsável por esse processo metabólico. De maneira semelhante, existem inúmeras outras moléculas envolvidas nesse mecanismo de sinalização durante o exercício. O aumento na concentração do íon cálcio no interior da célula, a atividade da óxido nítrico sintase (NOS) na síntese de óxido nítrico (NO), o aumento na concentração de bradicinina, ou até mesmo a hipóxia podem estimular a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT-4 para a membrana durante a contração muscular (Roberts et al. 1999).

A suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico interferiu no número de neurônios da região CA1 do hipocampo. No momento M30, apenas os animais suplementados com ômega-3 e tratados com melatonina (grupo D) diferiram significativamente dos animais do grupo suplementado apenas com ômega-3 (grupo A) e do grupo suplementado com ômega-3 e melatonina associado a exercício físico (grupo G), apresentando uma maior densidade neuronal. Aos 60 dias de idade (M60) o grupo tratado com melatonina (grupo B) apresentou densidade neuronal maior que a dos grupos A, C, E, F e H. Diferentemente, o grupo submetido a exercício físico (grupo C) apresentou uma menor população neuronal em relação aos grupos A, D, E, F e G. Os animais tratados com ômega-3 e melatonina (grupo D) apresentaram maior densidade de neurônios do que os grupos A, E, F e H. Os grupos A, E, F e G também apresentaram maior densidade neuronal em relação ao grupo H.

O fato do grupo A ter apresentado uma baixa densidade de neurônios na região CA1 no momento M30 pode estar interligado à relação dos AGPI  $\omega$ -3 com o estresse oxidativo, que tem sido abordada na literatura (Smaoui et al. 2006). A insaturação dos AGPI favorece a ação dos radicais livres, consequentemente aumentando a lipoperoxidação. Erdogan et al. (2004) relatou que a suplementação com AGPI  $\omega$ -3 está relacionada ao aumento da formação de ERO, que tratam-se de moléculas extremamente reativas e com grande capacidade de combinar-se inespecificadamente com diversas moléculas da estrutura celular, resultando em dano tecidual (Salvador & Henriques 2004).

A suplementação com óleo de peixe quando associada a administração da melatonina (grupo D), resultou em maior densidade neuronal em relação a suplementação realizada apenas com óleo de peixe (grupo A), em M60 e em M30. Esses dados corroboram com estudos que relatam que a melatonina, através da sua ação antioxidante, apresenta efeito neuroprotetor (Chu et al. 2016). O mesmo não foi visto no grupo G, no qual além da suplementação com óleo de peixe e melatonina, foi submetido a prática de exercício físico, a qual juntamente com o ômega-3, pode contribuir com a produção de ERO, devido ao metabolismo energético acelerado. Essas espécies indutoras do dano oxidativo podem contribuir para a neurodegeneração (Radák et al. 2013).

A ação da melatonina reforça a afirmativa de que a membrana neuronal torna-se mais sensível às lesões oxidativas se não for adequadamente contrabalançada pela defesa antioxidante (Tota et al. 2010). Segundo Crupi et al. (2011), a melatonina exerce ainda ação sobre as células tronco neurais (CTN), aumentando a proliferação, a viabilidade, a sobrevivência e a diferenciação destas. Estudos realizados por Rennie et al. (2009), constataram que a

pinelectomia causa um decréscimo no número de neurônios piramidais no hipocampo de ratos adultos. Tal fato pode ser revertido após a reposição de melatonina na água de beber dos animais.

A menor população de neurônios observada no grupo C (Fig. 6C) no momento M60, pode estar associada a elevação na produção de ERO que ocorre durante o exercício físico, em decorrência do aumento do metabolismo celular e conseqüentemente a captação e utilização de oxigênio pelos tecidos periféricos (Schneider & Graham 2004). As modalidades esportivas que obtêm energia através do metabolismo aeróbio apresentam maior facilidade de promover a liberação de ERO em comparação com aquelas que obtêm energia através do metabolismo anaeróbio (Goldfarb 1999).

As mudanças morfológicas e funcionais do hipocampo podem interferir nos processos cognitivos (Gomez-Pinilla & Ying 2010). Estas modificações em fases de desenvolvimento do SNC são reproduzidas na forma de retração dos dendritos no hipocampo, diminuição da neurogenese no giro denteado e dos espinhos dendríticos e funcionalmente na transmissão glutamatérgica alterada (Hennebelle et al. 2014). Estudos revelaram também diminuição nos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) hipocampal nos ratos submetidos ao exercício físico (Hashimoto 2010).

Opondo-se aos achados expostos acima, outras pesquisas relatam benefícios na utilização do exercício, tais como aumento do número de neurônios hipocampais em ratos, melhora da memória espacial de curta e longa duração, aumento nos níveis de BDNF (Khabour et al. 2013) e aumento da densidade dos astrócitos GFAP positivos hipocampais que estão diretamente envolvidos com a neuroplasticidade (Saur et al. 2014).

Estudo recente relata que embora o exercício de intensidade moderada aumente a ativação de neurônios do hipocampo, há aumento significativo dos níveis sanguíneos de lactato e outros marcadores de resposta ao estresse biológico. Nesse mesmo estudo foi observado que a neurogênese hipocampal é mais significativa em exercício de baixa intensidade, não havendo a produção de lactato ou estresse biológico (Soya et al. 2011).

Em particular, a memória espacial é conhecidamente dependente da atividade hipocampal em ratos (Henninger et al. 2007). Embora tenha sido observado alterações morfológicas no hipocampo entre os diferentes grupos experimentais, estas não resultaram em diferenças significativas no TREO.

Semelhante aos nossos resultados, estudo recente mostra que não houve diferença na aprendizagem, emocionalidade e na atividade exploratória, com o uso de AGPI. Ao comparar a relação intragrupo, através do índice de discriminação, observou-se que a memória foi preservada em todos os grupos, independente do protocolo utilizado, alcançando o reconhecimento do novo objeto quanto a sua forma e localização (Rachetti et al. 2013).

Os dados relativos ao teste de memória discordam de estudos realizados com ratos jovens submetidos a uma dieta rica em AGPI ômega-3 que apresentaram efeitos positivos na habilidade de aprendizagem (Carrié et al. 2000).

Corroborando com os nossos resultados quanto a realização de exercício físico e seu efeito no TREO, em estudo realizado por Mello et al. (2008), ratos que foram submetidos ao exercício forçado durante 8 semanas em esteira mecânica, não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, mostrando efeito nulo da atividade física no teste de memória espacial. Curiosamente, o mesmo tipo de exercício aplicado durante 2 semanas resultou em prejuízo no desempenho dos ratos no referido teste.

O tipo de exercício e a intensidade são parâmetros críticos a serem considerados. A intensidade alta do exercício pode ser um fator estressor e resultar em prejuízos iniciais a aquisição de uma tarefa de aprendizado espacial (Blustein et al. 2006). Pequenas quantidades diárias de exercício, resultando em exercício de baixa intensidade foram eficazes em demonstrar melhoras no aprendizado espacial, diferentemente de quantidades médias ou altas de atividade física (Garcia-Capdevila et al. 2009).

## CONCLUSÕES

A suplementação com ômega-3 e melatonina e a submissão ao exercício físico interferiu no metabolismo dos animais aos 30 e aos 60 dias, resultando em alteração do ganho de peso, semelhantemente ao que é descrito na literatura. Os AGPI EPA e DHA, a melatonina e o exercício físico exerceram ainda efeitos sobre os níveis de glicose, HDL, VLDL e triglicerídeos dos animais.

O tempo de suplementação das ratas com ômega-3 e melatonina, e treinamento físico, interferiu de maneira significativa sobre a densidade dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo da prole, avaliada aos trinta e sessenta dias de idade, indicando que os diferentes protocolos utilizados têm influência no desenvolvimento do tecido cerebral.

O exercício físico e a suplementação com óleo de peixe e melatonina aplicados durante o período experimental não foram capazes de causar influência nos processos relacionados ao aprendizado. A presente pesquisa fornece novas evidências de que os efeitos induzidos pela associação entre ômega-3, melatonina e exercício físico no aprendizado e na memória nem sempre são benéficos e dependem da intensidade, do período de desenvolvimento e do tempo de aplicação das intervenções.

Embora os efeitos da suplementação com ômega-3, melatonina e exercício físico sobre memória, morfometria hipocampal, perfil bioquímico e desenvolvimento corporal tenham sido estudados de forma individual ou combinada, existem algumas divergências quanto aos resultados encontrados, indicando que investigação adicional é indispensável para esclarecer os mecanismos envolvidos.

**Agradecimentos.**-Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA)/ UFRPE e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e Bolsa de Pós-Graduação.

## REFERÊNCIAS

- Águila M.B., Apfel M.I.R. & Mandarim de Lacerda C.A. 1997. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e óleo de canola (rico em ácido graxo  $\omega$ -3). *Arq Bras Cardiol.* 68:155-61.
- Aggleton J.P. 2012. Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(7):1579-96.
- Aimone J.B & Gage F.H. 2011. Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 33:1160-1169.
- Alsina B., Vu T. & Cohen-Cory S. 2001. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience.* 4:1093-1101.
- Ardern C.I., Katzmarzyk P.T., Janssen I. et al. 2004. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc.* 36(9):1610-5.
- Ando T., Usui C., Ohkawara R. et al. 2013. Effects of intermittent physical activity on fat utilization over a whole day. *Med Sci Sports Exerc.* 45:1410-1418.
- Baker L.D., Frank L.L., Foster-Schubert K. et al. 2010. Effects of Aerobic Exercise on Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology.* 67:71-79.
- Batista de Oliveira M., Lopes A.A.C., Mendes da Silva R.F. et al. 2012. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. *Experimental Gerontology.* 47: 452-457, 2012.
- Bazinet R.P. & Laye S. 2015. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 15: 771-785.
- Benitez-King G. 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research.* 40:1-9.
- Blustein J.E, McLaughlin, M. & Hoffman J.R. 2006. Exercise effects stress-induced analgesia ad spatial learning in rats. *Physiology & Behavior.* 89:582-586.
- Braga D.K., Oliveira F.M., Silva A.C. et al. 2007. Modulação da inflamação por ômega-3/6. 27(3):275-282.
- Carrié I., Clément M., Javel D. et al. 2000. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *Journal of Lipid Research.* 41(3):465-472.
- Chang Y.K., Labban J.D., Gapin J. et al. 2012. The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. *Brain Research*, 1453(250):87-101.
- Cherubini E. & Miles R. 2015. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neurociensce.* 9:19.
- Chen W.W., Zhang X. Huang W.J. 2016. Role of physical exercise in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 4:403-407.
- Chu J., Tu Y., Chen J. et al. 2016. Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 420:169-179.
- Cipolla Neto J., Amaral F.G., Afeche S.C. et al. 2014. Melatonin, energy, metabolismo and obesity: a review. *J Pineal Research.* 56:371-381.
- Cosar M., Songur A., Sahin O. et al. 2008. The neuroprotective effect of fish n-3 fatty acids in the hippocampus of diabetic rats. *Nutritional Neuroscience.* 11:161-167.
- Creer D.J., Romberg C., Saksida L.M. et al. 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107:2367-2372.
- Cruzat V.F., Rogero M.M., Borges M.C. et al. 2007. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 13(5):336-342.
- Crupi R., Marino A. & Cuzzocrea S. 2013. N-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. *Current medicinal chemistry.* 20(24):2953-63.

- Decimo I., Bifari F., Krampera M. et al. 2012. Neural stem cell niches in health and diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 18:1755–1783.
- Despres J.P., Gagnon J., Bergeron J. et al. 1999. Plasma post-heparin lipase activities in the HERITAGE Family Study: the reproducibility, gender differences, and associations with lipoprotein levels. *Health, Risk factors, exercise Training and Genetics Clin Biochem*. 32(3):157-65.
- Duda M.K., O’Shea K.M. & Stanley W.C. 2009. N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for the treatment of heart failure: mechanisms and clinical potential. *Cardiovascular Research*. 84(1):33-41.
- Ennaceur A., Michalikova S., Bradford A. et al. 2005. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behavioural Brain Research*. 159:247-266.
- Erdogan H., Fadillioglu E., Ozgocmen S. et al. 2004. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 71:148-152.
- Escalante Y., Saavedra J.M., García-Hermoso A. et al. 2012. Improvement of the lipid profile with exercise in obese children: a systematic review. *Prev Med*. 2012;54:293.
- Etherton P.M.K., Harris W.S. & Appel L.J. 2002. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 106:2747-5.
- Ferguson M.A., Alderson N.L., Trost, S.G. et al. 1998. Effects of four different single exercise sessions on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase. *J Appl Physiol*, 85(3):1169-74.
- Fernandes K. & Polacow M. 2005. Análise morfológica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 9(2):235–241.
- Firlag M., Kamasewski M., Katarzyna G. et al. 2013. The neuroprotective effect of long-term n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in the cerebral cortex and hippocampus of aging rat. *Folia Neuropathol*. 51(3):235-242.
- Garcia-Capdevila S., Portell-Cortés I., Torras-Garcia, M. et al. 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behavioural Brain Research*. 202:162–170.
- Goldfarb A.H. 1999. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*. 24(3):249-66.
- Gomez-Pinilla F. & Ying Z. 2010. Differential effects of exercise and dietary docosahexaenoic acid on molecular systems associated with control of allostasis in the hypothalamus and hippocampus. *Neuroscience*. 168:130–137.
- Goodyear L.J. & Kahn B.B. 1998. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*. 49:235–261.
- Hashimoto, K. 2010. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. *Review Psych Clin Neurosc*. 64:341–357.
- Hennebelle M., Champeil-Petokar G., Lavialle M. et al. 2014. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and chronic stress-induced modulations of glutamatergic neurotransmission in the hippocampus. *Nutrition Review*. 72:99–112.
- Henninger N., Feldmann R.E., Futterer, C.D. et al. 2007. Spatial learning induces predominant downregulation of cytosolic proteins in the rat hippocampus. *Genes Brain Behav*. 6:128-140.
- Iritani N., Koniya M., Fukuda, H. et al. 1998. Lipogenic enzyme gene expression is quickly suppressed in rats by a small amount of exogenous polyunsaturated fatty acids. *J Nutr*. 128(6):967-72.
- Khabour O.F., Alzoubi K.H., Alomari M.A. et al. 2013. Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. *Brain Research Bulletin*. 90:19–24.
- Kong X., Li X., Cai Z. et al. 2008. Melatonin Regulates the Viability and Differentiation of Rat Midbrain Neural Stem Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 28(4):569–579.
- Kraus W.E., Houmard J.A., Duscha B.D. et al. 2002. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 347(19):1483-92.
- Lima-Leopoldo A.P., Leopoldo A.S., Silva D.C.T. et al. 2013. Influência de prolongados períodos de obesidade sobre a expressão gênica miocárdica. *Arq Bras Cardiol*. 100(3):229-237.
- Lim G.P., Calon F. & Morihara T. 2005. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroscience*. 25(12):3032-3040.
- Massoni F. 2011. *Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas*. 6. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- McMorris T., Sproule J., Turner A. et al. 2011. Acute, intermediate intensity exercise, and speed and accuracy in working memory tasks: a meta-analytical comparison of effects. *Physiol Behav*. 102:421-8.
- Mello P.B., Benetti F., Cammarota M. et al. 2008. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 80(2):301-309.
- Micallef M.A. & Garg, M.L. 2008. The Lipid-Lowering Effects of Phytosterols and (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids are synergistic and complementary in hyperlipidemic men and women. *J. Nutr*. 138:1086-1090.
- Ming G. & Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *The Annual Review of Neuroscience*. 28:223-50.
- Moore C.S., Bryant S.P., Mishra G.D. et al. 2006. Oily fish reduces plasma triacylglycerols: a primary prevention study in overweight men and women. *Nutrition*. 22:1012-1024.

- Mori T.A., Burke V., Puddey I.B. et al. 2000. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 71:1085-94.
- Musi N., Fujii N., Hirshman M.F. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes.* 50(5):921-7.
- Oelrich B., Dewell A. & Gardner C.D. 2013. Effect of fish oil supplementation on serum triglycerides, LDL cholesterol and LDL subfractions in hypertriglyceridemic adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 23(4):350-7.
- Pedersen H., Petersen B., Major-Pedersen A. et al. 2003. Influence of fish oil supplementation in vivo and in vitro oxidation resistance of low-density lipoprotein in type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 57:713-720.
- Peerapatdit T., Likidilid A., Patchanans N. et al. 2006. Antioxidant status and lipid peroxidation end products in patients of type 1 diabetes mellitus. *J Med Assoc Thai.* 5:141-146.
- Pellizzon M., Buisson A., Ordiz F. et al. 2002. Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats. *Obes Res.* 10(9):947-55.
- Picinato M.C., Haber E.P., Carpinelli A.R. et al. 2002. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research.* 33(3):172-177.
- Queiroz J.C.F., Alonso-Vale M.I.C., Curi R. et al. 2009. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 53(5):582-94.
- Rachetti A.L.F., Arida R.M., Patti C.L. et al. 2013. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. *Behavioural Brain Research.* 237:283-289.
- Rakic P., Ayoub A.E., Breuning J.J. et al. 2009. Decision by division: making cortical maps. *Trends in Neuroscience.* 32(5):291-301.
- Radák Z., Marton O., Nagy E. et al. 2013. The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. *Journal of Sport and Health Science.* 2:87-93.
- Ramirez-Rodriguez G., Klempf F., Babu H., King G.B., Kempermann G. 2009. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology.* 34:2180-2191.
- Raquel H.A., Lyra A.S., Souza C.O. et al. 2013. Caracterização bioquímica e composição corporal de um modelo de treinamento físico de natação em ratos. *Biosaúde.* 15(2):55-64.
- Rasmussen D.D., Mitton D.R., Larsen S.A. et al. 2001. Aging dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res.* 1:89-94.
- Redins G.M., Redins C.A. & Novaes J.C. 2000. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. *Brazilian Journal Biology.* 61(4):679-684.
- Rennie K., De Butte M. & Pappas B.A. 2009. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research.* 47(4):313-317.
- Roberts C.K., Barnard R.J., Jasman A. et al. 1999. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 277:E390-4.
- Rocha de Melo A.P., Cavalcanti J.B., Barros A.B. et al. 2006. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9:155-160.
- Saad P.C.B., Guimarães A., Dal Pai, V. et al. 2002. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 8(4):144-150.
- Saavedra J.M., Escalante Y. & Garcia-Hermoso A. 2011. Improvement of aerobic fitness in obese children: a meta-analysis. *Int J Pediatr Obes.* 6:169-177.
- Salvador H. & Henriques J.A.P. 2004. Radicais livres e a resposta celular ao Estresse oxidativo. 1. Ed. Canoas: Editora da Ulbra.
- Santos F.V. 2014. Avaliação comportamental e bioquímica dos efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 e do exercício físico não voluntário em ratos wistar. Tese de Doutorado. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/35901>> Acesso em 29 nov. 2016.
- Saur L., Baptista P.P.A., Senna, P.N. et al. 2014. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct.* 219:293-302.
- Schaeffers A.T.U. 2013. Rearing conditions and domestication background determine regulation of hippocampal cell proliferation and survival in adulthood – laboratory cd1 and c57bl/6 mice versus wild house mice. *Neuroscience.* 228:120-127.
- Schneider C.D. & Graham, T.E. 2004. Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise. *Exerc Sports Sci Rev.* 32(3):120-126.
- Scopel D., Fochesatto D., Cimarosti H. et al. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 71:155-159.

- Smaoui M., Koubaa N., Hammami S. et al. 2006. Association between dietary fat and antioxidant status of Tunisian type 2 diabetic patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 74:323-329.
- Skulas-Ray A., Kris-Etherton P.M., Harris W.S. et al. 2011. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr*. 93:243-52.
- Sotthibundhu A., Phansuwan-Pujito P. & Govitrapong P. 2010. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *Journal of Pineal Research*, 49(3):291-300.
- Soya H., Okamoto M., Matsui T. et al. 2011. Brain Activation via Exercise: Exercise conditions leading to neuronal activation & hippocampal neurogenesis. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 15(1):1-10.
- Stonehouse W. 2014. Does Consumption of LC Omega-3 PUFA Enhance Cognitive Performance in Healthy School-Aged Children and throughout Adulthood? Evidence from Clinical Trials. *Nutrients*. 6(7):2730-2758.
- Subramanian P., Mirunalini S., Pandiperumal S.R. et al. 2007. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *European Journal of Pharmacology*, 571:116-119.
- Surette M.E., Edens M., Chilton F.H. et al. 2004. Dietary echium oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. *J Nutr*. 134:1406-1411.
- Tomprowski P.D. 2013. Effects of acute bouts of exercise on cognition. *Rev Acta Psychol*. 112(3):297-324.
- Tota S., Awasthi H., Kamat P.K. et al. 2010. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behavioural Brain Research*. 209:73-79, 2010.
- Yoshida H., Mawatani M., Ikeda, I. et al. 1999. Effect of dietary seal and fish oils on triacylglycerol metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 45(4):411-21.
- Viana V. 2002. Psicologia, saúde e nutrição: Contributo para o estudo do comportamento alimentar. *Aná Psicológica*. 20(4):611-624.
- Woodman R.J., Mori T.A., Burke, V. et al. 2002. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr*. 76:1007-15.
- Zanquetta M.M., Seraphim P.M., Sumida D.H. et al. 2003. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving Glut4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 35(3):141-148.
- Zhang X.J., Liu L.L., Jiang S.X. et al. 2011. Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*. 177:12-22.

### Legendas das Figuras

- Fig. 1. Fotomicrografias do hipocampo de rato. A - Secção coronal do hipocampo com indicações das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD. B - Região CA1. Os boxes em preto representam as áreas onde foram feitas as contagens da densidade celular. C - Grade (21 x 21) utilizada para a contagem dos pontos de intersecção de retas que incidiram sobre os neurônios piramidais. Cresil violeta: 400X.
- Fig. 2. Valores de peso corporal (média ± desvio padrão) dos animais avaliados aos trinta (M30) e aos sessenta (M60) dias de idade. A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).
- Fig. 3. Perfil bioquímico sérico dos animais avaliados aos 30 dias de idade (M30). A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Mediana ± intervalo interquartilico. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).
- Fig. 4. Perfil bioquímico sérico dos animais avaliados aos 60 dias de idade (M60). A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Mediana ± intervalo interquartilico. Letras diferentes em cima da coluna indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).
- Fig. 5. Fotomicrografias do hipocampo de rato aos 30 dias de idade (M30). Neurônios piramidais da região CA1 (setas). A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Cresil violeta: 400X.
- Fig. 6. Fotomicrografias do hipocampo de rato aos 60 dias de idade (M60). Neurônios piramidais da região CA1 (setas). A - ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H - controle. Cresil violeta: 400X.

Fig. 7. Teste de reconhecimento espontâneo de objetos nos momentos M30 e M60. A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle ( $p > 0,05$ ).

## Os Quadros

**Quadro 1. Média da densidade de área (%) de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos avaliados aos trinta e sessenta dias de idade (M30 e M60, respectivamente).**

Grupos	30 dias	60 dias
A	19,68 ± 1,03 <sup>a</sup>	20,38 ± 0,35 <sup>a</sup>
B	20,10 ± 0,69 <sup>abc</sup>	22,63 ± 0,34 <sup>b</sup>
C	20,72 ± 0,48 <sup>abc</sup>	15,61 ± 0,58 <sup>c</sup>
D	24,24 ± 1,31 <sup>bc</sup>	23,22 ± 0,46 <sup>bd</sup>
E	20,36 ± 0,61 <sup>abc</sup>	20,50 ± 0,43 <sup>ae</sup>
F	20,23 ± 0,59 <sup>abc</sup>	19,91 ± 0,42 <sup>aef</sup>
G	19,00 ± 0,45 <sup>ac</sup>	21,14 ± 0,35 <sup>abdef</sup>
H	21,17 ± 0,55 <sup>abc</sup>	16,97 ± 0,40 <sup>c</sup>

A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

As figuras

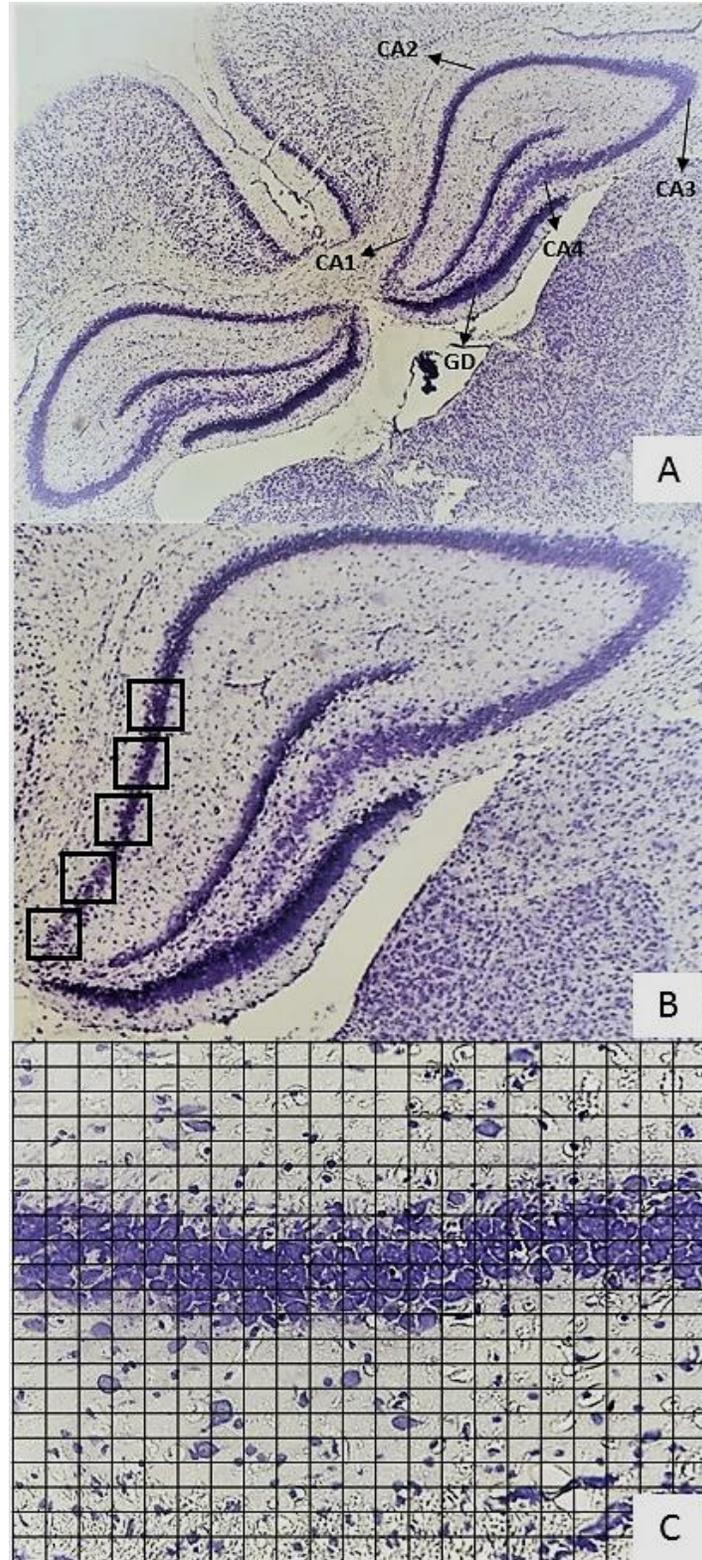


Figura 1

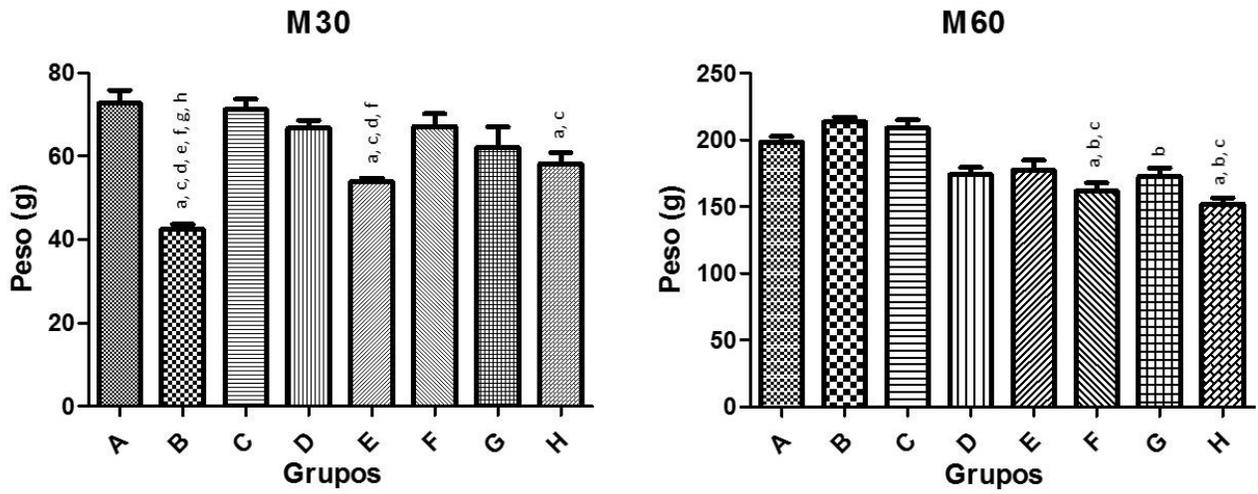


Figura 2

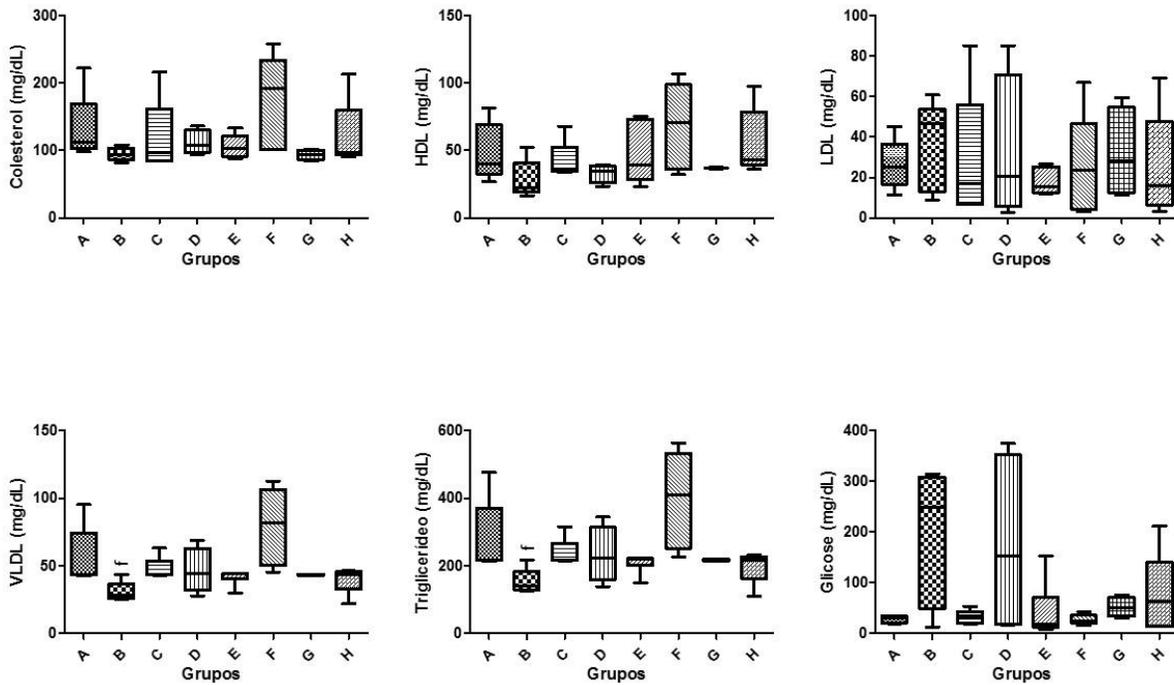


Figura 3

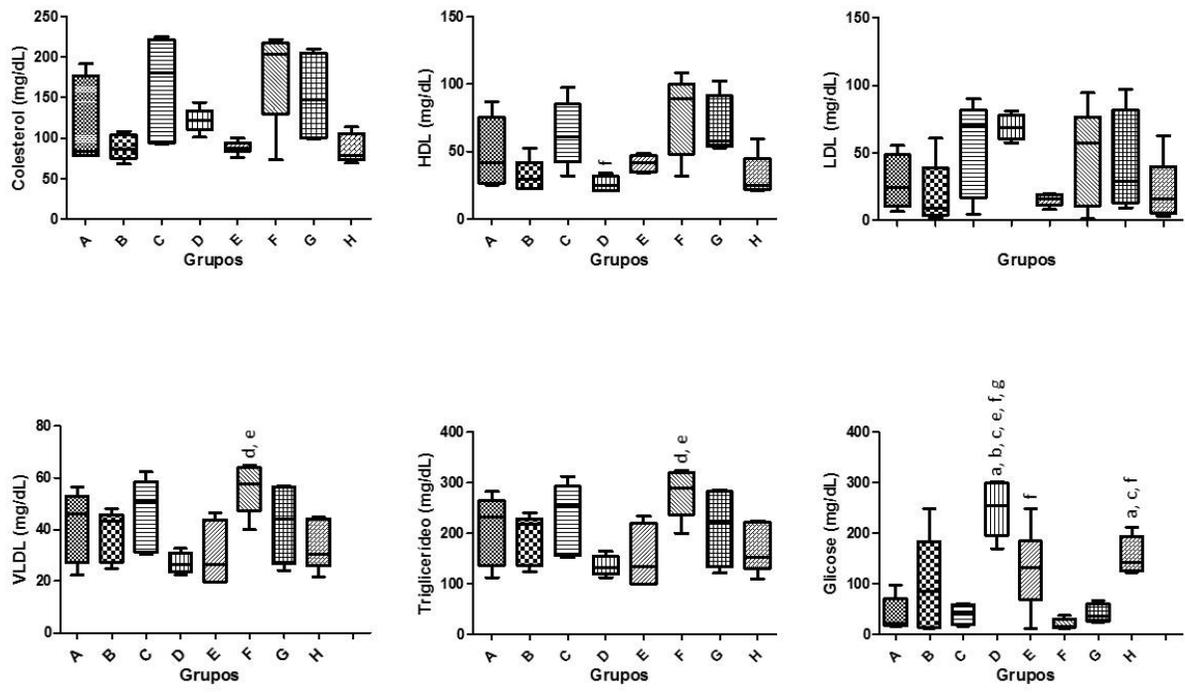


Figura 4

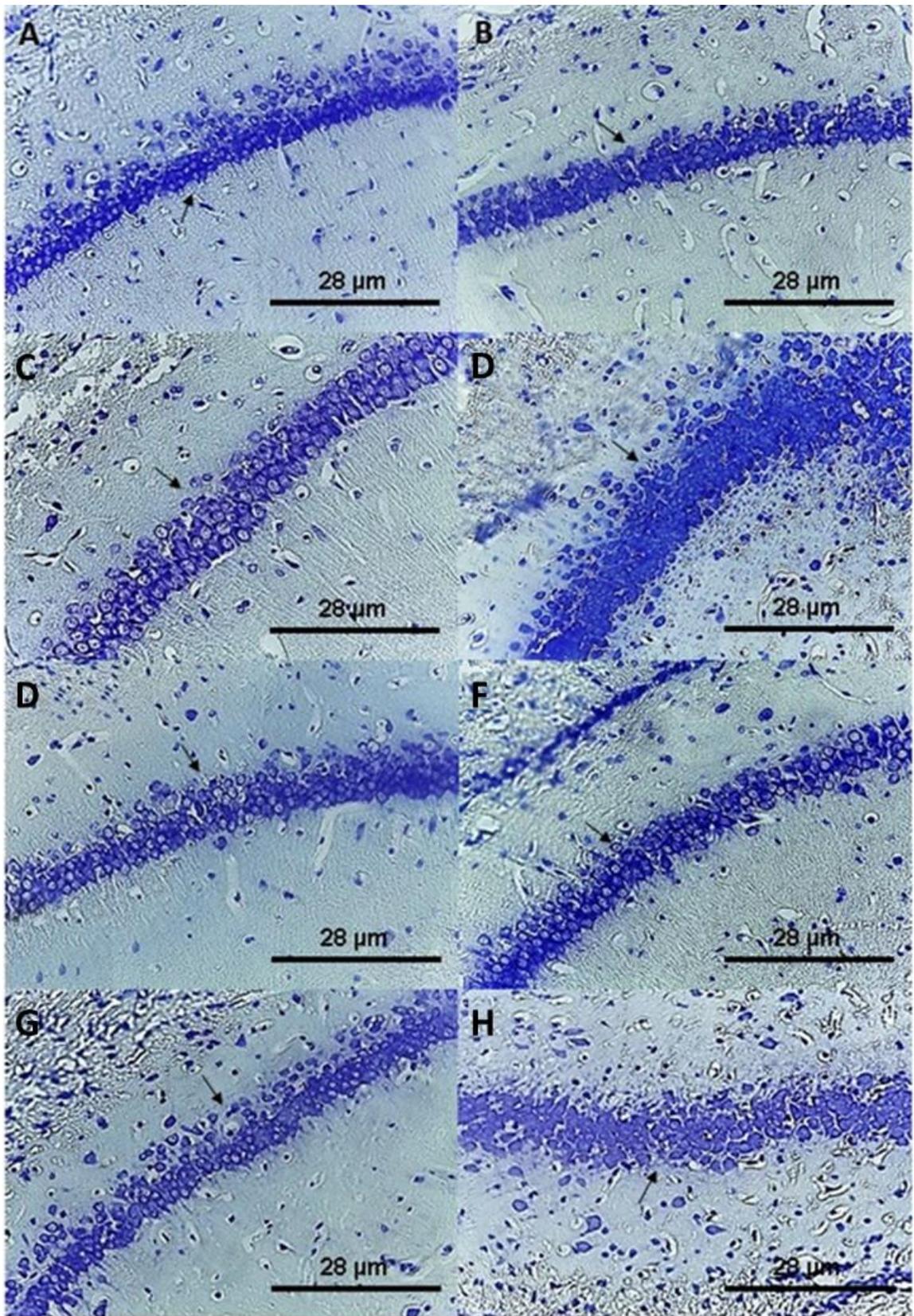


Figura 5

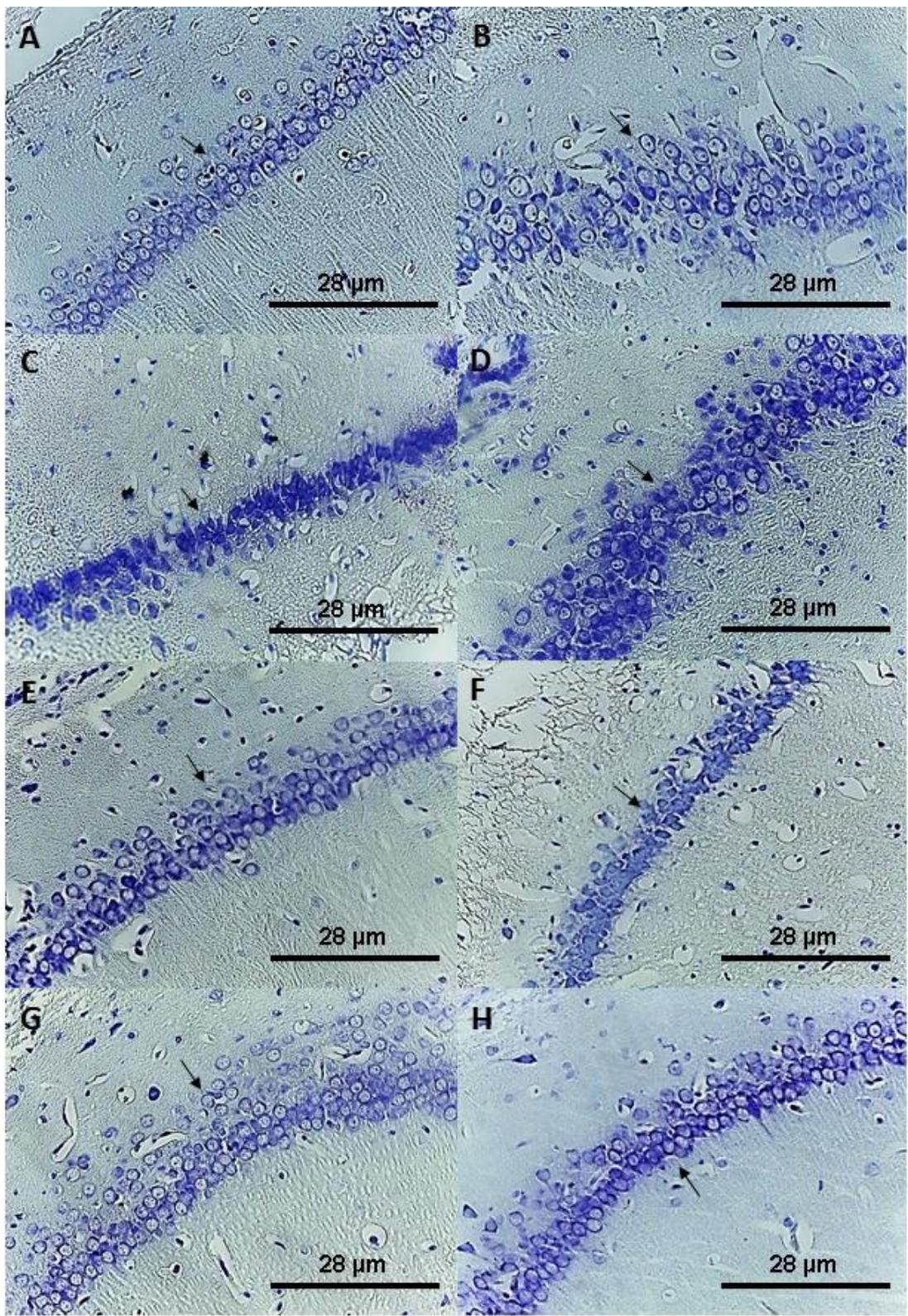


Figura 6

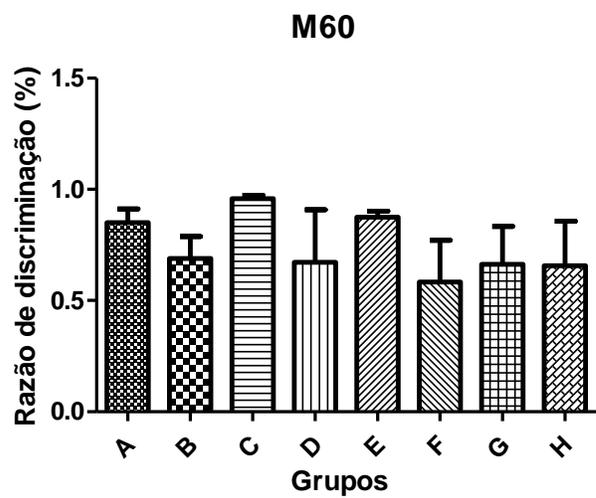
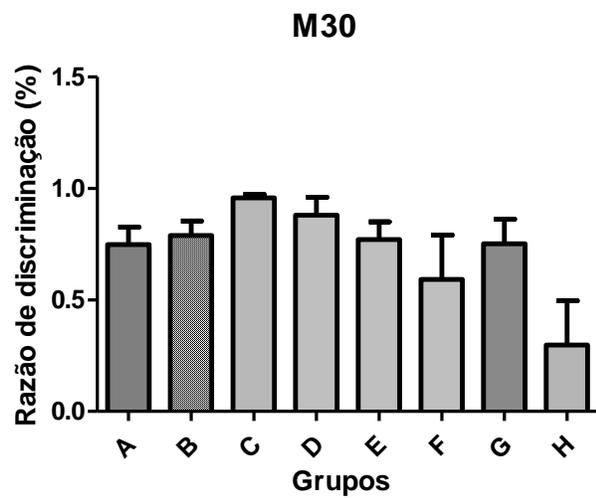


Figura 7

# Artigo II

**Modulação da atividade elétrica cortical promovida  
pela suplementação com ômega-3 e melatonina  
associados a exercício físico moderado**

**Modulation of the cortical electrical activity promoted by the  
supplementation with omega-3 and melatonin associated with  
moderate physical exercise**

Artigo redigido de acordo com as normas da  
revista Arquivo Brasileiro de Medicina  
Veterinária e Zootecnia.

## **Modulação da atividade elétrica cortical promovida pela suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico moderado**

### **Modulation of the cortical electrical activity promoted by the supplementation with omega-3 and melatonin associated with moderate physical exercise**

PEREIRA, D. D.<sup>1</sup>; SILVA, J. E. S.<sup>2</sup>; EVÊNCIO-NETO, J.<sup>3\*</sup>

1, 3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Autor correspondente J. Evencio-Neto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: 81-3320-6057. E-mail: evencioneto@bol.com.br

#### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina, associados a exercício físico moderado sobre a atividade elétrica cortical de ratos jovens. Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) de 60 dias de idade, divididas em oito grupos experimentais (n =5 animais/ grupo) de acordo com o tratamento: A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. A prole (n = 5 machos/ grupo) dos referidos grupos experimentais foi submetida ao mesmo protocolo das respectivas matrizes, e sua atividade elétrica cortical avaliada aos 70 dias de idade por meio do registro do eletrocorticograma (EcoG), o qual foi analisado com técnicas de análise linear e não linear. O comportamento do espectro de potência evidenciou um aumento da contribuição do ritmo beta entre todos os grupos experimentais, analisados pela Transformada de Fourier (TF). Os animais do grupo suplementado apenas com ômega-3 apresentaram menor média para a complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), mostrando maior auto-similaridade da atividade elétrica cortical. A análise de flutuação sem tendência (DFA) indicou modificação dessa atividade, com menor valor do expoente  $\alpha$  observado no grupo ômega-3 e melatonina associados a exercício físico.

**Palavras-chave:** Análise linear e não-linear, ECoG, Exercício físico, Melatonina, Ômega-3.

### **Abstract**

The aim of this study was to verify the effects of supplementation with omega-3 and melatonin associated with moderate physical exercise on the cortical electric activity of young rats by means of linear and non-linear analysis techniques of the ECoG recording. Sixty-day-old rats (*Rattus norvegicus*) were divided into eight experimental groups (n = 5/ group) according to the treatment: A - omega-3; B - melatonin; C - physical exercise; D - omega-3 and melatonin; E - omega-3 and exercise; F- melatonin and exercise; G - omega-3, melatonin and exercise; H - control. The offspring (n = 5 males / group) of these experimental groups were submitted to the same protocol of their respective matrices and their cortical electrical activity evaluated at 70 days old, through the electrocorticogram (EcoG) recording, which was analyzed using linear and nonlinear analysis techniques. The behavior of the power spectrum evidenced an increase in the contribution of the beta rhythm among all the experimental groups, analyzed by the Fourier Transform (TF). The animals in the group supplemented with only omega-3 presented a lower average for the complexity of Lempel-Ziv (CLZ), showing greater self-similarity of the cortical electric activity. The detrended fluctuation analysis (DFA) indicated a modification of this activity, with a lower  $\alpha$  exponent value observed in the omega-3 and melatonin associated with physical exercise group.

**Keywords:** ECoG, Exercise, Linear and non-linear analysis, Melatonin, Omega-3.

## **INTRODUÇÃO**

Os ácidos graxos são essenciais para o funcionamento do cérebro e transmissão de impulsos neurais, apresentando papel importante no desempenho cognitivo, no metabolismo de neurotransmissores e no desenvolvimento neural (Chalon *et al.*, 2001). Dentre estes, destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), os quais representam um terço do valor total de lipídeos neste órgão (Swingler, 2008). O ácido docosahexaenóico (DHA) e o eicosapentaenóico (EPA), representantes dos AGPI  $\omega$ -3, apresentam papel fundamental nas propriedades físico-químicas da membrana tais quais fluidez, permeabilidade e viscosidade; características críticas no controle de transferência de informações neuronais (Stonehouse, 2014).

A deficiência de DHA e EPA pode causar perda de habilidades de aprendizagem e memória (Fedorova *et al.*, 2007), além de prejudicar o processo de mielinização que pode provocar déficits sensoriais, bem como atraso no crescimento em neurônios do hipocampo (Borba *et al.*, 2010). Em contrapartida, a presença destes AGPI favorece a ação dos radicais livres com consequente aumento da lipoperoxidação (Erdogan *et al.*, 2004). Quantidades elevadas de radicais livres, bem como uma deficiência de mecanismos antioxidantes são fatores que contribuem para problemas neurocognitivos e neurodegenerativos, em razão do aumento da apoptose celular hipocampal decorrente de estresse oxidativo, com consequente implicação no processo de neurogênese (Manda e Reiter, 2010).

Na busca da redução do estresse oxidativo no cérebro, vários estudos têm apontado para o efeito neuroprotetor da melatonina, através da ação redutora de radicais livres (Tan *et al.*, 2015); capacidade de estimular uma série de enzimas antioxidantes (Tan, 2010) e atuação no aumento da atividade de outros oxidantes (Mayo *et al.*, 2003).

Associado à ação antioxidante da melatonina, o exercício físico também parece ser capaz de apresentar efeito neuroprotetor, diminuindo a expressão de genes associados ao estresse oxidativo e aumentando a expressão de genes associados a plasticidade sináptica, à função mitocondrial e ao desenvolvimento dos espinhos dendríticos, evocando aprendizado e memória (Stranahan *et al.*, 2008).

Uma maneira de investigar os efeitos da suplementação com  $\omega$ -3 e melatonina, associada ao exercício físico sobre a sua atividade cerebral é através do eletrocorticograma (ECoG), uma ferramenta importante para avaliar o padrão de normalidade ou detectar disfunções dessa atividade (Geng *et al.*, 2014). Nesta técnica registra-se o somatório das atividades elétricas das populações de neurônios, com uma modesta contribuição das células gliais (Niedermeyer e Silva, 2004), produzido através da amplificação e gravação de diferenças de tensão entre os eletrodos colocados diretamente sobre o córtex cerebral, que refletem essa atividade (Geng *et al.*, 2014).

A atividade cerebral comporta-se como parte de um sistema dinâmico determinístico não-linear, o qual, ao longo dos últimos anos, tem sido estudado sobre o ponto de vista da teoria do caos (Faure e Korn, 2001; Díaz *et al.*, 2015). Um sistema dinâmico determinístico tem o seu estado em um instante dependente de seu estado num instante precedente. A não-linearidade de um sistema, por sua vez, diz respeito à imprevisibilidade dos efeitos de pequenas mudanças nas condições iniciais de suas variáveis. Assim, ao contrário dos sistemas lineares, a resposta total não pode ser

conhecida simplesmente pelo somatório das partes constituintes (proporcionalidade e superposição) (Savi, 2006).

O caos no cérebro pode implicar o grau de imprevisibilidade dos eventos mentais e comportamentais que está de acordo com a extensão das variações nos padrões espaço-temporais da atividade dos sistemas caóticos. A descoberta do caos também tem profundas implicações para o estudo das funções cerebrais como um sistema dinâmico (Bob, 2008).

Além do domínio do tempo, os processos caóticos podem ser descritos no domínio da frequência. Neste contexto, pode-se efetuar a análise de uma série temporal em um espaço apropriado. A técnica de Transformada de Fourier (TF), pela qual obtemos o espectro de potência (Maciver e Bland, 2014), estabelece uma relação entre uma série em um determinado intervalo de tempo e como certas frequências contribuem para esta série (domínio da frequência); trata-se de um método de análise linear (Savi, 2006).

Entretanto, a descrição de fenômenos naturais a partir de modelos lineares fica sempre restrita a uma pequena região, não permitindo a correta compreensão de diversos aspectos a ela associada. Dessa forma, métodos de dinâmica não linear foram propostos para descrever os processos caóticos, tais como a Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) e Análise de Flutuação Destendenciada (Detrended Fluctuation Analysis - DFA) (Huang *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico sobre a atividade elétrica cortical de ratos jovens por meio de técnicas de análises linear e não-linear do registro de ECoG.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem Wistar, fêmeas (F0), provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local onde foram realizados os ensaios biológicos. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*.

Estes foram divididos em oito grupos experimentais ( $n = 5$  animais/ grupo) de acordo com o tratamento: A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Os protocolos foram iniciados a

partir dos 60 dias de idade das matrizes e prosseguiu até o desmame da prole (165 dias de idade).

A suplementação com  $\omega$ -3 foi realizada por meio de cápsulas de óleo de peixe Naturalis® (1000mg) contendo 180 mg EPA e 120 mg DHA) administrado por meio de gavagem (Braga *et al.*, 2007). A melatonina foi administrada na dose de 0,5mg/kg de peso corporal, entre as 18:00 e 19:00 horas (Subramanian *et al.* 2007), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1 ml de NaCl a 0,9%, contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu injeções diárias de 0,1ml do veículo por via subcutânea (Redins *et al.*, 2000) e solução fisiológica de NaCl 0,9% por meio de gavagem.

O exercício moderado de natação foi realizado em tanque com água mantida em temperatura controlada de  $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A sessão de treino teve duração de 60 minutos, realizada numa frequência de cinco dias por semana (Saad *et al.*, 2002). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao meio aquoso durante cinco dias consecutivos, em que o tempo das sessões foi aumentado gradualmente até atingir o estipulado no protocolo. Do 1° ao 4° dia de adaptação, os animais permaneceram no tanque por 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente. No 5° dia, foi repetido o mesmo tempo realizado no dia anterior (60 minutos) o qual foi utilizado até o fim do experimento.

A prole (n = 5 machos/ grupo) foi submetida ao mesmo protocolo das respectivas matrizes desde o desmame até os 70 dias de idade. Nesse momento, os animais foram pesados em balança analítica e anestesiados com uma associação de cetamina (50 mg) e xilazina (20 mg), na dose de 0,1 mL da solução para cada 100 g de peso vivo, administrada por via intramuscular (Massoni, 2011). A temperatura corporal foi controlada em torno de  $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  com aquecedor elétrico posicionado sob o animal.

Com a cabeça do animal fixada à base de um estereotáxico, realizou-se uma pequena incisão na pele e foi removido parte do periósteo. Posteriormente, trepanou-se um orifício circular com aproximadamente 3 mm de diâmetro sobre o hemisfério esquerdo na região parietal no córtex sensorio-motor cerca de 1,5 a 2,5 mm anterior e 1 a 2 mm lateral ao bregma. Neste orifício foi posicionado um eletrodo em aço inoxidável e outro eletrodo, do mesmo tipo, foi implantado sobre o osso frontal (eletrodo de referência), numa adaptação para o método descrito por Nascimento *et al.* (2010).

Aos 80 dias de idade, após cicatrização da ferida cirúrgica, foi feita a aquisição do registro do ECoG. Para cada animal registrou-se 10 a 15 minutos da atividade cerebral com um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000

pontos por segundo. Durante o registro do ECoG, os animais foram alocados em uma gaiola de Faraday, a qual foi mantida fechada, evitando-se a interferência de estímulos sonoros e luminosos (Aguilar *et al.* 2014).

Os registros dos ECoG foram segmentados em janelas de dois minutos. Estes segmentos foram importados para o software OriginPro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) e filtrados com um filtro passa banda do tipo Transformada Rápida de Fourier. Em seguida os envelopes correspondentes aos ritmos: delta (0 - 4 Hz), teta (4 - 8 Hz), alfa (8 - 16 Hz) e beta (16 - 32 Hz) foram extraídos pela Transformada de Hilbert (Welch, 1967). A utilização desse teorema torna possível a decomposição de um sinal periódico nas suas componentes frequenciais com a somatória de termos senos e cossenos harmonicamente relacionados na forma da seguinte expressão:

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (1)$$

A função  $F(\nu)$  é a transformada de Fourier da função temporal  $f(t)$ , que representa as amplitudes das várias frequências de ondas que constituem o sinal  $f(t)$ ; passando uma informação no tempo para o domínio da frequência. Então,  $F(\nu)$  representa o grau de participação das componentes frequenciais da função  $f(t)$ .

O quadrado da Transformada de Fourier do ECoG gera seu espectro de potência. A potência média obtida no espectro permite estimar a contribuição dos diferentes ritmos cerebrais no sinal ECoG. Formalmente, o espectro de potência para um registro do ECoG pode ser calculado como segue:

$$\overline{E}_\omega = \frac{\int_{\nu_s}^{\nu_e} |f(\nu)|^2 d\nu}{\int_{\nu_s}^{\nu_e} d\nu} \quad (2)$$

onde  $f(\nu)$  é a Transformada de Fourier do sinal no domínio do tempo, aqui representado pelo ECoG. O  $\overline{E}_\omega$  é a energia do espectro de potência normalizado por um determinado intervalo de frequência  $\omega = [\nu_s, \nu_e]$ , aqui representado pelos diferentes ritmos (Machado *et al.*, 2012). Os espectros de potência foram construídos a partir de cada segmento de ECoG e a potência média foi calculada em intervalos de frequência diferentes, correspondente aos diferentes ritmos.

A complexidade do registro do ECoG foi calculada utilizando-se o método de Lempel-Ziv (CLZ) (Abásolo *et al.*, 2014) é definida pela seguinte equação:

$$CLZ = \frac{c(n) \log_k n}{n} \quad (3)$$

onde  $c(n)$  é o número de dígitos inseridos,  $n$  é o tamanho do sinal e  $k$  o número de símbolos diferentes na sequência (no caso binário,  $k = 2$ ).

Quando calculada a CLZ, obtém-se um número que está entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto similaridade (Aboy *et al.*, 2006).

O método da análise de flutuação destendenciada (*Detrended Fluctuation Analysis* - DFA) desenvolvido por Peng *et al.* (1995), tem sido uma técnica largamente usada para a detecção de correlações de longo alcance em séries temporais não-estacionárias (Goldberger *et al.*, 2002). Esta técnica revela se uma série temporal possui correlação de longo alcance e consiste na integração do sinal que está sendo analisado, visando a sua descrição como um processo auto-similar. Em nosso caso, o ECoG é integrado a séries auto-similares  $y_L(k)$ , onde  $k$  é o número de intervalos.

Desta forma, a série temporal é dividida em diferentes intervalos de escalonamento (caixas), e uma regressão linear é ajustada para cada caixa de comprimento  $L$ , assim, a tendência local é representada dentro dessa caixa  $y_L(k)$ . Quando a tendência é removida, a flutuação da raiz quadrada média da série temporal, sem tendência, é dada por:

$$F(L) = \sqrt{1/N \sum_{k=1}^N [y(k) - y_L(k)]^2} \quad (4)$$

$F(L)$  é a flutuação média, segue uma lei de potência com o  $L$  da seguinte forma:

$$F(L) \sim L^\alpha \quad (5)$$

O expoente de escalonamento  $\alpha$  é obtido pela inclinação de um gráfico duplo log de  $F(L)$  versus  $L$ . A auto-similaridade do expoente  $\alpha$  pode ser calculada usando a inclinação obtida por regressão linear de gráfico log  $F(n)$  versus log  $n$ . Se  $\alpha = 0,5$ , então a série é dita descorrelacionada;  $\alpha > 0,5$  indica correlações de longo alcance persistentes;  $\alpha < 0,5$ , mostra uma correlação de longo alcance anti-persistentes. Os outros valores que podem ser encontrados são:  $\alpha = 1$  correspondente ao ruído  $1/f$ ; o  $\alpha \geq 1$  existe correlação no sinal, contudo está não segue a forma de uma lei de potência;  $\alpha = 1,5$  - ruído marrom (You-Fou *et al.*, 2013).

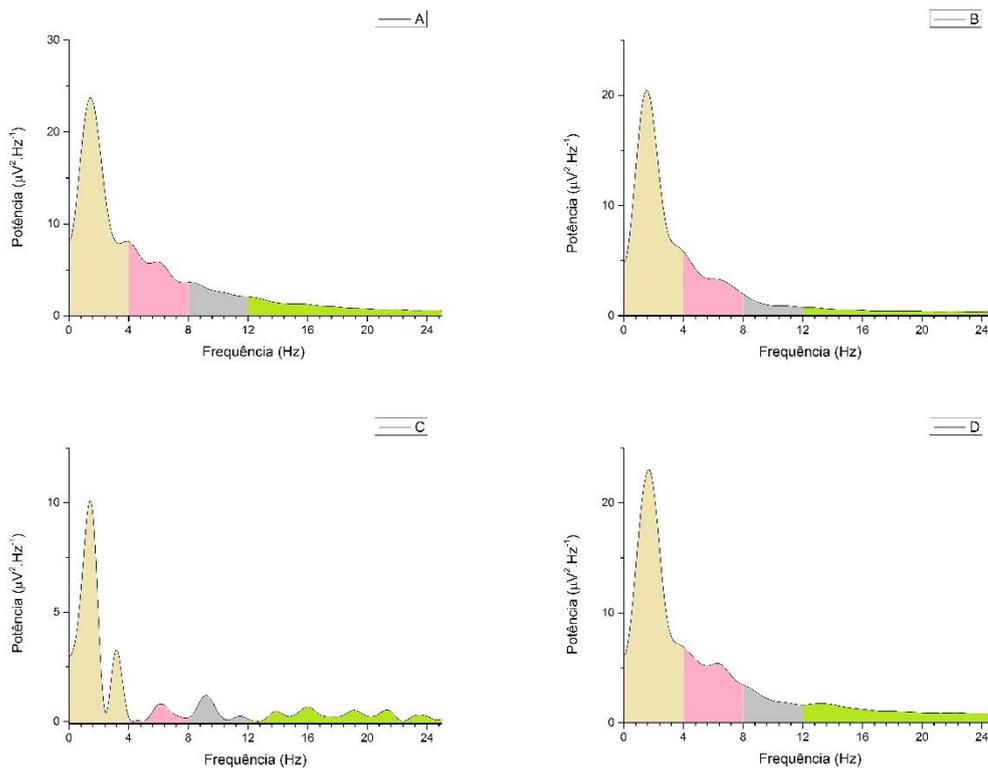
O método de DFA permite uma distinção confiável entre diferentes tipos de sinais, com base na variação dos parâmetros de escala, o que pode ser importante para a

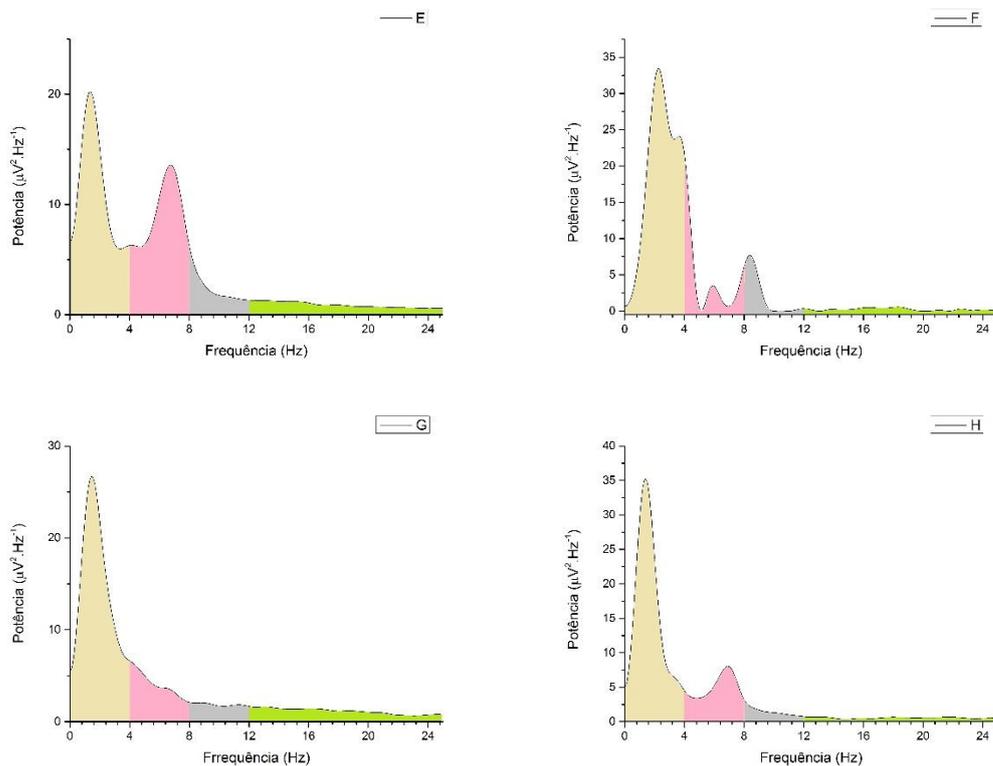
compreensão da origem do ECoG e para saber se o processo é gerado por mecanismos estocásticos ou caóticos (Bryce e Sprague, 2012).

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Graphpad® Prisma v. 5.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento das potências das ondas é característica de cada animal, independentemente do tratamento realizado (Fig. 1). Houve contribuição de todos os ritmos cerebrais (delta, teta, alfa e beta).





**Figura 1.** Espectro de potência para um animal de cada grupo experimental. A energia de cada onda é calculada pela integral da área do intervalo de frequência correspondente das ondas: delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 16 Hz) e beta (16 – 20 Hz). A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle.

O ômega-3 e a melatonina associados ao exercício físico modificaram o padrão de comportamento da atividade cerebral no que se refere a contribuição das frequências para a onda beta ( $p < 0,05$ ), bem entre todos os grupos experimentais. Para as demais ondas não houve diferença significativa, como pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de potência média ( $\mu\text{V}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$ ) das distintas ondas cerebrais.

Grupos	Delta (1-4 Hz)	Teta (4-8 Hz)	Alpha (8-12 Hz)	Beta (12-30 Hz)
A	$16,77 \pm 2,38^a$	$4,34 \pm 0,42^a$	$1,87 \pm 0,36^a$	$0,52 \pm 0,09^a$
B	$13,85 \pm 0,67^a$	$4,60 \pm 0,38^a$	$1,85 \pm 0,21^a$	$0,73 \pm 0,06^b$
C	$12,99 \pm 12,99^a$	$4,77 \pm 0,14^a$	$2,07 \pm 0,05^a$	$1,30 \pm 0,03^c$
D	$12,07 \pm 0,73^a$	$5,07 \pm 0,29^a$	$2,10 \pm 0,17^a$	$1,09 \pm 0,07^d$
E	$13,28 \pm 0,87^a$	$5,19 \pm 0,43^a$	$2,03 \pm 0,16^a$	$0,77 \pm 0,05^e$
F	$14,37 \pm 1,36^a$	$4,66 \pm 0,23^a$	$2,00 \pm 0,12^a$	$0,93 \pm 0,07^f$
G	$12,47 \pm 0,90^a$	$4,39 \pm 0,21^a$	$1,98 \pm 0,11^a$	$1,12 \pm 0,06^g$
H	$15,46 \pm 0,95^a$	$5,31 \pm 0,44^a$	$1,96 \pm 1,96^a$	$0,75 \pm 0,09^h$

A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F- melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O ritmo beta é observado em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição (Geng *et al.*, 2014). O grupo

A apresentou a menor potência da onda beta. Óleos ricos em AGPI são altamente propensos à oxidação de peróxidos lipídicos e outros produtos de oxidação secundária. Os óleos oxidados podem ter sua atividade biológica alterada, tornando-os ineficazes ou prejudiciais (Alberts *et al.*, 2013), o que pode estar relacionado à redução de potência na onda beta observada no referido grupo.

De acordo com os resultados obtidos, o grupo C, o qual foi submetido a exercício físico, apresentou a maior potência desse ritmo. Isto pode estar relacionado aos relatos acerca da onda beta ser predominante em atividades motoras, exercícios de alta intensidade e concentração (Moraes *et al.*, 2007). Além disso, a predominância de onda beta no grupo C denota alta atenção e aprendizado cognitivo associados a melhora da atividade cerebral e função cognitiva decorrente do exercício físico (Baker *et al.*, 2010).

Os mecanismos pelos quais o exercício produz benefícios no cérebro, provavelmente envolvem mudanças na plasticidade sináptica. Diversas adaptações orgânicas ocorrem frente à exigência metabólica durante o estado de atividade corporal aumentado, ativando as cascatas moleculares e celulares que aumentam a sensibilidade cerebral a insulina, melhoram a vascularização e o metabolismo energético e aumentam a neurogênese e sinaptogênese (Chen *et al.*, 2016).

O exercício físico também parece ser capaz de modular mecanismos de neurotransmissão cerebral e sinalização neurotrófica (Cotman e Berchtold, 2002), diminuir a expressão de genes associados ao estresse oxidativo e aumentar a expressão de genes associados à plasticidade sináptica, à função mitocondrial e ao desenvolvimento dos espinhos dendríticos, evocando aprendizado e memória (Stranahan *et al.*, 2008).

Quando a melatonina foi associada ao óleo de peixe (grupo D), houve um aumento na potência da onda beta. Isso pode estar associado ao apresentado na literatura, em que revelou que a administração crônica de melatonina produz efeitos positivos sobre o desempenho cognitivo (Tocharus *et al.*, 2014), resultando assim no aumento da potência da referida onda. O grupo G também mostrou uma alta representatividade do ritmo beta, apresentando a segunda maior potência, indicando que a combinação entre as metodologias utilizadas pode potencializar a atividade elétrica cerebral ao que corresponde a esse ritmo.

Diferenças significativas foram obtidas para os dados da Complexidade de Lempel-Ziv (Tab. 2). Os animais do grupo A apresentaram menor média para este parâmetro em relação aos grupos D, F e G, mostrando que a atividade cortical dos animais do grupo A apresentou maior auto-similaridade, ou seja, o comportamento da atividade

cerebral mostra maior nível de padronização em relação aos demais grupos experimentais.

**Tabela 2.** Valores obtidos para a Complexidade de Lempel-Ziv (média  $\pm$  desvio padrão) e análise de flutuação sem tendência (média  $\pm$  desvio padrão) dos registros do ECoG.

<b>Grupos</b>	<b>CLZ (M <math>\pm</math> SD)</b>	<b>DFA (M <math>\pm</math> SD)</b>
<b>A</b>	0,28 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
<b>B</b>	0,42 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	1,09 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
<b>C</b>	0,42 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	1,07 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>
<b>D</b>	0,48 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,11 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
<b>E</b>	0,39 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	1,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
<b>F</b>	0,46 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	1,10 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>
<b>G</b>	0,51 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	1,02 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>H</b>	0,39 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	1,20 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

A – ômega-3; B - melatonina; C - exercício físico; D - ômega-3 e melatonina; E - ômega-3 e exercício físico; F - melatonina e exercício físico; G - ômega-3, melatonina e exercício físico; H – controle. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O registro da atividade cerebral obtida no ECoG apresenta característica de caoticidade e auto-similaridade (Aguiar *et al.*, 2014). Neste contexto, o termo caótico e auto-similar teria uma conotação positiva, refletindo uma situação fisiológica, na qual o organismo processa a informação mais rapidamente e pode ter uma maior variedade de respostas às mudanças abruptas do meio no qual está inserido (Wang *et al.*, 2010). O comportamento caótico é interessante para sistemas que necessitam apresentar uma reação rápida a determinadas perturbações (Savi, 2005).

Geralmente, se  $\alpha = 0,5$ , não há correlação, e a série temporal é um não correlacionado (ruído aleatório); se  $\alpha < 0,5$ , a série temporal é anti-correlacionada; se  $\alpha > 0,5$ , existem correlações positivas na série temporal (Moura *et al.*, 2009). Os dados obtidos no presente estudo mostram que as séries correspondentes ao registro do ECoG dos animais apresentam correlação, sendo persistente para o grupo G e anti-persistente para os demais grupos.

Os valores médios do expoente  $\alpha$  e os respectivos desvios-padrão do DFA do registro da atividade elétrica cerebral são apresentados na Tabela 2. Esses valores mostram que todos os grupos apresentam correlação de longo alcance, mas não seguem uma lei de potência (Golberger *et al.*, 2002).

O grupo G diferiu dos grupos A, E e H, apresentando menor média (1,02  $\pm$  0,03) para o valor do DFA. O valor do expoente  $\alpha$  aproximadamente igual a 1 pode ser favorável às condições necessárias para a manutenção da saúde, o que corrobora com estudos que

indicam que indivíduos saudáveis mostram correlações de longo alcance com  $\alpha \approx 1$  (Peng *et al.*, 1995; Golberger *et al.*, 2002). Dessa forma, observamos que a suplementação com ômega-3 e melatonina associados ao exercício físico de intensidade moderada apresentou um melhor efeito sobre a atividade cerebral.

O fato do grupo G apresentar o valor do coeficiente mais próximo a 1 deve estar relacionado ao tipo de tratamento envolvendo o óleo de peixe, a melatonina e a natação. O DHA e o EPA atuam nas propriedades físico-químicas da membrana (Stonehouse, 2014), críticas no controle da transferência de informações neuronais (Cunnane *et al.*, 2009). Associado a isso, a melatonina colabora para a maturação e complexidade dos dendritos dos novos neurônios (Zhang *et al.*, 2011), facilitando a sua integração à circuitos pré-existentes (Benitezking, 2006). Ainda, o exercício físico também parece ser capaz de modular mecanismos de neurotransmissão cerebral e sinalização neurotrófica (Cotman e Berchtold, 2002), produzindo benefícios no cérebro, provavelmente através de mudanças na plasticidade sináptica (Chen *et al.*, 2016).

## **CONCLUSÕES**

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que suplementação com ômega-3 e melatonina associados a exercício físico pode modular a atividade elétrica cortical de ratos jovens, avaliada aos 80 dias de idade. Os efeitos dessa modulação sobre o padrão eletrocorticográfico por sua vez podem ser avaliados por meio de métodos de análise de dinâmica linear e não linear, como o espectro de potência, complexidade de Lempel-Ziv e análise de flutuação destendenciada.

## **REFERÊNCIAS**

- ABÁSULO, D.; MORGADO DA SILVA, R.; SIMONS, S. et al. Lempel-Ziv complexity analysis of local field potentials in different coarse-graining techniques. *IFMBE Proceedings*, v.41, p.706–709, 2014.
- ABOY, M.; HORNERO, R.; ABÁSULO, D. et al. Interpretation of the Lempel-Ziv Complexity measure in the context of biomedical signal analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. v.53, p.2282-2288, 2006.
- AGUIAR, L.A.A.; PESSOA, D.T.; NOGUEIRA, R.A. Epilepsy & Behavior NEW roscience 2013-Posters Abstracts. *Epilepsy & Behavior*, v.38, p.181, 2014.

ALBERT, B.B.; CAMERON-SMITH, D.; HOFMAN, P. L. et al. Oxidation of Marine Omega-3 Supplements and Human Health. *BioMed Research International*, v.2013, p.464921, 2013.

BAKER, L.D.; FRANK, L.L.; FOSTER-SCHUBERT, K. et al. Effects of Aerobic Exercise on Mild Cognitive Impairment. *Archives of Neurology*, v.67, p.71–79, 2010.

BENITEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research*, v.40, p.1–9, 2006.

BOB, P. Chaos, cognition and disordered brain. *Activitas Nervosa Superior*, v.50, p.114-117, 2008.

BORBA, J.M.C.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; SANTOS, A.A. et al. Essential fatty acids deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. *Nutrition Neuroscience*, v.3, p.144-150, 2010.

BRAGA, D. K.; OLIVEIRA, F. M.; SILVA, A. C.; SILVA, G.; MURADAS, R. F.; GUSMÃO, L. J. MARTINS, T. Modulação de inflamação por ômega-3/6. *Salusvita*, v.27, n.3, p.275-282, 2007.

BRYCE, R. M.; SPRAGUE, K. B. Revisiting detrended fluctuation analysis. *Scientific Reports*, v.2, p. 315, 2012.

CHEN, W.W.; ZHANG, X.; HUANG, W.J. Role of physical exercise in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, v.4, p.403–407, 2016.

CHALON, S.; VANCASSEL, S.; ZIMMER, L. et al. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*, v.36, p.937-944, 2001.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Neuroscience*, v.25, p.295-301, 2002.

CUNNANE, S.C.; PLOURDE, M.; PIFFERI, F. et al. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in lipid research*, v.48, n.5, p.239–256, 2009.

DIAZ, H. M.; CÓRDOVA, F. M.; CAÑETE, L.; PALOMINOS, F.; CIFUENTES, F.; SANCHEZ, C.; HERRERA, M. Order and chaos in the brain: fractal time series analysis of the EEG activity during a cognitive problem solving task. *Procedia Computer Science*, v. 55, p.1410-1419, 2015.

ERDOGAN, H.; FADILLIOGLU, E.; OZGOCMEN, S. et al. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukotriene Essential Fatty Acids*, v.71, p.148-152, 2004.

FAURE, P.; KORN, H. Is there chaos in the brain? I. Concepts of nonlinear dynamics and methods of investigation. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la vie*, v. 324, p.773–793, 2001.

FEDOROVA, I.; HUSSEIN, N.; DI MARTINO, C. et al. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 77, p. 269-77, 2007.

GENG, S.; ZHOU, W.; ZHAO, X. et al. Bifurcation and oscillation in a time-delay neural mass model. *Biological cybernetics*, v.108, n.6, p.747–756, 2014.

GOLDBERGER, A.L.; AMARAL, L.A.; HAUSDORFF, J.M. et al. Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.1, p.2466-2472, 2002.

HUANG, R.; DU, S.; CHEN, Z. et al. Study on nonlinear dynamic characteristic indexes of epileptic electroencephalography and electroencephalography subbands. *Journal of biomedical engineering*, v.31, n.1, p.18–22, 2014.

MACHADO, B. S.; KUNICK, A. C. B.; MORYA, E.; SAMESHIMA, K. Spectral characteristics of the hippocampal LFP during contextual fear conditioning. *Einstein*, v. 10, n. 2, p. 140–144, 2012.

MACIVER, M. B.; BLAND, B. H. Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 8, p. 203, 2014.

MANDA, K.; REITER, R. J. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Process in Neurobiology*, v. 90, p. 60-68, 2010.

MASSONI, F. *Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas*. 6. ed. Guanabara Koogan, 2011. p. 448.

MAYO, J.C.; TAN, D.X.; SAINZ, R.M. et al. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*, v.37, p.543-553, 2003.

MORAES, H.; FERREIRA, C.; DESLANDES, A. et.al. Beta and Alpha electroencephalographic activity changes after acute exercise. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v.65, n.3-A, p.637-641, 2007.

MOURA, E. P.; VIEIRA, A. P.; IRMÃO, M. A. S.; SILVA, A. A. Applications of detrended-fluctuation analysis to gearbox fault diagnosis. *Mechanical Systems and Signal Processing*, v.23, p.682, 2009.

NASCIMENTO, R. S.; ARAÚJO, L. H. G. D.; MORAES, R. B.; BARBOSA, C. T. F.; GUEDES, R. C. A.; NOGUEIRA, R. A.; STOSIC, T. Analysis of signal fluctuations of

Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. v.389, n.9, p.1869–1873, 2010.

NIEDERMEYER, E.; SILVA, F.H.L. *Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

PENG, C.K.; HAVLIN, S.; STANLEY, H.E. et al. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*, v.5, p.82–87, 1995.

REDINS, G.M.; REDINS, C.A.; NOVAES, J.C. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. *Brazilian Journal Biology*, v.61, n.4, p.679-684, 2000.

SAAD, P.C.B.; GUIMARÃES, A.; DAL PAI, V. et al. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.8, n.4, 2002.

SAVI, M.A. Chaos and Order in Biomedical Rhythms. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, n.2, p.157-169, 2005.

SAVI, M.A. *Dinâmica não-linear e caos*. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. p. 304.

STONEHOUSE, W. Does Consumption of LC Omega-3 PUFA Enhance Cognitive Performance in Healthy School-Aged Children and throughout Adulthood? Evidence from Clinical Trials. *Nutrients*, v. 6, n. 7, p. 2730–2758, 2014.

STRANAHAN, A.M; LEE, K.; BECKER, K.G. et al. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of aging memory by running in aged mice. *Neurobiology of Aging*, v.31, p.1937-1949, 2008.

SUBRAMANIAN, P.; MIRUNALINI, S.; PANDIPERUMAL, S.R. et al. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *European Journal of Pharmacology*, v.571, p.116-119, 2007.

SWINGLER, D. Omega-3 fatty acids and mood Rhodes University, South Africa Abstracts. *Journal of Affective Disorders*, v. 107, p. S21–S52, 2008.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; ESTEBAN-ZUBERO, E. et al. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules*, v. 20, p. 18886–18906, 2015.

TAN, D.X. Melatonin and brain. *Current Neuropharmacology*, v.8, n.3, p.161, 2010.

TOCHARUS, C.; PURIBORIBOON, Y.; JUNMANEE, T.; TOCHARUS, J.; EKTHUWAPRANEE, K.; GOVITRAPONG, P. Melatonin enhances adult rat

hippocampal progenitor cell proliferation via ERK signaling pathway through melatonin receptor. *Neuroscience*, v. 275, p.314–321, 2014.

WANG, X.; MENG, J.; TAN, G. et al. Research on the relation of EEG signal chaos characteristics with high-level intelligence activity of human brain. *Nonlinear biomedical physics*, v.4, n.1, p.2, 2010.

WELCH, P.D. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms. *IEEE Transactions on Information Theory*, v.15, n.2, p.70–73, 1967.

YOU-FU, T.; SHU-LIN, L.; RUI-HONG, J.; YING-HUI, L. Correlation between detrended fluctuation analysis and the Lempel-Ziv complexity in nonlinear time series analysis. *Chinese Physics B*, v.22, n.3, p. 030504, 2013.

ZHANG, X.J.; LIU, L.L.; JIANG, S.X. et al. Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience*, v.177, p.12–22, 2011.