

EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO AERÓBICO SOBRE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA CAUSADOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNAL

Gabriela Gomes ¹

Ben Hur Souto das Neves ²

Guilherme Salgado Carrazoni ³

Gabriel Palermo Del Rosso Barbosa ⁴

Pamela Billig Mello Carpes ⁵

Priscila Marques Sosa ⁶

Resumo:

A deprivação materna (DM) é um evento estressor que está relacionado à déficits cognitivos, alterações neuroquímicas, comportamentais e modificação na função de sistemas de neurotransmissores, como o dopaminérgico. Estudos mostram a eficácia do exercício físico na prevenção de déficits na consolidação das memórias de curta e longa duração, bem como na melhora da memória de reconhecimento de objetos. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de uma sessão de exercício aeróbico agudo sobre o déficit de memória em ratos submetidos à DM. Para isso, foram utilizadas 23 ratas Wistar prenhas e, em seguida, 65 ratos Wistar machos provenientes da prole das mesmas. Inicialmente, os ratos foram divididos em dois grupos, sendo um deles submetido à DM e o outro não. A DM consiste na retirada da mãe da caixa-moradia por um período de 3 h/dia, durante 10 dias. Posteriormente, os animais foram divididos em 6 grupos: 1)DM+RO (n=10); 2)DM+Exercício agudo+RO (n=10); 3)DM+Habituação ao exercício agudo+RO (n=10); 4)NDM+RO (n=10); 5)NDM+Exercício agudo+RO (n=10); 6)NDM+Habituação ao exercício agudo+RO (n=10). Para avaliação da memória de reconhecimento de objetos, utilizou-se a tarefa de RO. Para avaliar se a DM e o tratamento não afetam o estado de ansiedade dos animais, foi utilizada a tarefa de labirinto em cruz elevado (LCE). Para verificar a normalidade da amostra, utilizamos o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar a porcentagem de tempo total de exploração gasto em cada objeto, foi utilizado o teste de Wilcoxon, e no labirinto em cruz elevado, os dados foram comparados por Kruskal-Wallis. O grupo DM não consolidou memória. Os ratos submetidos à deprivação e que realizaram exercício agudo ou habituação ao exercício, apresentaram melhora na consolidação e retenção da memória. Tanto a deprivação materna quanto o protocolo de exercício físico não alteraram a ansiedade dos animais. Os resultados mostram que a DM causa déficits na memória de longa duração, bem como na persistência da memória de reconhecimento de objetos. Além disso, demonstram que uma sessão de exercício aeróbico agudo é capaz de melhorar a memória de ratos submetidos à DM, tanto na formação da memória de longa duração quanto na persistência da memória até 7 dias.

Palavras-chave: Cognição, aprendizado, déficit mnemônico, privação materna

EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO AERÓBICO SOBRE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA CAUSADOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNAL

¹ Aluno de graduação. gabi1984ela@gmail.com. Autor principal

² Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - Universidade Federal do Pampa - Uruguiana/RS. benhur.gpfis@gmail.com. Co-autor

³ Mestrando em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Pampa - Uruguiana/RS. guilhermecarazoni@gmail.com. Co-autor

⁴ Graduando em Fisioterapia e Aluno de Iniciação científica no Grupo de Pesquisa em Fisiologia - Universidade Federal do Pampa - Uruguiana/RS. gabrieldelrosso@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Doutoranda em Ciências Fisiológicas no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa-Uruguiana/RS. priscilasosa.gpfis@gmail.com. Co-orientador

EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO AERÓBICO SOBRE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA CAUSADOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNAL

INTRODUÇÃO

Durante o período neonatal o cérebro é muito suscetível a quaisquer influências externas, possivelmente porque passa por alterações significativas durante esse período (Marco *et al.*, 2015). Estudos têm mostrado que a exposição a eventos estressantes durante esta fase da vida pode influenciar no desenvolvimento do cérebro (Marco *et al.*, 2015), bem como na predisposição a comportamentos depressivos (Heim e Nemeroff, 2001).

Em mamíferos, sabe-se que a relação entre mãe e filhote no início da vida é importante no desenvolvimento do neonato, e a interrupção desta interação pode induzir déficits cognitivos (Cao *et al.*, 2014), alterações neuroquímicas, neurobiológicas, comportamentais (Rentesi *et al.*, 2013), e em parâmetros imunológicos (Hennessy *et al.*, 2010), além de modificar a função de diferentes sistemas de neurotransmissores de maneira persistente, até a vida adulta, como o sistema dopaminérgico (NEVES *et al.*, em preparação).

Em contrapartida, o exercício físico crônico é capaz de prevenir déficits na consolidação das memórias de curta e de longa duração provocados pela deprivação materna (DM) (Neves *et al.*, 2015). Ademais, evidências mostram que o exercício físico agudo, realizado imediatamente após a sessão de aprendizagem é eficaz na melhora da memória de reconhecimento de objetos (Da Silva De Vargas *et al.*, 2017).

Em animais, o modelo de DM tem se demonstrado eficaz para mimetizar o estresse ocorrido durante a fase inicial de desenvolvimento (Benetti *et al.*, 2009). Assim sendo, a compreensão dos mecanismos envolvidos em eventos traumáticos durante a primeira infância, bem como os seus impactos na vida adulta permite o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para os transtornos psicológicos e comportamentais provenientes destes traumas. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos de uma sessão de exercício aeróbico agudo sobre o déficit de memória em ratos submetidos à DM. Hipotetiza-se que uma sessão de exercício poderia promover aumento nos níveis de alguns neurotransmissores, dentre eles da dopamina, que parece estar diminuída no cérebro de animais deprivados.

METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Unipampa, sob o protocolo 050/2017.

Para este estudo, primeiramente utilizamos 23 ratas Wistar prenhas, e em seguida, foram utilizados 65 ratos Wistar machos provenientes da prole das mesmas. Inicialmente os ratos foram divididos em dois grupos: deprivados (DM) e não deprivados (NDM). Posteriormente, os ratos foram subdivididos em 6 grupos: 1. DM+ Reconhecimento de Objetos (RO) (n=10): Ratos deprivados que realizaram a tarefa de RO; 2. DM+Exercício agudo + RO (n=10): Ratos deprivados que passaram pela única sessão de exercício agudo em esteira rolante logo após o treino no RO; 3. DM+Habituação ao exercício agudo+RO (n=10): Ratos deprivados que apenas foram habituados à esteira, porém não realizaram o exercício logo após o RO; 4. NDM+RO (n=10): Ratos não deprivados que realizaram a tarefa de RO; 5. NDM+Exercício agudo+RO (n=10): Ratos não deprivados que passaram pela única sessão de exercício agudo em esteira rolante logo após o treino no RO e 6. NDM+Habituação ao exercício agudo + RO (n=10): Ratos não deprivados habituados à esteira, porém não realizaram o exercício logo após o RO. e 7.

O protocolo de DM consiste em, a partir do dia seguinte ao parto (DPN-01), retirar a rata mãe da caixa por um período diário de 3 horas, durante 10 dias seguidos (PDN-01 ao 10).

Durante o período de DM os filhotes foram mantidos em um ambiente devidamente climatizado (32°C), para manter a temperatura corporal adequada. Ao final de cada sessão, as mães foram realocadas nas caixas em que estavam anteriormente, retornando ao ambiente original (Benetti *et al.*, 2009). No PND-21 todos os ratos foram desmamados e mantidos em caixas limpas, com no máximo 4 animais. Os testes mnemônicos e comportamentais foram realizados com os filhotes machos adultos, a partir do 100º dia de vida dos ratos.

Para o exercício aeróbico, foi utilizado um protocolo de corrida em esteira rolante, com intensidade de 60-70% de absorção máxima de oxigênio (VO₂) medida indiretamente (Brooks e White, 1978) em uma única sessão de exercício físico aeróbico com duração de 30 minutos, sendo esta realizada imediatamente após o treino para o RO. Previamente ao treino para a tarefa de RO, os ratos foram habituados à esteira durante dois dias (velocidade 2 a 5 m/min durante 10 min). Depois, eles foram submetidos ao “protocolo do bom corredor” (8m/min durante 10 minutos), e no dia seguinte, o teste de VO₂máx foi realizado (Sosa *et al.*, 2015).

Para avaliar a memória de reconhecimento de objetos, utilizamos a tarefa de RO (Ennaceur e Delacour, 1988). O aparato para esta tarefa consiste em uma caixa de madeira, onde inicialmente os animais foram habituados, sendo colocados no interior da caixa durante 4 dias consecutivos, 20 min/dia. Após os dias de habituação, dois objetos diferentes (A e B) foram colocados na caixa para que os animais os explorassem livremente durante 5 minutos (sessão de treino). Após 24 horas da sessão de treino, um dos objetos (B) foi substituído por um novo objeto (C), e os animais foram colocados novamente no aparato por mais 5 minutos, para livre exploração (sessão de teste). Sete dias após o treino, (para testar a persistência da memória), outro teste de RO foi realizado, com os objetos A (familiar) e D (novo). Espera-se que o animal que aprende reconheça o objeto familiar, e, portanto, gaste mais tempo explorando o objeto novo.

Para avaliar se a DM e o tratamento não afetam o estado de ansiedade dos animais, o que poderia alterar os resultados dos testes de memória indiretamente, foi utilizada a tarefa do labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste em uma plataforma em cruz, com dois braços contralaterais possuindo paredes elevadas, sendo denominados braços fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados braços abertos. Foi registrado o número de entradas e a permanência nos braços abertos e fechados (Pellow *et al.*, 1985).

A normalidade de distribuição dos dados foi analisada através do teste de Shapiro-Wilk. O tempo de exploração dos objetos no RO foi convertido em porcentagem do tempo total de exploração. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar a porcentagem do tempo total de exploração gasto em cada objeto considerando uma média teórica de 50%. No teste de labirinto em cruz elevado, os dados foram comparados através do teste de Kruskal-Wall. Os resultados estão expressos na forma de média ± DP e foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação e persistência da memória foram avaliadas através do teste de RO. Na análise, observamos que durante o treino os ratos exploraram os objetos (A e B) por aproximadamente 50% do tempo total de exploração cada um ($A = 50,68 \pm 7,43$; $B = 49,32 \pm 7,43\%$; $P = 0,3788$; $t_{(66)} = 1,084$ – tanto para 24h quanto para 7 dias após o treino) (Figura 1A e 1B).

O grupo DM não formou memória de longa duração avaliada 24h após o treino ($A = 46,24 \pm 13,42$; $C = 53,75 \pm 13,42$; $P = 0,570$; $t_{(9)} = 0,8847$) (Figura 1A). Sete dias após o treino, estes animais ainda exploraram mais o objeto familiar ($A = 58,15 \pm 10,90$; $D = 41,85 \pm 10,90$; $P = 0,031$; $t_{(9)} = 2,366$) (Figura 1B). O grupo NDM, formou memória 24h após o treino ($A =$

40,73 ± 11,07; C = 59,27 ± 11,07; P = 0,039; $t_{(8)} = 2,513$) (Figura 1A), no entanto, não apresentou persistência da memória quando avaliado 7 dias após (A = 46,24 ± 6,56; D = 53,76 ± 6,56; P = 0,250; $t_{(8)} = 1,718$) (Figura 1B). Estes resultados eram esperados considerando os dados disponíveis na literatura (Neves *et al.*, 2015).

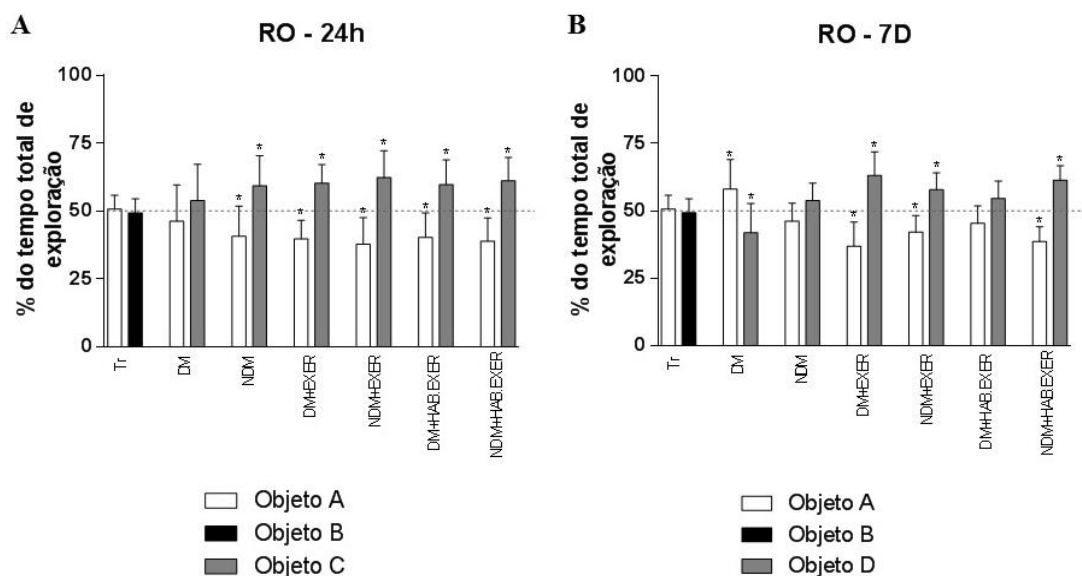


Figura 1: A deprivação materna causa déficits na memória de longa duração e persistência da memória no reconhecimento de objetos (RO). O exercício físico agudo evita esses déficits. A. Os animais foram treinados na tarefa de RO e testados 24 h depois. Na sessão de treinamento os animais foram expostos aos objetos A e B e exploraram cerca de 50% do tempo total de exploração de cada um. Na sessão de teste, os ratos foram expostos ao objeto familiar (A) e a um novo objeto (C). O grupo DM não foi capaz de distinguir o familiar do novo objeto na sessão de teste, mas os ratos DM submetidos ao exercício físico agudo foram. B. Os animais foram treinados em tarefa de RO e testados 7 dias após o treinamento. Na sessão de treinamento os animais foram expostos aos objetos A e B e exploraram cerca de 50% do tempo total de exploração de cada um. Na sessão de teste, os ratos foram expostos a um familiar (A) e a um novo objeto (D). O grupo DM não distinguiu o objeto familiar do novo objeto, e, ainda, explorou mais o objeto familiar. Os ratos DM que realizaram exercício físico agudo foram capazes de distinguir o objeto familiar do novo. Os dados são expressos como média ± desvio-padrão da porcentagem do tempo total de exploração; * P < 0,05 para o teste de Wilcoxon, considerando uma média teórica de 50%; n = 8-10 por grupo.

A análise do grupo DM+Exercício agudo, mostrou que os ratos formaram memória 24h após o treino (Média A = 39,68 ± 6,83; C = 60,32 ± 6,83; P = 0,002; $t_{(9)} = 4,774$) (Figura 1A), e, ainda, que essa memória persistiu, sendo expressa 7 dias após o treino (A = 36,89 ± 8,88; D = 63,11 ± 8,88; P = 0,007; $t_{(9)} = 4,429$) (Figura 1B). Os ratos NDM que passaram pelo exercício agudo formaram memória 24 horas após o treino (A = 36,68 ± 9,87; C = 62,32 ± 9,87; P = 0,015; $t_{(7)} = 3,529$) (Figura 1A) e a mesma persistiu 7 dias após o treino (A = 42,09 ± 6,18; D = 57,91 ± 6,18; P = 0,015; $t_{(7)} = 3,617$) (Figura 1B). Por outro lado, os animais deprivados que foram apenas habituados ao aparato de exercício, porém não realizaram a sessão de exercício logo após a aprendizagem de RO, formaram memória 24h após o treino (A = 40,26 ± 9,04; C = 59,74 ± 9,04; P = 0,019; $t_{(9)} = 3,402$) (Figura 1A), no entanto, essa memória não persistiu 7 dias após o treino (A = 45,40 ± 6,45; D = 54,60 ± 6,45; P = 0,05; $t_{(9)} = 2,255$) (Figura 1B). Já os animais não deprivados que passaram apenas pela habituação ao exercício (sem a sessão de exercício agudo), formaram memória 24 horas após o treino (A = 38,84 ± 8,53; C = 61,16 ± 8,53; P = 0,002; $t_{(9)} = 4,139$) (Figura 1A) e apresentaram persistência dessa memória 7 dias após o treino (A = 38,60 ± 5,41; D = 51,40 ± 5,41; P = 0,002; $t_{(9)} = 6,663$) (Figura 1B).

Tanto a deprivação materna, quanto o protocolo de exercício físico, não alteraram a ansiedade dos animais. Esses resultados podem ser observados tanto 24 horas (P = 0,778) quando 7 dias após o treino (P = 0,391) (Tabela 1). Este resultado é importante para que possamos garantir que os resultados dos testes mnemônicos não sofreram interferências comportamentais.

Tabela 1: A deprivação materna e o exercício físico não alteram a ansiedade dos animais. Os dados são expressos como Média $\pm$ DP do tempo gasto e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado. Não houve diferença significativa entre os grupos – Kruskal-Wallis – 8-10 por grupo.

LCE – 24h	DM	NDM	DM+EXER	NDM+EXER	DM+HAB.EXER	NDM+HAB.EXER
Tempo nos braços abertos	138,7 $\pm$ 19,18	137,5 $\pm$ 29,53	145,0 $\pm$ 26,68	141,9 $\pm$ 26,73	146,0 $\pm$ 31,14	148,3 $\pm$ 7,77
Tempo nos braços fechados	137,8 $\pm$ 17,24	130,8 $\pm$ 21,14	138,4 $\pm$ 27,71	144,8 $\pm$ 30,15	137,4 $\pm$ 26,34	142,0 $\pm$ 6,09
Total de entradas	16,80 $\pm$ 3,882	15,22 $\pm$ 5,191	15,90 $\pm$ 6,790	17,25 $\pm$ 6,497	22,00 $\pm$ 6,766	22,80 $\pm$ 5,453
LCE – 7dias	DM	NDM	DM+EXER	NDM+EXER	DM+HAB.EXER	NDM+HAB.EXER
Tempo nos braços abertos	143,7 $\pm$ 18,01	139,6 $\pm$ 18,39	136,7 $\pm$ 22,32	146,0 $\pm$ 32,16	151,9 $\pm$ 19,13	132,1 $\pm$ 9,504
Tempo nos braços fechados	133,21 $\pm$ 5,96	144,9 $\pm$ 16,62	142,9 $\pm$ 25,31	136,6 $\pm$ 30,88	137,7 $\pm$ 21,57	132,5 $\pm$ 9,120
Total de entradas	17,50 $\pm$ 5,104	20,00 $\pm$ 5,431	18,00 $\pm$ 6,429	15,88 $\pm$ 5,083	18,70 $\pm$ 6,129	20,10 $\pm$ 4,175

Nossos resultados mostram que a DM causa déficits na memória de longa duração, e, portanto, também não há persistência da memória de reconhecimento de objetos. Estudos prévios já demonstraram os déficits mnemônicos causados pela DM, tanto 24h após o treino de RO (Mello *et al.*, 2009), até 8 dias após o treino (Pinheiro *et al.*, 2012).

Aqui, demonstramos o efeito protetor de uma sessão de exercício aeróbico agudo, realizado logo após o aprendizado, sobre a memória. Estudos prévios utilizando uma única sessão de exercício agudo, mostraram que esta prática é eficaz em promover melhora da memória de longa duração, gerando a persistência da memória até 21 dias após o treino de RO em ratos adultos (Da Silva De Vargas *et al.*, 2017). Estes resultados demonstram o potencial para o uso dos diferentes tipos de exercícios na tentativa de atenuar os danos cognitivos causados pela DM.

Alguns estudos já utilizaram com sucesso o exercício aeróbico crônico como alternativa para atenuar ou reverter os danos cognitivos causados pela DM (Mello *et al.*, 2009); (Neves *et al.*, 2015). Neves *et al.* (2015) demonstraram que o exercício físico aeróbico crônico (8 semanas) é capaz de reverter os déficits de memória de curta e longa duração causados pela DM (Neves *et al.*, 2015). Nossos achados acrescentam o potencial uso de uma sessão única de exercício logo após uma sessão de aprendizagem (no presente caso, RO), já que esta prática promoveu aprendizagem e persistência da memória em animais deprivados, que sem o exercício não foram capazes de aprender.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostram que uma sessão de exercício aeróbico agudo é capaz de melhorar a memória de ratos normais, promovendo a persistência da mesma, e de ratos submetidos à DM, que gera déficit cognitivo, promovendo a aprendizagem/formação e persistência da memória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENETTI, F. *et al.* Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. *Int J Dev Neurosci*, v. 27, n. 1, p. 59-64, Feb 2009. ISSN 0736-5748 (Print)

0736-5748.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 45, n. 6, p. 1009-15, Dec 1978. ISSN 0161-7567 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/730582> >.

CAO, X. et al. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. **Dev Psychobiol**, v. 56, n. 5, p. 1102-9, Jul 2014. ISSN 1098-2302 (Electronic)

0012-1630 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23712516> >.

DA SILVA DE VARGAS, L. et al. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 329, p. 120-126, Jun 30 2017. ISSN 0166-4328.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 1023-39, Jun 15 2001. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223.

HENNESSY, M. B.; DEAK, T.; SCHIML-WEBB, P. A. Early attachment-figure separation and increased risk for later depression: potential mediation by proinflammatory processes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 6, p. 782-90, May 2010. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359585> >.

MARCO, E. M. et al. The maternal deprivation animal model revisited. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 51, p. 151-63, Apr 2015. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616179> >.

MELLO, P. B. et al. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 3, p. 364-9, Oct 2009. ISSN 1074-7427.

NEVES, B. H. et al. Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. **Physiol Behav**, v. 152, n. Pt A, p. 99-105, Dec 1 2015. ISSN 1873-507X (Electronic)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403760> >.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270.

PINHEIRO, R. M. et al. Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by d-amphetamine: amelioration by valproic acid. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 119, n. 6, p. 627-37, Jun 2012. ISSN 1435-1463 (Electronic)

0300-9564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218930> >.

RENTESI, G. et al. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. **Behav Brain Res**, v. 244, p. 29-37, May 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395600> >.

SOSA, P. M. et al. Physical exercise prevents motor disorders and striatal oxidative imbalance after cerebral ischemia-reperfusion. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 9, p. 798-804, Sep 2015. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222650> >.