



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE DIFERENTES TIPOS
DE MEMÓRIA EM RATOS NORMAIS E COM PREJUÍZO MNEMÔNICO
CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNAL**

Dissertação de Mestrado

Pâmela Billig Mello

Orientador

Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Co-orientador

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre, março de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE DIFERENTES TIPOS
DE MEMÓRIA EM RATOS NORMAIS E COM PREJUÍZO MNEMÔNICO
CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNAL**

Pâmela Billig Mello

Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Básicas da Saúde - Fisiologia,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Fisiologia.

Porto Alegre, março de 2008.

PÂMELA BILLIG MELLO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE DIFERENTES TIPOS
DE MEMÓRIA EM RATOS NORMAIS E COM PREJUÍZO MNEMÔNICO
CAUSADO PELA SEPARAÇÃO MATERNAL**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Básicas da Saúde - Fisiologia,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Fisiologia.

Aprovada em 14 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aldo B. Lucion

Profa. Dra. Márcia L. Fagundes Chaves

Profa. Dra. Lia R. M. Bevilaqua

Prof. Dr. Martín Cammarota (suplente)

“Somos aquilo que nos lembramos.”

Norberto Bobbio

“Também nos caracteriza como indivíduos aquilo que resolvemos ou desejamos esquecer.”

Iván Izquierdo

“Não há questões esgotadas; o que há são homens esgotados no estudo dessas questões.”

Ramón y Cajal

Agradecimentos

Ao concluir este trabalho não posso deixar de agradecer...

Primeiramente as pessoas mais importantes de minha vida: minha família. Especialmente ao meu filho, Vítor, que chegou meio à minha formação acadêmica e, em vez de impedir-me de seguir a carreira científica me deu mais força para isso e aprendeu a dividir a mamãe com os ratinhos e os artigos científicos. Aos meus pais, Elena e Reynaldo, que sempre foram o exemplo que procurei seguir para minha vida acadêmica. Tomara que um dia possa ser como eles! Ao meu irmão, Reynaldo, que mudou sua vida para nos receber em Porto Alegre. E, ao meu namorado, Felipe, não só pelo seu apoio afetivo, mas também por sua ajuda científica, lendo e relendo inúmeras vezes meus artigos. Não há explicação para o bem que me fazes! E a todo o resto da “grande família” de Cruz Alta que sempre acreditou em mim.

Ao mestre, professor Iván Izquierdo, por ter, primeiramente, me aceitado como sua aluna e, mais que isso, ter dividido comigo inúmeros conhecimentos científicos e ter me proporcionado a oportunidade de conviver com esse importante cientista que, vai além de todo o mérito científico e é um grande humanista. Conviver com ele é uma grande honra! Ao professor Martín, que foi e é, sem dúvida alguma, um grande orientador neste e demais trabalhos e também em minha vida pessoal. É muito bom saber que vou continuar trabalhando com vocês.

À professora Adriane e demais colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia, em especial Tânia, Mariane e Maristela, que abriram as portas do seu laboratório e permitiram que realizasse o treinamento físico dos animais. Também ao professor Carlos Alexandre Netto por sua ajuda para que eu pudesse ingressar neste Programa de Pós-graduação.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Andressa, Carol, Cla, Cris, Fer, Gabi, Iza, Nine, Joci, Júlia, Jú, Lara, Lia, Lucas, Nati, Ramón, Sio, Weber... Pelo apoio nos experimentos e companheirismo nos momentos de lazer. Com vocês a vida no lab e em Porto fica muito mais divertida!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Departamento de Fisiologia pela possibilidade de realizar esse curso e apoio financeiro para tal.

À PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) por proporcionar parte da infra-estrutura essencial para a realização deste trabalho.

Aos demais amigos e colegas que colaboraram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho estudamos os efeitos do exercício forçado diário em esteira rolante e da exposição diária ao estresse (porque o exercício forçado envolve certo grau de estresse) durante 2 ou 8 semanas em diferentes tipos de memória em ratos Wistar machos. Os testes de memória utilizados foram: habituação da exploração em um campo aberto, reconhecimento de objetos, e memória espacial no labirinto aquático de Morris. Após estes primeiros experimentos procuramos verificar também a capacidade do exercício físico em reverter o prejuízo da memória causado pela separação maternal, procedimento que causa um déficit de memória já descrito pela literatura, utilizando, também, o teste de esquiva inibitória. O estresse diário realçou a memória de habituação, os animais aprenderam após 2 mas não após 8 semanas; houve prejuízo de memória curta (MCD) e de longa duração (MLD) na tarefa do reconhecimento em 2 semanas mas somente de MCD após 8 semanas; e não houve nenhum efeito na memória espacial após 2 ou 8 semanas. O protocolo do exercício realçou também a memória de habituação no campo aberto após 2 mas não após 8 semanas; prejudicou MCD e MLD na tarefa do reconhecimento após 2 mas não após 8 semanas; e realçou uma medida importante da aprendizagem espacial após 8 semanas (latência de escape), mas não outras medidas. Em relação ao grupo de animais que foram submetidos à separação maternal verificou-se que o exercício crônico foi capaz de reverter o déficit da MCD e MLD na esquiva inibitória e da MCD no reconhecimento de objetos, mas não teve efeitos sobre o prejuízo da MLD nesta tarefa e sobre a memória espacial testada no Labirinto Aquático de Morris. Portanto, o exercício físico crônico tem uma influência positiva sobre a

memória e, adicionalmente, pode ser visto como uma ferramenta terapêutica para reverter determinados déficits de memória.

Palavras-chaves: aprendizagem e memória, funções cerebrais, exercício forçado em esteira rolante, estresse, separação maternal.

ABSTRACT

Here we studied the effects of daily forced exercise in a treadmill and of daily stress (because forced exercise involves a degree of stress) during 2 or 8 weeks on different types of memory in male Wistar rats. The memory tests were: habituation of exploration in an open field, object recognition and spatial memory in Morris water maze. After these experiments we also tried to verify the physical exercise capacity to revert the memory deficit caused by maternal deprivation, procedure that causes a memory deficit already reported, by means of the inhibitory avoidance test. Daily footshock stress enhanced habituation learning after 2 but not after 8 weeks; it hindered both short- (STM) and long-term memory (LTM) of the recognition task after 2 weeks but only STM after 8 weeks; and had no effect on the spatial task after neither 2 or 8 weeks. The exercise protocol also enhanced habituation in the open field after 2 but not 8 weeks; it hindered STM and LTM in the recognition task after 2 but not at 8 weeks; and it enhanced one important measure of spatial learning after 8 weeks (latency to escape) but not other measures. In relation of the animals that was submitted to maternal deprivation we verified that the exercise is capable to revert the deficit of STM and LTM in inhibitory avoidance test and of STM in object recognition test, but don't have any effect on the prejudice of LTM in object recognition and in spatial memory verify using the Morris water maze test. Thus, the physical exercise had a positive influence on memory and, additionally, it can be seen like one therapeutic strategy to reverts some memory deficits.

Key Words: learning and memory, brain function, forced exercise in a treadmill, stress, maternal deprivation.

SUMÁRIO

Agradecimentos	05
Resumo	07
Abstract	09
Lista de figuras	13
Lista de tabelas	16
Lista de abreviaturas e siglas	17
Capítulo I: Introdução	18
1.1 Memória	18
1.2 Tipos de memória	19
1.3 Estresse, exercício físico e memória	22
1.4 Separação maternal e memória	25
1.5 Problema de pesquisa	27
1.6 Hipótese	28
1.7 Objetivos	29
1.7.1 Objetivo geral	29
1.7.2 Objetivos específicos	29
1.8 Justificativa	30
Capítulo II: Metodologia	31
2.1 Animais experimentais	31
2.2 Definição de variáveis	33
2.2.1 Variáveis dependentes	33
2.2.2 Variáveis independentes	33
2.3 Delineamento experimental	34

2.4 Procedimentos	35
2.4.1 Protocolo estresse	35
2.4.2 Protocolo de exercício físico	36
2.4.2.1 Controle adicional do consumo máximo de oxigênio	38
2.4.3 Protocolo de separação maternal	38
2.5 Testes de memória	39
2.5.1 Campo aberto (CA)	39
2.5.2 Memória de reconhecimento de objetos (RO)	41
2.5.3 Labirinto aquático de Morris (LAM)	42
2.5.4 Esquiva inibitória (EI)	44
2.6 Procedimentos	46
2.6.1 Grupo controle I (controle estresse 2 semanas)	46
2.6.2 Grupo experimental I (estresse 2 semanas)	46
2.6.3 Grupo controle II (controle estresse 8 semanas)	46
2.6.4 Grupo experimental II (estresse 8 semanas)	47
2.6.5 Grupo controle III (controle exercício 2 semanas)	47
2.6.6 Grupo experimental III (exercício 2 semanas)	47
2.6.7 Grupo controle IV (controle exercício 8 semanas)	47
2.6.8 Grupo experimental IV (exercício 8 semanas)	48
2.6.9 Grupo controle V (animais não separados)	48
2.6.10 Grupo experimental V (separação maternal)	48
2.6.11 Grupo controle VI (animais não separados exercitados)	48
2.6.12 Grupo experimental VI (separação maternal e exercício)	49
2.7 Análise estatística dos resultados	49
2.8 Aprovação pelo Comitê de Ética	50

	12
Capítulo III: Resultados	51
3.1 Efeitos do exercício sobre a memória	51
3.1.1 Memória de habituação	51
3.1.2 Memória de reconhecimento	52
3.1.3 Memória espacial	53
3.1.4 Atividade exploratória e locomotora	55
3.1.5 Efetividade do treinamento de exercício físico	56
3.2 Efeitos do exercício sobre a memória de ratos com déficit mnemônico causado pela separação maternal	56
3.2.1 Memória de habituação	57
3.2.2 Memória de reconhecimento	57
3.2.3 Memória espacial	58
3.2.4 Memória aversiva	59
3.2.5 Atividade exploratória e locomotora	60
Capítulo IV: Discussão	62
Capítulo V: Conclusões	65
Capítulo VI: Perspectivas	67
Capítulo VII: Artigos científicos	68
Referências	69
Anexos	83
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética	83
ANEXO II – Artigo 1	85
ANEXO III – Artigo 2	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de memória de acordo com o seu tempo de duração e fases de formação da memória.	21
Figura 2. Memória explícita e memória implícita.	22
Figura 3. Delineamento experimental.	34
Figura 4. Protocolo de estresse.	36
Figura 5. Protocolo de exercício físico.	38
Figura 6. Teste de campo aberto.	40
Figura 7. Esquema de realização do teste de memória de habituação à exploração no campo aberto.	41
Figura 8. Teste de reconhecimento de objetos.	41
Figura 9. Esquema de realização do teste de reconhecimento de objetos.	42
Figura 10. Piscina para realização do labirinto aquático de Morris.	43
Figura 11. Teste de esquiva inibitória.	45

Figura 12. Esquema de realização do teste de esquiiva inibitória.	46
Figura 13. Esquema dos procedimentos realizados nesta dissertação de acordo com a idade dos animais.	49
Figura 14. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 ou 8 semanas, e do exercício físico em esteira rolante durante 2 ou 8 semanas na habituação à exploração em campo aberto.	52
Figura 15. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 ou 8 semanas e do exercício forçado por 2 ou 8 semanas na memória de reconhecimento de objetos.	53
Figura 16. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 ou 8 semanas e do exercício forçado por 2 ou 8 semanas na memória espacial.	54
Figura 17. Velocidade de nado no teste no Labirinto Aquático de Morris.	55
Figura 18. Consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) indireto antes e no meio de treinamento físico.	56
Figura 19. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na habituação à exploração em campo aberto.	57

Figura 20. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória de reconhecimento de objetos de curta (MCD) e longa duração (MLD). 58

Figura 21. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória espacial. 59

Figura 22. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória aversiva de curta (MCD) e longa duração (MLD) na esquiava inibitória. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos diferentes procedimentos (estresse e exercício físico forçado em esteira rolante por 2 ou 8 semanas) na atividade exploratória e locomotora dos animais. 55

Tabela 2. Efeitos dos diferentes procedimentos (separação maternal, exercício físico ou ambos) na atividade exploratória e locomotora dos animais. 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MCD (STM)	Memória de curta duração (em inglês <i>short-term memory</i>)
MLD (LTM)	Memória de longa duração (em inglês <i>long-term memory</i>)
MT	Memória de trabalho
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
HPA	Hipotálamo - pituitária (hipófise) - adrenal
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina (do inglês <i>corticotropin releasing hormone</i>)
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio
cm	Centímetros
mA	Miliamperes
m/min	Metros por minuto
km/h	Quilômetros por hora
CA	Campo aberto
RO	Reconhecimento de objetos
LAM	Labirinto Aquático de Morris
cont	Controle

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1.1 Memória

Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003). A aquisição representa a aprendizagem; a formação e a conservação são processos complexos e dependem do tipo de memória; e, a evocação é a recordação, a lembrança daquilo que foi aprendido anteriormente (Squire, 2004).

O conceito de memória é tão complexo como a tentativa de descrever seus processos de formação e consolidação (Izquierdo, 1989; Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo e McGaugh, 2000; Igaz et al., 2004; Riedel e Plat, 2004; Thompson, 2005). O conjunto de nossas memórias determina nossa personalidade, é único e individual, e para cada um de nós diferente. Dizemos que nossos computadores têm memória, livros têm memória, enfim... Todos nós temos recordações, lembranças nossas, de diversos e variados momentos, que, nada mais são que memórias.

Conforme descreve Izquierdo (2002) a palavra “memória” inclui desde os mecanismos que operam as placas de computadores, até a história dos povos e as memórias individuais de cada ser vivo. Mas, em casa situação, tem um significado próprio, pois os mecanismos de aquisição, armazenamento e evocação são distintos.

De acordo com Squire e Kandel (2003), Bliss e Collingridge (1993) e Martin et al. (2000) as memórias derivam de mudanças da transmissão sináptica entre os neurônios (células do sistema nervoso) que ocorrem como resultado de atividade neural prévia. Sinapse é o ponto de encontro entre a terminação nervosa dos

axônios de um neurônio com os dendritos do neurônio seguinte, é nesse ponto que ocorre a transferência de informação de um neurônio para outro, através da liberação de neurotransmissores que possuem receptores específicos. Mas nem todos os neurônios fazem memória, alguns inclusive inibem a formação e evocação de memórias e, um número muito grande de neurônios (do hipocampo e regiões corticais, como córtex pré-frontal, frontal, temporal e parietal) se especializa nesta função (Izquierdo, 2003).

Cabe ressaltar que as memórias são moduladas pelas emoções, pelo nível de alerta e pelo estado de ânimo, estes sendo reguladores da aquisição, da formação e da evocação de memórias (Izquierdo, 2002; Cahill e McGaugh, 1998; McGaugh 2004, 2005). É impossível adquirir memórias sem um estado mínimo de alerta (inclusive durante o sono), então, as regiões do cérebro responsáveis por manter esse estado devem estar ativadas quando aprendemos algo novo. Também, os estados de ânimo e as emoções, mobilizam, em maior ou menor grau, vias neuro-humorais específicas que influenciam esse processo (Izquierdo, 2004; Phelps, 2006).

1.2 Tipos de memória

As diversas formas de memória constituem mecanismos delicados e muito aperfeiçoados, capazes de conservar, durante períodos de tempo muito breves ou muito longos, os mais variados tipos de informação (Izquierdo, 2004; Carew, 1996; Izquierdo et al., 2006, McGaugh, 1966; Medina e Izquierdo, 1995).

Há muitas classificações para as memórias, considerando sua função, seu conteúdo e seu tempo de duração. Se formos considerar o tempo que as memórias duram, podemos dizer que algumas duram somente alguns segundos, enquanto

outras duram horas, dias, meses ou anos (Squire e Zola, 1996). Neste aspecto, as memórias podem ser: memórias de trabalho (MT), de curta duração (MCD) ou de longa duração (MLD; Alonso et al., 2002).

A memória de trabalho é a memória imediata. No momento em que a informação é recebida ela determina se esta é uma informação nova ou não, se é útil para o organismo ou não. Ela serve para manter a informação durante alguns segundos ou poucos minutos e não produz arquivos, sendo regulada basicamente pelo córtex pré-frontal e suas conexões. Muitos não consideram a memória de trabalho como um tipo de memória, mas sim como um sistema gerenciador central que mantém a informação por um tempo suficiente para que ela entre ou não para a memória propriamente dita (Izquierdo, 2002; Dash et al., 2007).

As memórias de curta e longa duração são consolidadas por células especializadas do hipocampo e das áreas do córtex com as quais ele se conecta. A memória de curta duração mantém a informação disponível enquanto a de longa duração está sendo formada (Unsworth e Engle, 2007), é como uma moradia transitória para a informação, já que a memória de trabalho dura poucos segundos e a de longa duração demora horas para se formar definitivamente (Richardson, 2007; Izquierdo, 2004). A memória de curta duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos, como a síntese protéica. As memórias de longa duração duram muitos meses ou anos, sendo também chamadas memórias remotas (Izquierdo, 2002; Moncada e Viola, 2007).

A figura 1 ilustra os tipos de memória de acordo com o seu tempo de duração e as fases de formação da memória.

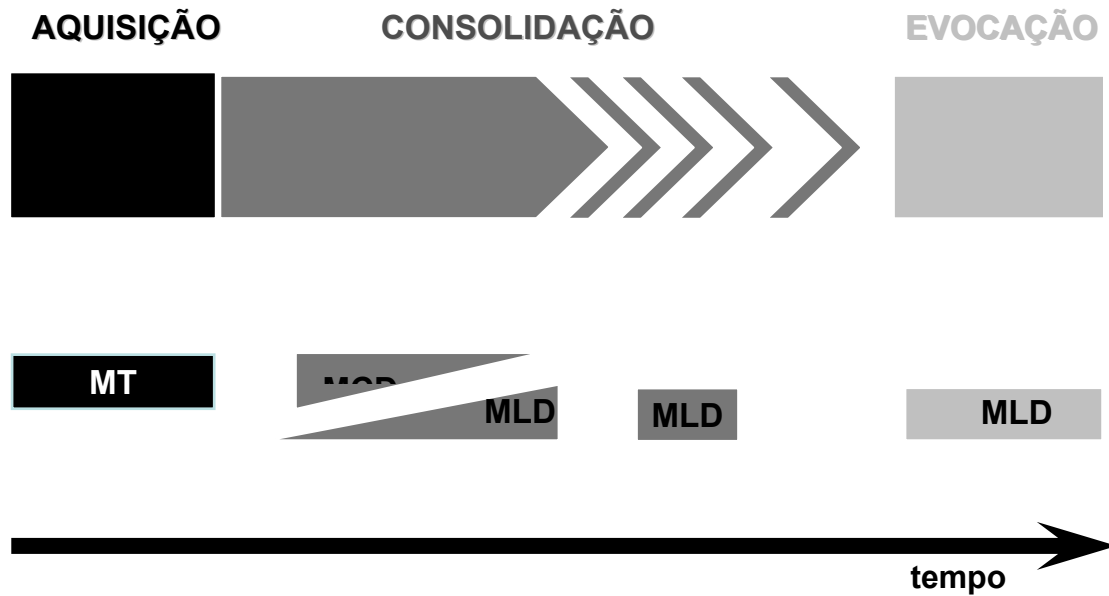


Figura 1. Tipos de memória de acordo com o seu tempo de duração e fases de formação da memória.

Existe também outra classificação de memória, que divide as memórias naquelas que podem ser relatadas, as memórias explícitas ou declarativas, e naquelas que não podem ser verbalizadas, as implícitas (Squire e Zola, 1996).

As memórias declarativas incluem lembranças de fatos e eventos e envolvem estruturas como o lobo medial temporal e o diencéfalo. Já as explícitas, também chamadas procedurais ou procedimentais referem-se a um conjunto de habilidades e hábitos que não podem ser descritos e envolvem estruturas como a amígdala, o cerebelo e os gânglios da base.

A figura 2 (adaptada de Bear et al., 2002) ilustra estes dois tipos de memória.



Figura 2. Memória explícita e memória implícita

1.3 Estresse, exercício físico e memória

Sabe-se que diversos fatores, tais como estado de ânimo, emoção e estado de alerta, influenciam os processos de aquisição, consolidação e evocação das memórias (Izquierdo, 2004; Izquierdo et al., 2002; McGaugh, 2004, 2005, 2006; Maroun, 2006; Phelps, 2004). Sabe-se também, que o exercício físico causa certo estresse ao organismo por meio de seus diferentes sistemas. Poucas pesquisas, porém, têm se preocupado em estudar os efeitos do estresse puro, do exercício e do estresse causado pelo exercício físico sobre a memória, bem como em comparar estes efeitos.

Os benefícios funcionais do exercício sobre a função cerebral têm sido estudados em humanos (Winter et al., 2007; Coles e Tomporowski, 2008; Sibley e Beilock, 2007) e também em animais, especialmente roedores. O exercício físico regular tem sido relacionada com a melhora da função cognitiva em ratos (Kramer et al., 1999; Sutto e Akihama, 2003; Cotman e Berchthold, 2002; Berchthold et al., 2005; Chen et al., 2007; Van der Borght et al., 2007). Dentre os achados relacionando o exercício físico com as funções cognitivas estão: o aumento da neurogênese hipocampal (During e Cao, 2006; Fabel et al., 2003; van Praag et al.,

1999), a redução de variáveis relacionadas ao estresse oxidativo (Ogonovsky et al., 2005; Radak et al., 2006), o aumento dos níveis do BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*; Vaynman et al., 2006; Huang et al., 2006; Berchthold et al., 2005; Neeper et al., 1995), o incremento da vascularização cerebral (Isaacs et al., 1992), e uma variedade de mudanças morfológicas (Arida et al., 2004).

Alguns autores têm reportado efeitos geralmente favoráveis do exercício em testes de memória (Barnes et al., 1991; Uysal et al., 2005; van Praag et al., 2005; Blustein et al., 2006; Ang et al., 2006; Ogonovsky et al., 2005; Radak et al., 2006; Alaei et al., 2006; Chen et al., 2007). Muitos destes estudos em roedores foram feitos utilizando exercício voluntário (van Praag et al., 2005); mas alguns têm investigado os efeitos do exercício forçado (Ang et al., 2006; Radak et al., 2006), que se assemelha mais ao exercício realizado por humanos, por permitir que a intensidade do esforço e a frequência sejam controladas (Winter et al., 2007), assim como envolve um grau de estresse (Cotman e Berchthold, 2002; Ang et al., 2006; Blustein et al., 2006). O estresse, agudo ou crônico, obviamente provoca profundas alterações na memória (McEwen and Magarinos, 2001; McGaugh 2004, 2005, 2006; Das et al., 2005; Manikandan et al., 2006; Radley, 2005; Rodrigues et al., 2004). Então, torna-se importante tentar separar os efeitos causados pelo exercício daqueles causados pelo estresse inerente ao exercício.

Uysal *et. al.* (2005) estudaram os efeitos do exercício aeróbico regular em ratos com 22 dias de vida (período equivalente à adolescência) sobre a densidade neuronal, apoptose e memória espacial (avaliada através do labirinto aquático). Para isso realizaram sessões diárias de 30 minutos de corrida a uma velocidade de 8 metros/minuto durante 8 semanas. Dentre outros aspectos, o estudo demonstrou

que o exercício induziu significativa melhora cognitiva nos ratos, além de aumentar o número de neurônios nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo.

Ogonovszky e colaboradores (2005) também realizaram uma pesquisa buscando comparar os efeitos do treino de exercício moderado, enérgico e do *overtraining* sobre a memória, entre outros fatores. Neste aspecto, através do teste de esQUIVA passiva com grupos de ratos que haviam realizado diferentes tipos de treino, perceberam uma melhora da memória nos grupos que haviam realizado exercício enérgico e sobre-treinamento (*overtraining*). Seus achados permitiram afirmar que o *overtraining* não induz a um estresse oxidativo cerebral e não causa perda de memória.

Van Praag *et. al.* (2005) investigaram como a corrida voluntária em rodas poderia beneficiar ratos sedentários de 19 meses de idade (considerados idosos, uma vez que os ratos de laboratório vivem no máximo 20-26 meses). Perceberam que o declínio da neurogênese em ratos idosos foi revertido em 50% em relação ao grupo controle, e a morfologia dos novos neurônios não diferiu entre o grupo de jovens e o de idosos corredores, indicando que a maturação inicial das novas células neuronais não foram afetadas pela idade. Desta forma, o grupo de pesquisadores concluiu que o exercício voluntário ameniza algumas das deteriorizações morfológicas e comportamentais decorrentes do envelhecimento.

Com relação ao estresse, Das *et. al.* (2005) pesquisaram os efeitos de três tipos de estresse em ratos. Um grupo de animais foi submetido ao estresse por imobilização aguda; o segundo grupo ao estresse crônico predito, por imobilização diária, durante 5 dias consecutivos; e, o terceiro grupo ao estresse crônico não predito, que incluiu, entre outras coisas, natação forçada, imobilização e exercício forçado por 5 dias consecutivos. O grupo de pesquisadores observou que a

aprendizagem ocorreu no grupo predito, mas não no grupo não predito; que a atividade cerebral da acetilcolinesterase apresentou decréscimo nos três grupos submetidos ao estresse, quando comparados ao grupo controle; e, que o aspecto cognitivo só foi afetado no grupo que sofreu estresse não predito. Ou seja, o estresse crônico predito não afetou a memória.

As pesquisas realizadas até então com relação a este tema são, em sua maioria, recentes e analisam diferentes tipos de memória. Não foram encontradas pesquisas que comparem os efeitos do estresse e do exercício físico sobre os diferentes tipos de memória.

1.4 Separação maternal e memória

Assim como o exercício físico, diversos estudos têm relatado os efeitos da separação maternal sobre as funções do sistema nervoso central, que incluem efeitos desde a vida adulta até a velhice (Cirulli et al., 1998; Oitzl et al., 2000; Lehmann et al., 1999). O estresse ao longo da vida está associado com mudanças nas respostas comportamentais e fisiológicas do indivíduo tornando-o mais susceptível a psicopatologias na idade adulta (Mirescu et al., 2004).

Em mamíferos, incluindo roedores, primatas e humanos, a mãe é a fonte que garante o alimento para os filhotes. Além disso, surge, a partir do nascimento, uma complexa interação mãe-filhote, que vai além da necessidade nutricional, afinal é a mãe que provém à temperatura essencial dos filhotes no ninho, mantém-se atenta aos estímulos visuais, olfatórios e auditivos em relação à ninhada por um extenso período no desenvolvimento pós-natal e é a mãe que garante todo o cuidado dos filhotes para o seu perfeito desenvolvimento (Pryce et al., 2001). Portanto, aplicar situações de estresse para os neonatos como a separação maternal e as demais

intervenções na relação mãe-filhote, influencia no desenvolvimento e no amadurecimento do sistema neural e de outros sistemas (Benetti et al., 2007; Lucion et al., 1994).

Dentre os efeitos desse tipo de intervenção podemos destacar a redução do BDNF e da expressão da subunidade do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato, do inglês *N-methyl-D-aspartate*) no hipocampo do rato (Roceri et al., 2002; Kuma et al., 2004) e, dentre outras, elevada atividade basal do eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA) na vida adulta (Rots et al., 1996; Schimidt et al., 2002). Considerando a separação maternal somente, os diferentes protocolos utilizados consistem em afastar os filhotes da mãe por um período que vai desde 24 horas de separação, durante um dia, até 3 horas de separação, durante dez dias (McIntosh et al., 1999; Plotsky e Meaney, 1993; Wigger e Neumann, 1999).

Longos períodos de separação maternal promovem várias alterações comportamentais, neuroendócrinas e estruturais estáveis na idade adulta (Francis et al., 2002). Ratos separados da mãe no período neonatal apresentam uma maior secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona em resposta ao estresse na idade adulta, embora mantenham inalteradas as condições basais do eixo HPA na secreção destes hormônios (Plotsky et al., 1993; Meaney et al., 1993; Lehmann et al., 1999; Viau et al., 1993; Huot et al., 2004).

Associado a essas mudanças hormonais, a separação maternal também promove mudanças comportamentais nos animais separados, como o aumento da ansiedade e a depressão, e prejuízos no cuidado com os filhotes (no caso das fêmeas). Além disso, ratos recém-nascidos afastados da mãe por um período de 24 horas mantidos na temperatura do ninho, mas sem alimentação, mostraram

alterações ao longo do desenvolvimento, como retardo na abertura dos olhos, no aparecimento dos pêlos e na abertura vaginal (Swanson et al., 1984).

Estes dados indicam que a separação da mãe na infância faz com que os adultos pareçam ter mais medo em um ambiente novo, como o campo aberto ou o labirinto em cruz elevado (Wigger & Neumann, 1999; Ogawa et al., 1994) e, além disso, machos adultos separados da mãe por 6 horas diárias no período neonatal apresentaram comportamento sexual reduzido, além de uma latência maior em montar na fêmea receptiva (Rhees et al., 2001).

Os estudos relacionando os efeitos da separação maternal sobre as tarefas de aprendizado e memória ainda são poucos e os resultados até o momento são em parte contraditórios. Hout et al. (2002) mostraram que animais separados da mãe no período neonatal possuem um menor aprendizado de orientação espacial quando testados no labirinto aquático de Morris.

No entanto, outros estudos realizados em animais que foram separados da mãe por um longo período diário de 3 horas ou por um único período de 24 horas mostraram que, esses animais, quando testados no labirinto aquático ou na esquiiva inibitória apenas apresentaram uma tendência a aprender menos, e que esta menor aquisição é dependente do sexo e do período que o animal foi submetido à separação da mãe durante a infância (Lehmann et al., 1999; Huot et al., 2002).

1.5 Problema de pesquisa

É tido por certo que o exercício traz benefícios à memória. Porém faltam estudos científicos controlados que realmente comprovem este fato, expliquem e especifiquem quais seriam estes benefícios (Ang e Gomez-Pinilla, 2007).

Neste sentido, propomos estudar os efeitos do exercício físico sobre a memória em ratos de laboratório avaliados em diferentes tarefas comportamentais.

Como o exercício envolve certo grau de estresse (Blustein et al., 2006) estudamos, paralelamente, os efeitos do estresse de duração e intensidade comparáveis àquelas estudadas no exercício sobre as diversas tarefas.

Alguns estudos não têm demonstrado efeitos positivos do exercício sobre a memória (Barnes et al., 1991; Rosa et al., 2007), mas o exercício tem sido amplamente descrito como uma efetiva ferramenta para reverter o déficit mnemônico causado por diferentes fatores, como a morfina (Alaei et al., 2006), o envelhecimento (Garza et al, 2004; vanPraag et al, 2005) e a exposição pré-natal ao etanol (Chirstie et al, 2005). Adicionalmente, o exercício pode desempenhar um papel preventivo, aumentando a resistência ao estresse oxidativo (Radak et al., 2007), reduzindo o risco de decaimento cognitivo e demência em pessoas idosas (Laurin et al., 2001), e o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (Friedland et al., 2001).

Quando consideramos um efeito deletério à memória, como a separação maternal, e um efeito terapêutico/preventivo, como o desempenhado pelo exercício físico, combinados, podemos ver o exercício como uma estratégia para reverter o déficit mnemônico causado pela separação maternal.

Neste sentido, delineamos o seguinte problema de pesquisa:

QUAIS SÃO OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIA EM RATOS NORMAIS E COM PREJUÍZO MNEMÔNICO CAUSADOS PELA SEPARAÇÃO MATERNAL?

1.6 Hipótese

O exercício físico causa diferentes efeitos sobre os diversos tipos de memória, sendo que deve ter um efeito modulatório positivo sobre a memória de ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Verificar quais são os efeitos do exercício físico sobre os diferentes tipos de memória em ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal.

1.7.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos do estresse e do exercício físico sobre diferentes tipos de memória no rato normal;
- Analisar os efeitos do exercício sub-crônico (uma semana de adaptação + uma semana de treinamento físico) sobre os diferentes tipos de memória em ratos Wistar e comparar com os efeitos do exercício crônico (oito semanas);
- Analisar os efeitos do estresse sub-crônico (duas semanas) sobre os diferentes tipos de memória em ratos Wistar e comparar com os efeitos do exercício crônico (oito semanas);
- Verificar os efeitos da separação maternal sobre os diferentes tipos de memória no rato;
- Comparar os resultados obtidos nos testes comportamentais entre os grupos separados da mãe que realizaram e que não realizaram exercício físico crônico (oito semanas), e verificar se o exercício físico é capaz de reverter o déficit mnemônico causado pela separação maternal.

1.8 Justificativa

Torna-se importante esta pesquisa no sentido de verificar se o exercício físico realmente traz benefícios à memória de ratos normais, bem como, se é capaz de exercer um efeito modulatório positivo que gere algum tipo de melhora de uma memória normal. Diversos estudos têm sido conduzidos com objetivos semelhantes a esse, os resultados, porém, são bastante controversos, de forma que este tema ainda necessita ser pesquisado (Santos et al., 1998).

Igualmente importante é tentar separar os efeitos do exercício em si e do estresse inerente ao exercício físico forçado, o que poucos trabalhos se preocupam em fazer. É certo que esse tipo de exercício gera bastante estresse aos animais e elucidar os reais efeitos do exercício e compará-los aos efeitos do estresse sobre os diferentes tipos de memória é essencial para poder identificar os reais efeitos do exercício físico.

Além disso, verificar se o exercício é capaz de reverter prejuízos mnemônicos, como por exemplo, os causados pela separação maternal na infância, um procedimento simples e que, comprovadamente causa déficits em diversos tipos de memória, parece fundamental para que se possa ver o exercício também como uma prática terapêutica que traz benefícios não só para a reabilitação física, mas também para a reabilitação de algumas funções cognitivas.

CAPÍTULO II: METODOLOGIA

2.1 Animais experimentais

A população foi composta por ratos machos e fêmeas virgens e suas posteriores ninhadas, da raça Wistar provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com capacidade para 6 animais, forradas com maravalha. Foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7 hs e escuro a partir das 19 hs), com água e ração à vontade e uma temperatura constante de 23°C. As caixas eram trocadas e limpas a cada 2 dias. O máximo de precaução foi tomada com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos *“Principles of laboratory animal care”* (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

Para a primeira parte dos experimentos foram utilizados 112 ratos machos da raça Wistar selecionados aleatoriamente. Esta parte da amostra foi dividida em 8 grupos: o grupo controle I (controle estresse 2 semanas), composto por 14 animais sedentários; o grupo experimental I (estresse 2 semanas), composto por 14 animais que sofreram estresse subcrônico; o grupo controle II (controle estresse 8 semanas), composto por 14 animais sedentários; o grupo experimental II (estresse 8 semanas), composto por 14 animais que sofreram estresse crônico; o grupo controle III (controle exercício 2 semanas), composto por 14 animais que entraram em contato com a esteira sem, no entanto, correr; o grupo experimental III (exercício 2 semanas), composto por 14 animais que realizaram exercício físico subcrônico; o

grupo controle IV (controle exercício 8 semanas), composto por 14 animais que entraram em contato com a esteira sem, no entanto, correr; o grupo experimental IV (exercício 8 semanas) composto por 14 animais que realizaram exercício físico crônico.

Os animais iniciaram os treinos com 45 ou 80 dias de vida (animais treinados por 8 ou 2 semanas, respectivamente). Conseqüentemente, todos tinham em torno de 100 dias de vida quando foram submetidos aos testes de memória.

A segunda parte dos experimentos foi realizada com os filhotes machos das ratas oriundas do CREAL/UFRGS. As ratas virgens pesando entre 200 e 250 gramas foram colocadas por uma semana em caixas plásticas na presença de um macho da mesma espécie. Após este período de 7 dias, as ratas, já prenhas, foram colocadas em caixas individuais. Os filhotes machos foram divididos em 4 grupos: grupo controle V (não separados), composto por 10 animais não separados da mãe; grupo experimental V (separação maternal), composto por 10 animais que foram submetidos ao protocolo de separação maternal (protocolo descrito a seguir); grupo controle VI (não separados exercitados), composto por 14 animais não submetidos ao protocolo de separação maternal e submetidos ao protocolo de exercício físico por 8 semanas; e, grupo experimental VI (separação e exercício) , composto por 10 animais que foram submetidos ao protocolo de separação maternal e a um protocolo de exercício de 8 semanas.

O treinamento dos animais do grupo controle e experimental VI na esteira iniciou com 45 dias de vida, de forma que, no momento dos testes de memória estes tinham em torno de 100 dias de vida.

2.2 Definição de variáveis

2.2.1 Variáveis independentes

As variáveis independentes são aquelas controladas pelo pesquisador. Neste caso são: o estresse causado a alguns grupos de animais (por 2 ou 8 semanas), o exercício físico realizado (por 2 ou 8 semanas) e a separação maternal sozinha ou seguida de exercício físico (por 8 semanas).

2.2.2 Variáveis dependentes

As variáveis dependentes são as alterações na memória decorrentes das diversas intervenções, medidas através de diferentes tarefas comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris e esQUIVA inibitória).

2.3 Delineamento experimental

R	X1	O1	O2	O3	
R	X1'	O1	O2	O3	
R	X2	O1	O2	O3	
R	X2'	O1	O2	O3	
R	X3	O1	O2	O3	
R	X3'	O1	O2	O3	
R	X4	O1	O2	O3	
R	X4'	O1	O2	O3	
R	X5	O1	O2	O3	O4
R	X5'	O1	O2	O3	O4
R	X6	O1	O2	O3	O4
R	X6'	O1	O2	O3	O4

Figura 3. Delineamento experimental

Onde:

R = Ratos machos Wistar selecionados aleatoriamente.

X1 = Ratos mantidos sedentários por 2 semanas (n=14).

X1' = Ratos submetidos a procedimento que causa estresse subcrônico no animal por 2 semanas (n=14).

X2 = Ratos mantidos sedentários por 8 semanas (n=14).

X2' = Ratos submetidos a procedimento que causa estresse crônico no animal por 8 semanas (n=14).

X3 = Ratos mantidos perto e sobre a esteira rolante, ouvindo seu barulho, porém sem correr por 2 semanas (n=14).

X3' = Ratos submetidos a exercício físico subcrônico (corrida em esteira) por 2 semanas (n=14).

X4 = Ratos mantidos perto e sobre a esteira rolante, ouvindo seu barulho, porém sem correr por 8 semanas (n=14) .

X4' = Ratos submetidos a exercício físico crônico (corrida em esteira) por 8 semanas (n=14).

X5 = Ratos não submetidos ao protocolo de separação maternal (n=10).

X5' = Ratos submetidos ao protocolo de separação maternal (n=10).

X6 = Ratos não submetidos ao protocolo de separação maternal e submetidos ao protocolo de exercício físico por 8 semanas (n=14).

X6' = Ratos submetidos ao protocolo de separação maternal e ao protocolo de exercício em esteira rolante por 8 semanas (n=10).

O1 = Teste de memória de habituação à exploração (Campo aberto).

O2 = Teste de memória de reconhecimento (Memória de reconhecimento de objetos).

O3 = Teste de memória espacial (Labirinto aquático de Morris).

O4 = Teste de memória aversiva (Esquiva inibitória).

2.4 Procedimentos

2.4.1 Protocolo de estresse

Os animais foram estressados por 2 ou 8 semanas (figura 4). O aparato consistia de uma caixa construída em acrílico (50 x 25 x 25 cm) com assoalho feito de uma grade de bronze com barras a cada 1 cm. Durante a primeira semana os animais foram habituados ao aparato de treino. Após esta semana de habituação,

cada animal recebeu choques de 0,4 mA nas patas por 2 segundos a cada 30 segundos durante 5 minutos, cinco dias consecutivos por semana (adaptado de Cao et al., 2007).

Não houve dano aparente ao tecido das patas dos animais. Os grupos controles foram transportados para a sala experimental e manipulados exatamente como os animais experimentais, mas sem receber choque elétrico.



Figura 4. Protocolo de estresse. Animal durante o procedimento de estresse com choque elétrico.

2.4.2 Protocolo de exercício físico

Os animais foram treinados por 2 ou 8 semanas em uma esteira rolante (figura 5). Durante a primeira semana os animais foram habituados ao aparato de treino para minimizar o estresse. Para isso, foram colocados diariamente na esteira rolante por um tempo crescente, iniciando com 10 minutos sobre a esteira parada.

No primeiro dia da segunda semana foi realizado um teste para determinar a velocidade de corrida que seria utilizada durante os treinos. Foi utilizada a medida do consumo máximo de oxigênio indireto (VO_2 máx) recomendada por Brooks and White (1978). Cada animal correu por 25 minutos na esteira rolante a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5m/min a cada 3 minutos até atingir seu ponto de exaustão (incapacidade do rato em continuar a correr). O tempo

de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como índice da capacidade de exercício, e usadas para mensuração do VO_2 máx indireto.

Esta medida foi usada para controle da intensidade do exercício durante os treinos. Cada animal foi treinado a uma intensidade de 60-75% de seu VO_2 máx, durante 50 minutos, 5 vezes por semana. Em cada dia de treino, os primeiros 10 minutos eram destinados para aceleração da esteira, seguidos por 30 minutos de corrida na velocidade alvo (60-75% do VO_2 máx) e, os últimos 10 minutos para a desaceleração gradual da esteira.

As sessões de corrida foram conduzidas em uma esteira rolante motorizada adaptada para roedores (IMBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil) com pistas individuais de 10 cm de largura e 50 cm de comprimento, separadas entre si por paredes confeccionadas em acrílico, sempre entre as 10 horas e as 14 horas. Nenhum choque elétrico foi utilizado neste treinamento. Os animais inicialmente selecionados que se recusavam a correr eram encorajados com gentis tapinhas em suas costas. Os que, mesmo assim, se recusavam a correr foram excluídos da amostra (adaptado de Scopel et al., 2006).

Os grupos sedentários foram transportados para a sala de experimentos e manipulados exatamente como os animais do grupo experimental, pelo mesmo tempo, porém sem realizar a corrida. Os animais sedentários eram colocados nas pistas por 10 minutos com a esteira desligada e, então, em suas caixas residência, ao lado da esteira, enquanto os animais experimentais corriam.



Figura 5. Protocolo de exercício físico. Animais em treinamento de exercício na esteira rolante.

2.4.2.1 Controle adicional do consumo máximo de oxigênio

No primeiro dia da quinta semana, os animais submetidos ao protocolo de exercício por 8 semanas foram expostos a um segundo teste do consumo máximo indireto de oxigênio, de acordo com o protocolo utilizado por Brooks e White (1978), da mesma forma que foi feito antes do início do protocolo de corrida com os mesmos animais. Um aumento no VO_2 máx indireto (ou seja, na velocidade de corrida), indica que o protocolo de corrida está sendo eficiente, uma vez que gera um aumento da capacidade física aeróbica.

2.4.3 Protocolo de separação maternal

As ratas prenhas foram mantidas em caixas individuais até o momento do parto. O dia do parto foi considerado como dia zero. No dia seguinte ao parto (dia 1), as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos, quando possível) e então submetidas ao procedimento de separação maternal. Somente os filhotes em excesso (mais que oito de cada ninhada) foram tocados pelo experimentador para serem descartados. Depois de transcorridos os primeiros 10 dias de vida, as caixas retornaram a ser limpas normalmente.

Com 21 dias de vida os animais foram desmamados e os machos mantidos no ambiente adequado conforme descrito previamente. Somente os filhotes machos foram utilizados nos experimentos descritos posteriormente.

A separação maternal realizada neste trabalho consistiu em retirar a mãe da caixa residência, colocá-la numa caixa adjacente e levá-la a uma sala anexa ao Biotério, onde ela permanecia durante todo o procedimento de separação, com duração diária de 180 minutos. A separação foi realizada diariamente nos primeiros 10 dias pós-parto no ciclo claro, entre as 08 horas e as 14 horas. Imediatamente após a retirada da mãe da caixa residência iniciava a contagem do tempo de separação maternal, e os filhotes permaneciam na caixa residência, com luz e temperatura controladas (protocolo adaptado de Renard et al., 2005).

Os ratos controle permaneciam em suas caixas residência, na presença da mãe, sem serem perturbados.

2.5 Testes de memória

2.5.1 Campo Aberto (CA)

Para analisar a atividade exploratória e locomotora (descritas posteriormente), bem como a memória de habituação, os animais foram submetidos à tarefa de Campo Aberto (figura 6).



Figura 6. Teste de Campo Aberto.

Os animais foram gentilmente colocados no quadrante posterior esquerdo da arena de campo aberto, de tamanho 50 x 50 x 39 cm (comprimento x altura x profundidade), de paredes altas, feitas de madeira compensada branca com uma parede frontal de vidro. O soalho do campo aberto é dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. O número de vezes que o animal cruzou as linhas pretas (número de cruzamentos, em inglês *crossings*) e o número de vezes o rato se elevou sobre as patas traseiras (número de elevações, em inglês *rearings*) foram registrados enquanto foi permitida a livre exploração do ambiente pelo animal durante 5 minutos.

Para testar a memória de habituação ao campo aberto, 24 horas depois, os animais foram novamente colocados no campo para livre exploração por outros 5 minutos (figura7) e os mesmos parâmetros foram mensurados para avaliar a habituação do animal ao ambiente (BARROS, *et al.*, 2006).

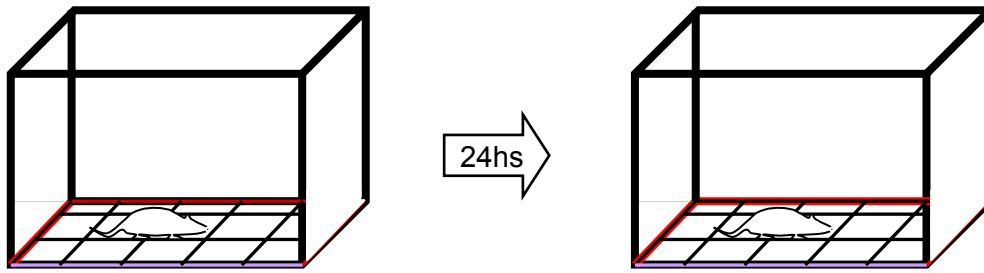


Figura 7. Esquema de realização do teste de memória de habituação à exploração no campo aberto.

2.5.2 Reconhecimento de objetos (RO)

Os ratos são animais exploratórios. Na tarefa de reconhecimento de objetos este comportamento exploratório é observado e avaliado (Ennaucer and Delacour, 1988). O teste de reconhecimento de objetos foi realizado na mesma arena que o campo aberto, utilizando o protocolo proposto por Dere *et al.* (2005). Todos os animais foram habituados ao ambiente de teste durante 4 dias, tendo 20 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Os objetos, feitos de metal ou vidro, foram fixados à arena com fita adesiva (figura 8).

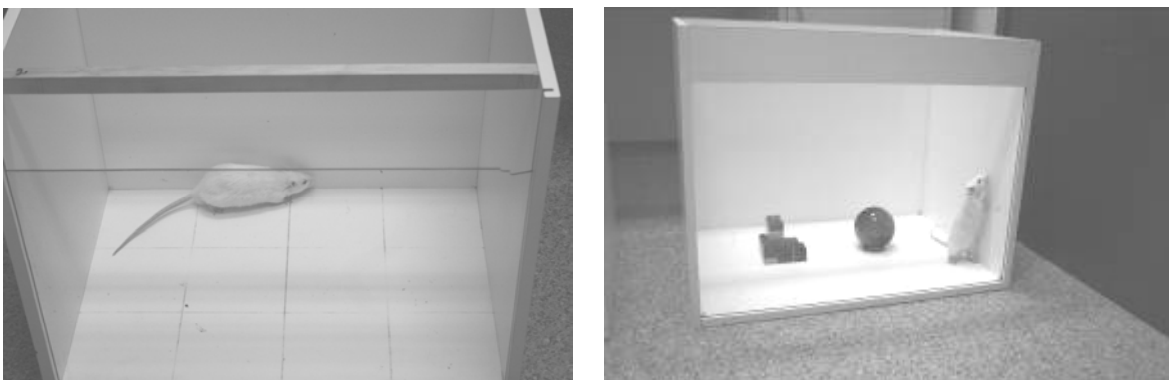


Figura 8. Teste de reconhecimento de objetos.

No primeiro dia (sessão de treino) os animais foram colocados na arena contendo dois objetos diferentes (A e B) para livre exploração por 5 minutos. O teste foi repetido 180 minutos depois para testar a memória de curta duração (MCD) ou 24 horas depois do treino para testar a memória de longa duração (MLD). Nos testes, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (C, para MCD ou D, para MLD) e o rato foi colocado na arena por mais 5 minutos (figura 9).

As posições dos objetos (familiar ou novo) foram randomizadas e a arena foi limpa entre os testes. Exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. Sentar ou andar em torno do objeto não foi considerado comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto foi marcado por um observador cego ao tratamento recebido pelo animal e expresso em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos (Rossato et al., 2007).

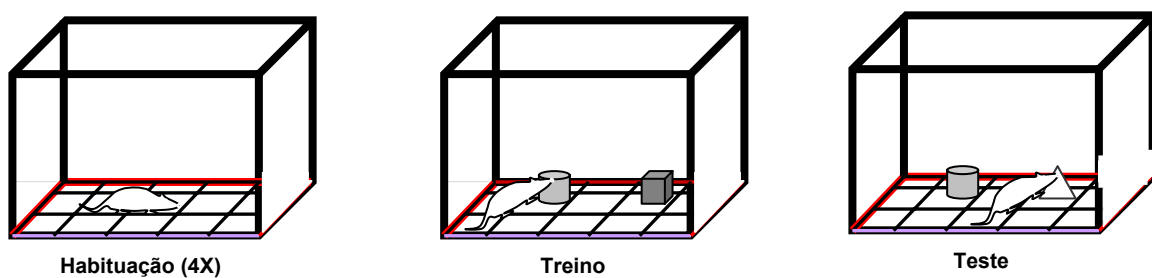


Figura 9. Esquema de realização do teste de reconhecimento de objetos.

2.5.3 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O labirinto aquático é uma piscina circular preta (200 cm de diâmetro) conceitualmente dividida em quatro quadrantes imaginários para a posterior análise dos dados. A temperatura da água foi mantida entre 21 e 23°C. Uma plataforma

circular preta (12 cm de diâmetro) foi colocada 2 cm abaixo da superfície da água e fora do alcance da visão dos ratos. A plataforma possui uma superfície áspera que permite ao rato subir nela facilmente uma vez que a detectar (figura 10).

A trajetória de nado dos animais foi gravada usando uma câmera de vídeo colocada acima do centro da piscina e então analisada usando um sistema computadorizado de análise. O labirinto aquático está localizado em uma sala branca com alguns pôsteres e outros estímulos visuais colocados nas paredes como pistas espaciais. Uma cortina separa a sala da piscina da sala onde se localiza o computador e os animais durante os testes (figura 10).

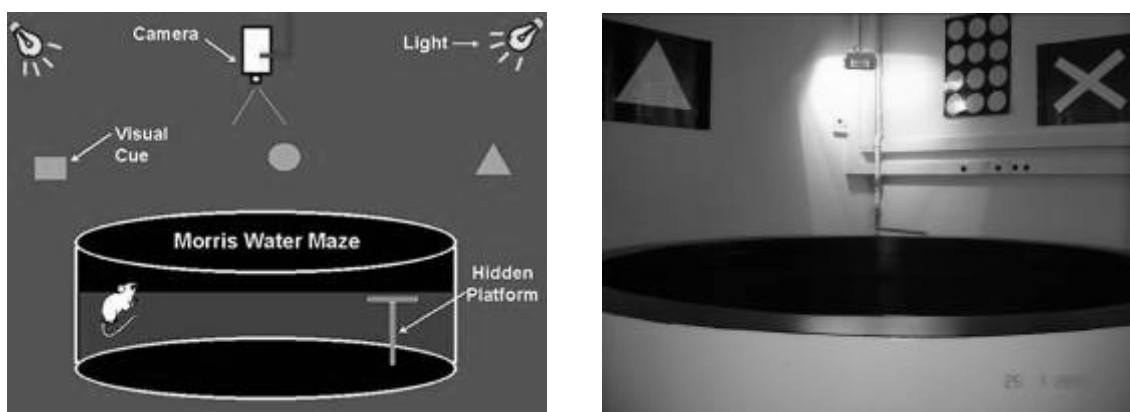


Figura 10. Piscina para realização do labirinto aquático de Morris.

O treino no LAM iniciou 24 horas após o teste de reconhecimento de objetos e foi realizado durante 5 dias consecutivos (Rossato et al., 2006b). Este protocolo de 5 dias de treino seguidos do teste é mais sensível à análise dos diferentes parâmetros do aprendizado espacial (Rossato et al., 2006b, 2007) que o protocolo de 1 dia (Frick et al., 2000) preferido por alguns (Ang et al., 2006). Em cada dia de treino os animais realizaram 8 largadas consecutivas nas quais a plataforma foi mantida na mesma localização. Um diferente local de largada foi usado em cada uma destas largadas. Ratos que não encontraram a plataforma em 60 segundos foram guiados

até ela pelo experimentador. Após encontrar a plataforma os animais permaneciam nela por 30 segundos.

A retenção da memória foi avaliada durante um teste de 30 segundos realizado 24 horas após a última sessão de treino na ausência de plataforma de escape (Rossato et al., 2006a). A latência de chegada ao local onde antes estava a plataforma e o tempo de nado no quadrante alvo foram usados como parâmetros para verificação da memória espacial.

2.5.4 Esquiva inibitória (EI)

Este teste foi realizado apenas com os grupos controle e experimentais V e VI, visto que na primeira parte dos experimentos deste trabalho os resultados dos animais submetidos ao exercício foram comparados com os resultados de animais submetidos ao estresse diário através de choques elétricos em um aparato semelhante ao utilizado neste teste.

A esquiva inibitória consiste em um aparelho com a parte frontal confeccionada em acrílico transparente, medindo 50 x 25 x 25 cm. O soalho é uma grade de barras de bronze paralelas de 0,1 cm de calibre, separadas entre si por 1 cm. Na parte esquerda, sobre a grade, há uma plataforma de fórmica com 7 cm de largura e 2,5 cm de altura (IZQUIERDO *et. al.*, 1992). O rato é colocado sobre a plataforma no interior de uma caixa com o soalho metálico conectado a um estimulador elétrico. O rato, como um animal exploratório vai procurar explorar o restante da caixa (figura 11).



Figura 11. Teste de esquiva inibitória.

Para o teste de sessão única, os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treino individual, na qual foram gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquiva inibitória e permitidos explorar toda a caixa. Após alguns segundos, no instante em que o animal desce da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o resto da caixa, recebe um choque elétrico de 0.4 a 0.5 mA por 2 a 3 segundos. O animal é então retirado da caixa de teste e recolocado na sua caixa residência (VIANNA *et. al.*, 2001).

Para avaliar a memória formada durante a sessão treino os animais foram submetidos a sessões de teste, 180 minutos e 24 horas após o treino (para memória de curta e longa duração, respectivamente), quando foram novamente colocados sobre a plataforma da caixa de esquiva. Na sessão de teste foi verificada a latência de descida da plataforma. Quanto mais o animal reter a memória formada durante o treino, maior será a latência de descida da plataforma no momento do teste (figura 12).

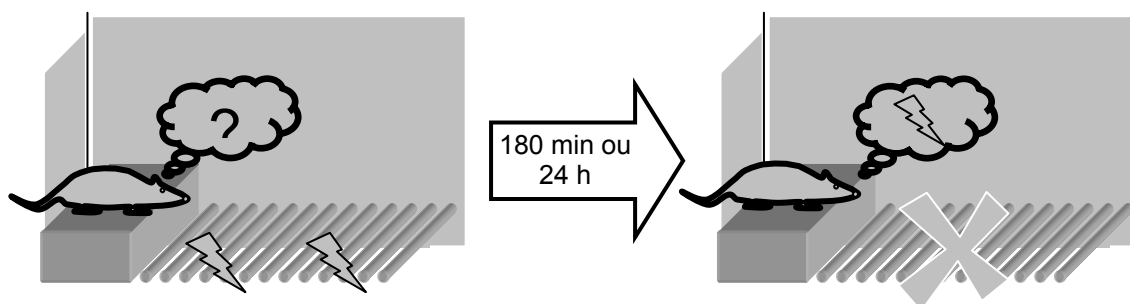


Figura 12. Esquema de realiação do teste de esquila inibitória.

2.6 Procedimentos

2.6.1 Grupo controle I (controle estresse 2 semanas)

Os animais não realizaram nenhum tipo de atividade especial, sendo mantidos sedentários em suas caixas residência.

2.6.2 Grupo experimental I (estresse 2 semanas)

Os animais foram submetidos a um estresse subcrônico controlado pelos pesquisadores através de choques elétricos. Eles receberam os choques a cada 30 segundos, com uma intensidade de 0,4 mA, por 2 segundos, durante 5 minutos, de acordo com o protocolo previamente descrito. Esse procedimento foi realizado por 2 semanas, 5 vezes por semana.

2.6.3 Grupo controle II (controle estresse 8 semanas)

Os animais não realizaram nenhum tipo de atividade especial, sendo mantidos sedentários em suas caixas residência.

2.6.4 Grupo experimental II (estresse 8 semanas)

Os animais foram submetidos a um estresse crônico controlado pelos pesquisadores através de choques elétricos diários. Receberam os choques a cada 30 segundos, com uma intensidade de 0,4 mA, por 2 segundos, durante 5 minutos, conforme o protocolo descrito anteriormente. Esse procedimento foi realizado por 8 semanas, 5 vezes por semana.

2.6.5 Grupo controle III (controle exercício 2 semanas)

Os animais foram levados, junto aos animais do grupo experimental III, a uma sala onde estava a esteira rolante, sendo então, colocados sobre a esteira e mantidos na sala com a esteira rolante ligada, porém sem correr. Esse procedimento foi repetido durante 2 semanas, 5 vezes por semana.

2.6.6 Grupo experimental III (exercício 2 semanas)

Os animais realizaram um exercício subcrônico de corrida em esteira rolante regularmente durante 2 semanas, por 50 minutos, 5 vezes por semana, sendo os primeiros 10 minutos para elevação da velocidade e os últimos 10 para decréscimo desta, de acordo com o protocolo previamente descrito.

2.6.7 Grupo controle IV (controle exercício 8 semanas)

Os animais foram levados, junto aos animais do grupo experimental IV, a uma sala onde estava a esteira rolante, sendo então colocados sobre a esteira e mantidos na sala com a esteira rolante ligada, porém sem correr. Esse procedimento foi repetido durante 8 semanas, 5 vezes por semana.

2.6.8 Grupo experimental IV (exercício 8 semanas)

Os animais realizaram um exercício crônico de corrida em esteira rolante regularmente durante 8 semanas, 5 vezes por semana, por 50 minutos, sendo os primeiros 10 minutos para elevação da velocidade e os últimos 10 para decréscimo desta, de acordo com o protocolo previamente descrito.

2.6.9 Grupo controle V (animais não separados)

Os animais foram mantidos com suas mães (8 filhotes por mãe) até o 21º dia de vida, quando então foram desmamados. Após este período permaneceram em suas caixas residência até os 100 dias de vida, sem nenhuma atividade fora da rotina diária do Biotério.

2.6.10 Grupo experimental V (separação maternal)

Os animais foram submetidos ao protocolo de separação maternal, conforme descrito anteriormente. Aos 21 dias de vida foram desmamados e mantidos em suas caixas residência até os 100 dias de vida, sem nenhuma atividade fora da rotina diária do Biotério.

2.6.11 Grupo controle VI (animais não separados exercitados)

Os animais foram mantidos com suas mães (8 filhotes por mãe) até o 21º dia de vida, quando então foram desmamados. Com 45 dias de vida passaram a realizar exercício em esteira rolante, por 8 semanas, conforme o protocolo de exercício descrito anteriormente.

2.6.12 Grupo experimental VI (separação maternal e exercício)

Os animais foram submetidos ao protocolo de separação maternal, conforme descrito anteriormente. Aos 21 dias de vida foram desmamados. Com 45 dias de vida passaram a realizar exercício em esteira rolante, por 8 semanas, conforme o protocolo de exercício descrito anteriormente.

Após os procedimentos específicos da cada grupo, toda a amostra foi submetida às tarefas comportamentais, de maneira idêntica, para que os resultados pudessem ser comparados entre si (figura 13).

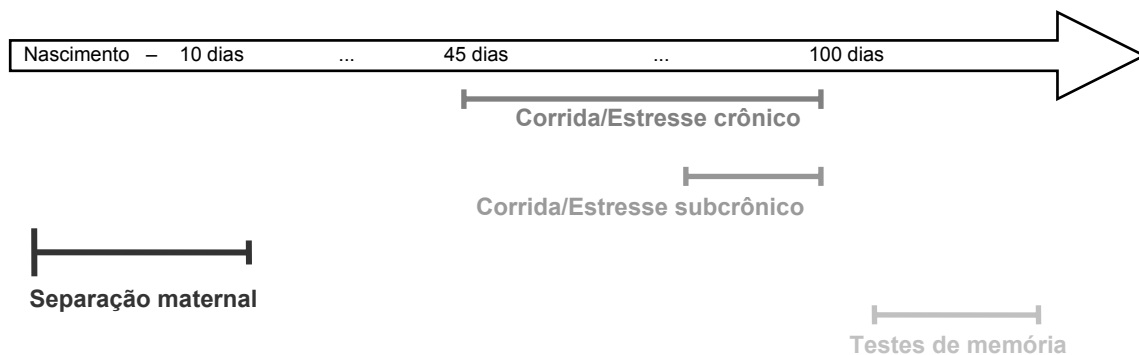


Figura 13. Esquema dos procedimentos realizados nesta dissertação de acordo com a idade dos animais.

Depois de realizados todos os testes de memória os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina, procurando gerar o mínimo sofrimento possível.

2.7 Análise estatística dos resultados

Ao final dos experimentos os resultados foram analisados de maneira comparativa entre os grupos, utilizando-se o programa estatístico Excel (versão

2003, Microsoft Corp., EUA) e o software estatístico Graph-Pad Prism (versão 4.00, GraphPad Software Inc., EUA).

Os resultados do teste de Esquiva Inibitória estão apresentados como mediana \pm intervalos interquartis, e a comparação entre os grupos foi feita através do teste U de Mann-Witney ou Kruskal-Wallis, ambos testes não-paramétricos, seguidos pelo *post hoc* de Dunn. A razão para o uso de testes não-paramétricos para esta tarefa foi o uso de um teto de 300 segundos em cada sessão de teste (Izquierdo et al., 2007).

Para os demais dados a comparação entre cada grupo experimental e seu grupo controle foi feita através do teste t de *Student* e para comparação entre os grupos uma análise de variância para medidas repetidas ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Dunn ou Bonferroni, conforme o caso. Estes dados estão expressos na forma de média \pm erro padrão.

Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

2.8 Aprovação pelo Comitê de Ética

Este trabalho foi apresentado na forma de projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foi aprovado conforme a carta de aprovação anexado ao final desta dissertação (ANEXO 1).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Efeitos do exercício sobre a memória

Resultados dos grupos controle e experimental I, II, III e IV.

3.1.1 Memória de habituação

Tanto o estresse diário (figura 14 A) quanto o exercício físico diário (figura 14 C) melhoraram a memória de habituação à exploração após 2 semanas, mas não após 8 semanas (figuras 14 B e 14 D). Não houve diferenças significantes ($p < 0,05$) detectadas em um teste de Dunn após 2 ou 8 semanas no número de cruzamentos e elevações entre o primeiro e o segundo dia de exposição ao aparato nos dois tipos de tratamento.

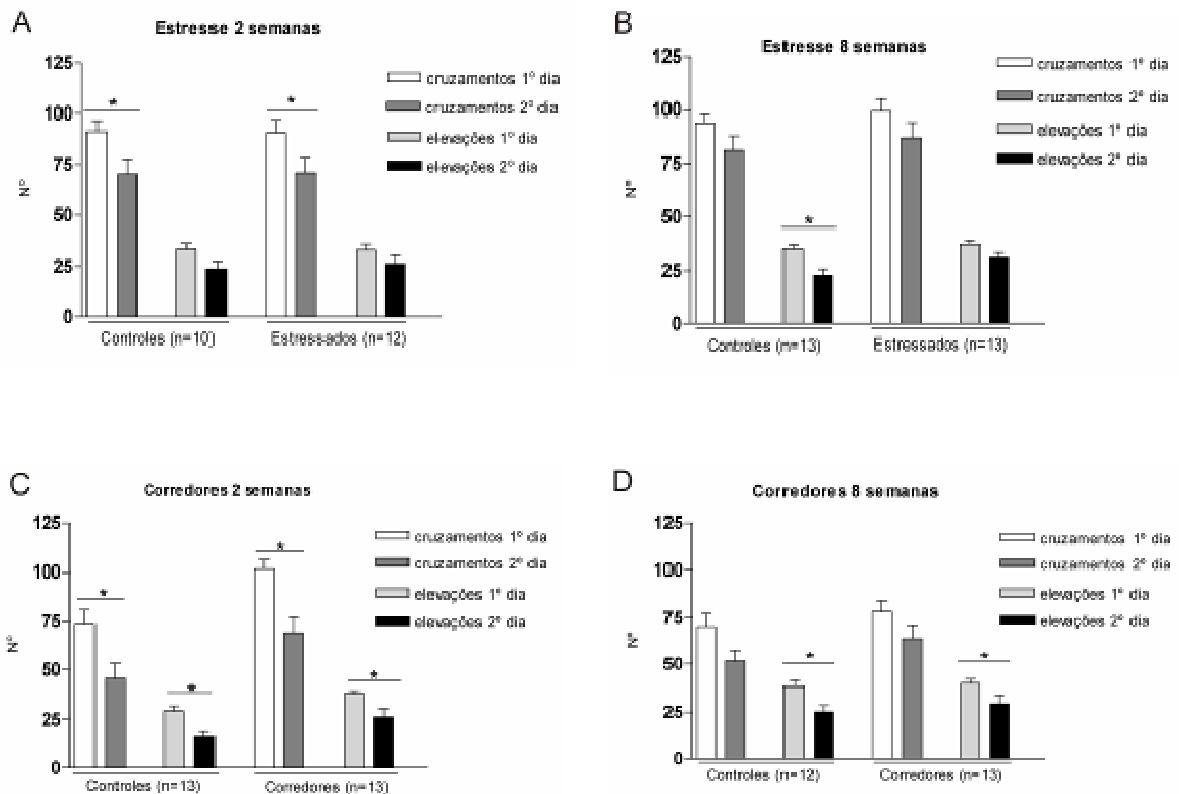


Figura 14. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 (A) e 8 semanas (B), e do exercício físico em esteira rolante durante 2 (C) ou 8 semanas (D) na habituação à exploração em campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão do número de cruzamentos e elevações. O N (número de animais) de cada grupo está indicado na figura. Cada gráfico compara um grupo experimental com seu controle; * $p < 0.05$ (treino x teste) em um teste t de *Student*.

3.1.2 Memória de reconhecimento

O estresse diário por meio de choque elétrico nas patas foi seguido de um decréscimo na memória de curta (MCD) e longa duração (MLD) no teste de reconhecimento de objetos após 8 semanas de treinamento e decréscimo na MCD após 2 semanas (figuras 15 A, B). Resultados similares foram obtidos com 2 semanas de exercício forçado (redução da MCD e MLD, figura 15 C). Entretanto, em contraste aos grupos estressados, os ratos submetidos ao exercício forçado por 8 semanas não mostraram efeitos na MCD nem MLD (figura 15 D).

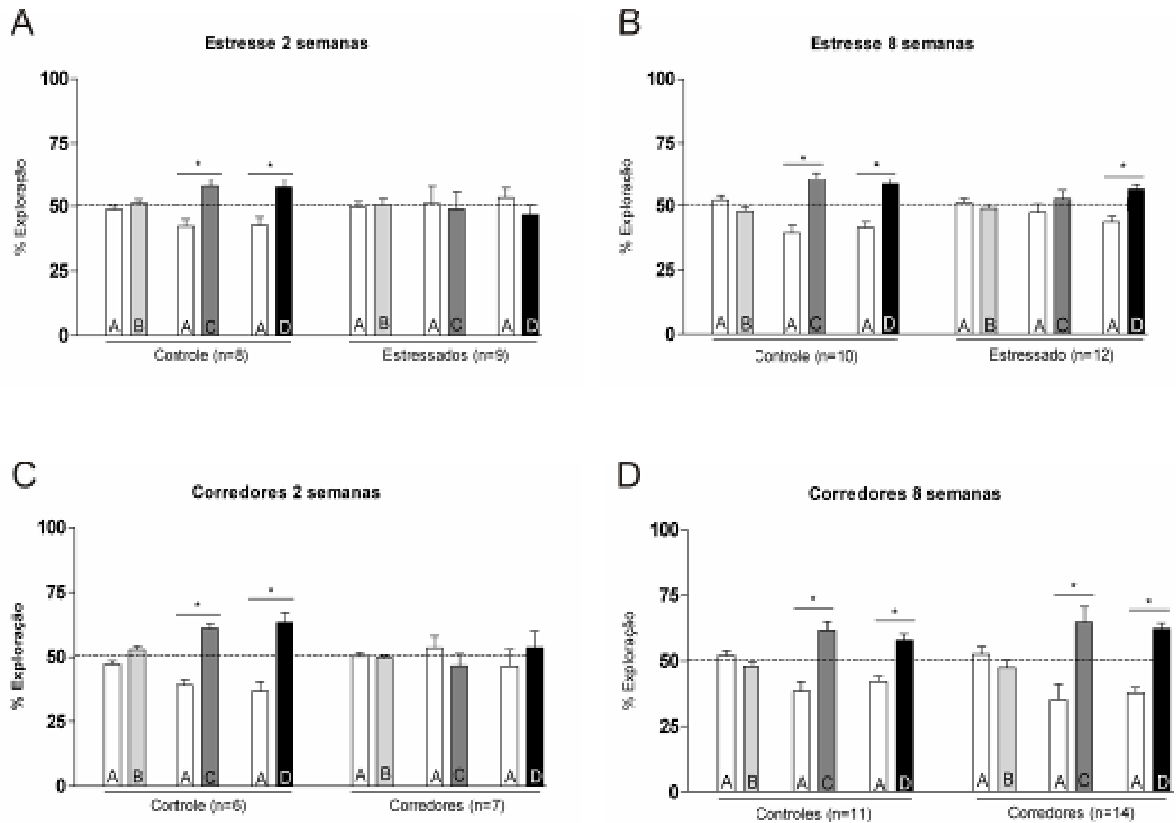


Figura 15. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 (A) ou 8 semanas (B) e do exercício forçado por 2 (C) ou 8 semanas (D) na memória de reconhecimento de objetos. Os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos na sessão de treino. Três horas depois um teste de memória de curta duração foi realizado: os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um novo (C) novamente por 5 minutos. O teste de memória de longa duração foi realizado 24 horas após o treino: os animais foram novamente expostos a um objeto familiar (A) e outro objeto novo (D) por 5 minutos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão do percentual de tempo de exploração a um objeto particular em relação ao tempo total de exploração. O N (número de animais) de cada grupo está indicado na figura. * $p < 0.05$ no teste t de *Student*.

3.1.3 Memória espacial

Não foram observadas diferenças entre os grupos submetidos ao estresse e ao exercício por 2 ou 8 semanas (figuras 16 A, B), exceto por uma influência substancial do exercício por 8 semanas sobre a latência para encontrar a plataforma alvo no teste, o que indica uma melhora da memória espacial (figura 16 C).

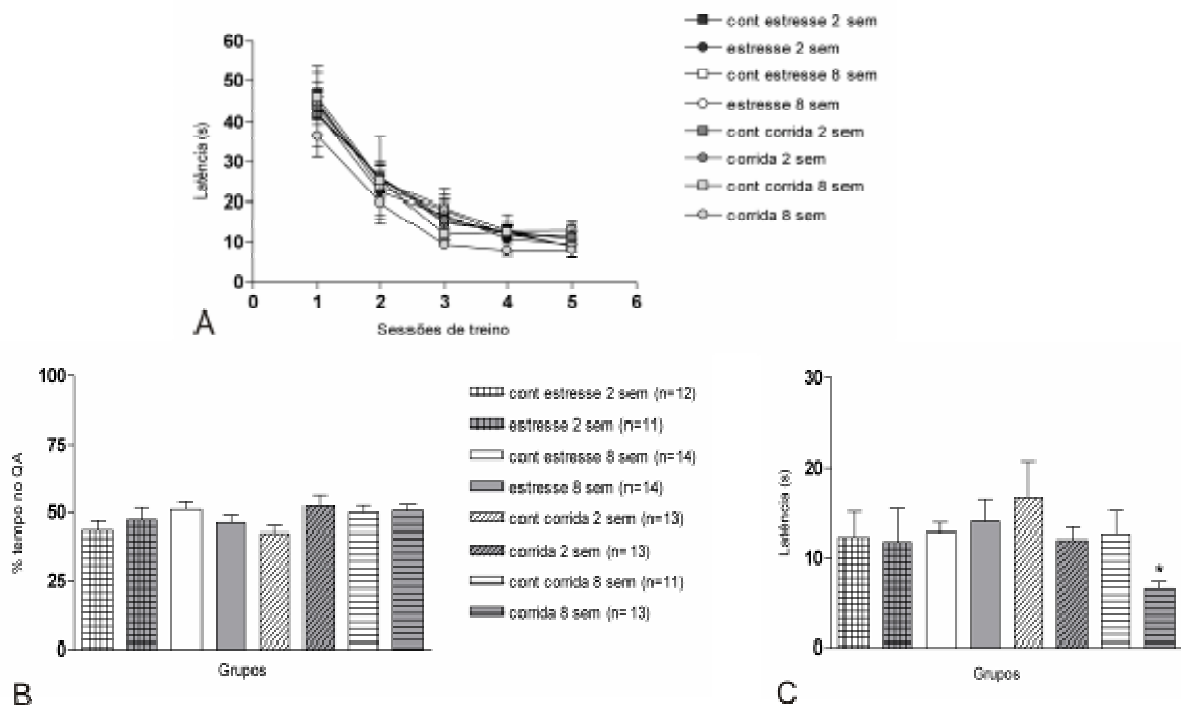


Figura 16. Efeitos do estresse diário por choque elétrico por 2 ou 8 semanas e do exercício forçado por 2 ou 8 semanas na memória espacial. Os animais foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). (A): Média ± erro padrão da latência de escape (tempo gasto para encontrar a plataforma de escape) em cada sessão de treino. (B): Média ± erro padrão do percentual de tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante o teste de 60 segundos feito 24 horas após a quinta sessão de treino, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos. (C): Média ± erro padrão da latência, medida no teste, para detectar o local exato onde a plataforma estava localizada durante os treinos. Os animais submetidos ao exercício forçado por 8 semanas apresentaram uma latência significativamente mais baixa que os demais (* $p < 0,05$ no teste de Bonferroni; cont = controle). O N (número de animais) de cada grupo está indicado na figura.

A velocidade de nado deste grupo (exercício 8 semanas) não apresentou diferença em relação aos seus controles (figura 17), o que mostra que a latência menor não se deve a uma velocidade de nado mais rápida. Nenhuma diferença estatística entre os grupos em um teste t de *Student* foi observada.

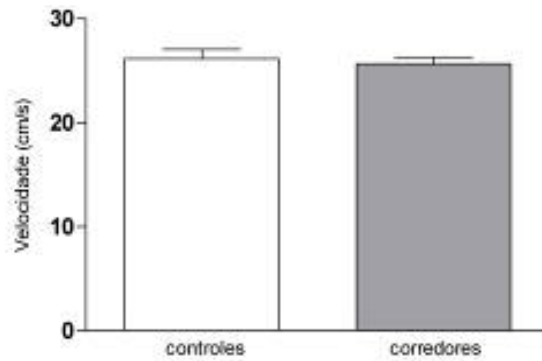


Figura 17. Velocidade de nado no teste no Labirinto Aquático de Morris. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da velocidade (em cm/s) do grupo de corrida forçado em esteira por 8 semanas e seu controle. Os animais submetidos ao exercício forçado por 8 semanas não apresentaram diferença significativamente em relação ao controle, no teste t de *Student*.

3.1.4 Atividade exploratória e locomotora

Se observarmos o comportamento dos animais dos diferentes grupos no campo aberto por um dia, comparando cada grupo experimental com seu controle, verificamos que não existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e seus controles em nenhum parâmetro (tabela 1).

Tabela 1. Efeitos dos diferentes procedimentos (estresse e exercício físico forçado em esteira rolante por 2 ou 8 semanas) na atividade exploratória e locomotora dos animais. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e seus controles. N (número de animais) =13 para cada um dos grupos apresentados na tabela.

Grupos	Cruzamentos	Elevações
Controle estresse 2 sem	91,60 \pm 16,28	33,90 \pm 9,04
Estresse 2 sem	91,07 \pm 23,61	33,47 \pm 11,26
Controle estresse 8 sem	94,00 \pm 13,98	35,46 \pm 6,863
Estresse 8 sem	99,43 \pm 21,04	37,79 \pm 6,863
Controle exercício 2 sem	73,67 \pm 25,82	29,42 \pm 9,00
Exercício 2 sem	101,2 \pm 17,44	38,08 \pm 5,93
Controle exercício 8 sem	70,00 \pm 25,11	38,50 \pm 10,43
Exercício 8 sem	78,43 \pm 21,76	40,00 \pm 8,35

3.1.5 Efetividade do treinamento de exercício físico

Conforme descrito previamente, os animais que realizaram 8 semanas de treinamento foram submetidos a um novo teste de velocidade máxima, realizado no primeiro dia da quinta semana de treinamento. Este teste serviu tanto para verificar a efetividade do treinamento aeróbico (porque, se o protocolo de corrida forçada em esteira rolante fosse efetivo deveria levar a um aumento do VO_2 máx indireto), como também para readequar o treino de acordo com o novo VO_2 máx.

Os resultados são mostrados na figura 18. Como se pode observar, todos os animais corredores apresentaram um aumento no consumo máximo de oxigênio, indicando que o protocolo de corrida levou a um aumento da capacidade aeróbica.

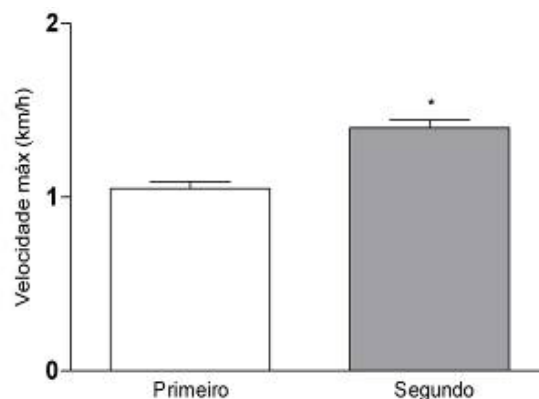


Figura 18. Consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) indireto antes e no meio do período de treinamento físico. Animais submetidos ao protocolo de corrida forçada por 8 semanas foram submetidos a duas medidas do consumo máximo indireto de oxigênio (VO_2 máx) usando o protocolo de Brooks e White (1978). A primeira medida foi feita no início do treinamento, e a segunda após 4 semanas de treino. Houve um significativo aumento do VO_2 máx (* $p < 0,05$ no teste t de *Student*), mostrando que o treinamento realizado foi eficiente e serve com o propósito de exercício.

3.2 Efeitos do exercício sobre a memória de ratos com déficit mnemônico causado pela separação materna

Resultados dos grupos controle e experimental V e VI.

3.2.1 Memória de habituação

Houve diferenças significantes ($p < 0,05$) entre o treino e o teste (dias 1 e 2, respectivamente), nos dois parâmetros observados, dos animais separados da mãe (figura 19). Os animais não separados exercitados apresentaram diferenças somente no número de elevações (figura 19).

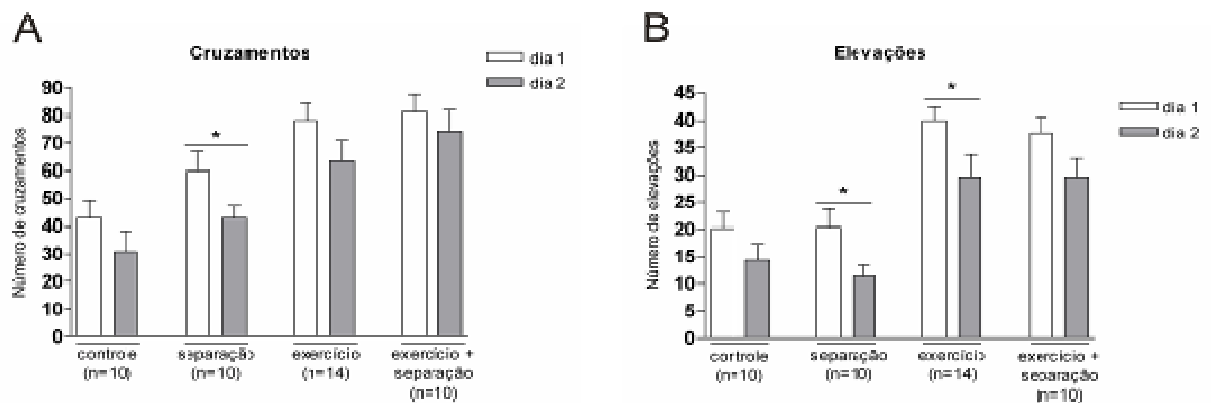


Figura 19. Efeitos da separação materna e da separação materna seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na habituação à exploração em campo aberto. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão do número de cruzamentos (A) e elevações (B). O N (número de animais) de cada grupo está indicado na figura. * $p < 0,05$ (treino – dia 1 x teste – dia 2) em um teste t de *Student*.

3.2.2 Memória de reconhecimento

No teste de reconhecimento de objetos, enquanto os animais controles e exercitados exploraram mais tempo o novo objeto durante o teste ($p < 0,0001$), os ratos separados da mãe passaram o mesmo tempo explorando o objeto familiar e o novo, o que indica déficit mnemônico (figura 20).

Os ratos separados da mãe submetidos ao protocolo de exercício forçado por 8 semanas apresentaram uma reversão no déficit da MCD, mas não da MLD (figura 20).

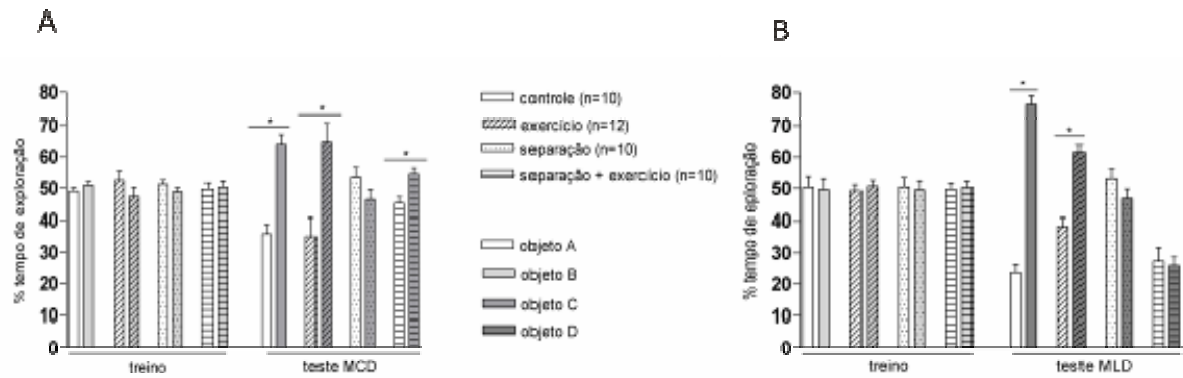


Figura 20. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória de reconhecimento de objetos de curta (MCD; A) e longa duração (MLD; B). Os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (objetos A e B) por 5 minutos na sessão de treino. Três horas depois um teste de MCD foi realizado (A): os animais foram expostos a um objeto familiar (objeto A) e um novo (objeto C) novamente por 5 minutos. O teste da MLD (B) foi realizado 24 horas após o treino: os animais foram novamente expostos a um objeto familiar (objeto A) e outro objeto novo (objeto D) por 5 minutos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão do percentual de tempo de exploração a um objeto particular em relação ao tempo total de exploração. O N (número de animais) de cada grupo está indicado na figura. * $p < 0.05$ no teste t de *Student*.

3.2.3 Memória espacial

Todos os animais apresentaram uma curva de aprendizado similar ao longo dos cinco dias de treino no LAM (figura 21A) Entretanto, no teste realizado no primeiro dia após o término do treino foram encontradas diferenças. A separação maternal causou um déficit de memória, que pode ser observado no tempo de nado no quadrante alvo, que foi menor que os demais grupos ($p < 0,001$; figura 21B). Neste caso, o exercício não melhorou a memória espacial e não reverteu o prejuízo de memória causado pela separação maternal (figura 21B). Observando o tempo de latência para encontrar o local onde a plataforma estava localizada nos treinos, pode-se perceber que a separação maternal não causa prejuízo neste parâmetro, mas o exercício por si tem uma influência positiva sobre a memória espacial, reduzindo o tempo de latência ($p < 0,01$ para os exercitados; $p < 0,05$ para os separados exercitados; figura 21C).

Não foram encontradas diferenças na velocidade de nado entre os diferentes grupos.

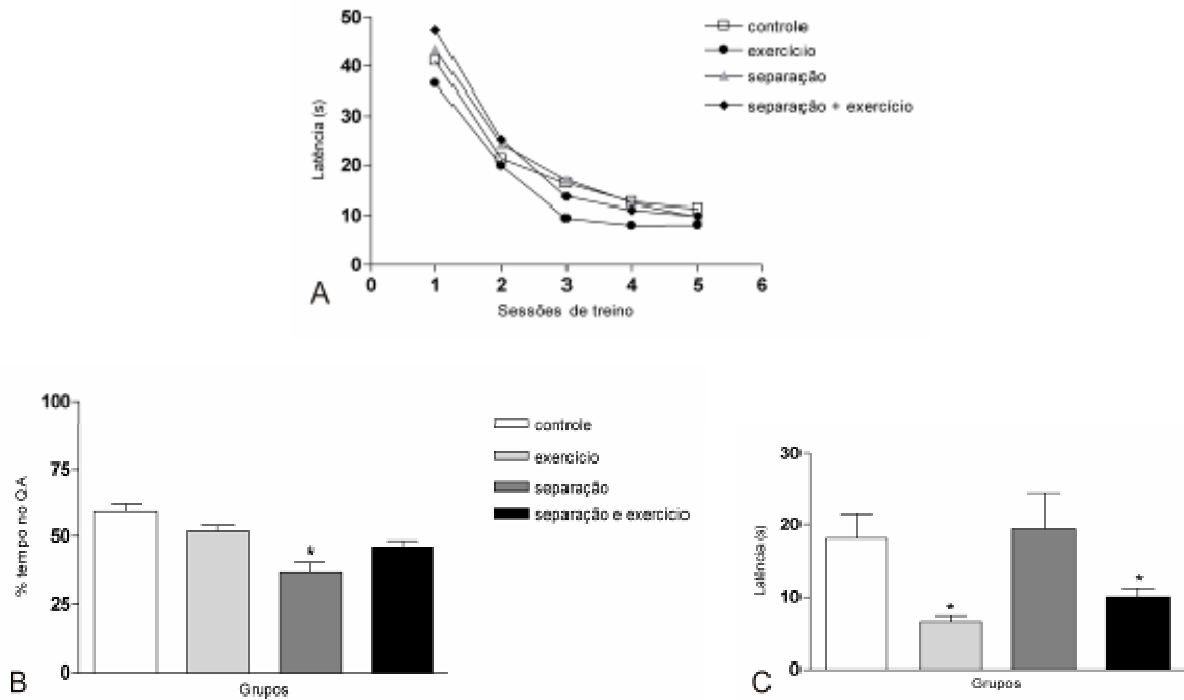


Figura 21. Efeitos da separação materna e da separação materna seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória espacial. Os animais foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). (A): Média ± erro padrão da latência de escape (tempo gasto para encontrar a plataforma de escape) em cada sessão de treino. (B): Média ± erro padrão do percentual de tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante o teste de 60 segundos feito 24 horas após a quinta sessão de treino. (C): Média ± erro padrão da latência, medida no teste, para detectar o local onde a plataforma estava localizada durante os treinos. N (número de animais) = 10 para todos os grupos apresentados na figura. * $p < 0,05$ no teste de Bonferroni.

3.2.4 Memória aversiva

A separação materna causou um prejuízo na memória aversiva (MCD e MLD). Os animais separados tiveram uma latência de descida da plataforma menor que os controles ($p < 0,001$). Os animais exercitados apresentaram uma alta latência, similar aos controles, na MLD; porém, estranhamente, apresentaram uma baixa latência de descida na MCD. Os animais separados da mãe submetidos a um treinamento físico por 8 semanas tiveram uma alta latência, tanto na MCD como na

MLD (figura 23). Estes resultados indicam que o exercício, embora não traga benefícios à memória normal, é capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela separação maternal à MCD e MLD.

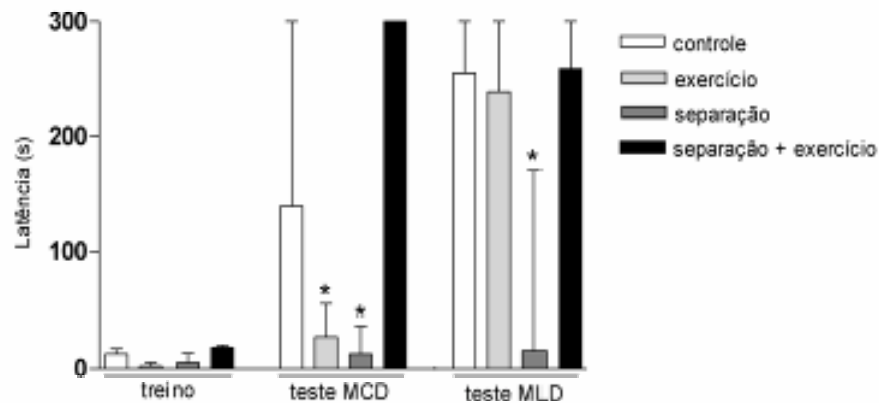


Figura 22. Efeitos da separação maternal e da separação maternal seguida de 8 semanas de exercício forçado de corrida em esteira rolante na memória aversiva de curta (MCD) e longa duração (MLD) na esquiava inibitória. Os ratos foram expostos à caixa de esquiava na sessão de treino e foi mensurado o tempo que o animal levava para descer da plataforma. Três horas depois um teste de MCD foi realizado. O teste MLD foi realizado 24 horas após o treino. Os resultados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil da latência de descida da plataforma (segundos) no treino e testes. N (número de animais) =10 para todos os grupos apresentados na figura. * $p < 0.05$ no teste de *Dunn*.

3.2.5 Atividade exploratória e locomotora

Se observarmos o comportamento dos animais dos diferentes grupos no campo aberto por um dia, verificamos que não existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle, separados da mãe e exercitados em nenhum parâmetro (conforme descrito por Madruga et al., 2006; tabela 2).

Tabela 2. Efeitos dos diferentes procedimentos (separação maternal, exercício físico ou ambos) na atividade exploratória e locomotora dos animais. Não houve diferenças significantes entre os grupos experimentais e seus controles. N (número de animais) =10 para todos os grupos apresentados na tabela.

Grupos	Cruzamentos	Elevações
Controle	70,00 ± 25,11	38,50 ± 10,43
Exercício	78,43 ± 21,76	40,00 ± 8,357
Separação maternal	60,10 ± 21,75	35,40 ± 10,42
Separação + exercício	78,00 ± 20,94	37,60 ± 9,513

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO

O exercício diário forçado de corrida em esteira rolante e o estresse diário por choque elétrico tiveram alguns efeitos similares e alguns efeitos opostos nos três tipos de memória examinados. Os efeitos de ambos os tipos de tratamento foram geralmente similares, mas não idênticos, assim como os resultados da literatura (van Praag et al., 2005; Ogonovisky et al., 2005; Uysal et al., 2005; Radak et al., 2006; Blustein et al., 2006; Alaei et al., 2006; Ang et al., 2006). Também, alguns estudos em humanos mostram que o exercício físico aeróbico de corrida de melhora algumas formas de aprendizado, embora também cause aumento das catecolaminas circulantes e outras mudanças indicativas de estresse (Winter et al., 2007).

Ambos os procedimentos (estresse e exercício físico) foram seguidos de um ganho do aprendizado de habituação (figura 14).

O efeitos dos dois procedimentos foram desfavoráveis no aprendizado de reconhecimento de objetos após 2 semanas, sugerindo que os efeitos do exercício podem ser, em parte, atribuídos ao estresse inerente ao exercício. Após 8 semanas, quando este se torna crônico, de exercício forçado houve um aprendizado não diferente do grupo controle (figura 15), o que condiz com os achados relacionados ao estresse de Das et al. (2005), que concluiu que um procedimento de estresse crônico, quando predito (sempre os mesmos parâmetros), não causa as alterações comportamentais relacionadas ao estresse. Os efeitos do estresse crônico e do exercício forçado na memória de reconhecimento não tinham sido, até então, estudados, ao menos em nosso conhecimento.

Finalmente, uma pequena, mas significativa melhora foi observada no labirinto aquático de Morris após 8 semanas de corrida forçada (menor latência para encontrar o local da plataforma no teste; figura 16C), o que está de acordo com os achados de Ang et al. (2006), Alaei et al. (2008), Radak et al. (2006) e Blustein et al. (2006). Nenhuma outra diferença foi detectada após 2 ou 8 semanas de estresse ou após 2 semanas de exercício.

Os resultados sugerem que, enquanto as variáveis do exercício podem ser um fator chave que influencia o aprendizado comportamental nos ratos, o estresse inerente aos procedimentos comportamentais pode ser outro. É difícil estabelecer com exatidão o grau de estresse que acompanha o exercício forçado, assim como é impossível controlá-lo através de algum procedimento experimental. Entretanto, estimativas podem ser feitas estudando os efeitos comportamentais de outros procedimentos estressantes, o que foi feito aqui e por Blustein et al. (2006).

Não foi observado uma melhora exacerbada da memória dos ratos normais exercitados. Isto pode se dever, em parte, ao fato destes animais já possuírem uma memória normal. Existe um consenso de que a memória dos indivíduos normais, incluindo crianças, adultos e animais experimentais, funciona o tempo todo no máximo de sua capacidade possível, de acordo com a modulação das vias nervosas (Izquierdo, 2003).

Mas verificou-se um efeito modulatório favorável do exercício físico de corrida forçada sobre a memória pode ser percebido também quando verificamos os efeitos do exercício sobre a memória de ratos com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal logo após o nascimento (figuras 19 a 22).

Como relatado por diversos autores, o exercício físico pode influenciar as funções cognitivas em humanos e animais (Winter et al. 2007, Arkin 2007, Abbot et

al. 2004; Kramer et al. 1999, Sutoo e Akiyama 2003, Cotman e Berchthold 2002, Berchthold et al. 2005, Chen et al., 2007). O exercício físico também pode ser visto como um tratamento para os déficits mnemônicos, como o causado pela idade (Garza et al, 2004; vanPraag et al, 2005), pela morfina (Alaei et al, 2006) e pela exposição pré-natal ao etanol (Chirstie et al, 2005).

O protocolo de separação maternal empregado causou déficit de memória em ratos Wistar adultos machos, como já relatado por Lehmann et al., 1999; Huang et al., 2002; Lévy et al., 2003; Lai et al., 2006; e Aisa et al., 2007. Neste trabalho nós confirmamos este prejuízo mnemônico causado pela separação maternal em ratos, e verificamos que o exercício por si só, apesar de ter um efeito modulatório favorável sobre a memória, não traz grandes benefícios comportamentais, mas pode agir como um tratamento, revertendo o déficit da memória aversiva de curta e longa duração testada em esQUIVA INIBITÓRIA (figura 22) e o déficit de memória de reconhecimento de objetos de curta duração (figura 20), mas não age da mesma forma no déficit causado à memória espacial (figura 21) e à memória de reconhecimento de objetos de longa duração (figura 20).

Não existem, até este momento, artigos publicados que estudem a capacidade do exercício físico de reverter o déficit de memória causado pela separação maternal.

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES

Pode-se perceber que o exercício tem uma modulação favorável sobre a memória. A questão que continua aberta é até onde a influência do exercício sobre a cognição pode ser atribuída ao exercício em si, e onde começa ou termina a influência do estresse inerente ao exercício (McEwen e Magarinos, 2001; Cotman e Berchthold, 2002). Então, o exercício forçado, que assume um efeito benéfico sobre a função cerebral como um todo, incluindo a cognição, deve ser feito com um protocolo cuidadosamente selecionado. Experimentos mensurando os parâmetros do estresse oxidativo (Radak et al., 2006, 2006; Ogonovsky et al., 2006) sugerem que o exercício forçado crônico não é estressante e, desta forma, pode ser considerado, com certos limites, favorável, exercendo uma influência modulatória positiva sobre as funções mnemônicas.

Além disso, o exercício foi capaz de reverter o prejuízo de memória aversiva de curta e longa duração na esQUIVA inibitória e o de memória reconhecimento de curta duração.

Em resumo, o exercício físico crônico tem uma influência positiva sobre a memória. Pode reverter alguns déficits mnemônicos, como relatado por van Praag et al., 2005 e Alaei et al., 2006. Adicionalmente, o exercício pode ter um papel protetor, reduzindo o risco de decaimento cognitivo e demência em pessoas idosas (Laurin et al., 2001), o risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (Friedland et al., 2001; Nichol et al., 2007), entre outros efeitos preventivos (Radak, 2007; White e Castellano, 2008; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005).

Desta forma, o exercício pode ser visto como uma simples prática comportamental que afeta a saúde como um todo, inclusive a função cerebral, promovendo uma variedade de efeitos amplamente descritos na literatura (efeitos que resultam de suas ações na estrutura e funcionamento do sistema nervoso central; Cotman and Brechtold, 2002; Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005) e culminam em efeitos perceptíveis, como uma melhor memória, podendo, assim, ser indicado e utilizado como uma ferramenta terapêutica.

CAPÍTULO VI: PERSPECTIVAS

Neste trabalho o exercício físico forçado crônico mostrou-se uma excelente ferramenta terapêutica no tratamento do déficit de memória causado pela separação maternal. Além disso, o exercício já tem sido utilizado com essa finalidade em déficits com variadas causas (Garza et al., 2004; vanPraag et al., 2005; Alaei et al., 2006; Chirstie et al., 2005). O exercício físico apresentou, ainda, um efeito modulatório favorável sobre os resultados dos testes de memória em ratos.

A pergunta que permanece aberta é quais são as bases bioquímicas das modificações observadas? Esses mecanismos bioquímicos podem incluir neurogênese hipocampal (During e Cao, 2006; Fabel et al., 2003; van Praag et al., 1999), redução do estresse oxidativo (Ogonovsky et al, 2005; Radak et al., 2006) e aumento nos níveis de BDNF (Vaynman et al., 2006; Huang et al., 2006; Berchtold et al., 2005; Neeper et al., 1995).

Experimentos bioquímicos envolvendo os grupos experimentais utilizados neste trabalho serão realizados com o intuito de tentar responder estas questões que permaneceram em aberto.

CAPÍTULO VII: ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os primeiros resultados apresentados nesta dissertação de mestrado foram publicados no periódico *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (ANEXO 2), conforme a referência abaixo:

MELLO, PB; BENETTI, F; CAMMAROTA, M; IZQUIERDO, I. 2008. Effects of chronic exercise and stress in different types of memory in rats. *Annals of Brazilian Academy of Sciences*. 80(1): 1-9.

Um segundo artigo com os resultados referentes aos efeitos do exercício físico sobre o déficit mnemônico causado pela separação maternal foi submetido para publicação no periódico *Behavioral Brain Research* (ANEXO 3), conforme a referência abaixo:

MELLO, PB; BENETTI, F; CAMMAROTA, M; IZQUIERDO, I. 2008. The physical exercise reverts the long-term memory caused by maternal deprivation in Inhibitory avoidance test, but not in Morris water maze and object recognition test. 2008.

Estes artigos encontram-se anexos no final desta dissertação, após as Referências (ANEXOS 2 e 3).

Referências

- ABBOT RD, WHITE LR, ROSS GW, MASAKI KH, CURB JD, PETROVITCH H. 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA* 292: 1447-1453.
- AISA B, TORDERA R, LASHERAS B, DEL RÍO J, RAMÍREZ MJ. 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 256-66.
- ALAEI H, BORJEIAN L, AZIZI M, ORIAN S, POURSHANAZARI A, HANNINEN O. 2006. Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 536: 138-141.
- ALAEI H, MOLOUDI R, SARKAKI AR. 2008. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodywork Mov Ther* 12: 72-75.
- ALONSO M, VIANNA MRM, DEPINO AM, MELLO E SOUZA T, PEREIRA P, SZAPIRO G, VIOLA H, PITOSI F, IZQUIERDO I, MEDINA JH. 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12: 551-560.
- ANG ET, DAWE GS, WONG PTH, MOOCHHALA S, NG YK. 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 1113: 186-193.
- ANG ET, GOMEZ-PINILLA F. 2007. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem* 14:2564-2571.
- ARIDA RM, SCORZA CA, DA SILVA AV, SCORZA FA, CAVALHEIRO EA. 2004. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett* 364: 135-138.

ARKIN S. 2007. Language-enriched exercise plus socialization slows cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Others Dement* 22: 62-77.

BARNES CA, FORSTER MJ, FLESHNER M, AHANOTU EN, LAUDENSLAGER ML, MAZZEO RS, MAIER SF, LAL H. 1991. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 12: 47-53.

BARROS D, AMARAL O, IZQUIERDO I, GERACITANO L, RASEIRA MCB, HENRIQUES AT, RAMIREZ MR. 2006. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol, Biochem and Behav* 84: 229-234.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. 2002. *Neurociências – desvendando o sistema nervoso*. 2 ed. Porto Alegre/RS: Artmed.

BENETTI F, ANDRADE DE ARAÚJO P, SANVITTO GL, LUCION AB. 2007. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Dev Psychobiol* 49: 258-264.

BERCHTOLD NC, CHINN G, CHOU M, KESSLAK JP, COTMAN CW. 2005. Exercise primers a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133: 853-861.

BLISS TVP, COLLINGRIDGE GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

BLUSTEIN JF, MCLAUGHLIN M, HOLFMAN JR. 2006. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav* 89:582-586.

BROOKS GA, WHITE TP. 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats in treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015.

CAHIL L, MCGAUGH JL. 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 11: 294-299.

CAO L, HUDSON CA, MOYNINHAN JA. 2007. Chronic foot shock induces behaviors and accompanying pro- and anti-inflammatory responses in mice. *J Neuroimmunol* 186: 63-74.

CAREW TJ. 1996. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16: 5-8.

CIRULLI F, MICERA A, ALLEVA E, ALOE L. 1998. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 853-858.

CHEN H, LIN L, YU L, LIU Y, KUO Y, HUANG A, CHUANG J, WU F, LIAO P, JEN C. 2007. Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: The role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiol Learn Mem* *In press*.

CHIRSTIE BR, SWANN SE, FOX CJ, FROC D, LIEBLICH SE, REDILA V, WEBBER A. 2005. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci* 21: 1719-1726.

COLES K, TOMPOROWISKI PD. 2008. Effects of acute exercise on executive processing, short-term and long-term memory. *J Sports Sci* 26: 333-44.

COTMAN CW, BERCHTOLD NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 295-301.

DAS A, RAI D, DIKSHIT M, PALIT G, NATH C. 2005. Nature of stress: Differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. *Life Sci* 77: 2299-2311.

DASH PK, MOORE AN, KOBORI N, RUNYN JD. 2007. Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem* 14: 554-63.

DERE E, HUSTON JP, SILVA, MAS. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84: 214-221.

DURING MJ, CAO L. 2006. VEGF a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* 3:29-33.

ENNAUCER A, DELACOUR J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59.

FABEL K, FABEL K, TAM B, KAUFER D, BAIKER A, SIMMONS N, KUO CJ, PALMER TD. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-2812.

FRANCIS DD, DIORIO J, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal deprivation on stress reactivity. *J Neurosci* 22: 7840-7843.

FRICK KM, STILLNER ET, BERGER-SWEENEY J. 2000. Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. *Neuro Report* 11: 3461-3465.

FRIEDLAND RP, FRITSCH T, SMYTH KA, KOSS E, LERNER AJ, CHEN CH, PETOT GJ, DEBANNE SM. 2001. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 3440-3445.

GARZA AA, HA TG, GARCIA C, CHEN MJ, RUSSO-NEUSTADT A. 2004. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol, Biochem and Behav* 77: 209-220.

HOUT RL, GONZALEZ ME, LADD CO, THRIVIKRAMAN KV, PLOTSKY PM. 2004. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 29: 279-289.

HOUT RL, PLOTSKY PM, LENOX RH, MCNAMARA RK. 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950: 52-63.

HUANG LT, HOLMES GL, LAI MC, HUNG PL, WANG CL, WANG TJ, YANG CH, LIOU CW, YANG SN. 2002. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia* 43: 1141-1148.

HUANG AM, JEN CJ, CHEN HF, YU L, KUO YM, CHEN HI. 2006. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm* 113: 803-11.

IGAZ LM, BEKISCHTEIN P, VIANNA MRM, IZQUIERDO I, MEDINA JH. 2004. Gene expression during memory formation. *Neurotoxicol* 6: 189-204.

ISAACS KR, ANDERSON BJ, ALCANTARA AA, BLACK JE, GREENOUGH. 1992. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 110-119.

IZQUIERDO I. 2004. *A arte de esquecer – Cérebro, memória e esquecimento*. Rio de Janeiro: Vieira e Lent.

IZQUIERDO I. 1989. Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology* 51: 171-202.

IZQUIERDO I. 2002. *Memória*. Porto Alegre/RS: Artmed.

IZQUIERDO I. 2003. *Questões sobre memória*. São Leopoldo/RS: Editora Unisinos.

IZQUIERDO I, BEVILAQUA LRM, ROSSATO JI, BONINI JS, CAMMAROTA M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends Neurosci* 29: 496-505.

IZQUIERDO I, CUNHA C, ROSAT R, JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, MEDINA JH. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amigdala, medium septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58: 16-26.

IZQUIERDO I, MCGAUGH JL. 2000. Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 11: 517-534.

IZQUIERDO I, MEDINA JH. 1997. Memory formation, the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285-316.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, DA COSTA JC, FURINI C, ZINN C, CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, IZQUIERDO I. 2007. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 88: 160-166.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, MEDINA JH, IZQUIERDO I. 2000. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired Esther one day or many months before. *Behav Pharmacol* 13: 203-13.

KRAMER AF, HAHN NJ, COHEN NJ, BANISH MT, MCAULEY E, HARRISON CR, CHASON J, VAKIL E, BARDELL L, BOILEAU RA, COLCOMBRE A. 1999. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400: 418-419.

KUMA H, MIKI T, MATSUMOTO Y, GU H, LI HP, KUSAKA T, SATRIOTOMO I, OKAMOTO H, YOKOYAMA T, BEDI KS, ONISHI S, SUWAKI H, TAKEUCHI Y. 2004. Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 372: 68-73.

LAI MC, HOLMES GL, LEE KH, YANG SN, WANG CA, WU CL, TIAO MM, HSIEH CS, LEE CH, HUANG LT. 2006. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats – the role of corticosterone. *Epilepsy Res* 68:123-136.

LAURIN D, VERREAULT R, LINDSAY J, MACPHERSON K, ROCKWOOD K. 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 58: 498-504.

LEHMANN J, PRYCE CR, BETTSCHEN D, FELDON J. 1999. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64: 705-715.

LÉVY F, MELO AI, GALEF BG JR, MADDEN M, FLEMING AS. 2003. Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Dev Psychobiol* 43: 177-191.

LUCION AB, DE ALMEIDA RM, DE MARQUES AA. 1994. Influence of the mother on development of aggressive behavior in male rats. *Physiol Behav* 55: 685-689.

MADRUGA C, XAVIER LL, ACHAVAL M, SANVITTO GL, LUCION AB. 2006. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav Brain Res* 166: 241-246.

MANIKANDAN S, PADMA M, SRIKUMAR K, PARTHASARATHY NI, MUTHUVEL A, DEVI RS. 2006. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 399: 17-22.

MAROUN M. 2006. Stress reverses plasticity in pathway projecting from the ventromedial prefrontal cortex to the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24: 2917-22.

MARTIN SJ, GRIMWOOD PD, MORRIS RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Ann Rev Neurosci* 23: 649-711.

MCEWEN BS, MAGARINOS AM. 2001. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 16: 117-127.

MCINTOSH J, ANISMAN H, MERALI Z. 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev Brain Res* 113: 97-106.

MCGAUGH JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.

MCGAUGH JL. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Ann Rev Neurosci* 27: 1-28.

MCGAUGH JL. 2005. Emotional arousal and enhanced amygdala activity: new evidence for the old perseveration-consolidation hypothesis. *Learn Mem* 12: 77-79.

MCGAUGH JL. 2006. Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cog Sci* 10: 345-347.

MEANEY MJ, SEEMA B, LAROCQUE S, MCCORMICK C, SHARMA S, SMYTHE J, VIAU V, PLOTSKY PM. 1993. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann N Y Acad Sci* 697: 70-85.

MEDINA JH, IZQUIERDO I. 1995. Retrograde messengers, long-term potentiation, and memory processes. *Brain Res Rev* 21: 185-194.

MICHEAU J, RIEDEL G, ROLOFF EL, INGLIS J, MORRIS RG. 2004. Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci* 118: 1022-1032.

MONCADA D, VIOLA H. 2007. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci* 27: 7476-7481.

NEEPER SA, GOMÉZ-PINILLA F, CHOI J, COTMAN C. 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109.

NICHOL KE, PARACHIKOVA AI, COTMAN CW. 2007. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res* 184: 124-132.

OGAWA T, MIKUNI M, KURODA Y, MUNEOKA K, MORI KJ, TAKAHASHI K. 1994. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 961-967.

OGONOVSKY H, BERKES I, KUMAGAI S, KANEKO T, TAHARA S, GOTO S, RADAK Z. 2005. The effects of moderate-, strenuous- and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in the rat brain. *Neurochem Int* 46: 635-640.

ROSA EF, TAKAHASHI S, ABOULAFIA J, NOUAILHETAS VL, OLIVEIRA MG. 2007. Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. *J Neurophysiol* 98: 1820-6.

OITZL MS, WORKEL JO, FLUTTERT M, FROSCH F, DE KLOET ER. 2000. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescence Brown Norway rats. *Eur J Neurosci* 12: 3771-3780.

PHELPS EA. 2006. Emotion and cognition: insights from studies of the human amygdala. *Ann Rev Psychol* 57: 27-53.

PHELPS EA. 2004. Human emotion and memory: interactions of the amigdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 14: 198-202.

PLOTSKY PM, MEANEY MJ. 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 195-200.

PRYCE CR, BETTSCHEN D, FELDON J. 2001. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol* 38: 239-251.

RADAK Z, KUMAGAIS, TAYLOR AW, NAITO H, GOTO S. 2007. Effects of exercise on brain function: role of radicals. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 942-946.

RADAK Z, TOLD A, SZABO Z, SIAMILIS S, NYAKAS C, SILYE G, JAKUS J, GOTO S. 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Internat* 49: 387-392.

RADLEY JJ, ROCHER AB, JANSSEN WG, HOF PR, MCEWEN BS, MORRISON JH. 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repetitive stress. *Exp Neurol* 196: 199-203.

RENARD GM, SUÁREZ MM, LEVIN GM, RIVAROLA MA. 2005. Sex differences in rats: Effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiology and Behavior* 85: 363-369.

RHEES RW, LEPHART ED, ELIASON D. 2001. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res* 123: 1-10.

RICHARDSON JT. 2007. Measures of short-term memory: a historical review. *Cortex* 43: 635-650.

RIEDEL G, PLATT B. 2004. From Messenger to molecules: Memories are made of these. Kluwer Academic/Plenum Publishers.

ROCERI M, HENDRIKS W, RACAGNI G, ELLENBROEK BA, RIVA MA. 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7: 609-616.

RODRIGUES SM, SHAFE GE, LEDOUX JE. 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in lateral amygdale. *Neuron* 44: 75-91.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MYSKIW JC, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14: 36-46.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, LIMA RH, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2006a. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience* 143: 15-23.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MEDINA JH, CAMMAROTA M. 2006b. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13: 431-440.

ROTS NY, DE JONG J, WORKEL JO, LEVINE S, COOLS AR, DE KLOET ER. 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol* 8: 501-506.

SANTOS DL, MILADO ME, ROSAT R. 1998. Exercício físico e memória. *Rev Paul Educ Física* 12: 95-106.

SCHMIDT MV, OITZL MS, LEVINE S, DE KLOET ER. 2002. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res Dev* 139: 39-49.

SCOPEL D, FOCHESTATTO C, CIMAROSTI H, RABBO M, BELLÓ-KLEIN A, SALBEGO C, NETTO CA, SIQUEIRA IR. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71: 155-159.

SIBLEY BA, BEILOCK SL. 2007. Exercise and working memory: an individual differences investigation. *J Sport Exerc Psychol* 29: 783-791.

SQUIRE LR. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177.

SQUIRE LR, KANDEL ER. 2003. Memória: da mente às moléculas. Artmed: Porto Alegre/RS.

SQUIRE LR, ZOLA SM. 2006. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13515-13522.

SUTOO D, AKIYAMA K. 2003. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis* 13: 1-14.

SWANSON HH, BOLWERK E, BRENNER E. 1984. Effects of cooling in infant rats on growth, maturation, sleep patterns and responses to food deprivation. *Br J Nutr* 52: 139-148.

THOMPSON RF. 2005. In search of memory traces. *Annu Rev Psychol* 56: 1-23.

UNSWORTH N, ENGLE RW. 2007. On the division of short-term and working memory: an examination of simple and complex span and their relation to higher order abilities. *Psychol Bull* 133: 1038-1066.

UYSAI N, TUGYAN K, KAYATEKIN BM, ACIKGOZ O, BAGRIYANIK HA, GONENC S, OZDEMIR D, AKSU I, TOPCU A, SEMIN I. 2005. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 383: 241-245.

VAN DER BORGHT K, HAVEKES R, BOS T, EGGEN BJ, VAN DER ZEE EA. 2007. Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci*. 121: 324-334.

VAN PRAAG H, CHRISTIE BR, SEJNOWSKI TJ, GAGE FH. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13427-13431.

VAN PRAAG H, SHUBERT T, AHAO C, GAGE F. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680-8685.

VAYNMAN S, GOMEZ-PINILLA F. 2005. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair* 19: 283-295.

VAYNMAN SS, YING Z, YIN D, GOMEZ-PINILLA F. 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070: 124-130.

VIANNA, M. R.; SZAPIRO, G.; MCGRAUGH, J. L.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. 2001. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12251-12254.

VIAU V, SHARMA S, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. 1993. Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. *J Neurosci* 13: 1097-1105.

WHITE LJ, CASTELLANO V. 2008. Exercise and brain health – implications for multiple sclerosis: part 1 – neuronal growth factors. *Sports Med* 38: 91-100.

WIGGER A; NEUMANN ID. 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66: 293-302.

WINTER B, BREITENSTEIN C, MOOREN FC, VOELKER K, FOBKER M, LECHTERMANN A, KRUEGER K, FROMME A, KORSUKEWITZ C, FLOEL A, KNECHT S. 2007. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 87: 597-609.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007766

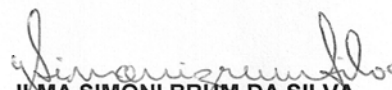
Título : EFEITOS DO ESTRESSE E DO EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO SOBRE DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIA NO RATO

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
CARLOS ALEXANDRE NETTO	PESQ RESPONSÁVEL	alex@prograd.ufrgs.br	
FERNANDO BENETTI	PESQUISADOR	00132334@ufrgs.br	
IVAN ANTONIO IZQUIERDO	PESQUISADOR	izquier@zaz.com.br	33085534
PÂMELA BILLIG MELLO	PESQUISADOR	panmello@hotmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 16 , ata nº 96 , de 11/10/2007 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, terça-feira, 6 de novembro de 2007


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
 Coordenador do CEP-UFRGS

ANEXO II – Artigo 1



Effects of Acute and Chronic Physical Exercise and Stress on Different Types of Memory in Rats

PÂMELA B. MELLO¹, FERNANDO BENETTI¹, MARTÍN CAMMAROTA² and IVÁN IZQUIERDO²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, 2º andar, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil

²Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 2º andar, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil

*Manuscript received on August 17, 2007; accepted for publication on November 15, 2007
 contributed by IVÁN IZQUIERDO**

ABSTRACT

Here we study the effect of acute and chronic physical exercise in a treadmill and of daily stress (because forced exercise involves a degree of stress) during 2 or 8 weeks on different types of memory in male Wistar rats. The memory tests employed were: habituation in an open field, object recognition and spatial learning in the Morris water maze. Daily foot-shock stress enhanced habituation learning after 2 but not after 8 weeks; it hindered both short- (STM) and long-term memory (LTM) of the recognition task at 2 weeks but only STM after 8 weeks and had no effect on spatial learning after either 2 or 8 weeks. Acute but not chronic exercise also enhanced habituation in the open field and hindered STM and LTM in the recognition task. Chronic exercise enhanced one important measure of spatial learning (latency to escape) but not others. Our findings indicate that some care must be taken when interpreting effects of forced exercise on brain parameters since at least part of them may be due to the stress inherent to the training procedure.

Key words: physical activity, stress, learning and memory, forced running.

INTRODUCTION

The functional benefits of physical exercise on brain function have been studied in humans (Winter et al. 2007, Arkin 2007, Abbot et al. 2004) and also in laboratory animals, especially rodents. Regular physical activity has been related to improvement of cognitive function in rats (Kramer et al. 1999, Sutoo and Akiyama 2003, Cotman and Berchthold 2002, Berchthold et al. 2005). Physical exercise modulates hippocampal neurogenesis (During and Cao 2006, Fabel et al. 2003, van Praag et al. 1999), reduces oxidative stress (Ogonovszky et al. 2005, Radak et al. 2006), increases brain-derived neurotrophic factor levels (Vaynman et al. 2006, Huang et al. 2006, Berchthold et al. 2005, Neeper et al. 1995) and brain vascu-

larization (Isaacs et al. 1992), and causes a variety of morphological changes (Arida et al. 2004).

Several authors have reported favorable effects of physical exercise on memory (Barnes et al. 1991, Uysal et al. 2005, VanPraag et al. 2005, Blustein et al. 2006, Ang et al. 2006, Ogonovsky et al. 2005, Radak et al. 2006, Alaei et al. 2006). Most studies in rodents were carried out using voluntary exercise such as free wheel running (eg. Van Praag et al. 2005) but few investigated the effects of forced exercise (see Ang et al. 2006, Radak et al. 2006). The latter, which is much used by humans (eg., Winter et al. 2007), probably involves a degree of stress (Cotman and Berchthold 2002, Ang et al. 2006, Blustein et al. 2006, Winter et al. 2007), which is difficult to control. Only few authors have studied, animals submitted for similar periods to other forms of stress besides that provided by physical exercise (see Berchthold

*Member Academia Brasileira de Ciências
 Correspondence to: Iván Izquierdo
 E-mail: izquier@terra.com.br

et al. 2005, Ang et al. 2006, Blustein et al. 2006). Stress, especially if subacute or chronic, can produce profound alterations on memory processing (McEwen and Magarinos 2001, McGaugh 2004, 2005, 2006, Das et al. 2005, Manikandan et al. 2006, Radley et al. 2005). Consequently, it is important to distinguish the effects caused by the exercise itself from those produced by the stress inherent to physical exercise.

Here we investigate the effects of acute and chronic physical training in a treadmill and of daily exposure to 5 min mild footshock stimulation on three different learning tasks: habituation of exploration in an open field, object recognition and the Morris water maze.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

One hundred and twelve male Wistar rats purchased at Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) were used. The animals were housed into plastic cages under a light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and Purina lab chow freely available and at a constant temperature of 23°C. The animals started the physical training with 45 or 80 days old (for animals trained for 8 or 2 weeks, respectively). In consequence, they were around 100 days old when they were submitted to behavioral testing.

All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. In all experiments the "principles of laboratory animal care" (NIH publication N° 85-23, revised 1996) were strictly followed.

BEHAVIORAL PROCEDURES

Animals were separated in four experimental groups, as follows: acute exercise (for 2 weeks), acute stress (for 2 weeks), chronic exercise (for 8 weeks) and chronic stress (for 8 weeks). Each group was further divided in two sub-groups: experimental and control. After the physical exercise period, the animals were tested in three different memory tests: open field, object recognition and Morris water maze.

PHYSICAL EXERCISE PROTOCOL

Animals were submitted to protocols of acute (2 weeks) or chronic physical exercise (8 weeks) in a treadmill

(see below). Prior to exposure to the exercise or stress, all animals were placed in the training apparatus for 10 min during the first week in order to minimize novelty-induced stress.

In the first day of the second week an incremental test was carried out on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) to determine the physical exercise intensity that would be used in the training period. The indirect measurement of oxygen uptake (VO_2) peak was measured as recommended by Brooks and White (1978). Each rat ran for 25 min on the treadmill at a low initial speed followed by increases of speed of 5 m/min every 3 minutes until they reached their point of exhaustion (i.e, failure of the rats to continue running). The time to fatigue (in minutes) and workload (expressed by velocity in m/min) were taken as indexes of capacity for exercise, and as a measure of VO_2 peak.

This measure was used to control the exercise intensity during the physical training program. The intensity of the physical training protocol (50 min/day 5 day/week) was adapted for each animal so it never surpassed 60-75% of the respective maximum oxygen uptake. Each training session started with a 10 min-long warm-up (gradual acceleration) followed by 30 min at 60-75% level of the maximum oxygen consumption. The last 10 min of each session were for gradual deceleration.

The running sessions were conducted between 10:00 AM and 14:00 PM on an adapted motorized rodent treadmill with individual 10 cm wide, 50 cm long lanes separated by acrylic walls. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. Those animals that refused to run were encouraged by gently tapping on their backs. Animals that were not able to perform the exercise were excluded of the sample. The sedentary group was transported to the experimental room and handled exactly as the experimental animals but were not submitted to the forced running protocol (adapted from Scopel et al. 2006). To do that the animals were daily put in the running lanes with the treadmill off for ten minutes, and then returned to their home cages.

STRESS PROTOCOL

Animals were submitted to acute (2 weeks) or chronic stress (8 weeks). To do that we used a 50 × 25 × 25 cm acrylic box whose floor was made of a grid of

parallel bronze bars 1 cm apart. The animal received a 0,4 mA, 2-seconds footshock every 30 seconds during 5 min (adapted from Cao et al. 2007), five times a week during 2 or 8 weeks. There was no apparent tissue damage observed in the footpads of shocked rats. The control group was transported to the experimental room and handled exactly as the experimental animals, but did not receive footshocks.

OPEN-FIELD TEST

To analyze exploratory and locomotor activities, as well as habituation memory, animals were placed on the left rear quadrant of a 50 × 50 × 39 cm open field with white walls and floor divided into 12 equal rectangles by black lines on the floor. The number of line crossings and the number of rearings were measured over 5 minutes. These are classical measures of locomotor and exploratory activities. Twenty-four hours later, animals were left to explore the apparatus again for another 5 minutes and the same measures were recorded to evaluate habituation to the task (Barros et al. 2006).

OBJECT RECOGNITION TEST

The object recognition test (Ennauer and Delacour 1988) was carried out one in the same arena used for the open field test, as described by Dere et al. (2005). All animals were habituated to the experimental arena in the absence of any specific behavioral stimulus for 20 min/day during 4 days. The objects, made of metal or glass, were fixed to the arena's floor with adhesive ribbon. In the first day (training session) the animals were placed in the arena containing two different objects (M and N) and left to explore them freely for 5 minutes. The test was repeated 180 minutes later to test short-term memory (STM) or 24 hours later to evaluate long-term memory (LTM) after the physical training program. In the tests, one of the objects was changed for a new object (P, for STM or R, for LTM) and the rat was introduced in the arena for more 5 minutes. The positions of the objects (familiar or novel) were randomly permuted for each experimental animal and the arena was cleaned between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the object was not considered exploratory behavior. The time spent to explore each object was recorded by an observer blind to the treatment

and expressed as a percentage of the total exploration time computed in seconds (Rossato et al. 2007).

MORRIS WATER MAZE (MWM)

The water maze was a black circular pool (200 cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water temperature was maintained between 21–23°C. Two centimeters beneath the surface of the water and hidden from the rats view there was a black circular platform of 12 cm in diameter. It had a rough surface, which allowed the rat climbing onto it easily once detected. The swimming path of the rats was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the water maze room from the room where the computer setup was installed and the animals were temporarily housed during the behavioral sessions. Morris water maze training period began 24 hours after the object recognition test and was carried out during five consecutive days (Rossato et al. 2006b). A 5-day training-test procedure was employed. This is more sensitive to the analysis of different parameters of spatial learning (Rossato et al. 2006b, 2007) than the 1-day protocol (Frick et al. 2000) preferred by some (eg., Ang et al. 2006). On each training day/session, the rats received eight consecutive training trials while the hidden platform was kept in constant position. A different starting location was used for each trial, which consisted of swimming followed by a 30 seconds platform sit. Rats who did not find the platform within 60 seconds were guided to the platform by the experimenter. Memory retention was evaluated during a 30 seconds probe trial carried out 24 hours after the last training session in the absence of the escape platform (Rossato et al. 2006a).

STATISTICAL ANALYSIS

Duncan multiple range tests were used to make comparisons between various groups, and Student's *t*-test was used to compare each group against its control.

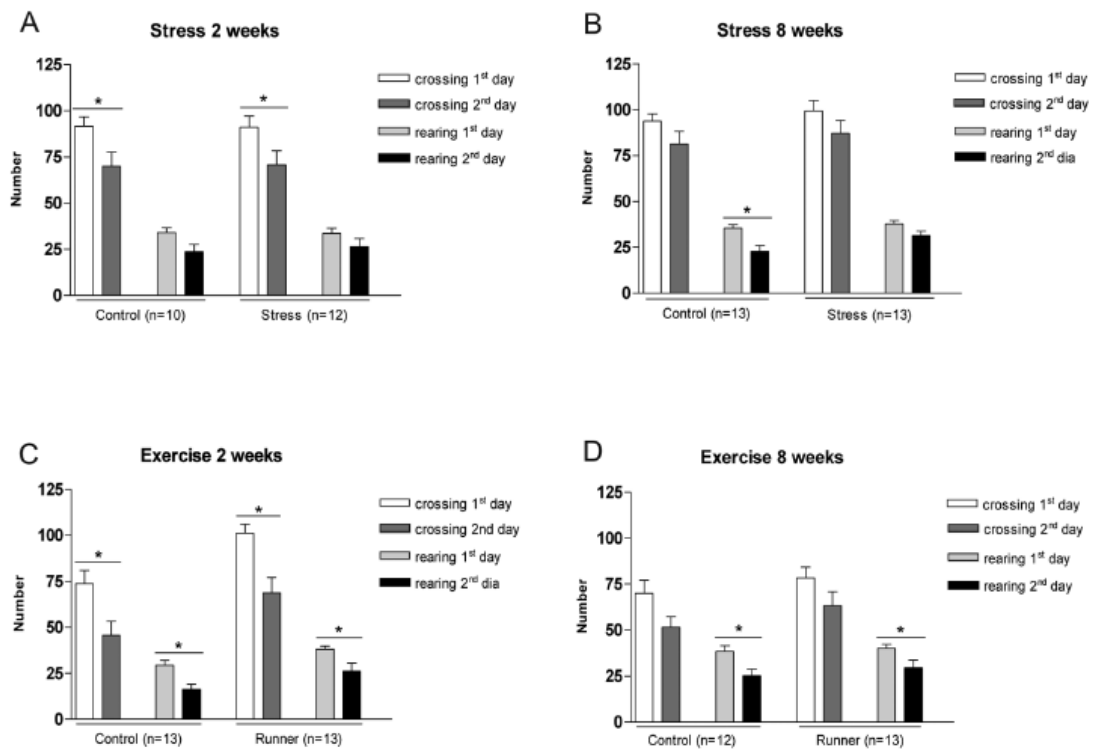


Fig. 1 – Effects of daily footshock stress for 2 (A) or 8 weeks (B), and of forced exercise during 2 (C) or 8 weeks (D) on the habituation of exploration on an open field (OF). Animals were placed for 5 min in the OF (training session) and 24 h later were submitted to a similar exposure (test session). Values are expressed as means \pm SEM of crossings and rearings. N indicated in each figure. Each graph compare the experimental and control groups; * $p < 0.05$ (training \times test) in a Student's *t*-test.

RESULTS

OPEN-FIELD TEST

Both daily stress (Fig. 1A) and forced running protocols (Fig. 1C) enhanced habituation learning after 2 weeks (acute), but not after 8 weeks of training (chronic) (Figs. 1B and 1D).

OBJECT RECOGNITION TEST

Acute stress impaired both short- (STM) and long-term object recognition memory (LTM) while chronic stress hampered only LTM (Fig. 2A and Fig. 2B). Similarly, acute physical exercise also hindered short- and long-term object recognition memory (Fig. 2C). However, chronic forced exercise did not affect short- or long-term memory retention (Fig. 2D).

MORRIS WATER MAZE

Neither stress nor physical exercise, chronic or acute, had any effect on spatial memory acquisition or retention (Fig. 3A and Fig. 3B). However, chronic physical exercise induced a clear decrease in the latency to swim over the previous location of the escape platform during a probe test carried 24 h after the last training session (Fig. 3C). No difference in swimming speed was observed among experimental groups.

ANALYSIS OF MAXIMUM OXYGEN UPTAKE

On the first day of the 5th week of training, animals submitted to the physical exercise protocol were submitted to a second measurement of maximum oxygen uptake to analyze whether the training protocol was effective. All animals increased their maximum oxygen uptake,

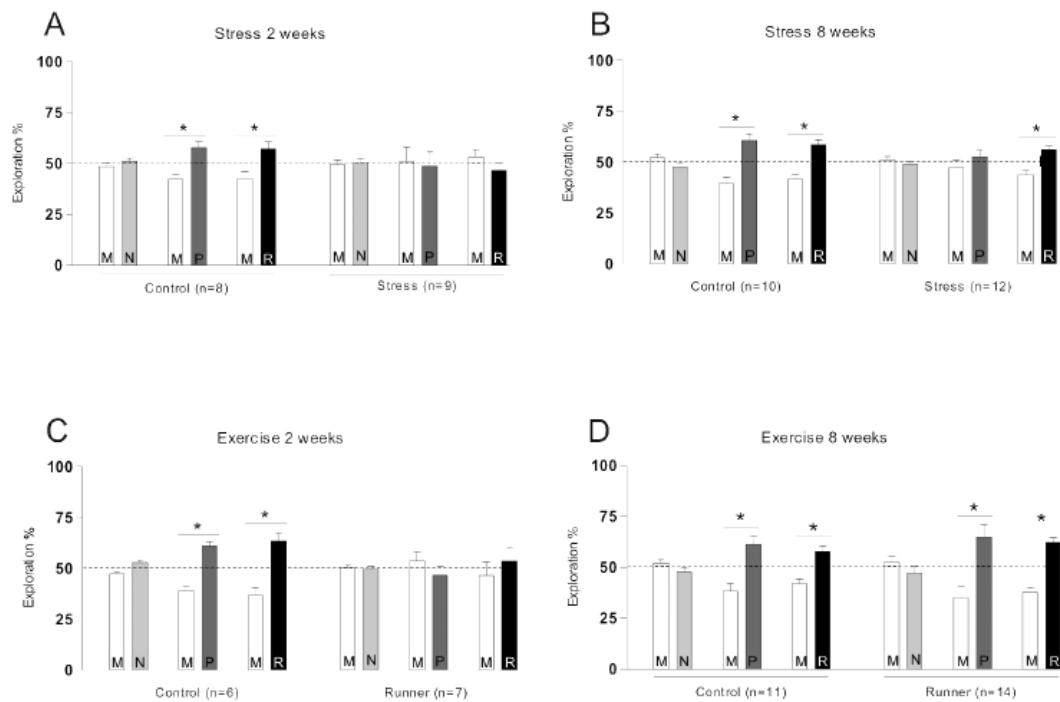


Fig. 2 – Effects of daily footshock stress for 2 (A) or 8 weeks (B) and of forced exercise during 2 (C) or 8 weeks (D) on object recognition memory. Rats were exposed to two different objects (M and N) for 5 min in the training session. Three hours later a short-term memory (STM) test was carried out: animals were exposed to a familiar object (M) and a novel object (P) again for 5 min. Long-term memory (LTM) was measured 24 h after training: the animals were exposed again to the familiar object (M) and to another novel object (R) for 5 min. Data are presented as means \pm SEM of the percentage of time spent exploring a particular object divided by the total time of object exploration. * $p < 0.05$ in Student's *t*-test.

indicating that forced running protocol indeed enhanced physical aerobic capacity (Fig. 4). Maximum oxygen uptake was not evaluated at the end of the training period to avoid confounding stress at the end of running period because this test can cause some stress to the animals, and immediately after the exercise protocol was finished the animals were submitted to the memory tests.

DISCUSSION

The effects of daily forced exercise and daily footshock stress were quite similar, but not identical in the three tasks here examined. Our results fall within the wide variability of reports in the literature on the nature of these effects (van Praag et al. 2005, Ogonovsky et al. 2005, Uysal et al. 2005, Radak et al. 2006, Blustein et al. 2006, Alaei et al. 2006, Ang et al. 2006). Further,

our findings correlate with others in humans showing that high impact running improves some forms of learning, but also causes blood catecholamine and other changes indicative of stress (Winter et al. 2007).

Both procedures were followed by an enhancement of habituation learning but not of within-session performance of crossings or rearings in the open field (Fig. 1).

The two treatments impaired object recognition learning after 2 weeks, suggesting that the effect of acute exercise could be at least in part attributed to the inherent stress. At 8 weeks, only the deleterious effect of chronic stress on this task persisted, while the animals submitted to chronic forced exercise showed a behavioral performance not different from untreated controls (Fig. 2). The effect of chronic stress or forced exercise on recognition learning had not been previously studied, to our knowledge.

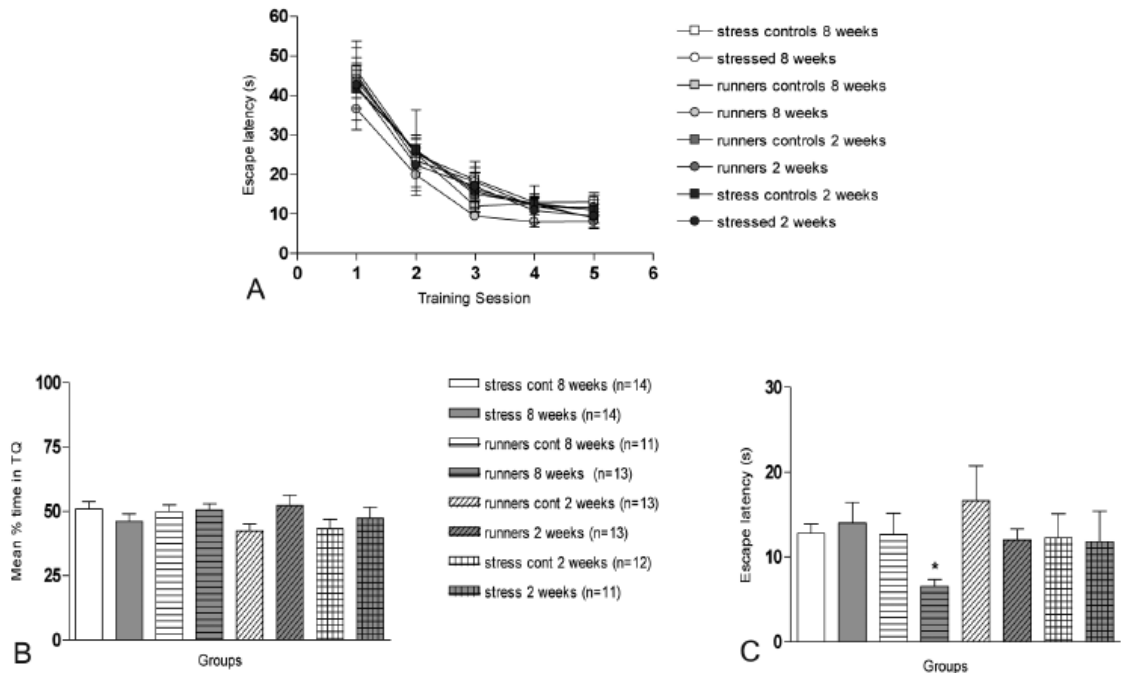


Fig. 3 – Animals were trained during 5 days in a spatial version of the Morris Water Maze (MWM). (A): Mean \pm SEM escape latency (time spent to find the escape platform) on each training session (data shown as blocks of 8 trials). (B): Mean \pm SEM time spent to find the target quadrant (TQ) during a 60 s probe test carried out 24 h after the 5th training session; no significant differences among groups were detected. (C): Mean \pm SEM latency, measured in the probe test, to detect the position where the escape platform had been during the training. Animals submitted to the forced exercise during 8 weeks showed a significantly lower latency than all the others (* $p < 0,05$ in Duncan's test).

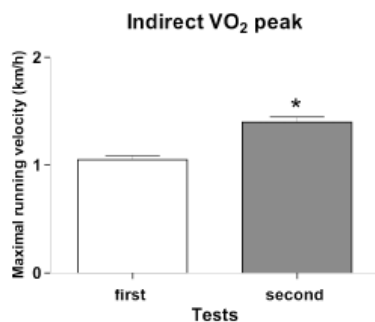


Fig. 4 – Animals submitted to forced running during 8 weeks were submitted to two indirect measurements of maximum oxygen consumption (VO₂ peak) using the procedure of Brooks and White (1978). The first measurement was one day before the beginning of training, and the second was after 4 weeks of training. Note that the training procedure significantly enhanced VO₂ (* $p < 0,05$ in Student's *t*-test), showing that it effectively served the purpose of an exercise.

Finally, a slight but significant enhancing effect of chronic exercise was observed in the Morris maze (Fig. 3C), which agrees with a report of Ang et al. (2006); Alaei et al. (2007) and with those of Radak et al. (2006) and Blustein et al. (2006). No such influence or any others were detected in the acute or chronic stress groups or in the acute exercise group.

In summary, our results suggest that while physical exercise can play a key role to influence the learned behavior in rats, the amount of stress inherent to each experimental procedure also has a prominent effect. It is difficult to establish exactly the degree of stress associated with the physical exercise protocol utilized in our experiments. However, it is clear that since it forces the animal to run at the experimenter demand, running in a treadmill is far more stressing than doing so, at will, in a running wheel (Blustein et al. 2006).

What is the biochemical basis of the behavioral

modifications that we observed? Mechanisms to support our results may involve hippocampal neurogenesis (During and Cao 2006, Fabel et al. 2003, van Praag et al. 1999), reduced oxidative stress (Ogonovszky et al. 2005, Radak et al. 2006), and increased brain-derived neurotrophic factor levels (Vaynman et al. 2006, Huang et al. 2006, Berchtold et al. 2005, Neeper et al. 1995).

In any case, the question that remains open is how the influence of exercise on cognitive function can be ascribed to the exercise and stress separately (McEwen and Magarinos 2001, Cotman and Berchtold 2002), since the forced exercise per se also includes a degree of stress as suggested by stress oxidative investigations (Radak et al. 2006, Ogonovsky et al. 2005). Proper experiments are in course to answer this issue.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to II and MC. The authors thank Dra. Adriane Belló Klein for her technical advice.

RESUMO

Neste trabalho estudamos os efeitos do exercício forçado diário em esteira rolante e da exposição diária ao estresse (porque o exercício forçado envolve um certo grau de estresse) durante 2 ou 8 semanas em diferentes tipos de memória em ratos Wistar machos. Os testes de memória utilizados foram: habituação da exploração em um campo aberto, reconhecimento de objetos, e memória espacial no labirinto aquático de Morris. O estresse diário facilitou a memória de habituação, os animais aprenderam após 2 mas não após 8 semanas; houve prejuízo na memória curta (STM) e de longa duração (LTM) no teste de reconhecimento em 2 semanas, mas somente de STM após 8 semanas; não houve nenhum efeito na memória espacial após 2 ou 8 semanas. O protocolo do exercício facilitou também a memória de habituação no campo aberto após 2 mas não após 8 semanas; prejudicou STM e LTM na tarefa do reconhecimento após 2 mas não após 8 semanas; e facilitou uma medida importante da aprendizagem espacial após 8 semanas (latência de escape), mas não outras medidas. Nossos resultados indicam que algum cuidado deve ser tomado ao se interpretar efeitos de exercício forçado sobre as funções cognitivas, já que uma parte deles, embora não todos, podem ser atribuídos ao estresse inerente ao exercício.

Palavras-chave: atividade física, estresse, aprendizagem e memória, corrida forçada.

REFERENCES

- ABBOT RD, WHITE LR, ROSS GW, MASAKI KH, CURB JD AND PETROVITCH H. 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA*. 292: 1447-1453.
- ALAEI H, BORJEIAN L, AZIZI M, ORIAN S, POURSHANAZARI A AND HANNINEN O. 2006. Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 536: 138-141.
- ALAEI H, MOLOUDI R AND SARKAKI AR. In press. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodywork Mov-Ther.* (available on sciencedirect site).
- ANG ET, DAWE GS, WONG PTH, MOOCHHALA S AND NG YK. 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 1113: 186-93.
- ARIDA RM, SCORZA CA, DA SILVA AV, SCORZA FA AND CAVALHEIRO EA. 2004. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett* 364: 135-138.
- ARKIN S. ????. Language-enriched exercise plus socialization slows cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Others Dement.* 22: 62-77.
- BARNES CA, FORSTER MJ, FLESHNER M, AHANOTU EN, LAUDENSLAGER ML, MAZZEO RS, MAIER SF AND LAL H. 1991. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 12: 47-53.
- BARROS D, AMARAL O, IZQUIERDO I, GERACITANO L, RASEIRA MCB, HENRIQUES AT AND RAMIREZ MR. 2006. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol, Biochem and Behav* 84: 229-234.
- BERCHTOLD NC, CHINN G, CHOU M, KESSLAK JP AND COTMAN CW. 2005. Exercise primers a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133: 853-861.
- BLUSTEIN JF, MCLAUGHLIN M AND HOLFMAN JR. 2006. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav* 89: 582-586.
- BROOKS GA AND WHITE TP. 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats in treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015.

- CAO L, HUDSON CA AND MOYNINHAN JA. 2007. Chronic foot shock induces behaviors and accompanying pro- and anti-inflammatory responses in mice. *J Neuroimmunol* 186: 63–74.
- COTMAN CW AND BERCHTOLD NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosci* 25: 295–301.
- DAS A, RAI D, DIKSHIT M, PALIT G AND NATH C. 2005. Nature of stress: Differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. *Life Sci* 77: 2299–2311.
- DERE E, HUSTON JP AND SILVA MAS. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84: 214–221.
- DURING MJ AND CAO L. 2006. VEGF a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* 3: 29–33.
- ENNAUCER A AND DELACOUR J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47–59.
- FABEL K, FABEL K, TAM B, KAUFER D, BAIKER A, SIMMONS N, KUO CJ AND PALMER TD. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18: 2803–2812.
- FRICK KM, STILLNER ET AND BERGER-SWEENEY J. 2000. Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. *Neuro Report* 11: 3461–3465.
- HUANG AM, JEN CJ, CHEN HF, YU L, KUO YM AND CHEN HI. 2006. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm*. 113: 803–811.
- ISAACS KR, ANDERSON BJ, ALCANTARA AA, BLACK JE AND GREENOUGH. 1992. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 110–119.
- KRAMER AF ET AL. 1999. *Nature* 400: 418–419.
- MANIKANDAN S, PADMA M, SRIKUMAR K, PARTHASARATHY NI, MUTHUVEL A AND DEVI RS. 2006. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 399: 17–22.
- MCEWEN BS AND MAGARINOS AM. 2001. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 16: 117–127.
- MCGAUGH JL. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1–28.
- MCGAUGH JL. 2005. Emotional arousal and enhanced amygdala activity: new evidence for the old perseveration-consolidation hypothesis. *Learn Mem* 12: 77–79.
- MCGAUGH JL. 2006. Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cog Sci* 10: 345–347.
- NEEPER SA, GOMÉZ-PINILLA F, CHOI J AND COTMAN C. 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109.
- OGONOVSKY H, BERKES I, KUMAGAI S, KANEKO T, TAHARA S, GOTO S AND RADAK Z. 2005. The effects of moderate-, strenuous- and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in the rat brain. *Neurochem Int* 46: 635–640.
- RADAK Z, TOLD A, SZABO Z, SIAMILIS S, NYAKAS C, SILYE G, JAKUS J AND GOTO S. 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Internat* 49: 387–392.
- RADLEY JJ, ROCHER AB, JANSSEN WG, HOF PR, MCEWEN BS AND MORRISON JH. 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol* 196: 199–203.
- ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MYSKIW JC, MEDINA JH, IZQUIERDO I AND CAMMAROTA M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14: 36–46.
- ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, LIMA RH, MEDINA JH, IZQUIERDO I AND CAMMAROTA M. 2006a. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience* 143: 15–23.
- ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MEDINA JH AND CAMMAROTA M. 2006b. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13: 431–440.
- SCOPEL D, FOCHESSATO C, CIMAROSTI H, RABBO M, BELLÓ-KLEIN A, SALBEGO C, NETTO CA AND SIQUEIRA IR. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71: 155–159.
- SUTOO D, AKIYAMA K. 2003. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis* 13: 1–14.
- UYSAI N, TUGYAN K, KAYATEKIN BM, ACIKGOZ O,

- BAGRIYANIK HA, GONENC S, OZ-DEMIR D, AKSU I, TOPCU A AND SEMIN I. 2005. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 383: 241–245.
- VAN PRAAG H, CHRISTIE BR, SEJNOWSKI TJ AND GAGE FH. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13427–13431.
- VAN PRAAG H, SHUBERT T, AHAO C AND GAGE F. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680–8685.
- VAYNMAN SS, YING Z, YIN D AND GOMEZ-PINILLA F. 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070: 124–30.
- WINTER B ET AL. 2007. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 87: 597–609.

ANEXO III – Artigo 2

Artigo submetido à revista Behavioural Brain Research

Long term memory deficit secondary to maternal deprivation can be reversed by physical exercise in an inhibitory avoidance test, but not in Morris water maze and object recognition tests

PÂMELA BILLIG MELLO

FERNANDO BENETTI

MARTÍN CAMMAROTA

IVÁN IZQUIERDO

Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 2nd floor, (90610-000) Porto Alegre, RS, Brasil.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, 2nd floor (90050-170) Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondence to: Iván Izquierdo

Av. Ipiranga 6690, Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, CEP 90610-000

Fone: (51)33203000 ramal 2532

E-mail: izquier@terra.com.br

Abstract

Maternal deprivation in the first 10 days of life can induce memory deficits in rats when they become adult. The effect is seen in a one-trial inhibitory avoidance task, in spatial learning in a water maze, and in an object recognition test. Starting at day 45 of life, maternally-deprived and control rats were submitted to 8 weeks of daily forced physical exercise in a treadmill during 8 weeks, 5 times per week, for 50 min/day, with an intensity corresponding to 60-75% of the maximum VO_2 of each animal. This treatment reversed the memory deficit seen in the inhibitory avoidance task, but not in the two other memory tests. The exercise alone had no effect on performance in the memory tests. The results indicate that forced exercise can reverse the deleterious effect of maternal deprivation on the memory of some tasks but not others.

Key-words: maternal deprivation, treadmill running, memory tests, learning and memory,

Introduction

Human and animal studies have shown several beneficial effects of physical exercise in overall health and cognitive functions, including learning and memory (Ang and Gomez-Pinilla, 2007; Alaei et al., 2006; Winter et al., 2007). Several authors reported enhancements of spatial memory in rats trained in a Morris Water Maze (MWM, Ang et al., 2006; Blustein et al., 2006; Radak et al., 2006; Alaei et al., 2007; Asl et al., 2007), Y maze (Van Der Borght et al, 2007) or in mice trained in a radial arm water maze (Nichol et al, 2007), and improved memory in an inhibitory avoidance test (IA, Chen et al., 2007). In our laboratory (Mello et al., 2008) we have detected only very mild enhancing effects, if any, in IA and spatial learning in a water maze, and no

effects at all in an object recognition task. Barnes et al. (1991) have also been unable to report significant influences of physical exercise on cognitive parameters in rats.

In contrast, maternal deprivation at a very early age in rats has been reported to induce cognitive deficits observable in adulthood and even lasting into senescence (Lehmann et al., 1999; Oitzl et al., 2000). Neurochemical and anatomical disturbances accompany these effects: a reduced expression of brain-derived neurotrophic factor and NMDA receptor subunits in the rat hippocampus (Roceri et al., 2002; Kuma et al., 2004), increased nerve growth factor expression in rat hippocampus (Cirulli et al., 1998), reduced hippocampal mossy fiber density (Hout et al., 2002), and adult elevated basal pituitary-adrenal activity (Rots et al., 1996; Schmidt et al., 2002). Different protocols of maternal deprivation have been used by different authors over the years. The most widely used nowadays is 3h of separation a day during ten days (McIntosh et al., 1999).

Exercise has been described as effective to revert memory deficits caused by morphine (Alaei et al., 2006) and aging (van Praag et al., 2002). Additionally, in humans, exercise can play a preventive role, reducing the risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons (Laurin et al., 2001), and the risk of developing Alzheimer's disease (Friedland et al., 2001).

Here we study whether exercise can revert the memory deficits caused by maternal deprivation.

Materials and Methods

Animals

Pregnant female Wistar rats (age, 3-4 months, weight, 250 – 280 g) and 45 days-old male Wistar rats were obtained from the Reproduction Center of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). All animals were maintained in light/dark

cycle (lights on at 07:00 A.M., off at 7:00 P.M.) and the temperature (± 22 °C) and humidity (60%) were kept constant. The pregnant females were individually housed with *ad libitum* access to food and water. The day of delivery (day 0) was controlled.

A maternal deprivation protocol was applied on day 1 to 10 after birth, as aforementioned, to approximately 50% of the pups; the rest were used as controls.

Twenty-three of the male rats were submitted to a chronic exercise protocol (experimental) beginning at the age of 45 days. and the other twenty-two were not exercised (controls). Consequently, the behavioral testing was accomplished with the animals completing around 100 days of life.

All efforts were done in order to minimize animal suffering and to reduce the number of animals necessary to the experiments. For all experiments the “principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) were strictly followed.

Behavioral procedures

Maternal deprivation protocol

The female Wistar rats were maintained in individual boxes until their birth day. This day was considerate as the day zero. The day following their birth (day 1), the pups were divided in groups of 8 (4 females and 4 males). Then, half of the animals were submitted to the maternal deprivation protocol, and the rest were just kept in their home cages. The former were deprived of their mother for 180 min daily during the first 10 days of life (on day 1 to 10). The protocol employed in this study consisted in removing the mother from the residence box, putting the female rat in other box (Renard et al., 2005). The pups were maintained in the original home cage (grouped in the nest in presence of maternal odor), which was transferred to a different room kept at 32°C to compensate for the mother’s body heat. At the end of each daily

deprivation, the mothers were returned to the home boxes. This procedure was carried out in the light cycle, between 8:00 AM and 2:00 PM., and the pups remained in the residence box with light and temperature controlled (Renard et al., 2005). The control rats stayed in their resident boxes with their mothers, throughout the experimental procedures.

Only on day 11, the boxes were cleaned normally again in accordance with the laboratory routine. At the age of 21 days the animals were weaned; only the male pups were used in the experiments described below. All animals above the age of 21 days were kept in standard 50 x 30 x 20 cm plastic boxes, 4-5 to a box, in rooms where the light and temperature conditions were as indicated above.

Physical exercise protocol

Animals were submitted to chronic physical exercise (8 weeks) in a treadmill (described below). Prior to exposure to the exercise all animals were placed in the training apparatus for 10 min during the first week, in order to minimize novelty-induced stress.

In the first day of the second week an incremental test was carried out on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) to determine the physical exercise intensity that would be used in the training period. The indirect measurement of peak oxygen uptake (VO_2 peak) was carried out as recommended by Brooks and White (1978). Each rat ran for 25 min on the treadmill at a low initial speed followed by increases of speed of 5m/min, every 3 minutes, until they reached their point of fatigue (i.e., failure to continue running). The time to fatigue (in minutes) and workload (expressed by velocity in m/min) were taken as indexes of capacity for exercise, and as an indirect measurement of VO_2 peak.

The intensity of the physical training protocol (50 min/day for 5 day per week) was controlled to remain within 60 to 75% of the respective peak oxygen uptake. Each training session started with a 10 min warm-up (gradual acceleration) followed by 30 min at a velocity corresponding to 60-75% of the peak oxygen uptake. The last 10 min of each session were for gradual deceleration (Scopel et al. 2006).

The running sessions were conducted between 10:00 AM and 14:00 PM on an adapted motorized rodent treadmill with individual 10cm wide, 50cm long lanes separated by acrylic walls. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. Those animals that refused to run were encouraged by gently tapping on their backs. Animals that were not able to perform the exercise were excluded from the sample. The control group was transported to the experimental room and handled exactly as the experimental group. The animals were placed exposed to the treadmill stopped and kept in the lanes for 10 minutes, but the treadmill was not activated and they were thus not exposed to running.

Analysis of maximum oxygen uptake

On the first day of the 5th week of training, animals submitted to the physical exercise protocol were submitted to a second measurement of maximum oxygen uptake to analyze whether the training protocol was effective, and to verify if the forced running protocol indeed enhanced physical aerobic capacity. Peak oxygen uptake was not evaluated in the end of the training period to avoid effects of high intensity exercise stress on the memory tests that the animals were submitted after the protocol finished.

The animals submitted to physical exercise increased their maximum oxygen uptake, indicating that forced running protocol indeed enhanced physical aerobic capacity (graph do not show).

Morris water maze test

The water maze was a black circular pool (200cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water temperature was maintained between 21-23°C. Two centimeters beneath the water surface, and hidden from the rats' view, there was a black circular platform with diameter of 12cm; its position was maintained during the training sessions. It had a rough surface that allowed to the rat to climb onto it easily once he detected it. The swimming path of the rats was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking path and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the water maze room from the room where the computer setup was installed and the animals were temporarily housed during the behavioral sessions. Morris water maze was carried out during five consecutive days (Rossato et al. 2006a). A 5-day training-test procedure was employed. This procedure is more sensitive to different parameters of spatial learning (Rossato et al. 2006b, 2007) than the 1-day protocol (Frick et al. 2000). On each day of training, the rats were submitted to eight consecutive trials, while the hidden platform was kept in constant position. A different starting location was used for each trial, which consisted of swimming followed by a 30 seconds platform sit. Rats who did not find the platform within 60 seconds were guided to the platform by the experimenter. Memory retention was evaluated during a 30 seconds probe trial carried out 24 hours after the last training session in the absence of the escape platform (Rossato et al. 2006a).

Object recognition test

The object recognition test (Ennauer and Delacour 1988) was carried out in the same arena used for the open field test, as described by Dere et al. (2005). All animals were habituated to the experimental arena in the absence of any specific behavioral stimulus for 20 min/day during 4 days. The objects for recognition, made of metal or glass, were fixed to the arena's floor with adhesive ribbon. In the first day (training session) the animals were placed in the arena containing two different objects (M and N), and left to explore them freely for 5 minutes. The test was repeated 24 hours later to evaluate long term memory (LTM). In the test, one of the objects was removed and a new object (P) was placed in their place, and the rat was introduced in the arena for more 5 minutes. The positions of the objects (familiar or novel) were randomly permuted for each experimental animal, with the arena being always cleaned between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the object was not considered as an exploratory behavior. The time spent to explore each object was recorded by an observer blind to the treatment and expressed as a percentage of the total exploration time computed in seconds (Rossato et al. 2007).

Inhibitory avoidance test

The Inhibitory avoidance apparatus consisted in a 50 x 25 x 25 cm acrylic box whose grid was a series of 1 mm caliber bronze bars spaced 1 cm apart. The left end of the floor was covered by one 8 cm wide, 5,0 cm high wood platform (Izquierdo et al, 1992). During training, animals were gently placed on the platform, and when they stepped down onto the grid they received a 3 seconds scrambled foot-shock with intensity of 0,5 mA.

The rats were tested for retention 24h after the training. With this test was verified the step down latency, which would be longer than training if the animal had a good long-term memory (VIANA et al, 2001).

Open field test

The animals were submitted to an additional test: the open field test was employed to evaluate the exploratory and locomotor activity. The open field apparatus consisted of an open arena with dimensions of 40 x 30 x 50 cm. The animal was placed in the arena and observed during 5 min. The critical measurement was the frequency and the time spent for locomotion in the center and the peripheral area to open field.

Statistical analysis

IA data are expressed as medians \pm interquartile range of step down latencies during training and test sessions and were compared between groups using a Kruskal-Wallis analysis of variance followed by individual Mann-Whitney U tests. The reason for using non-parametric tests was that in this task there was a ceiling of 180 sec in the test session (Izquierdo et al., 2007).

In the OR a Student's *t*-test was used to analyze the time spent exploring each object. All other data were expressed as mean \pm SEM, the statistic significance was evaluate using ANOVA followed by Bonferroni or Dunn test, as appropriate.

Results

Morris water maze (MWM) test

All the animals had a similar learning curve in the five days of training in the MWM. However, for the PROBE test accomplished in the first day after the end of training, the maternal deprivation caused memory deficit. Exercise was found not to affect MWM memory significantly, and not to reverse the deficit caused by maternal

deprivation (fig 1). No difference in swimming speed was observed among experimental groups (Data not shown).

Object recognition test (OR)

In the OR test, while the controls exploring the novel object for more time, the deprived rats spent a similar amount of time exploring familiar and novel objects, which indicates an inability to form a memory of this task (fig 2). In this case, the exercise also had no effect of its own, and did not modify the effect maternal deprivation effect (fig 2).

Inhibitory avoidance (IA) test

Maternal deprivation disrupted IA memory. The deprived animals had a shorter step down latency than the controls ($p < 0,05$). Animals exposed to the treadmill also presented a test latency similar to that of the controls. Maternally deprived animals submitted to 8 weeks of physical exercise showed no impairment. Thus, in this task, unlike in the others, exercise reverted the detrimental effect of maternal deprivation (fig. 3).

Locomotor and exploratory activity

Statistical analyses showed no significant differences between control, deprived and exercised animals in any of the parameters analyzed, like observed by Madruga et al. (2006; data not show).

Discussion

Like related for several authors, the physical exercise can influence the cognitive functions in human and animals (Winter et al. 2007, Arkin 2007, Abbott et al. 2004). This central nervous system functions include memory, in which, according some papers, the physical exercise cause an improvement of memory (VanPraag et al. 2005, Ang et al. 2006, Ogonovsky et al. 2005), and, according others, did not has an effect (Barnes et al, 1991; Mello et al, 2008).

Physical exercise has been used as treatment for memory deficits, like the prejudice of memory caused by aging (Garza et al, 2004; vanPraag et al, 2005), by morphine (Alaei et al, 2006) and by prenatal ethanol exposure (Christie et al, 2005).

The present findings confirm the deleterious effect of maternal deprivation on memory parameters in the offspring when they become young adults (Lehmann et al., 1999; Huang et al., 2002; Lévy et al., 2003; Lai et al., 2006; Aisa et al., 2007). The deficit was observed in three tasks: one clearly aversive (IA), one spatial (the MWM), and one involving recognition (OR).

The deficit was reversed by the forced exercise protocol only in the aversive task (fig. 3). This is in line with the reports of van Praag et al. (2005), Christie et al. (2005) and Alaei et al.(2006) on other reversals of cognitive deficits, and perhaps with the protective influence of exercise in persons exposed to aversivity, like the elderly (Laurin et al., 2001; see also Friedland et al. (2001) and Cotman and Brechtold (2002)

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the National Research Council of Brazil (CNPq) to II and MC.

References

- ABBOTT RD, WHITE LR, ROSS GW, MASAKI KH, CURB JD, PETROVITCH H. 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA*. 292: 1447-1453.
- AISA B, TORDERA R, LASHERAS B, DEL RÍO J, RAMÍREZ MJ. 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32: 256-66.

ALAEI H, BORJEIAN L, AZIZI M, ORIAN S, POURSHANAZARI A, HANNINEN O. 2006. Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 536: 138-141.

ALAEI H, MOLOUDI R, SARKAKI AR. 2007. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodywork Mov Ther* *In press*.

ANG ET, DAWE GS, WONG PTH, MOOCHHALA S, NG YK. 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 1113: 186-93.

ANG ET, GOMEZ-PINILLA F. 2007. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem*.14:2564-71.

ARKIN S. 2007. Language-enriched exercise plus socialization slows cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Others Demen*. 22: 62-77.

ASL NA, SHEIKHZADE F, TORCHI M, ROSHANGAR L, KHAMNEI S. 2007. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology*. *In press*.

BARNES CA, FORSTER MJ, FLESHNER M, AHANOTU EN, LAUDENSLAGER ML, MAZZEO RS, MAIER SF, LAL H. 1991. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 12: 47-53.

BERCHTOLD NC, CHINN G, CHOU M, KESSLAK JP, COTMAN CW. 2005. Exercise primers a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133: 853-61

BLUSTEIN JF, MCLAUGHLIN M, HOLFMAN JR. 2006. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav* 89:582-6.

- BROOKS GA, WHITE TP. 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats in treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015.
- CIRULLI F, MICERA A, ALLEVA E, ALOE L. 1998. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav.* 59: 853-8.
- CHEN H, LIN L, YU L, LIU Y, KUO Y, HUANG A, CHUANG J, WU F, LIAO P, JEN C. 2007. Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: The role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiol Learn Mem.* *In press.*
- CHRISTIE BR, SWANN SE, FOX CJ, FROC D, LIEBLICH SE, REDILA V, WEBBER A. 2005. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci.* 21: 1719-26.
- COTMAN CW, BERCHTOLD NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosci* 25: 295-301.
- DERE E, HUSTON JP, SILVA, MAS. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84: 214-221.
- ENNAUCER A, DELACOUR J. 1988. A new one-trail test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59.
- FRICK KM, STILLNER ET, BERGER-SWEENEY J. 2000. Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. *Neuro Report* 11: 3461-3465.
- FRIEDLAND RP, FRITSCH T, SMYTH KA, KOSS E, LERNER AJ, CHEN CH, PETOT GJ, DEBANNE SM. 2001. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 3440-5.

GARZA AA, HA TG, GARCIA C, CHEN MJ, RUSSO-NEUSTADT A. 2004. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol, Biochem and Behav.* 77: 209-220.

HOUT RL, PLOTSKY PM, LENOX RH, MCNAMARA RK. 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 950: 52-63.

HUANG LT, HOLMES GL, LAI MC, HUNG PL, WANG CL, WANG TJ, YANG CH, LIOU CW, YANG SN. 2002. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia.* 43: 1141-8.

IZQUIERDO, I.; CUNHA, C. da; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B.; MEDINA, J. H. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amigdala, medium septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58: 16-26.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, DA COSTA JC, FURINI C, ZINN C, CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, IZQUIERDO I. 2007. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 88: 160-6.

KRAMER AF, HAHN NJ, COHEN NJ, BANISH MT, MCAULEY E, HARRISON CR, CHASON J, VAKIL E, BARDELL L, BOILEAU RA, COLCOMBRE A. 1999. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400: 418-419.

KUMA H, MIKI T, MATSUMOTO Y, GU H, LI HP, KUSAKA T, SATRIOTOMO I, OKAMOTO H, YOKOYAMA T, BEDI KS, ONISHI S, SUWAKI H, TAKEUCHI Y. 2004. Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 372: 68-73.

LAI MC, HOLMES GL, LEE KH, YANG SN, WANG CA, WU CL, TIAO MM, HSIEH CS, LEE CH, HUANG LT. 2006. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats – the role of corticosterone. *Epilepsy Res.* 68:123-36.

LAURIN D, VERREAULT R, LINDSAY J, MACPHERSON K, ROCKWOOD K. 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol.* 58: 498-504.

LEHMANN J, PRYCE CR, BETTSCHEN D, FELDON J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. 1999. *Pharmacol Biochem Behav.* 64: 705-15.

LÉVY F, MELO AI, GALEF BG JR, MADDEN M, FLEMING AS. 2003. Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Dev Psychobiol.* 43: 177-91.

MADRUGA C, XAVIER LL, ACHAVAL M, SANVITTO GL, LUCION AB. 2006. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav Brain Res* 166: 241-6.

MCINTOSH J, ANISMAN H, MERALI Z. 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev Brain Res.* 113: 97-106.

MELLO PB, BENETTI F, CAMMAROTA M, IZQUIERDO I. 2008. Effects of acute and chronic exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cien.* *In press.*

NICHOL KE, PARACHIKOVA AI, COTMAN CW. 2007. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res.* 184: 124-32.

OITZL MS, WORKEL JO, FLUTTERT M, FROSCH F, DE KLOET ER. 2000. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescence Brown Norway rats. *Eur J Neurosci.* 12: 3771-80.

OGONOVSKY H, BERKES I, KUMAGAI S, KANEKO T, TAHARA S, GOTO S, RADAK Z. 2005. The effects of moderate-, strenuous- and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in the rat brain. *Neurochem Int* 46: 635-640.

RADAK Z, TOLD A, SZABO Z, SIAMILIS S, NYAKAS C, SILYE G, JAKUS J, GOTO S. 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Internat* 49: 387-392.

RENARD GM, SUÁREZ MM, LEVIN GM, RIVAROLA MA. 2005. Sex differences in rats: Effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiology and Behavior* 85: 363-369.

ROCERI M, HENDRIKS W, RACAGNI G, ELLENBROEK BA, RIVA MA. 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry.* 7: 609-16.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MEDINA JH, CAMMAROTA M. 2006b. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13: 431-440.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, MYSKIW JC, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14: 36-46.

ROSSATO JI, BEVILAQUA LRM, LIMA RH, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. 2006a. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience* 143: 15-23.

ROTS NY, DE JONG J, WORKEL JO, LEVINE S, COOLS AR, DE KLOET ER. 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol.* 8: 501-6.

SCHMIDT MV, OITZL MS, LEVINE S, DE KLOET ER. 2002. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res Dev Brain Res.* 139: 39-49.

SCOPEL D, FOCHESSATTO C, CIMAROSTI H, RABBO M, BELLÓ-KLEIN A, SALBEGO C, NETTO CA, SIQUEIRA IR. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71: 155-159.

SUTOO D, AKIYAMA K. 2003. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis* 13: 1-14.

UYVAL N, TUGYAN K, KAYATEKIN BM, ACIKGOZ O, BAGRIYANIK HA, GONENC S, OZDEMIR D, AKSU I, TOPCU A, SEMIN I. 2005. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 383: 241-245.

VAN DER BORGHT K, HAVEKES R, BOS T, EGGEN BJ, VAN DER ZEE EA. 2007. Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci.* 121: 324-34.

VAN PRAAG H, SHUBERT T, AHAO C, GAGE F. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680-8685.

VIANNA, M. R.; SZAPIRO, G.; MCGAUGH, J. L.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. 2001. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12251-4.

WINTER B, BREITENSTEIN C, MOOREN FC, VOELKER K, FOBKER M, LECHTERMANN A, KRUEGER K, FROMME A, KORSUKEWITZ C, FLOEL A, KNECHT S. 2007. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 87: 597-609.

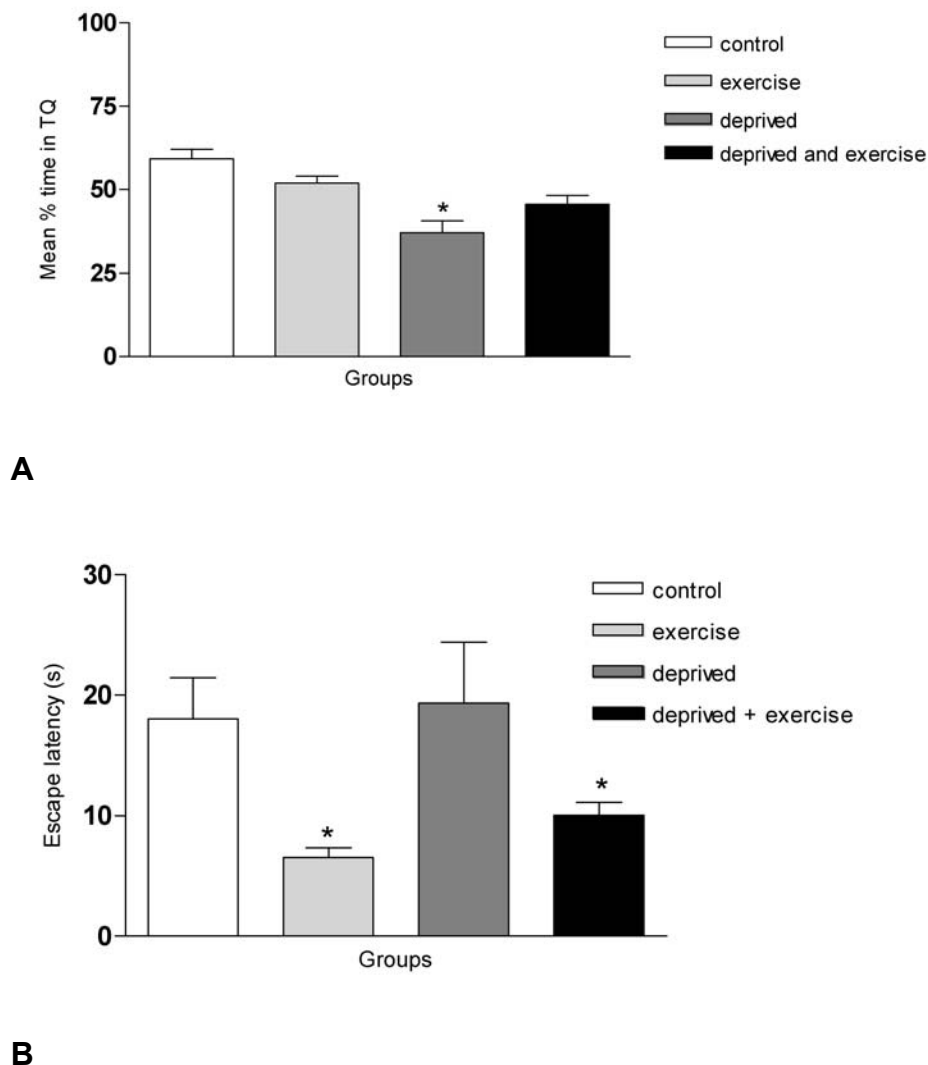


Fig. 1. Animals were trained during 5 days in a spatial version of the Morris Water Maze (MWM). (A): Mean \pm SEM time spent to find the target quadrant (TQ) during a 60 s probe test carried out 24 h after the 5th training session. Animals submitted to maternal deprivation showed a significantly high time spent to find the TQ; * $p < 0,001$ in Dunn's test. (B): Mean \pm SEM latency, measured in the probe test, to detect the position where the escape platform had been during the training. Animals submitted to

the forced exercise during 8 weeks showed a significantly lower latency than the others (* $p < 0,01$ in Dunn's test).

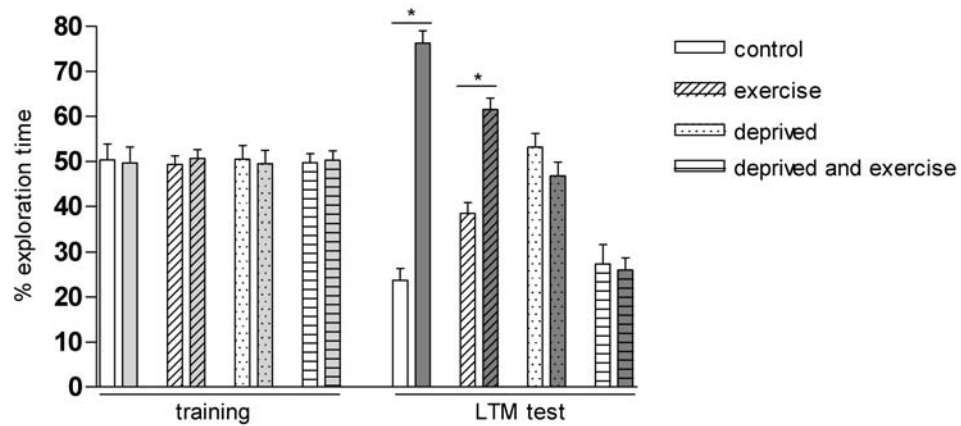


Fig. 2. Rats were exposed to two different objects for 5 min in the training session and explore a similar percent of time each one. Long-term memory (LTM) was measured 24h after training: the animals were exposed again to the familiar object and to another novel object during 5 min. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent exploring a particular object divided by the total time of object exploration (* $p < 0,001$ in Student's *t*-test).

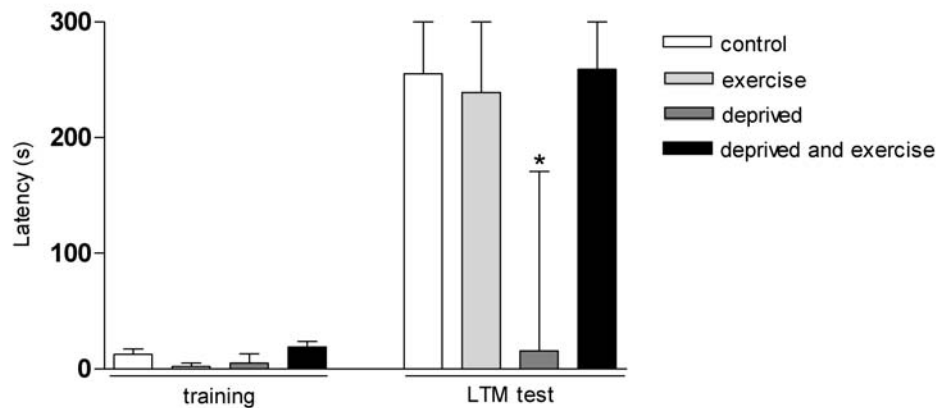


Fig. 3. Escape latency to step down in Inhibitory Avoidance (IA) test. All animals had a shorter latency in the training. In the test the animals submitted to maternal deprivation protocol showed a significantly lower latency than all the others (* $p < 0,001$ in Dunn's test). The deprived animals submitted to 8 weeks of physical exercise did not show this difference.

Groups	Crossings	Rearings
Control	70,00 ± 25,11	38,50 ± 10,43
Exercise	78,43 ± 21,76	40,00 ± 8,357
Deprived	60,10 ± 21,75	35,40 ± 10,42
Deprived and exercise	78,00 ± 20,94	37,60 ± 9,513

Table 1. Maternal deprivation, physical exercise for 8 weeks or both had no effect on locomotor and exploratory activities.