



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA**

---

**EFEITOS DA MANUTENÇÃO EM AMBIENTE ENRIQUECIDO EM ASPECTOS  
COGNITIVOS E NAS PROTEÍNAS AKT, RhoA E RhoE MUSCULARES DE RATOS  
DIABÉTICOS**

**WELTON FERREIRA DE ASSIS**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do Câmpus  
de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências da  
Motricidade.

**Março - 2017**

WELTON FERREIRA DE ASSIS

**EFEITOS DA MANUTENÇÃO EM AMBIENTE ENRIQUECIDO EM ASPECTOS  
COGNITIVOS E NAS PROTEÍNAS AKT, RhoA E RhoE MUSCULARES DE  
RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências do Câmpus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Motricidade.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Curiacos  
de Almeida Leme

Rio Claro  
2017

617.1027 Assis, Welton Ferreira de.  
A848e Efeitos da manutenção em ambiente enriquecido em aspectos cognitivos e nas proteínas AKT, RhoA e RhoE musculares de ratos diabéticos / Welton Ferreira de Assis. – Rio Claro, 2017  
63 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: José Alexandre Curiacos de Almeida Leme

1. Medicina esportiva. 2. Diabetes. 3. Enriquecimento ambiental. 4. Atividade física. 5. Fosforilação da AKT. 6. Proteínas RhoA e RhoE. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

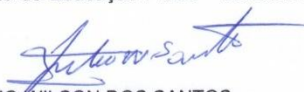
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS, COGNITIVOS E NAS PRÓTEÍNAS AKT, RhoA e RhoE MUSCULARES DE RATOS DIABÉTICOS

AUTOR: WELTON FERREIRA DE ASSIS

ORIENTADOR: JOSE ALEXANDRE CURIACOS DE ALMEIDA LEME

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, especialidade: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOSE ALEXANDRE CURIACOS DE ALMEIDA LEME  
Departamento de Educação Física - Unisalesiano Lins - Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - Lins/SP

  
Prof. Dr. JULIO WILSON DOS SANTOS  
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - SP

  
Profa. Dra. ANDRESSA COOPE DOS SANTOS  
Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - SP

Rio Claro, 06 de agosto de 2016

Título alterado para: *Efeitos do enriquecimento ambiental em parâmetros cognitivos e nas proteínas AKT, RhoA e RhoE nos músculo de ratos diabéticos.*

## RESUMO

O diabetes *mellitus* é um quadro patológico que traz diversas complicações como prejuízos metabólicos, endócrinos, cognitivos, sarcopenia, emagrecimento, hiperfagia e polidipsia. Estudos prévios têm demonstrado que a manutenção de animais em ambiente enriquecido traz um conjunto de benefícios através dos estímulos que oferece, sendo a atividade física um desses estímulos. Apesar disso, poucos estudos investigaram os efeitos da manutenção de animais diabéticos em ambiente enriquecido. Desta forma, a presente dissertação teve por objetivos investigar os efeitos do diabetes na atividade física realizada no ambiente enriquecido e investigar os efeitos do ambiente enriquecido em parâmetros bioquímicos, morfométricos, cognitivos e nas proteínas AKT, RhoA e RhoE musculares. Para isso, na primeira etapa do desenho experimental, ratos *wistar* foram distribuídos em dois grupos: controle e diabetes. O diabetes foi induzido por estreptozotocina via intraperitoneal (50 mg/kg) e os animais foram inseridos em gaiolas amplas contendo objetos coloridos e rodas de atividade com contador de giros. O rastreamento foi realizado pelo sistema para análises cinemáticas, *Digital Video For Biomechanics - Windows 32 bits (DVIDEOW®)* e *software Matlab®*. Na segunda etapa do desenho experimental, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: controle, diabetes e diabetes gaiola enriquecida. O diabetes foi induzido por estreptozotocina via intraperitoneal (50 mg/kg) e os animais foram mantidos em gaiolas padrão ou ambiente enriquecido. A massa corporal, ingestão hídrica e alimentar foram coletadas duas vezes por semana e a glicemia no início e final do experimento. Ao final do período experimental foi registrado o comprimento corporal e coletadas amostras do músculo gastrocnêmio para as análises da fosforilação da AKT e expressão de RhoA e RhoE. Para estas análises, foram utilizados o teste t ou *Mann-Whitney* para as análises entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) *two way*, com *posthoc* de Bonferroni (significância de 5%) para as demais análises. O *software SPSS®* foi utilizado para as análises. O diabetes reduziu o acúmulo de atividade física no ambiente enriquecido. A manutenção no ambiente enriquecido amenizou o aumento da hiperglicemia e melhorou, parcialmente, o desempenho no labirinto aquático de *Morris* dos animais diabéticos. A redução na massa corporal, índice de *Lee* e o aumento na ingestão hídrica e alimentar nesses animais diabéticos não foram influenciados pelo ambiente

enriquecido. Ainda, neste período de 6 semanas, não houve efeitos do diabetes ou do ambiente enriquecido na fosforilação da AKT e expressão das proteínas RhoA e RhoE. Pode ser concluído que a manutenção no ambiente enriquecido traz benefícios aos animais diabéticos, apesar deste realizar menos atividade física que animais controles.

**Palavras-chave:** Diabetes. Enriquecimento ambiental. Atividade física.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a pathological condition that brings several complications such as metabolic, endocrine, cognitive loss, sarcopenia, weight loss, hyperphagia and polydipsia. Previous studies have shown that keeping animals in enriched environment brings a set of benefits through the stimuli it provides, and the physical activity is one of these stimuli. Despite this, few studies have investigated the effects of the maintenance of animals in diabetic enriched environment. The present dissertation aimed to investigate the effects of diabetes on physical activity performed in the enriched environment and to investigate the effects of enriched environment on biochemical parameters, morphometric, cognitive, and AKT, RhoA and RhoE proteins in the muscle. For this, in the first step of the experimental design, wistar rats were distributed into two groups: control and diabetes. Diabetes was induced streptozotocin via intraperitoneal (50 mg/kg) and the animals were placed in large cages, containing colored objects and the wheels of activity and a counter of revolutions. The tracking was carried out by the system for analysis, kinematics, Digital Video For Biomechanics - 32-bit Windows (DVIDEOW®) and Matlab® software. In the second step of the experimental design, the animals were distributed into the following groups: control, diabetic and diabetic - enriched cage. Diabetes was induced streptozotocin via intraperitoneal (50 mg/kg) and the animals were kept in cages of standard or enriched environment. The body mass, the intake of water and food were collected twice per week and the blood glucose at the beginning and end of the experiment. At the end of the experimental period was recorded and the length of the body and collected samples of the gastrocnemius muscle for the analysis of the phosphorylation of AKT and expression of RhoA and RhoE. For these analyses, were used the t test or the Mann-Whitney test for analyses between two groups and analysis of variance (ANOVA) two way, with posthoc Bonferroni (significance of 5%) for all other analyses. The software SPSS® was used for the analyses. Diabetes reduced the accumulation of physical activity in the enriched environment. The maintenance in the enriched environment slowdown the increase of hyperglycemia and improved, in part, the performance of the diabetic animals in the water maze of Morris. The reduction in the body mass, index of Lee and the increase in the intake of water and food of these diabetic animals were not influenced by the enriched

environment. Still, in this period of 6 weeks, there were no effects of the diabetes or from the enriched environment in the phosphorylation of AKT and expression of the RhoA and RhoE proteins. It can be concluded that maintenance in enriched environment brings benefits to the animals and diabetic patients, although this perform less physical activity than control animals.

Keywords: Diabetes. Enriched environment. Physical activity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A $\beta$**  - Proteína  $\beta$ -Amilóide  
**AD** - Doença de *Alzheimer*  
**ADDL** - *Amyloid Beta-Derived Diffusible Ligands*  
**AE** - Ambiente Enriquecido  
**AF** - Atividade Física  
**BDNF** - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro  
**C** - Controle  
**CBL** - Protooncogene  
**CGE** - Controle Gaiola Enriquecida  
**D** - Diabetes  
**DGE** - Diabetes Gaiola Enriquecida  
**DM1** - Diabetes *Mellitus* Tipo 1  
**DM2** - Diabetes *Mellitus* Tipo 2  
**FP2ase** - Frutose-1,6-Bisfosfatase  
**G6P** - Glicose-6-Fosfato  
**G6Pase** - Glicose-6-fosfatase  
**GluA2** - Glutamate Receptor  
**GLUT** - Transportadores de Glicose  
**GLUT-4** - Transportador de Glicose-4  
**HHA** - Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal  
**IGF-I** - *Insulin-like Growth Factor-I*  
**IL-6** - Interleucina-6  
**IRS** - Substrato do Receptor de Insulina  
**MAPK** - *Mitogen Activated Protein Kinase*  
**MCD** - Memória de Curta Duração  
**MLD** - Memória de Longa Duração  
**Mtor** - *Mammalian Target of Rapamycin*  
**NF $\kappa$ B** - Fator Nuclear Kappa B  
**OFT** - *Open Field Test*  
**PI3K** - Fosfatidilinositol 3-quinase  
**PEP** - Fosfoenolpiruvato

**PEPCK** - Fosfoenolpiruvato Carboxilase

**PKB** - Proteína Quinase B

**PKM $\zeta$**  - *Protein Kinase M Zeta*

**RAGES** - Glicação Reativa Avançada

**RG** - Receptor de Glicocorticoides

**SH2** - *Src-Homology-2*

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNP** - Sistema Nervos Periférico

**TNF $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

**VEGF** - *Vascular Endothelial Growth Factor*

**Mm** - Micrômetro

## SUMÁRIO

|            |                                                                                             |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                     | <b>11</b> |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                           | <b>13</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Ambiente enriquecido .....</b>                                                           | <b>13</b> |
| 2.1.1      | Ambiente e o bem estar dos animais no laboratório .....                                     | 13        |
| 2.1.2      | O que é ambiente enriquecido? .....                                                         | 14        |
| 2.1.3      | História do enriquecimento ambiental.....                                                   | 14        |
| 2.1.4      | Protocolos diferentes para enriquecimento ambiental .....                                   | 15        |
| <b>2.2</b> | <b>Efeitos do ambiente enriquecido no organismo.....</b>                                    | <b>16</b> |
| 2.2.1      | Efeitos em aspectos cognitivos.....                                                         | 16        |
| 2.2.2      | Potenciais efeitos negativos do ambiente enriquecido .....                                  | 19        |
| <b>2.3</b> | <b>Gaiola enriquecida e atividade física .....</b>                                          | <b>19</b> |
| 2.3.1      | Atividade física realizada no ambiente enriquecido .....                                    | 20        |
| <b>2.4</b> | <b>Diabetes <i>Mellitus</i> .....</b>                                                       | <b>21</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Sinalização da insulina e diabetes: participação das proteínas AKT, RhoA e RhoE.....</b> | <b>24</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Sinalização central da insulina e memória.....</b>                                       | <b>26</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Diabetes <i>Mellitus</i> e atividade física.....</b>                                     | <b>27</b> |
| <b>2.8</b> | <b>Diabetes e ambiente enriquecido .....</b>                                                | <b>27</b> |
| <b>3</b>   | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                      | <b>30</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Objetivo geral.....</b>                                                                  | <b>30</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Objetivos específicos .....</b>                                                          | <b>30</b> |
| <b>4</b>   | <b>METODOLOGIA.....</b>                                                                     | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Amostra .....</b>                                                                        | <b>31</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Distribuição nos grupos.....</b>                                                         | <b>31</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Indução ao diabetes experimental .....</b>                                               | <b>32</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Gaiola enriquecida.....</b>                                                              | <b>32</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Avaliações prévias ao sacrifício dos animais .....</b>                                   | <b>33</b> |
| 4.5.1      | Mensuramento da atividade física na roda de atividades .....                                | 33        |
| 4.5.2      | Ingestão alimentar e hídrica.....                                                           | 34        |
| 4.5.3      | Massa corporal .....                                                                        | 34        |
| 4.5.4      | Glicemia.....                                                                               | 34        |

|            |                                                                                              |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.5      | Labirinto aquático de <i>Morris</i> .....                                                    | 34        |
| 4.5.6      | Rastreamento dos animais .....                                                               | 35        |
| <b>4.6</b> | <b>Avaliações após o sacrifício dos animais .....</b>                                        | <b>36</b> |
| 4.6.1      | Índice de <i>Lee</i> , massa e comprimento corporal .....                                    | 36        |
| 4.6.2      | Extração tecidual e análise proteica por <i>immunoblotting</i> .....                         | 36        |
| <b>4.7</b> | <b>Análise estatística .....</b>                                                             | <b>38</b> |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                      | <b>38</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Resultados da atividade realizada na gaiola enriquecida.....</b>                          | <b>38</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Resultados da manutenção dos animais nas gaiolas convencional ou<br/>enriquecida.....</b> | <b>39</b> |
|            | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                       | <b>43</b> |
|            | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                       | <b>49</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                      | <b>50</b> |
|            | <b>ANEXO A.....</b>                                                                          | <b>59</b> |
|            | <b>ANEXO B.....</b>                                                                          | <b>61</b> |
|            | <b>ANEXO C.....</b>                                                                          | <b>62</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é um grupo de doenças metabólicas cuja característica principal é a hiperglicemia, associada a defeitos nas células beta do pâncreas e na insulina (BELL; POLONSKY, 2001). O diabetes já foi considerado um mal menor, mas, atualmente, com mudanças no ambiente, estilo de vida e comportamento humano, tornou-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Segundo a *International Diabetes Federation*, o diabetes afeta cerca de 382 milhões de pessoas no mundo (WHITING et al., 2011). Para a população brasileira, a prevalência do diabetes em 2013 era de 11,9 milhões de pessoas, e a expectativa é que o diabetes atinja cerca 19,2 milhões de pessoas em 2030 (VIGITEL, 2011; WHITING et al., 2011). Estes números mostram a importância de se direcionar mais recursos e pesquisas para melhor entendimento da sua fisiopatologia e formas de tratamento (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). O impacto econômico para o sistema de saúde pública e para a sociedade é muito grande, devido ao alto custo para hospitalização e tratamento da doença, e suas complicações, como por exemplo, desordens cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal, amputações, diminuição cognitiva, entre outras debilitações e condições mortais (LUCIANO; MELLO, 1998). A comunidade científica tem intensificado os seus esforços em esclarecer, prevenir e tratar o diabetes.

A atividade física em suas diversas apresentações pode trazer benefícios para o indivíduo diabético, prevenindo e amenizando os prejuízos da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). Dentre os prejuízos diabéticos está a deficiência no metabolismo de proteínas musculares, levando a diminuição da massa muscular (WORKENEH; BAJAJ, 2013), sendo a sarcopenia mais evidente no diabetes tipo 1 (KRAUSE; RIDDELL; HAWKE, 2011). A atividade física pode recompor o nível proteico muscular de ratos diabéticos (LUCIANO; MELLO, 1998).

O ambiente pode provocar muitas respostas na adaptação e na sobrevivência dos seres vivos. Em seu ambiente, o ser vivo é estimulado a desenvolver habilidades e capacidades que permitirão sua sobrevivência, bem como a manutenção da espécie. Em laboratórios, estes estímulos podem ser promovidos através do ambiente enriquecido, que torna as respostas comportamentais mais

próximas do real (BAUMANS, 2005). O enriquecimento ambiental pode ser definido como uma combinação de estímulos inanimados e sociais inseridos no ambiente. Para que esses estímulos sejam obtidos em uma gaiola maior, alguns objetos são inseridos no ambiente, como rodas de atividade e objetos coloridos, através dos quais os animais têm oportunidade de exercer seus repertórios sensoriais, motores, cognitivo, social e comportamental (SZTAINBERG; CHEN, 2010).

Dentre os fatores que contribuem para as melhorias encontradas no ambiente enriquecido, a atividade física parece ser fator primordial. Animais mantidos em ambientes enriquecidos com a presença de rodas de atividade mostram melhoria na neurogênese e fatores neurotróficos (KOBILO et al., 2011; BENNETT et al., 2014). Estudos têm obtido resultados interessantes sobre acréscimo de roda de atividades à gaiola, reforçando a necessidade intrínseca do animal realizar atividade física (BENNETT et al., 2014). Em seus estudos, Jordão et al. (2015) apresentaram que a manutenção em ambiente enriquecido promove melhora no condicionamento aeróbio, mostrando que a atividade física nele realizada pode ter causado esta melhoria.

A manutenção de animais diabéticos em ambiente enriquecido pode ser uma forma para estudar os efeitos da atividade física nesses organismos. Todavia, estudos envolvendo a manutenção de animais diabéticos em ambiente enriquecido são escassos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ambiente enriquecido

O ambiente pode influenciar o ser vivo em diversos aspectos, pois como uma resposta necessária para a sobrevivência, o ser vivo buscará adaptar-se ao meio. Em seu meio o ser vivo é estimulado a desenvolver capacidades e habilidades que permitirão sua sobrevivência e manutenção da espécie através do êxito ou fracasso na obtenção de suas ações (COOPER, 2005).

Desta forma, surgiu o conceito do ambiente enriquecido (AE) como uma proposta de criar condições para que os animais, nele mantidos, pudessem desenvolver suas capacidades e aplicar seu repertório comportamental de forma mais próxima ao que fariam, caso não estivessem cativos. (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

#### *2.1.1 O ambiente e o bem estar dos animais no laboratório*

A evolução da pesquisa experimental em laboratório tem conduzido à manutenção dos animais em situações cada vez mais adequadas para que mantenham condições controladas, estáveis, reprodutíveis e próximas ao ambiente nativo. Esses fatores podem promover melhorias na qualidade da pesquisa e bem estar dos animais (OLSSON; DAHLBORN, 2002).

Aos animais terrestres, as análises do ambiente podem ser feitas do ambiente imediatamente próximo a ele, chamado de microambiente, que envolve a iluminação, cheiro, temperatura, umidade, limpeza do solo e partículas no ar (NRC, 2011). O macroambiente é o ambiente físico no qual o microambiente está situado, como um biotério ou uma sala (NRC, 2011). Em animais de laboratório, a gaiola onde são mantidos pode ser considerada o microambiente.

Importante ressaltar que normalmente micro e macroambientes estão relacionados, podendo um afetar ao outro. Desta forma, o planejamento deles deverá ser realizado considerando esta relação entre eles. Todos os cuidados com o macroambiente irão afetar o microambiente, podendo alterar as respostas nos organismos dos animais residentes.

É, pois, de interesse da comunidade científica envolvida na experimentação

animal proporcionar as melhores condições possíveis para a manutenção dos animais e, desta forma, o enriquecimento ambiental na gaiola é uma proposta para esta promoção do bem estar aos animais. O ambiente enriquecido é, também, uma proposta de melhorar as condições de sobrevivência do animal, pois para ser considerado enriquecido o ambiente precisa aumentar o bem estar do animal e melhorar seu funcionamento biológico (SMITH; CORROW, 2005).

### *2.1.2 O que é o ambiente enriquecido?*

O ambiente enriquecido é definido como um meio que promove complexas estimulações inanimadas e sociais, que proporcionam ao ser vivo que nele habita melhores condições para o seu desenvolvimento (ROSENZWEIG et al., 1978). Este conceito pode ser aplicado, por exemplo, aos animais de zoológico, domésticos ou de laboratório, ou ainda aos seres humanos (ROSENZWEIG et al., 1978).

As gaiolas enriquecidas utilizadas em laboratório são maiores que as tradicionais (gaiola padrão) e com uma variedade de objetos (posteriormente descritos) que promovem estímulos cognitivos, sensoriais, motores e sociais. A manutenção na gaiola enriquecida gera condições e oportunidades ao animal para que desempenhe seu repertório comportamental e motor (SZTAINBERG; CHEN, 2010).

### *2.1.3 História do enriquecimento ambiental*

As observações da interferência do ambiente no comportamento animal foram feitas de forma não empírica durante muito tempo e foram importantes para ampliar os conceitos aplicados, por exemplo, em zoológicos e parques. Porém, foram os estudos experimentais posteriormente realizados que permitiram aplicar este conceito também aos animais mantidos em laboratório.

Dentre os autores que estudaram sobre o tema, Robert Yerkes (apud SIMPSON; KELLY, 2011) apresentou a importância do companheirismo e da brincadeira para o desenvolvimento de macacos, visto as complicações que apresentavam aqueles que viviam isolados.

O psicólogo Hebb (1947) foi o pioneiro na aplicação dos conceitos de AE em laboratório, observando que, após levar alguns animais para casa, estes

apresentaram desempenho cognitivo melhor que os animais que permaneceram no laboratório, concluindo que importantes modificações cerebrais aconteceram com estes animais, especulando que poderiam ser mudanças estruturais e funcionais que facilitariam a aprendizagem (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Posteriormente, os pesquisadores norte-americanos Bennett; Rosenzweig; Diamond (1969) efetuaram pesquisas envolvendo comparações entre ambientes enriquecidos e não enriquecidos. Estes autores perceberam que os animais mantidos em ambientes enriquecidos tinham mais oportunidades para interação social, estimulações e atividades física e cognitiva que animais mantidos nas gaiolas convencionais isolados.

Tais estudos precursores desbravaram uma ampla linha de pesquisa que pode conduzir a estudos em diversas áreas como veterinária, zootecnia, bioética, biologia, psicologia além das áreas relacionadas à saúde.

#### *2.1.4 Protocolos diferentes para enriquecimento ambiental*

Em uma cuidadosa revisão da literatura sobre o tema, Simpson; Kelly (2011) observaram que diversas características diferenciam os protocolos de gaiola enriquecida nos estudos encontrados. As principais características são o tamanho da gaiola, número de animais nelas mantidos, os objetos de enriquecimento, o sexo e a idade do animal, a duração do período experimental e os animais controles.

Com relação aos parâmetros temporais, a exposição pode ser contínua ou restrita a um período do dia. Neste aspecto, Will et al. (1977) e Widman; Rosellini (1990) realizaram estudos para investigar a exposição durante 2 horas por dia e verificaram que este período foi suficiente para produzir os efeitos similares a manutenção durante 24 horas em aspectos neurobiológicos e testes de cognição. Desta forma, neste aspecto é importante consultar os objetivos do estudo.

Outro aspecto temporal relevante é o tempo de duração do experimento, sendo mais comuns, estudos que durem entre 4 e 8 semanas, havendo, todavia estudos cujo período experimental é maior que 1 ano (SIMPSON; KELLY, 2011).

No aspecto social é importante ressaltar que a gaiola convencional comporta entre 3 e 5 animais, enquanto nos modelos de gaiola enriquecida normalmente são alocados entre 5 e 15 animais, aumento que promove melhores condições para interação social, física, comportamental e sensorial (PORTO, 2010). Este fator pode

ser adequado ou inadequado, sendo importante levá-lo em consideração no desenho experimental da pesquisa. Em revisão, Simpson e Kelly (2011) afirmam que a densidade média das gaiolas enriquecidas dos estudos apontados pelos autores é de 1039 cm<sup>3</sup>, sendo mantidos 4-5 ratos por gaiola, relatando uma variação entre 2 e 15 ratos por gaiola nos estudos analisados.

Os objetos inseridos na gaiola são importantes para o enriquecimento por poderem promover uma série de estímulos aos animais. Dentre estes objetos estão túneis, elementos para formação de ninhos ou ninhos artificiais, escadas, balanços, brinquedos, roda de atividade além da inserção de um segundo andar na gaiola. No presente estudo destacamos a relevância da roda de atividade, como estímulo para realização de atividade física (ROSENZWEIG et al., 1978).

## **2.2 Efeitos do ambiente enriquecido no organismo**

Desde a década de 60 do século passado (XX), diversos pesquisadores têm colocado seus esforços em investigar os efeitos do AE no organismo de animais mantidos em laboratório.

Em um dos estudos pioneiros nas pesquisas de efeitos do AE, Bennett; Rosenzweig e Diamond (1969) observaram que a massa cortical cerebral de ratos expostos ao ambiente enriquecido foi maior que de animais mantidos em ambiente empobrecido (convencional). Este estudo foi corroborado pelo estudo de Henderson (1970), que também observou este aumento da massa encefálica em animais mantidos no AE.

### *2.2.1 Efeitos em aspectos cognitivos*

Diversos estudos têm investigado a relação entre a manutenção em ambiente enriquecido e as respostas dos animais em testes cognitivos utilizando várias metodologias para estes testes. Todavia, estes estudos são inconclusivos, pois em parte deles é apontado o aumento da resposta, e em outra parte a ausência de alterações (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

As relações entre a manutenção no AE e as respostas cognitivas começaram a ser desvendadas em uma série de estudos que tiveram o hipocampo e o giro denteado como regiões alvo. Assim, Kempermann; Kuhn e Gage (1997)

encontraram um aumento significativo de novos neurônios no giro denteado, descoberta confirmada em estudos posteriores.

A associação entre a neurogênese aumentada e melhor resposta em testes cognitivos foi realizada por Bruel-Jungerman; Laroche e Rampon (2005) que evidenciaram esta correlação. Neste interessante estudo, os autores utilizaram o acetato de metilazoximetanol, um agente antimitótico, para inibir a neurogênese e concluíram que os animais que receberam este agente tiveram redução na neurogênese e na melhoria da memória promovidos pelo ambiente enriquecido, esclarecendo a importância da neurogênese no giro denteado.

Outro conjunto de elementos importantes nesse processo são os fatores de crescimento produzidos no encéfalo, pois são aumentados pelo AE em neurônios e células gliais (YOUNG et al., 1999), particularmente no hipocampo (PHAM, 2002).

Além do aumento na neurogênese e dos fatores de crescimento, a manutenção dos animais no AE promoveu redução em 45% a apoptose celular no hipocampo dos ratos, protegeu contra lesões e injúrias celulares e melhorou a função neuroimunológica (YOUNG et al., 1999; WILLIAMSON; CHAO; BILBO, 2012).

Estas informações sobre as alterações morfológicas do AE no hipocampo foram complementadas por outros estudos na região, como alterações no sistema glutamatérgico no hipotálamo, particularmente pela redução na expressão de RNAm do transportador de glutamato (EAAC1) e pelo aumento da expressão dos receptores de glutamato NMDA (ANDIN et al., 2007). Gagné et al. (1998), em um relevante estudo, concluíram que o enriquecimento ambiental promove mudanças hipocampus nas propriedades do receptor de AMPA, num processo dependente do cálcio.

Possíveis alterações nos potenciais relacionados ao armazenamento de memória no hipocampo, particularmente na região CA1 também têm sido estudados. Desta forma, foram encontrados aumento no potencial de longa duração, possivelmente intermediado pela proteína quinase dependente de cAMP (DUFFY et al., 2001), ou não alteração neste potencial (FOSTER; DUMAS, 2001), ou redução na depressão de longa duração (ECKERT; BILKEY; ABRAHAM, 2010).

Outras regiões encefálicas também parecem ser alteradas com a manutenção dos animais no AE. O córtex pré-frontal, por exemplo, foi foco dos estudos de

Segovia et al. (2008a;b), que verificaram que os animais mantidos em AE apresentaram um aumento da produção de dopamina e acetilcolina no córtex pré-frontal em resposta ao estresse comparados aos animais controles. Sabendo que a dopamina no córtex pré-frontal tem papel fundamental na modulação da atividade motora, o mesmo grupo apresentou que o AE promove alterações no número de receptores para dopamina no córtex pré-frontal (DEL ARCO et al., 2007).

Pinaud et al. (2001), estudando a interferência da exposição de ratos *wistar* durante 1 hora/dia por 3 semanas observaram significativas mudanças anatomicas no córtex cerebral desses animais.

No córtex parietal, a manutenção no AE provocou aumento da arborização dendrítica e densidade das espinhas dendríticas, podendo estar relacionado às melhores respostas nos testes cognitivos (LEGGIO et al., 2005). As alterações nas concentrações de fator neurotrófico de crescimento cerebral (BDNF) podem estar relacionadas, ainda, as alterações no circuito retinal de animais mantidos no AE, porém não estão envolvidas no aumento da atividade dopaminérgica no mesolímbico em animais mantidos no AE (SEGOVIA et al., 2010). A amígdala é uma região encefálica que, dentre outras funções, participa do sistema límbico nas respostas às emoções, particularmente ao medo. Em animais mantidos em AE, existe um aumento na expressão de BDNF na amígdala e alterações nas respostas ao medo, cuja participação da amígdala é fundamental (SEGOVIA et al., 2008a;b; YOUNG; WINTINK; KALYNCHUK, 2004).

Também no estriado, o AE reduz os prejuízos após lesão, promovendo melhora morfológicas e no andar na barra (URAKAWA et al., 2007), enquanto no córtex visual e enterorrinal promove aumento de BDNF (SEGOVIA et al., 2008a).

Nas respostas neuro-hormonais, alguns estudos demonstraram que a manutenção dos animais em AE pode tornar mais adequada a resposta ao estresse. Estudando hormônios muito influentes na resposta ao estresse, Belz et al. (2003) concluíram que a manutenção no AE promoveu redução nas concentrações séricas basais de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona comparados aos animais controles, bem como em situação de estresse agudo. A maioria dos estudos apresenta que o AE amenizou o estresse e a ansiedade dos animais promovendo também outras alterações. O aumento da corticosterona, um efeito importante da resposta ao estresse, reduz a angiogênese no hipocampo e córtex

pré-frontal, enquanto que, de forma oposta, a manutenção na AE aumenta a angiogênese nessas regiões encefálicas, podendo estar à redução da corticosterona envolvida nesse processo (EKSTRAND; HELLSTEN; TINGSTRÖM, 2008). O AE também aumenta a produção de esteróides neuroativos no hipocampo (MUNETSUNA et al., 2011).

### *2.2.2 Potenciais efeitos negativos do ambiente enriquecido*

Certamente, as pesquisas utilizando AE necessitam de determinados avanços, pois podem apresentar certas inconclusões ou serem utilizadas metodologias inapropriadas.

Todavia, Toth et al. (2011) citam potenciais consequências negativas que podem ocorrer em pesquisas envolvendo AE como aumento na variabilidade dos dados, confusão na interpretação e a dificuldade de replicação entre os laboratórios. Além disso, os animais possuem comportamentos sociais que podem estar mais exacerbados no AE, tais como agressividade ou dominância, fatores que provocam mudanças como hierarquia territorial, que promovem maior variabilidade nos dados coletados. Importante levar em consideração todos esses fatores no desenho experimental.

Bedi e Bhude (1988) fizeram uma revisão com olhar crítico sobre os modelos e concluíram que os estudos até a época não traziam dados consistentes e nem todos os estudos comprovavam os efeitos benéficos do AE, principalmente nos aspectos morfológicos (LANDI et al., 2007).

Apesar do valor científico do AE ter sido apresentado em numerosos artigos científicos que trouxeram avanços no conhecimento para diversas áreas, deve ser avaliado pelo pesquisador, em cada desenho experimental, se é conveniente a utilização do AE ou convencional (padrão).

## **2.3 Gaiola enriquecida e atividade física**

No AE os animais conseguem desenvolver melhor seu repertório comportamental. Desta forma, as atividades realizadas pelos animais podem ser agrupadas em exploratórias, locomotoras e sociais, promovendo condições para um bom desenvolvimento de aprendizagem, atividade de memória e aspectos

emocionais e sociais (LEAL-GALICIA et al., 2007).

Alguns estudos conseguiram apresentar correlações entre a atividade física realizada no AE com determinados benefícios promovidos. Em relevante estudo, Kobil et al. (2011) isolaram a atividade física dos demais componentes do AE e concluíram que a atividade física é o fator crítico para promover alguns dos benefícios concebidos, como aumento do BDNF, aumento da neurogênese na vida adulta e melhores resultados em teste cognitivo. Mustroph et al. (2012) confirmaram os achados de Kobil et al. (2011) e estenderam os resultados, reforçando a ideia da atividade física como um ponto crítico no AE. Neste estudo, os autores comprovaram que a atividade física presente no AE é promotora da melhoria na memória espacial e neurogênese no giro denteado do hipocampo.

### *2.3.1 Atividade física realizada no ambiente enriquecido*

Atividade física é definida como movimento corporal produzido pela contração do músculo esquelético e que eleva substancialmente o gasto energético, enquanto o exercício físico é um tipo de atividade física definida como movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo realizado com o intuito de melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física (ROITMAN, 2003).

Para o estudo da atividade física em modelos animais diversas formas são propostas, como o exercício físico forçado através da corrida em esteira, natação com cargas, saltos, ou ainda, a atividade física voluntária, sendo a forma mais comum, a inserção de rodas de atividade (OUDOT et al., 1996).

Dentre os diversos estímulos existentes para o animal mantido na gaiola enriquecida, o estímulo à prática de atividade física voluntária (AFV) parece ter um papel relevante, sendo encontrado em sua corrida na roda de atividade e o aumento na distância percorrida pelo animal ao longo do dia. Quando mantidos em gaiolas que tenham rodas de atividade, os animais chegam a percorrer cerca de 10-13 km/dia, aumentando o pico do consumo de oxigênio em 17% (HALSETH et al., 1995). Esta necessidade é observada quando os animais são simultaneamente treinados, reduzindo a prática de AFV (OUDOT et al., 1996).

Uma série de estudos tem apresentado os efeitos da atividade física voluntária aos animais em aspectos como sistema endócrino, sistema nervoso, músculo esquelético, cognitivo, métricos e outros (JORDÃO et al., 2015).

Além das comprovações empíricas da atividade física realizada no ambiente enriquecido, alguns estudiosos têm comprovado e compreendido melhor a prática da atividade física no AE. Em estudo realizado em nosso laboratório foi apresentado que a prática de atividade física realizada no AE foi suficiente para promover melhoria da capacidade aeróbia dos animais, visto que os mesmos animais mantidos em AE tiveram resposta no teste de máxima fase estável do lactato melhor que os animais mantidos em gaiola convencional (JORDÃO et al., 2015).

Ao estudar uma forma de quantificar ao acúmulo de atividade física realizada num ambiente enriquecido, Xie et al. (2013) utilizando um *software* de rastreamento comprovaram que os animais mantidos em ambiente enriquecido têm maiores distâncias percorridas e frequência de movimentos. A atividade física realizada pelos animais em ambientes enriquecidos é resultado da atividade na roda somada às atividades espontâneas, dentre as quais está o aumento na distância percorrida.

## **2.4 Diabetes Mellitus**

O diabetes *mellitus* é um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por elevada glicemia. Prejuízos nas células beta pancreática e sua secreção, o hormônio insulina, têm papel central na fisiopatologia do diabetes (BELL; POLONSKY, 2001). A insulina é um polipeptídeo tetramérico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas. A presença da insulina, entre outras funções, ativa na célula uma cascata de reações finalizada com aproximação dos transportadores de glicose (GLUT) junto à membrana das células de determinados órgãos permitindo sua ação. A ausência ou ineficácia deste peptídeo, portanto, pode prejudicar a ação dos GLUTs, podendo gerar hiperglicemia. Ocorre ainda redução da entrada de aminoácidos nos músculos e aumento da lipólise (ADA, 2010).

Há duas formas principais de diabetes, o Diabetes *Mellitus* Tipo 1 (DM1) e Tipo 2 (DM2). O DM1 está ligado principalmente à destruição autoimune das células beta pancreáticas, resultando em deficiência da secreção de insulina. Indivíduos com DM1 dependem de insulina exógena para a sobrevivência e para prevenção de cetoacidose. A prevalência de DM1 é baixa em relação ao DM2, que totaliza mais de 90% dos casos no mundo. O DM2 é caracterizado por resistência à insulina e/ou secreção anormal de insulina. Indivíduos com DM2 não são necessariamente dependentes de insulina exógena, mas podendo ser necessário o uso da mesma

para o controle dos níveis de glicose no sangue, caso isso não seja obtido através da dieta, agentes hipoglicemiantes orais e terapias alternativas (ZIMMET; ALBERT; SHAW, 2001).

Dentre as formas menos comuns de diabetes está o Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG), no qual a gestante afetada apresenta risco entre 40-60% de desenvolver DM2 nos próximos anos. Dentre outras causas o diabetes também pode resultar de defeitos genéticos, doenças pancreáticas, cirurgias, infecções, drogas e produtos químicos (COLBERG et al., 2010).

O DM1 pode ocorrer tanto em indivíduos magros, bem como em indivíduos obesos. O DM2 está fortemente associado a obesidade e caracterizado por várias anormalidades metabólicas (ADA, 2006).

Variações na sensibilidade à insulina ocorrem durante a vida normal do indivíduo podendo ser observadas durante a puberdade, gravidez e no envelhecimento. Mudanças no estilo de vida como, por exemplo, aumento do acúmulo de atividade física e ajustes na dieta estão associados à melhora na sensibilidade à insulina (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Os números associados com diabetes reforçam que é importante dedicar mais recursos e pesquisas para melhor compreensão da fisiopatologia da doença e seus mecanismos de tratamento (ADA, 2016).

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada em longo prazo com dano, disfunção ou deficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Sintomas marcantes da hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, perda da clareza na visão, prejuízo no crescimento, susceptibilidade a infecções e posterior cetoacidose. Em longo prazo, pode causar retinopatia com perda crescente da visão, nefropatia, neuropatia, amputações, disfunções gastrintestinais, geniturinárias, cardiovasculares e sexuais. Pacientes com diabetes também apresentam aumento na incidência de doenças cardio e cerebrovasculares (ADA, 2006).

O participante de maior relevância para a hiperglicemia é a produção excessiva de glicose hepática. A taxa da neoglicogênese é controlada principalmente pelas atividades de enzimas como fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK), frutose-1,6-bisfosfatase (FP2ase) e de glicose-6-fosfatase (G6Pase). PEPCK catalisa a conversão de oxaloacetato para fosfoenolpiruvato (PEP),

enquanto o G6Pase catalisa a etapa final da gliconeogênese, a produção de glicose convertido de glicose-6-fosfato (G6P). Os genes destas enzimas gliconeogênicas são controlados pela insulina, glucagon e glicocorticoides. A insulina inibe a gliconeogênese, suprimindo a expressão de PEPCCK e G6Pase, enquanto glucagon e glicocorticóides estimulam a produção hepática de glicose por induzir esses genes (POSTIC; DENTIN; GIRARD, 2004).

Vários estudos têm demonstrado relação entre diabetes e as disfunções do sistema nervoso central (SNC), sugerindo que o encéfalo é suscetível aos mesmos estímulos que provocam outras complicações do diabetes. Estudos têm demonstrado que pacientes com DM2 têm um risco aumentado de 39% para o desenvolvimento da doença de Alzheimer e um risco aumentado de 47% para o desenvolvimento de demência em geral (MOULTON et al., 2015).

No entanto, os mecanismos patológicos que levam a danos no SNC e sistema nervoso periférico (SNP) em diabéticos ainda não são totalmente compreendidos. Um, dentre vários mecanismos propostos, é a deficiência na ação da insulina. A insulina tem ação neurotrópica nos nervos periféricos para controlar a sobrevivência, manutenção, reparo e regeneração dos mesmos, e tendo também um papel na plasticidade, neuroproteção e memória cognitiva (KING et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que as complicações vasculares relacionadas ao diabetes, à ação glicotóxica da hiperglicemia, o estresse oxidativo causado pelos produtos finais de glicosilação, acúmulo da proteína amiloide intracerebral, hipoinsulinemia e redução do *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) encefálico são fatores que contribuem para um prejuízo cognitivo em organismo diabético (ALMEIDA-PITITTO et al., 2008).

Mudanças no ambiente, estilo de vida e comportamento humano têm resultado em um aumento escalonado de casos de diabetes e obesidade no mundo (ZIMMET; ALBERT; SHAW, 2001). Para prevenção e controle do diabetes *mellitus* são indicados medicamentos orais, injeção de insulina, balanço nutricional e atividade física (ADA, 2005).

Apesar da disponibilidade de uma gama de medicamentos, uma parcela significativa de pessoas com diabetes *mellitus* não são capazes de alcançar ou manter um controle glicêmico adequado. Além de focar no controle glicêmico, novos tratamentos deveriam proporcionar uma redução do risco de doenças

cardiovasculares além de uma ação favorável sobre o excesso de peso, com um baixo risco de hipoglicemia, bem como um mecanismo de ação sinérgica combinada com outras terapias (SEUFERT, 2015). Entre estas terapias, a atividade física tem se mostrado eficaz no controle glicêmico em pacientes com diabetes (ADA, 2015).

Uma completa mudança do estilo de vida, através da atividade física e balanço nutricional, tem se mostrado muito eficiente em indivíduos com alto risco de desenvolver DM2, com uma redução de aproximadamente 58% da glicemia depois de três anos de atividade física, associado com menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares (CHURCH, 2011; ADA, 2016).

Portanto, é recomendado, para terapias não farmacológicas, o uso de dieta combinada com programas de promoção da atividade física, acompanhados de aconselhamento e apoio psicológico, pois o diabetes é uma condição que exige uma atenção diária à dieta, ao estilo de vida e monitoramento constante do nível de glicemia e está associada com fatores diversos como estresse e ansiedade (DINNEEN, 2006; PRONK; REMINGTON, 2015).

## **2.5 Sinalização da insulina e diabetes: participação das proteínas AKT, RhoA e RhoE**

A insulina é um hormônio com efeitos metabólicos potentes como, por exemplo, controle glicêmico, controle lipídêmico, regulação e síntese de glicogênio, regulação e síntese de lipídios, síntese e manutenção da proteína *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), controle da fome, entre outros (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A secreção deste hormônio ocorre em resposta à ingestão de macronutrientes, pela captação de glicose pelos transportadores das células beta, e essa resposta é modulada por fatores neurais (SN simpático e parassimpático) e fatores hormonais (por exemplo, glucagon, glucagon-like peptide 1, polipeptídeo inibidor gástrico e a somatostatina). A glicose, no entanto, é o principal estímulo para sua secreção (BELL; POLONSKY, 2001).

Após ser secretada pelas células beta, a insulina agirá em seus órgãos alvo, ligando-se ao seu receptor. Após a ligação, a etapa da sinalização da insulina começa com a auto fosforilação do receptor de insulina, uma tirosina quinase que catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares, como substrato do receptor de insulina (IRS), Src-homology-2 (SH2) e Protooncogene (CBL) (CARVALHEIRA;

ZECCHIN; SAAD, 2002). Neste ponto da sinalização do receptor da insulina podem ocorrer alterações que resultam na resistência à insulina sistêmica (HOTAMISLIGIL, 2006). Após a fosforilação, essas proteínas se unem a outras moléculas de sinalização através de SH2, resultando na ativação das vias de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), ativação da proteína quinase B (PKB/AKT), a cascata da *Mitogen activated protein kinase* (MAPK) e a ativação da TC10 via Cap/CBL e via AKT-mTOR-pAS160 (TOMASOVIC, et al., 2012). Essas interações são fundamentais para a translocação do transportador de glicose-4 (GLUT-4) para a membrana plasmática. As vias intracelulares ativadas pela ligação da insulina ao receptor regulam o transporte de glicose, formação de glicogênio, lipídios e proteínas (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; MOLLER, 2001).

Recentemente, a secreção e ação da insulina foram relacionadas às proteínas da família Rho. As Rho são um conjunto de enzimas que pertencem a superfamília Ras, pequenas GTPases ativadas por ligação de GTP. A proteína Rho-Kinase (ROCK) é ativada pelo complexo RhoA/GTP e inativada pelo complexo RhoE/GTP. A ROCK participa de importantes funções celulares como a organização, motilidade, ploriferação e diferenciação celular, bem como, expressão de vários genes, contribuindo na secreção de insulina (LIU et al., 2014).

Nas células musculares as proteínas da família Rho participam no controle da dinâmica da actina citoesquelética. Desta forma, a RhoE age contribuindo para degenerar a fibra muscular e a RhoA estimula a formar o tecido, produzindo mudanças distintas no citoesqueleto (RUSSEL, 2010). A RhoA também intermedia a sinalização para a diferenciação esquelética miogênica (RIENTO et al., 2003).

A relação entre estas proteínas e a sinalização da insulina tem sido estudada e apresentada como sendo específica para cada tipo de célula, bem como, havendo efeitos distintos entre os membros da família (SATO, 2014). Tem sido apresentado que a ativação da RhoA pode contribuir para fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1), promovendo ativação da PI3k e consequentemente fosforilação da AKT (FURUKAWA et al., 2005). Todavia a ação específica da RhoA ainda permanece de difícil compreensão, sendo apontada como contribuinte na translocação dos GLUT-4, apesar de não haver alteração na captação da glicose em sua deleção (ISHIKURA; KOSHKINA; KLIP, 2008).

Por outro lado, animais obesos apresentam aumento da via RhoA/ROCK,

este aumento pode antagonizar a ação da insulina através da fosforilação da serina no IRS-1(KANDA et al., 2006).

## **2.6 Sinalização central da insulina e memória**

Além das clássicas funções metabólicas, a insulina tem papel importante em diversas funções como na memória e outras funções encefálicas. O encéfalo é um órgão com metabolismo muito ativo. O funcionamento adequado do cérebro depende de um constante e regular suprimento de sangue. Apesar de representar apenas 2% da massa corporal em um adulto humano, ele consome 20% do oxigênio e da glicose disponíveis. O fluxo sanguíneo cerebral e a absorção de oxigênio e glicose aumentam dramaticamente a excitação neural. A ação da insulina no encéfalo regula a sobrevivência neuronal, manutenção sináptica, ploriferação dendrítica, aprendizagem e memória. Vários pesquisadores encontraram que a insulina também influencia a captação de glicose no hipocampo, mas a ação direta da insulina, na captação de glicose permanece obscura e controversa, as suas ações indiretas estão bem elucidadas. Apesar de controverso, alguns estudos apresentam que a insulina é produzida em neurônios de mamíferos adultos enquanto outros apresentam que deve ser recrutada da periferia para o SNC (MEHRAN et al., 2012; HUGHES; CRAFT, 2015).

A síndrome de resistência à insulina, que está caracterizada por um aumento crônico de insulina periférica, redução da sua atividade e redução do nível de insulina no encéfalo, está associada a prejuízos na memória relacionados à idade e à Doença de *Alzheimer*. O excesso de insulina pode provocar um aumento no nível da proteína Beta Amiloide ( $A\beta$ ) e agentes inflamatórios, tendo efeito sobre a memória (CRAFT, 2005). Por outro lado, a ausência da insulina, característica de animais insulinopênicos também pode trazer uma série de comprometimentos cognitivos, menor ação da insulina no hipocampo, maior fosforilação da proteína Tau e formação de proteínas beta amiloide e a proteína precursora da beta amiloide (DIEGUES et al., 2014). É necessária a restauração da expressão normal dos genes requeridos para a função cognitiva, bem como das proteínas pró-inflamatórias e antioxidantes para que as capacidades cognitivas normais sejam restauradas (THOMAS; GARG; SMITH, 2014).

## 2.7 Diabetes *mellitus* e atividade física

O aumento da prevalência de DM2 e da obesidade ocorre concomitantemente à diminuição no nível de atividade física (AUNE et al., 2015).

Atividade física é definida como movimento corporal produzido pela contração do músculo esquelético e que eleva substancialmente o gasto energético (ROITMAN, 2003). Em suas diversas manifestações, a atividade física pode ser classificada como espontânea, voluntária, ocupacional, de lazer, estruturada na forma de exercício, entre outros.

A atividade física espontânea pode ser encontrada em diversas situações como, por exemplo, a locomoção. A locomoção tem um papel importante na vida dos mamíferos, na procura de alimentos, abrigo, busca de parceiros para reprodução e na fuga de predadores naturais. Este tipo de atividade física pode ser chamado de atividade física obrigatória ou espontânea (GARLAND et al., 2011).

A atividade física voluntária pode ser definida como uma atividade que não é necessária para a homeostase ou diretamente a sobrevivência do indivíduo, e não necessariamente estimulada por um fator externo (GARLAND et al., 2011).

A atividade física beneficia pessoas que desenvolveram o diabetes, a alcançar uma gama de melhorias, incluindo aumento da aptidão cardiorrespiratória, vigor, melhoria no controle glicêmico, diminuição da resistência à insulina, melhor perfil lipídico e melhoria no conteúdo da pressão arterial (SIGAL et al., 2013).

Mudanças de estilo de vida têm se mostrado de forma conclusiva, que retardam, ou mesmo, evitam o desenvolvimento do DM2 em indivíduos que são considerados de alto risco. *The Finnish Diabetes Prevention Study* mostrou em um ensaio clínico uma redução de risco de quase 60% com a prática de atividade física e dieta (LINDSTRÖM et al., 2013).

Sabendo que a atividade física, melhora o controle glicêmico, reduz a necessidade de hipoglicemiantes orais e insulina, poderia ser maior a aderência aos programas para a conscientização da importância da atividade física e difundir que o exercício físico regular é um componente chave na terapia do diabetes *mellitus* (SIGAL et al., 2013). Dados econômicos indicam que esses programas são eficazes também neste aspecto (PRONK; REMINGTON, 2015).

## 2.8 Diabetes e ambiente enriquecido

Em seu estudo, Beauquis et al. (2010) foram pioneiros nestes estudos envolvendo diabetes e AE, apresentando evidências do efeito positivo que a exposição a um ambiente enriquecido tem no hipocampo de ratos diabéticos. Proliferação celular, diferenciação e sobrevivência dos neurônios, foram melhoradas após uma exposição de curta duração em ambientes enriquecidos (ambiente social com estímulos sensoriais e cognitivos) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (BEAUQUIS et al., 2010).

Além disso, o hipocampo de ratos hiperglicêmicos é extremamente suscetível a eventos estressantes, que podem levar a graves danos hipocâmpais e a manutenção dos ratos em ambiente enriquecido pode amenizar estes danos (PAMIDI; NAYAK, 2014).

O enriquecimento ambiental diminui as concentrações de corticosterona sérica e atenua a ativação microglial prejudicial em ratos diabéticos. O AE ajuda a amenizar as comorbidades cognitivas associadas com DM1, possivelmente reduzindo hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e ativação microglial em animais diabéticos (PIAZZA, 2014).

Outro achado importante do estudo de Beauquis et al. (2010) foi relacionado à vascularidade cerebral em animais diabéticos e o efeito do ambiente enriquecido neste aspecto. De acordo com este estudo, os resultados sugerem que, em uma situação patológica hipocâmpal com vários distúrbios, como DM1, exposição de curta duração em ambiente enriquecido pode ser suficiente para promover uma potente resposta cerebral envolvendo um aprimoramento do adulto a neurogênese, ao crescimento e densidade dendrítica, bem como, o aumento da área vascular do hipocampo.

O ambiente enriquecido também fornece entretenimento, aumenta o comportamento cognitivo, estimula a faculdade criativa e promove mudanças moleculares a nível estrutural por melhorar as funções do cérebro que ainda não foram lesionadas (PAMIDI; NAYAK, 2014).

O ambiente enriquecido promove atividade física espontânea e voluntária, que pode contribuir para o controle glicêmico, visto que o treinamento físico aumenta a captação de glicose pela insulina, beneficiando a sensibilidade à insulina, assim, diminuindo a hiperglicemia (LUCIANO et al., 2002; VIEIRA et al., 2015; BEAUQUIS et al., 2010).

Todavia, pouco se sabe sobre os efeitos da manutenção no ambiente enriquecido e a atividade física nele promovida na ação da insulina no hipocampo, sendo um campo vasto para estudos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da manutenção em ambiente enriquecido em aspectos cognitivos e nas proteínas AKT, RhoA e RhoE musculares de ratos diabéticos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Este estudo teve os seguintes objetivos específicos:

Avaliar a influência do diabetes na atividade física realizada por animais mantidos no ambiente enriquecido;

Avaliar a influência do AE no desempenho de ratos diabéticos no labirinto de *Morris*;

Verificar os efeitos da manutenção no AE na massa corporal, comprimento naso-anal e índice de *Lee* de ratos diabéticos;

Verificar os efeitos da manutenção no AE nas ingestões hídrica e alimentar de ratos diabéticos;

Analisar os efeitos da manutenção no AE nas concentrações séricas de glicose de ratos diabéticos;

Analisar a influência da manutenção no AE na fosforilação da AKT e expressão de RhoA e RhoE no músculo de ratos diabéticos;

## 4 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais estão reunidos em um projeto que foi desenvolvido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* (CEUA-08/2015 UniSalesiano).

### 4.1 Amostra

Para desenvolver estes estudos, foram utilizados ratos machos adultos da linhagem *Wistar* (*Rattus Norvegicus Albinus Wistar*) com três meses de idade, oriundos do biotério central da Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu que foram alojados em gaiolas convencionais (padrão) de polietileno medindo 37x31x16 cm, mantidos cinco ratos por gaiola, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e ao alimento.

### 4.2 Distribuição nos grupos

Para investigar as atividades físicas realizadas pelos animais controle e diabéticos na gaiola enriquecida, os animais foram inseridos em gaiolas enriquecidas, distribuídos, assim, nos seguintes grupos:

Controle gaiola enriquecida (CGE) – animais controles que foram mantidos na gaiola enriquecida;

Diabetes gaiola enriquecida (DGE) - animais diabéticos que foram mantidos na gaiola enriquecida.

Para investigar os efeitos da manutenção no ambiente enriquecido, os animais controles e diabéticos foram distribuídos nos seguintes grupos:

Controle (C) - animais controles que foram mantidos na gaiola convencional (padrão);

Diabetes (D) - animais diabéticos que foram mantidos na gaiola convencional (padrão);

Diabetes gaiola enriquecida (DGE) - animais diabéticos que foram mantidos na gaiola enriquecida.

#### **4.3 Indução do diabetes experimental**

Nos experimentos que envolveram diabetes, após jejum de 12 horas, para a indução do diabetes experimental, os animais receberam estreptozotocina (50 mg/kg) dissolvida em tampão citrato (0,01  $\mu$ M, pH 4,5) por via intraperitoneal. Após este procedimento, os ratos foram recolocados nas gaiolas recebendo no primeiro dia pós estreptozotocina, uma solução de água e glicose (15%), além de ração (LUCIANO; LIMA, 1997; LEME et al., 2010). Cinco dias após a administração da droga, foi realizado um teste de glicemia utilizando monitor de glicose sanguínea *Optium Xceed*<sup>®</sup> para comprovação do estado diabético dos animais, sendo considerados diabéticos apenas aqueles que apresentarem glicemia igual ou superior a 250 mg/dL.

Após estes procedimentos, os animais foram pesados e distribuídos nos grupos gaiola convencional ou enriquecida conforme o peso para animais controles e glicemia, e peso para animais diabéticos, a fim de obter igual distribuição dos animais nos grupos baseado nestes parâmetros de peso e glicemia.

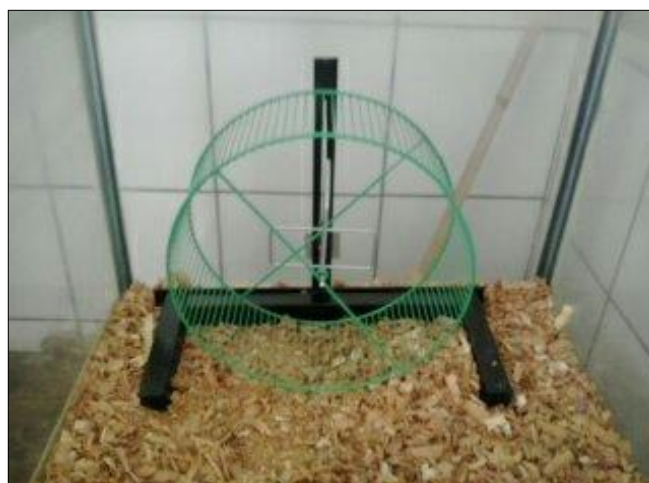
#### **4.4 Gaiola enriquecida**

A gaiola enriquecida (GE) é um ambiente onde foram inseridos objetos para estimular os diversos repertórios dos animais. Em nosso laboratório, as medidas da gaiola enriquecida são 1,5 m x 50 cm x 35 cm e possui como objetos inanimados túneis, brinquedos coloridos e a roda de atividade (figura 1). Os animais dos grupos GEs foram mantidos durante todo o período experimental no ambiente enriquecido, enquanto os demais foram mantidos na gaiola convencional.

A roda de atividade tem 20 cm de diâmetro e esteve numa base com um pilar (figura 2), um ciclo computador digital estava acoplado para controle do número e velocidade das voltas. Este mecanismo permitiu mensurar a atividade física realizada nas rodas de atividade.



**Figura 1.** Vista superior da gaiola enriquecida



**Figura 2.** Roda de atividades

#### **4.5 Avaliações prévias ao sacrifício dos animais**

Durante o período experimental, os ratos foram avaliados semanalmente, com relação à massa corporal, ingestão alimentar e hídrica para fins de registros e posterior análise e no final foram submetidos ao labirinto aquático de *Morris*. A glicemia foi analisada no início e final do período experimental.

##### **4.5.1 Mensuramento da atividade física na roda de atividades**

Na roda de atividade foi acoplado um contador de giros digital da marca Digtaq<sup>®</sup> modelo CD 1000 para o controle do número e velocidade das voltas. Este

mecanismo permitiu mensurar a atividade física realizada nas rodas de atividade.

#### *4.5.2 Ingestão alimentar e hídrica*

A ingestão alimentar e hídrica foi registrada duas vezes por semana, as segundas e quintas-feiras, ao longo do experimento, tendo sido calculados através da subtração diária entre a quantidade oferecida e o rejeito do dia subsequente utilizando balança eletrônica digital, marca Filizola<sup>®</sup> Mod BP LED (15kg x 5g). Foi realizada a média entre as duas coletas semanais.

#### *4.5.3 Massa corporal*

Os ratos foram avaliados semanalmente, as segundas e quintas-feiras, com relação à massa corporal. Para medida dos mesmos foi utilizada balança eletrônica digital, marca Filizola<sup>®</sup> Mod BP LED (15kg x 5g). Foi realizada a média entre as duas coletas semanais.

#### *4.5.4 Glicemia*

A glicemia dos animais diabéticos foi registrada no início e final do período experimental utilizando o monitor de glicose sanguínea *Optium Xceed*<sup>®</sup>.

#### *4.5.5 Labirinto Aquático de Morris*

Os ratos foram avaliados em tanque circular com 2 metros de diâmetro e com 70 cm de profundidade, e dividido em 4 quadrantes (norte, sul, leste e oeste) de acordo com uma das especificações sugeridas por Morris et al. (1984) e revisada por Vorhees; Williams (2006). O teste foi realizado durante 5 dias consecutivos de forma distinta cada dia. O tanque foi colocado em uma sala isolada e com temperatura controlada. A temperatura da água foi mantida em 30 graus e foi instalada uma plataforma com uma base inferior de apoio (12 x 12cm) e uma base superior para o escape (10 x 10cm) dos animais.

No primeiro dia, o tanque foi preenchido por água e a plataforma foi mantida 5

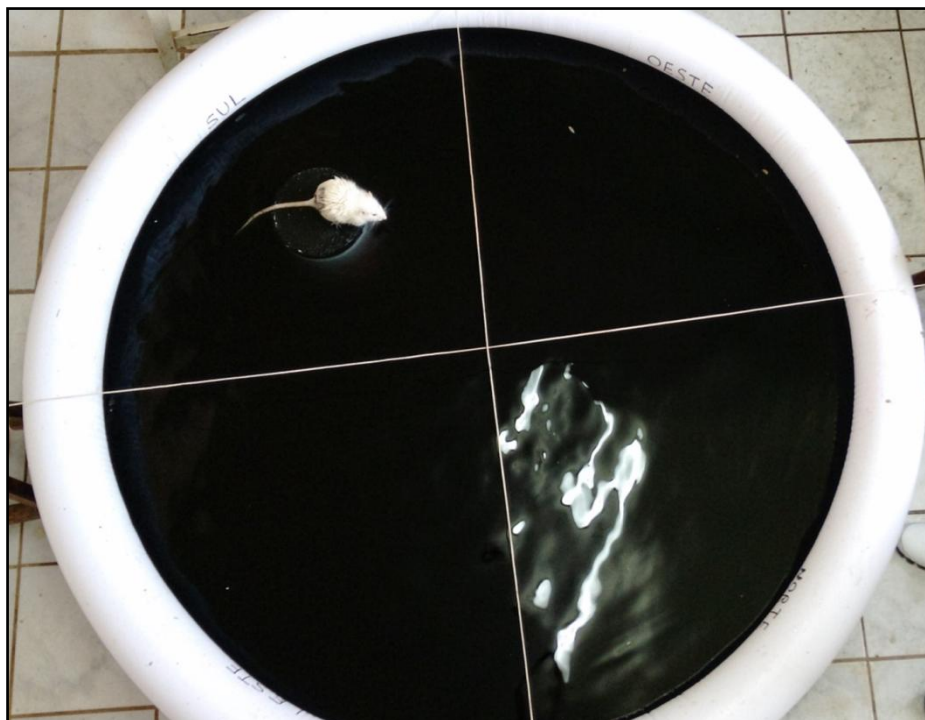
centímetros acima do nível da água de forma que os animais a enxergavam. Cada animal foi inserido individualmente, no lado oposto da plataforma e mantido no tanque num período de 1 minuto ou até que encontrasse a plataforma. Caso não a encontrasse nesse período o animal era conduzido até a plataforma e posto sobre ela. Nos dois casos, foi mantido durante 15 segundos sobre a plataforma, para facilitar a memorização.

Nos dias 2, 3 e 4, um corante alimentar líquido hidrossolúvel de cor preta (Arcolor<sup>®</sup>) foi diluído na água, tornando-a opaca. A plataforma foi submersa pela água opaca cerca de 5 cm (MORRIS et al., 1984). Os animais foram individualmente inseridos no tanque e o tempo despendido (tempo de latência em segundos) para encontrar a plataforma foi registrado a cada tentativa. Os quadrantes foram designados conforme os pontos cardeais, sendo os animais soltos na seguinte ordem, norte-norte, norte-leste, norte-oeste, norte-sul e na última sessão que constituía de uma tentativa, norte.

No último dia foi realizado o teste sem a plataforma, no qual os animais nadaram durante 1 minuto e foi marcado quanto tempo permaneceram no quadrante onde deveria estar a plataforma.

#### 4.5.6 Rastreamento dos animais

O rastreamento foi executado com a utilização de Câmera IP Infra 720p (1280x720) gerenciada pelo *Software* de captura CitroX<sup>®</sup>, fixada na parte central superior da gaiola enriquecida. A partir das imagens capturadas, foi realizado o rastreamento manual utilizando o sistema para análises cinemáticas *Digital Vídeo For Biomechanics - Windows 32 bits* (DVIDEOW<sup>®</sup>) (BARROS et al., 1999). O procedimento consistia em rastrear o animal através da função *Mouse Tracking* do *software* DVIDEOW<sup>®</sup>, gerando um arquivo com as coordenadas de tela dos pares ordenados (X, Y) em 2D da movimentação do animal na gaiola enriquecida. Após esta etapa, as informações foram calculadas em um protocolo desenvolvido no *software* Matlab<sup>®</sup> 2014a (Math Works Inc, Massachussets, Estados Unidos), para obtenção dos dados de deslocamento em metros dos animais.



**Figura 3.** Tanque circular dividido em quadrantes (norte, sul, leste e oeste) e corante diluído na água de acordo com uma das especificações sugeridas por Morris et al. (1984).

#### 4.6 Avaliações após o sacrifício dos animais

Ao final do período experimental, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg de peso corporal via injeção intraperitoneal). Após a eutanásia foram coletadas amostras do gastrocnêmio para análise proteica por *immunoblotting*.

##### 4.6.1 Índice de Lee, massa e comprimento corporal

O índice de Lee foi calculado ao final do experimento, usando a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal (CNA) do animal, com a seguinte formula  $\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA (cm)}}$ . A mensuração do peso foi realizada com balança eletrônica digital, marca Filizola Mod BP LED (15kg x 5g). O comprimento naso-anal e o peso foram realizados, após anestesia do animal.

##### 4.6.2 Extração tecidual e análise protéica por *immunoblotting*

Para a extração tecidual, o músculo gastrocnêmio foi cuidadosamente dissecado e mantido em placa de gelo, pesado, congelado em nitrogênio e macerado até a completa transformação destes tecidos em pó. Estas amostras foram armazenadas em *freezer* -80°C até serem analisadas no laboratório de Biologia Molecular do Exercício Físico (FCA-Unicamp).

Para a análise por *immunoblotting* as amostras foram submetidas ao processo de lise celular através de *kit* de fracionamento celular (*Pierce Protein Biology*®). Parte deste material foi utilizada para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método foto colorimétrico usando *kit* comercial BCA (*Pierce Reagents*®).

Após determinação do conteúdo de proteínas totais, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, a 4°C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A Sepharose 6 MB por 2 horas à 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (11000rpm, 20 minutos, 4 °C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada (11000rpm, 4 °C). As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de *Laemmli* (65) contendo 100mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5 -10 minutos. A seguir, quantidades iguais de proteína (30ug) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8-12%)-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD® (MiniProtean, Bio-Rad Laboratories®, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 V em períodos de tempo variáveis em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD®. A ligação dos anticorpos às proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/L de Tris; 150mmol/L de NaCl; 0.02% de *Tween* 20) por trinta minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpos, e então lavadas 3 vezes por 15 minutos em tampão fosfato. Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 horas na temperatura ambiente com o anticorpo secundário (com peroxidase-HRP diluído em solução basal contendo leite desnatado, 1%) referente às especificações dispostas no primeiro anticorpo utilizado. As membranas foram novamente lavadas por 3 vezes de 5 minutos com solução basal e incubadas em sala escura com substrato

luminolquimioluminescente (*Pierce Reagents*<sup>®</sup>) por 5 minutos e expostas a filmes fotossensíveis de RX Kodak e revelados por método tradicional (máquina de Raios-X). As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um *scanner* de mesa *Color Page HR6X (Genius)* e o programa *ScionImage (Scioncorp*<sup>®</sup>). Foram utilizados os anticorpos para *imunoblotting*: anti-AKT, anti-fosfo-AKT, RhoA e RhoE (*Sigma Aldrich*<sup>®</sup> and *Cell Signaling Technology*<sup>®</sup>).

#### 4.7 Análise estatística

Após o teste de normalidade realizado através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*, os resultados foram avaliados estatisticamente por meio do teste t ou *Mann-Whitney* para as análises entre dois grupos ou análise de variância (ANOVA) *two way*, com *posthoc* de Bonferroni (significância de 5%) para as demais análises. O software *SPSS*<sup>®</sup> foi utilizado para as análises.

### 5 RESULTADOS

#### 5.1 Resultados da atividade realizada na gaiola enriquecida

A tabela 1 apresenta os resultados da distância percorrida na roda de atividade. Pode ser observado que, ao longo das semanas, os animais do grupo diabetes (D) andaram menos que os animais do grupo controle (C), sendo comprovado pelo teste realizado na média ao longo das semanas ( $p < 0.0001$ ).

Na tabela 2 podem ser observados os resultados da distância percorrida pelos animais dentro da gaiola enriquecida. No início do período experimental, não houve diferenças significativas entre os animais. Na ultima semana, os valores também não diferiram entre os grupos estudados.

**Tabela 1.** Média da distância percorrida (m/dia) pelos animais pertencentes aos grupos controle GE (CGE) e diabetes GE (DGE) na roda de atividade ao longo das semanas durante o período experimental.

| Grupo      | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Média              |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------|
| <b>CGE</b> | 853      | 2208     | 1535     | 2338     | 3505     | 2087,8             |
| <b>DGE</b> | 99       | 129      | 189      | 91       | 50       | 111,6 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>p<0.05 comparado ao CGE (Teste t; p<0,05 n=7 ratos/ grupo).

**Tabela 2.** Média da distância percorrida (m/dia) dos animais pertencentes aos grupos controle GE (CGE) e diabetes GE (DGE) no início e final do período experimental.

| Grupo      | Início   | Final     |
|------------|----------|-----------|
| <b>CGE</b> | 4,33±2   | 4,47± 2,3 |
| <b>DGE</b> | 4,67±3,1 | 2,09±1,5  |

(Teste t; p<0,05 n=5 ratos/ grupo).

## 5.2 Resultados da manutenção dos animais nas gaiolas convencional ou enriquecida

A figura 1 apresenta resultados relacionados à massa corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) ao longo das 6 semanas do período experimental. A massa corporal ao longo do experimento foi menor nos animais diabéticos de ambos os grupos comparados aos grupos controles. Por outro lado, o diabetes aumentou a ingestão hídrica e alimentar em ambos os grupos diabéticos comparados aos controles. Os dados morfométricos apresentados na tabela 4 revelam que o comprimento naso-anal não foi alterado pelo diabetes ou AE, enquanto o índice de Lee foi reduzido nos animais diabéticos não sendo alterados pelo AE.

Conforme esperado, a glicemia dos animais diabéticos esteve aumentada nos períodos inicial e final e quando analisado o delta (diferença dos valores final-inicial) os animais do grupo D apresentaram resultados maiores comparados aos grupos C e DGE.

**Tabela 3.** Glicemia (mg/dl) dos animais pertencentes aos grupos controle (C), diabetes (D) e diabetes GE (DGE) no início e final do período experimental e a diferença entre final e inicial ( $\Delta$ ) durante o período experimental.

|            | Glicemia (mg/dl)               |                             |                    |
|------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|
|            | Inicial                        | Final                       | $\Delta$           |
| <b>C</b>   | 103,5 $\pm$ 4,8                | 109,6 $\pm$ 6,6             | 3,3                |
| <b>D</b>   | 392,6 $\pm$ 123,1 <sup>a</sup> | 558 $\pm$ 71,9 <sup>a</sup> | 164,6 <sup>a</sup> |
| <b>DGE</b> | 418,7 $\pm$ 140,1 <sup>a</sup> | 437,4 $\pm$ 18 <sup>a</sup> | 18,7 <sup>b</sup>  |

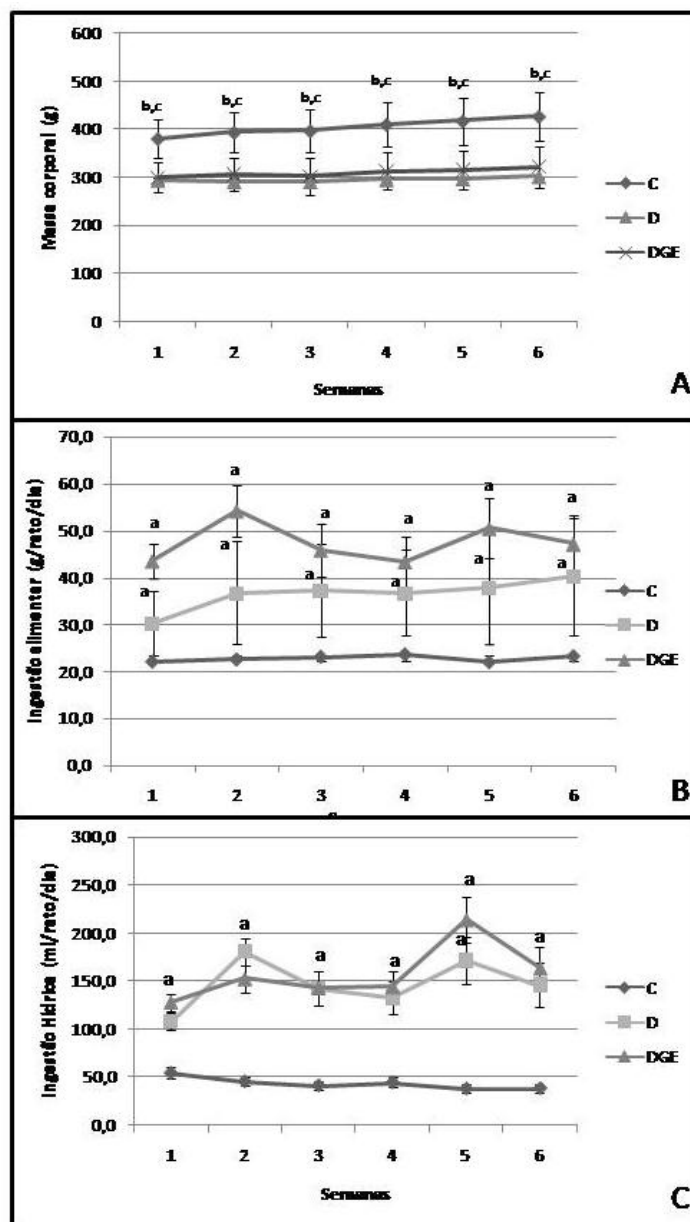
<sup>a</sup>p<0.05 comparado ao C; <sup>b</sup>p<0.05 comparado ao D (ANOVA-Bonferroni; n=7 ratos/grupo).

Nos dados de comprimento corporal não houve alterações entre os grupos estudados. Por outro lado, o diabetes diminui os valores do índice de Lee e o AE não foi capaz de amenizar este prejuízo.

**Tabela 4.** Comprimento naso-anal final (cm), índice de Lee dos animais pertencentes aos grupos controle (C), diabetes (D) e diabetes GE (DGE) ao final do período experimental.

| GRUPOS     | Comprimento corporal | Índice de Lee               |
|------------|----------------------|-----------------------------|
| <b>C</b>   | 24,4 $\pm$ 0,8       | 54,9 $\pm$ 8,8              |
| <b>D</b>   | 23,8 $\pm$ 1,2       | 41,5 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup> |
| <b>DGE</b> | 24,2 $\pm$ 1,1       | 43,4 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>p<0.05 comparado ao C; <sup>b</sup>p<0.05 comparado ao D (ANOVA-Bonferroni; n=7 ratos/grupo).



**Figura 4.** Massa corporal (g; A), ingestão alimentar (g/rato- B) e ingestão hídrica (ml/rato-C) dos animais pertencentes aos grupos controle (C), diabetes (D) e diabetes GE (DGE) ao longo das 6 semanas do período experimental. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ANOVA;  $P < 0.05$ ;  $a \neq C$ ;  $b \neq D$ ;  $c \neq DGE$ ; ANOVA-Bonferroni.

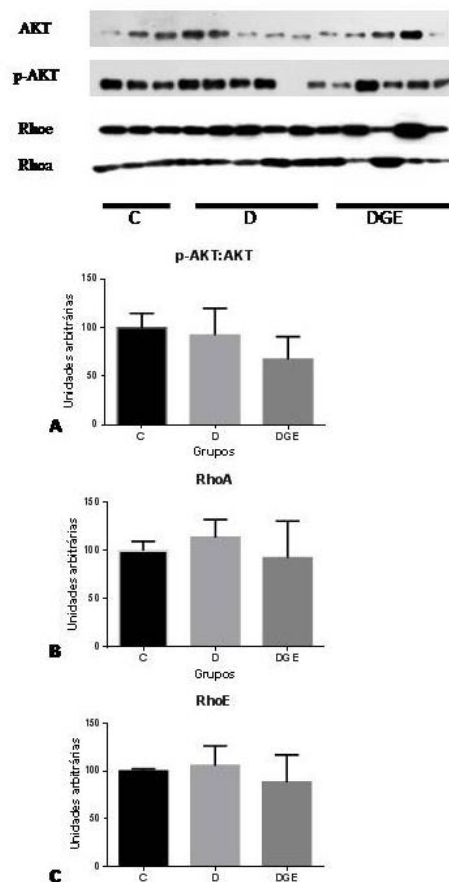
Os dados de labirinto aquático revelam que animais diabéticos mantidos no AE tiveram resultados melhores na fase inicial, conforme pode ser observado nos resultados de área sob a curva, não tendo alterado, contudo os valores do teste final. O diabetes, no presente estudo, não alterou o desempenho dos animais no labirinto aquático.

**Tabela 5.** Latência dos animais pertencentes aos grupos controle (C), diabetes (D) e diabetes GE (DGE) durante os testes de labirinto aquático de *Morris* (seg.) realizados na quinta semana do período experimental e a área sob a curva dos 4 primeiros dias de teste.

| GRUPOS     | Dia 1     | Dia 2     | Dia 3     | Dia 4     | Área sob a curva       | Teste Final |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-------------|
| <b>C</b>   | 48±9,9    | 40,9±19,6 | 21,8±13,9 | 16,7±13,9 | 1216,3±402,7           | 20±9,4      |
| <b>D</b>   | 49,4±10,1 | 37,9±19,9 | 23±11,5   | 16,7±13   | 1361±401,5             | 21,1±6,5    |
| <b>DGE</b> | 42 ±20,6  | 28,4±20,9 | 20,7±12,4 | 12±11,7   | 699,7±156 <sup>a</sup> | 21±6,9      |

<sup>a</sup>p<0.05 comparado ao D (ANOVA- Bonferroni n=7 ratos/ grupo).

Nas análises musculares, não foram encontradas diferenças significativas na fosforilação da AKT ou na expressão das proteínas RhoA e RhoE (figura 3).



**Figura 5.** Fosforilação da proteína AKT (A) e expressão da proteína RhoA (B) e RhoE (C) no músculo gastrocnêmio dos animais pertencentes aos grupos controle (C), diabetes (D) e diabetes GE (DGE) ao final das 6 semanas do período experimental. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

## DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta os resultados dos efeitos do diabetes no acúmulo de atividade física dos animais mantidos em ambiente enriquecido e os efeitos da manutenção em ambiente enriquecido nos animais diabéticos em aspectos cognitivos através do labirinto aquático de Morris, morfométricos através da massa corporal, comprimento naso-anal e índice de *Lee*, nas ingestões hídrica e alimentar, glicemia e na fosforilação da AKT (proteína B) e expressões de RhoA e RhoE no músculo destes animais.

O ambiente enriquecido é definido como ambiente promotor de complexas estimulações inanimadas e sociais aos animais nele mantidos que proporcionam boas condições para o seu desenvolvimento físico, social e comportamental (ROSENZWEIG et al., 1978).

O papel da atividade física no ambiente enriquecido foi destacado no estudo de Kobilko e colaboradores (2011) que distribuíram os animais em quatro grupos mantendo cada grupo em gaiolas de tamanhos iguais, sendo a primeira gaiola sem objetos, a segunda com objetos inanimados, mas sem roda de atividade, o terceiro grupo mantido em ambiente apenas com a roda e o quarto grupo em ambiente com a roda e objetos inanimados. Os autores concluíram que a atividade física realizada na roda é o fator crítico para promover parte das alterações encontradas, dentre as quais estão o aumento do fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), aumento da neurogênese na vida adulta e rendimento melhor no teste cognitivo. Apesar desta relevância da prática de atividade física no ambiente enriquecido, poucas pesquisas estudaram o volume de atividade física realizada no ambiente enriquecido.

Dentre as pesquisas desenvolvidas com este objetivo, Xie e colaboradores (2013) realizaram o rastreamento de animais mantidos em ambiente enriquecido e concluíram seus trabalhos apresentando que animais mantidos em ambiente enriquecido percorrem maiores distâncias e apresentam maior frequência de movimentos. Jordão e colaboradores (2015) submeteram animais mantidos no ambiente enriquecido e em gaiola convencional ao teste de máxima fase estável de lactato e comprovaram que os animais mantidos no ambiente enriquecido tiveram melhor desempenho no teste quando comparados aos animais controles, demonstrando que a prática de atividade física no ambiente enriquecido é capaz de

promover modificações no condicionamento aeróbio dos animais.

Nesta perspectiva, o acúmulo de atividade física de animais mantidos no ambiente enriquecido é um meio para o estudo das atividades físicas espontâneas e voluntárias. Ao ser estudado no presente estudo o acúmulo de atividade física realizada na roda de atividade, pôde ser observado que, ao longo das semanas, os animais diabéticos tiveram valores menores no número de giros da roda, quando comparados aos controles, sendo comprovado pelo teste realizado na média ao longo das semanas, não havendo, porém, alterações significativas no deslocamento dos animais na gaiola.

Estudos prévios realizados por Howarth et al. (2005a;b) e Shimomura et al. (1988) apresentaram que a atividade física de ratos diabéticos induzidos utilizando estreptozotocina foi significativamente reduzida, corroborando com o resultado obtido na roda de atividade no presente estudo. A redução do nível de atividade física parece estar relacionada, também, à diminuição do ritmo cardíaco e da temperatura corporal em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tanto em curto tempo, quanto em experimentos de longo tempo (HOWARTH et al., 2005a;b).

De ordem central, os ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam anormalidades metabólicas nos neurônios dopaminérgicos, fato que também contribui na explicação dessa redução no nível de atividade física (SHIMOMURA et al., 1988).

Em tentativa de reverter o quadro, Howarth et al. (2006), trataram ratos induzidos por estreptozotocina com insulina e obtiveram uma parcial normalização dos níveis de atividade física e temperatura corporal, corroborando com os achados de Carter e colaboradores (1987) que afirmaram que animais não tratados com insulina apresentaram um declínio no acúmulo de atividade física. No mesmo sentido, Chibalin et al. (2000) afirmaram que homeostase da glicose provoca melhora no nível de atividade física de ratos diabéticos. Estes poucos estudos que investigaram a diminuição do nível de atividade física em ratos induzidos ao diabetes por estreptozotocina, portanto, corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

A manutenção no ambiente enriquecido em biotérios experimentais, a princípio, pode estar ligada a melhoria nas condições de manutenção dos animais no biotério. Alguns estudos utilizam a manutenção no ambiente enriquecido como

forma de investigar os seus efeitos nos animais, sendo a grande parte desses estudos destinados a avaliar os efeitos na cognição e aspectos do sistema nervoso central.

Os organismos diabéticos apresentam numerosos distúrbios metabólicos causados primariamente pela ausência de insulina, como ocorrido no presente estudo nos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. A estreptozotocina é uma nitrosamina que participa de um grupo de drogas denominadas alquilantes. Após a entrada na corrente sanguínea é transportada para o interior das células beta através dos transportadores de glicose (GLUT2) que provoca, de forma seletiva em células beta pancreáticas, danos celulares iniciados com a metilação de DNA que resulta em desfragmentação e culminando com a morte dessas células gerando posteriormente hiperglicemia (LENZEN, 2008). A redução na produção da insulina ocorre algumas horas após a administração, havendo posteriormente um dano permanente nas células beta (LENZEN, 2008).

A ausência de insulina provoca prejuízos no controle da glicose hepática e na captação de glicose pelas células musculares e adiposas, pois a insulina reduz a glicogenólise e gliconeogênese hepáticas e aumenta a captação de glicose via translocação de GLUT4 (PESSIN; SALTIEL, 2000). Desta forma, em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, a lesão em células beta provoca hiperglicemia e instauração do quadro diabético conforme observado nos animais pertencentes aos grupos diabéticos no presente estudo.

Estudos envolvendo animais diabéticos mantidos em ambientes enriquecidos são escassos. Ao estudar os efeitos da manutenção em ambiente enriquecido na glicemia destes animais, alguns estudos apresentaram redução (BEAUQUIS et al., 2010) ou não alteração na hiperglicemia diabética (PIAZZA et al., 2011; DORFMAN; ARANDA; ROSENSTEIN, 2015). No presente estudo, a hiperglicemia foi amenizada pela manutenção no ambiente enriquecido, fator de grande relevância para a manutenção de melhores condições para organismo diabético.

As causas que promoveram a redução da hiperglicemia nos animais diabéticos, todavia, precisam ser mais bem estudadas. Alguns fatores a serem apontados são os hormônios contraregulatórios e a atividade física realizada no ambiente enriquecido. Os hormônios contraregulatórios são fundamentais em diversas situações como na reação ao estresse, um conjunto de respostas que

causam o aumento da glicemia (FUJIWARA et al., 1991). A manutenção em ambiente enriquecido promove redução na hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e consequente redução da atividade cortical da adrenal e na produção de cortisona (PIAZZA, 2014), que por ser um hormônio hiperglicemiante, tende a trazer maiores prejuízos ao organismo diabético.

A prática de atividade física promove modificações metabólicas que podem alterar a glicemia de forma aguda e crônica. Neste sentido, a atividade física promove efeitos sinérgicos à insulina, contribuindo com a manutenção da homeostase glicêmica. A atividade física realizada no ambiente enriquecido pode ter participado na redução da hiperglicemia diabética, mesmo tendo sido menos realizada que pelos animais controles.

A contração muscular ocorrida na atividade física promove fatores que causam captação de glicose independente da insulina como aumenta a atividade da enzima AMPK, concentrações miocelulares de cálcio e óxido nítrico facilitando a translocação dos GLUTs para próximo da membrana celular, promovendo a entrada da glicose na célula.

Em organismos que apresentam o quadro de resistência à insulina, o aumento da sensibilidade à insulina ocorre com as adaptações do exercício físico crônico, provocando melhora na atividade das moléculas intermediárias entre a ligação da insulina ao receptor e a translocação dos GLUTs, como aumento da expressão de proteínas como AMPK, TBC1D1, AKT 1, AKT 2 e GLUT4 (FUNAI; CARTEE, 2008; JESSEN et al., 2011).

O aumento da ingestão hídrica é resultado do desequilíbrio glicêmico em organismos diabéticos e é oriundo da poliúria e da polidipsia. O aumento da osmolaridade sanguínea provocado pela hiperglicemia induz glicosúria e perda de água e eletrólitos com fins de manter o equilíbrio osmótico, gerando desidratação e consequente sede particularmente por ativação dos osmorreceptores (THOMPSON; DAVIS; BAYLIS, 1989; LERCO et al., 2003).

Com relação à massa corporal e ingestão alimentar, os animais diabéticos apresentaram redução da massa e do índice de Lee, apesar de aumento na ingestão alimentar. Este é um resultado esperado em animais induzidos por estreptozotocina ou aloxana, por alterações das substâncias anorexígenas e orexígenas, havendo redução nas concentrações séricas de insulina e leptina e

aumento nas concentrações de grelina (SINDELAR et al., 1999; HIDAKA et al., 2002; PEREIRA et al., 2016). O emagrecimento é creditado, dentre vários fatores, à depleção das reservas hídricas, lipídicas, de glicogênio e à redução da massa muscular promovida por excessiva proteólise (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; LUCIANO; MELLO, 1998).

A manutenção no ambiente enriquecido não promoveu efeitos nestes parâmetros, mesmo em detrimento a amenização na hiperglicemia. Em partes, essas modificações foram observadas em estudos realizados com animais em condições diferentes. Vieira et al. (2015) demonstraram que animais idosos mantidos em ambiente enriquecido apresentaram diminuição da massa corporal, sem contudo, alterar o comprimento ou a glicemia. Em animais obesos, a manutenção no ambiente enriquecido reduziu massa corporal e glicemia, amenizando os prejuízos da dieta hipercalórica (MAESAKO, 2012).

Para investigar os efeitos do ambiente enriquecido na aprendizagem e memória espacial dos ratos diabéticos, foi utilizado o teste de labirinto aquático de Morris, uma ferramenta bem referenciada no estudo das funções cognitivas e bastante utilizada em pesquisas de áreas como Neurociência, Farmacologia, Psicologia, entre outras. O presente estudo demonstrou que, apesar do diabetes não ter alterado o desempenho dos animais no teste de labirinto aquático de Morris, a manutenção dos animais diabéticos no ambiente enriquecido promoveu algumas melhorias na aprendizagem e memória dos animais.

Alguns estudos apontam que o diabetes é uma condição que pode promover prejuízo cognitivo por lesão e dano dos neurônios e astrócitos hipocampais induzindo neurodegeneração (SEGOVIA et al., 2008a). Por outro lado, a manutenção no ambiente enriquecido promove melhorias e, em determinados quadros patológicos pode amenizar tais prejuízos (SEGOVIA et al., 2008b). Utilizando o teste de reconhecimento de objetos novos, Piazza e colaboradores (2014) mostraram que os animais diabéticos mantidos em ambiente enriquecido têm o prejuízo cognitivo amenizado, citando o importante papel da redução na hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Beauquis et al. (2010) demonstraram que a manutenção no ambiente enriquecido aumentou a neurogênese, vascularização e complexidade dendrítica em animais diabéticos, concluindo que se faz necessário a análise dos testes de memória para conectar os

achados do seu trabalho com alterações no teste.

Estes benefícios encontrados nos testes podem estar relacionados a diversos fatores sugeridos como plasticidade sináptica (LEGGIO et al., 2005), neurotransmissores (SEGOVIA, 2008), fatores de crescimento (VAN PRAAG, 1999) e redução de apoptose (WILLIAMSON, 2012). Contudo, as vias moleculares que participam nestes processos precisam ser melhor estudadas.

A manutenção do músculo esquelético depende de um equilíbrio entre degradação e síntese de proteína, onde o aumento da massa é caracterizado pela síntese de proteínas, enquanto a perda de massa ocorre quando a degradação das proteínas é maior que a síntese. Esta é uma das características de várias doenças crônicas e, entre elas, está o diabetes. Desta forma, entender esse processo é muito importante para identificação dos objetivos da terapêutica para essas doenças (RUSSELL, 2010).

Entre os mediadores do ganho e perda muscular estão as proteínas da família das Rho, que são responsáveis pela organização do citoesqueleto e repostas de mobilidade celular. A RhoE é pertencente à família RhoGTPase e é similar à RhoA. Estas proteínas controlam a dinâmica da actina citoesquelética tendo ações antagônicas. A RhoE atua no desmantelamento da fibra muscular, enquanto a RhoA estimula seu mantelamento, produzindo mudanças distintas no citoesqueleto (RIENTO et al., 2003). A RhoA também intermedia a sinalização para a diferenciação esquelética miogênica (CASTELLANI et al., 2006).

Em nosso estudo não foram encontradas diferenças nas expressões de RhoA e RhoE no músculo gastrocnêmio dos ratos estudados. A fosforilação da AKT, cuja atividade está relacionada com hipertrofia muscular, não foi influenciada pelo diabetes ou ambiente enriquecido no período de 6 semanas. Hulmi et al. (2012) encontraram redução na fosforilação da AKT após 1 e 3 semanas da indução de diabetes por estreptozotocina. Todavia, após 5 semanas, a fosforilação da AKT no músculo esquelético de animais diabéticos e controles não apresentou diferenças significativas, corroborando com os resultados do presente estudo.

## CONCLUSÃO

O ambiente enriquecido pode trazer diversos benefícios aos animais nele mantidos. Todavia, grande parte dos estudos, até o momento, tem sido direcionada para investigações no sistema nervoso central. O ambiente enriquecido pode ser visto como promotor de atividade física, podendo nele ser estudado não apenas parâmetros relacionados ao sistema nervoso central, comportamentais ou de reabilitação, mas como um meio para a prática de atividade física voluntária e espontânea, particularmente pelo deslocamento que os animais realizam, a interação social e a atividade na roda.

Os dados do presente estudo permitem concluir que o diabetes reduz a atividade física na roda de atividade sem, contudo, alterar significativamente o deslocamento dos animais na gaiola enriquecida. Mesmo assim, a manutenção em ambiente enriquecido ameniza o aumento da hiperglicemia e melhora o desempenho no labirinto aquático de *Morris* nos animais diabéticos.

O diabetes reduziu a massa corporal e o índice de Lee e aumentou as ingestões hídricas e alimentares. O ambiente enriquecido, contudo, não promoveu alterações nestes parâmetros. Ainda, nem o diabetes, nem a manutenção no ambiente enriquecido, no período de 6 semanas, promoveram alterações nas proteínas AKT, RhoA ou RhoE no músculo gastrocnêmio.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA-PITITTO et al. Déficit cognitivo: mais uma complicação do diabetes melito?. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**,v. 52, n. 7, p. 1076-1083, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, **Complete Guideto Diabetes**. Virginia, 4ed, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 29, p. S43-S48, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position Statement). **Diabetes Care**.v.33 (Supl. 1) p.S62–S69, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes Statistics**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

ANDIN, J. et al. Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. **Brain research**, n. 1174, p. 18-27, 2007.

AUNE, D. et al. Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose–response meta-analysis. **European journal of epidemiology**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 2015.

BARROS, R. D. et al. Desenvolvimento e avaliação de um sistema para análise cinemática tridimensional de movimentos humanos. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1-2, p. 79-86, Jan. 1999.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **ILAR journal**, v.46, n.2, p. 162-170, Jan. 2005.

BEAUQUIS, J. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. **PLoS One**, n. 5, v. 11, p. 13993, Nov. 2010.

BEDI, K. S.; BHIDE, P. G. Effects of environmental diversity on brain morphology. **Early human development**, v. 17, n. 1, p. 107-143, 1988.

BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in  $\beta$ -cell function. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 788-791, 2001.

BELZ, E. E. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 76, n. 3, p. 481-486, 2003.

BENNETT, D. A. et al. Cognitive and social lifestyle: links with neuropathology and

cognition in late life. **Acta neuropathologica**, v. 127, n. 1, p. 137-150, 2014.

BENNETT, E. L.; ROSENZWEIG, M. R.; DIAMOND, M. C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. **Science**, v. 163, n. 3869, p. 825-826, 1969.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 513-521, 2005.

CARTER, W. R. et al. Promotion of diabetes onset by stress in the BB rat. **Diabetologia**, v. 30, n. 8, p. 674-675, Aug. 1987.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASTELLANI, L. et al. Fine regulation of RhoA and Rock is required for skeletal muscle differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 22, p. 15249-15257, Jun. 2006.

CHIBALIN, A. V. et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 38-43, Jan. 2000.

CHURCH, T. Exercise in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 53, n. 6, p. 412-418, 2011.

COLBERG, S. R. et al. Exercise and type 2 diabetes the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. **Diabetes care**, v. 33, n. 12, p. 147-167, 2010.

COOPER, S. J. Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, n. 8 p. 851-874, 2005.

CRAFT, S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age-and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 1, p. 65-69, 2005.

DEL ARCO, A. et al. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. **Journal of neural transmission**, v. 114, n. 1, p. 43-48, 2007.

DIEGUES, J. C. et al. Spatial memory in sedentary and trained diabetic rats: Molecular mechanisms. **Hippocampus**, v. 24, n. 6, p. 703-711, 2014.

DINNEEN, S. F. What is diabetes? **Medicine**, v. 34, n. 2, p. 45-46, 2006.

DORFMAN, D.; ARANDA, M. L.; ROSENSTEIN, R. E. Enriched Environment

Protects the Optic Nerve from Early Diabetes-Induced Damage in Adult Rats. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. 136637. Aug. 2015.

DUFFY, S. N. et al. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. **Learning & Memory**, v. 8, n. 1, p. 26-34, 2001.

ECKERT, M. J.; BILKEY, D. K.; ABRAHAM, W. C. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 6, p. 3320-3329, 2010.

EKSTRAND, J.; HELLSTEN, J.; TINGSTRÖM, A. Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. **Neuroscience letter**, v. 442, n. 3, p. 203-207, 2008.

FOSTER, T. C.; DUMAS, T. C. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 4, p. 1377-1383, 2001.

FUJIWARA, T. et al. Role of cortisol in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. **Metabolism**, v. 45, n. 5, p. 571-578, 1996.

FUNAI K, CARTEE GD. Inhibition of contraction stimulated AMP-activated protein kinase inhibits contraction stimulated increases in PAS-TBC1D1 and glucose transport without altering PAS-AS160 in rat skeletal muscle. **Diabetes** 2008;58:1096-1104.

FURUKAWA, N. et al. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. **Cell Metab**, n. 2, p. 119–129, 2005.

GAGNÉ, J. et al. AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. **Brain research**, v. 799, n. 1, p. 16-25, 1998.

GARLAND, T. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **The Journal of experimental biology** v. 214, n. 2, p. 206-229, 2011.

HALSETH, A. E. et al. Metabolic responses of rat respiratory muscles to voluntary exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 3, p. 902-907, 1995.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problem solving at maturity. **Am Psychol**, n. 2, p. 306-307, 1947.

HENDERSON, N. D., Brain weight increases resulting from environmental enrichment: a directional dominance in mice. **Science**; v. 169, n. 3947, p.776-778, 1970.

HIDAKA, S. et al. Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent

of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 6, p. 509-518, Apr. 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HOWARTH, F. C. et al. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 33, n. 4, p. 327-331. Apr. 2006.

HOWARTH, F. C. et al. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. **Experimental physiology**, v. 90, n. 6, p. 827-35, 2005a.

HOWARTH, F. C. et al. Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. **Experimental physiology**, v. 90 n. 2 p. 237-45. 2005b.

HUGHES, T. M.; CRAFT, S. The Role of Insulin in the Vascular Contributions to Age-Related Dementia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 2015.

HULMI, J. J. et al. Altered REDD1, myostatin, and Akt/mTOR/FoxO/MAPK signaling in streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 3; p. 307-315, Feb. 2012.

ISHIKURA, S.; KOSHKINA, A.; KLIP, A. Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. **Acta Physiologica**, v. 192, n. 1, p. 61-74, 2008.

JESSEN N, et al. Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2011;301:164-171.

JORDÃO, L. F. et al. Effects of enriched environment on maximal lactate steady state of wistar rats. **Bioscience Journal**. v.31, n.4, 2015.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KANDA, T. et al. Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. **The FASEB journal** v.20, n.1, p. 169-171, 2006.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-495, 1997.

KING et al. Activation of the insulin-signaling pathway in sciatic nerve and hippocampus of type 1 diabetic rats. **Neuroscience**, v. 303, p. 220-228, 2015.

KOBILO, T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. **Learning & Memory**, v. 18, n. 9, p. 605-609, 2011.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatric diabetes**, v.12 n. 4, p. 345-364, jun. 2011.

LANDI, S. Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 130-139, 2007.

LEAL-GALICIA, P. et al. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. **Developmental neurobiology**, v. 67, n. 4, p. 395-405, 2007.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural brain research**, v. 163, n. 1, p. 78-90, 2005.

LEME, J. A. et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos *wistar*. **Biosci**, v. 26, n. 3, p.451-456, jun. 2010.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 2, p. 132-142, mar. 2003.

LINDSTRÖM, J. et al. Finnish Diabetes Prevention Study. Improved lifestyle and decreased diabetes risk over 13 years: long-term follow-up of the randomised Finnish Diabetes Prevention Study (DPS). **Diabetologia**, v. 56,n. 2, p. 284-293, 2013.

LIU, X. et al. Involvement of RhoA/ROCK in insulin secretion of pancreatic  $\beta$ -cells in 3D culture. **Cell and tissue research**, v. 358, n. 2, p. 359-369, 2014.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 149-157, 2002.

LUCIANO, E.; LIMA, F. B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Rev. ciênc. bioméd.** São Paulo, v. 18, p. 47-60, 1997.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**,v.12, n. 2, p. 202-209, jul. 1998.

MAESAKO, M. et al. Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A $\beta$  deposition and memory deficit in APP transgenic mice. **Neurobiology of aging**, v. 33, n.5, p. 1011 May, 2012.

MEHRAN, A. E. et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. **Cell metabolism**, v. 16, n. 6, p. 723-737, 2012.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 821-827, 2001.

MORRIS, R. et al. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, May, 1984.

MOULTON et al. Meta-analyses of structural regional cerebral effects in type 1 and type 2 diabetes. **Brain imaging and behavior**, p. 1-12, 2015.

MUNETSUNA, E. et al. Environmental enrichment alters gene expression of steroidogenic enzymes in the rat hippocampus. **General and comparative endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 28-32, 2011.

MUSTROPH, M. L. et al. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. **Neuroscience**, v. 219, p. 62-71, 2012.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697-709, 2006.

NRC (National Research Council) **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8th ed. Washington: The National Academies Press, 2011.

OLSSON, I. A.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment'. **Laboratory animals**, v.36, n. 3, p. 2, Jul. 2002.

OUDOT, F. et al. Modifications in dietary self-selection specifically attributable to voluntary wheel running and exercise training in the rat. **Physiology & behavior**, v. 59, n. 6, p. 1123-1128, 1996.

PAMIDI, N.; NAYAK, S. Effect of environmental enrichment exposure on neuronal morphology of streptozotocin-induced diabetic and stressed rat hippocampus. **Biomedical journal**, v. 37, n. 4, p. 225, 2014.

PEREIRA, A. S. et al. Influência do treinamento físico aeróbio nos marcadores séricos de estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Journal of Physical Education**. v. 27, n.1, May. 2016.

PHAM, T. M. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73. n. 1, p. 167-175, 2002.

PIAZZA, F. V. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. **Metabolic brain disease**, v. 29, n. 1, p.93-104, Mar. 2014.

PIAZZA, F. V. et al Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. **Behavioural brain research**, v. 217, n. 1, p. 16-20, Feb. 2011.

PINAUD, R. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. **Molecular brain research**, v. 91, n.1, p. 50-56, 2011.

PORTO, J. A. **Efeitos do enriquecimento ambiental em ratos submetidos à desnutrição precoce e crises convulsivas: avaliação da memória espacial.** 2010.

POSTIC, C.; DENTIN, R.; GIRARD, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. **Diabetes & metabolism**, v. 30, n. 5, p. 398-408, 2004.

PRONK, N. P.; REMINGTON, P. L. Combined diet and physical activity promotion programs for prevention of diabetes: Community Preventive Services Task Force recommendation statement. **Annals of internal medicine**, v. 163, n. 6, p. 465-468, 2015.

RIENTO, K. et al. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 12, p. 4219-4229, Jun. 2003.

ROITMAN, J. L. **Manual de pesquisa das diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição.** Tradução Antonio Francisco Dielo Paulo. 2003.

ROSENZWEIG, M. R. et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain research**, v. 153, n. 3, p. 563-576, 1978.

RUSSELL, A. P. Molecular regulation of skeletal muscle mass. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 378-384, Mar. 2010.

SATOH, T. Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake. **Small GTPases**, v. 5, n. 1, p. 28102, 2014.

SEGOVIA, G. et al. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. **Journal of neural transmission**, v. 117, n. 10, p. 1123-1130, 2010.

SEGOVIA, G. et al. Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. **Neurochemistry international**, 2008; v. 52, n. 6, p. 1198-1203, 2008b.

SEGOVIA, G. et al. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. **Behavioural brain research**. 2008; v. 187, n., 304-311 2008a.

SEUFERT, J. SGLT2 inhibitors—an insulin-independent therapeutic approach for treatment of type 2 diabetes: focus on canagliflozin. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 543, 2015.

SHIMOMURA, Y. et al. Changes in ambulatory activity and dopamine turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. **Endocrinology**, v. 123, n. 6 Apoio: 2621-5. Dec. 1988.

SIGAL, R. J. et al. Physical activity and diabetes. **Canadian journal of diabetes**, p. 40-44, 2013.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats

- behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 246-264, 2011.

SINDELAR D. K. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, v. 48, p. 61275-80, Jun. 1999.

SMITH, A. L.; CORROW, D. J. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. **ILAR journal**, v. 46, n. 2, p. 140-147, 2005.

SZTAINBERG, Y.; CHEN, A. An environmental enrichment model for mice. **Nature protocols**, v. 5, n. 9, p. 1535-1539, Sept. 2010.

THOMAS, J.; GARG, M. L.; SMITH, D. W. Dietary resveratrol supplementation normalizes gene expression in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic C57Bl/6 mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 313-318, 2014.

THOMPSON, C. J.; DAVIS, S. N.; BAYLIS, P. H. Effect of blood glucose concentration on osmoregulation in diabetes mellitus. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 256, n. 3, p. 597-604, Mar, 1989.

TOMASOVIC, A. et al. Role of Cbl-associated protein/ponsin in receptor tyrosine kinase signaling and cell adhesion. **Journal of Molecular Biochemistry**, v.1. p. 3, 2012.

TOTH, L. A. et al. Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question. **Comparative medicine**, v. 61, n. 4, p. 314-321. Aug. 2011.

URAKAWA, S. et al. Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. **Neuroscience**. v. 144, n. 3, p. 920-933, 2007.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191-198, 2000.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature neuroscience**. Mar, v.2, n.3, p. 266-70, 1999.

VIEIRA, T. A. et al. The effects of environmental enrichment on biochemical and metric parameters of aged rats. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 3. May, 2015.

VIGITEL, B. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. SVS/Ministério da Saúde e NUPENS/Universidade de São Paulo. 2011.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.

WHITING, D. R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 3, p. 311-321, Dec. 2011.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology & behavior**. v. 47, n. 1, p. 57-62, 1990.

WILL, B. E. et al. Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 91, n. 1, p. 33, 1977.

WILLIAMSON, L. L.; CHAO, A.; BILBO, S. D. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. **Brain, behavior and immunity**, v.26, n. 3, p. 500-510, Mar. 2012.

WORKENEH, B., BAJAJ, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.45, n.10, p. 2239-2244, Oct. 2013.

XIE, H. et al. Enrichment-induced exercise to quantify the effect of different housing conditions: A tool to standardize enriched environment protocols. **Behavioural brain research**, p. 249, 2013.

YOUNG, D. et al. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature medicine**, v. 5, n. 4, p. 448-453, 1999.

YOUNG, N. A.; WINTINK, A. J.; KALYNCHUK, L. E. Environmental enrichment facilitates amygdala kindling but reduces kindling-induced fear in male rats. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 5, p. 1128, 2004.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 13, n. 414, p. 782-787, Dec. 2001.

## ANEXO A- ARTIGO ORIGINAL: “Manutenção em ambiente enriquecido e memória: participação das proteínas AKT e ERK”

### MAINTENANCE IN AN ENRICHED ENVIRONMENT AND MEMORY: PARTICIPATION OF AKT AND ERK PROTEINS

#### RESUMO

O hipocampo possui funções importantes na memória dos mamíferos. Algumas vias de sinalização estão sendo estudadas e, entre elas, está a via da insulina que possui receptores em várias regiões do encéfalo, como o hipocampo, revelando seu papel em diversas funções encefálicas, como memória e prevenção de morte neuronal. O exercício físico promove benefícios cognitivos envolvendo proteína quinase B (AKT), proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O ambiente enriquecido é um meio promotor de atividade física, pois os animais nele mantidos têm acesso à diversos estímulos inanimados e sociais que promovem oportunidades aos animais para que exerçam seus repertórios sensoriais, motores, cognitivo, social e comportamental. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do ambiente enriquecido na memória e fosforilação das proteínas AKT e ERK no hipocampo de ratos wistar. Para isso, foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar distribuídos em grupo controle (C), animais que foram mantidos na gaiola convencional e grupo gaiola enriquecida (GE), animais que foram mantidos na gaiola enriquecida. Ao final do período experimental os animais foram avaliados com relação à massa corporal, submetidos ao labirinto aquático de Morris e ao teste de campo aberto. Após a eutanásia, foram coletadas amostras do hipocampo para análise proteica por *immunoblotting* da fosforilação das proteínas AKT e ERK. O ambiente enriquecido não alterou a massa, comprimento e glicemia, porém promoveu melhoras no desempenho nos testes do labirinto aquático de Morris, no teste de campo aberto e na fosforilação da AKT e ERK. O presente estudo permite concluir que o ambiente enriquecido promove parcialmente melhoras nas funções de memória em ratos wistar. O aumento da fosforilação das proteínas AKT e ERK pode

contribuir na explicação dos eventos moleculares que culminam nesta melhoria no desempenho dos animais no teste cognitivo.

Palavras chave: ambiente enriquecido, memória cognitiva, atividade física.

## **ABSTRACT**

*The hippocampus has central functions in memory capacity for mammals, such as learning and memory. Some signaling pathways are being studied, among them, the insulin that has receptors in several places of the brain, as the hippocampus showing its role in various brain functions, such as memory and prevention of neuronal death. The physical exercise promotes cognitive benefits, involving the proteins AKT, CREB and BDNF. The enriched environment is a mean of promoting physical activity; the animals kept therein have access to several inanimate and social stimulations that stimulate the animals to exercise their sensory, cognitive, social and behavioral repertoires. In this way, this study aimed to investigate the effects of an enriched environment in the memory and phosphorylation of proteins AKT and ERK in the hippocampus of Wistar rats. In this study, male adults Wistar rats were distributed in conventional cage and enriched cage, at the end of the experimental period the animals were assessed with relation to body mass, submitted to Morris Water Maze and the test of open field. After euthanasia, hippocampal samples were collected to analyze protein by immunoblotting; the proteins analyzed were AKT and ERK. The enriched environment has not promoted changes in body mass, length and glycaemia, but promoted improvements in the performance in the Water Maze of Morris and the open field and in the phosphorylation of AKT and ERK. In this study we concluded that the enriched environment promotes improvements in the functions of memory in wistar rats and the increase of phosphorylation of proteins AKT and ERK, contributing to the improvement of their performance in the memory tests.*

*Keywords: enrichment environment, cognitive memory, water maze of Morris, physical activity*

## ANEXO B- Revisão de literatura: “Enriquecimento ambiental e atividade física”

### **Environmental enrichment and physical activity**

#### **Resumo**

O conceito de enriquecimento ambiental aplicado à pesquisa em laboratório consiste em oferecer aos animais recursos como rodas de atividade, túneis, brinquedos, aumento no espaço e maior interação social entre os animais que promovem estímulos complexos e diversificados que favorecem aos animais desenvolverem e aplicarem seu repertório comportamental. Tal proposta produz diversos efeitos nos animais, dentre os quais está o aumento do acúmulo de atividade física realizada. Desta forma, este ambiente pode ser uma proposta interessante para o estudo da atividade física voluntária e espontânea em animais de laboratório.

#### **Abstract**

*The concept of environmental enrichment applied to the laboratory consists in providing features such as wheels of activity, tunnels, toys, space and greater social interaction between the animals that promotes complex and diversified stimuli that further to animals to develop and apply the behavioral repertoire. This proposal produces several effects in animals, between that is the increase in physical activity. Thus, this environment may be an interesting suggestion for the study of voluntary and spontaneous physical activity in laboratory animals.*

## ANEXO C- Aprovação da CEUA/ Unisalessiano



Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - Araçatuba SP

Unisalessiano

COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA NO USO DE ANIMAIS –  
CEUA / Unisalessiano

Ofício CEUA - Unisalessiano 08/2014

Araçatuba – SP, 27 de agosto 2015

Prezado (a) Senhor (a), José Alexandre Curiacos de Almeida Leme.

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da manutenção em ambiente enriquecido na memória e via de sinalização da insulina no hipocampo de ratos diabéticos.” (processo nº 08/2014), apresentado por Vossa Senhoria ao CEUA - Unisalessiano, foi apreciado pelo referido Comitê, tendo sido considerado **APROVADO**.

Cordialmente,

Profª. Ms. Paula Raquel Galbiati Terçariol

Coordenadora do Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais –  
CEUA - Unisalessiano de Araçatuba

Ilmo(a) Sr(a).

Prof(a). José Alexandre Curiacos de Almeida Leme- **Orientador(a)**

Unisalessiano – Lins - SP.