

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE
RATOS SUBMETIDOS A ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E
ISOLAMENTO SOCIAL**

Patrícia Caroline Testa
Bióloga

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE
RATOS SUBMETIDOS A ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E
ISOLAMENTO SOCIAL**

Patrícia Caroline Testa

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

2020

T342r Testa, Patrícia Caroline
Respostas fisiológicas e comportamentais de ratos submetidos a
atividade física voluntária e isolamento social / Patrícia Caroline
Testa. -- Jaboticabal, 2020
58 p. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz

1. Exercício. 2. Animais Comportamento. 3. Ansiedade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

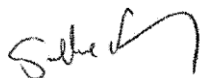
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE RATOS
SUBMETIDOS A ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E ISOLAMENTO
SOCIAL

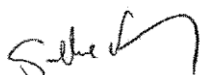
AUTORA: PATRÍCIA CAROLINE TESTA

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

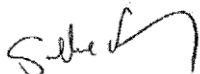
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. HERBERT GUSTAVO SIMÕES
Universidade Católica de Brasília-UCB/DF / Taguatinga-Brasília/DF
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Prof. Dr. ANTONIO DE QUEIROZ NETO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Jaboticabal, 12 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Patrícia Caroline Testa, Ribeirão Preto, 14/04/1994 – Nascida em Ribeirão Preto, São Paulo, em 14 de abril de 1994, filha de Paulo Testa e Cristina de Goréti de Carvalho Testa. Realizou sua graduação em Ciências Biológicas, modalidade Bacharel na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Conclui seus estudos e obteve o título de Bacharela em Ciências Biológicas em fevereiro de 2016. Realizou estágio no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do Exercício (LAFEQ) sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz. Neste período desenvolveu projetos relacionados à fisiologia do exercício e comportamento animal em ratos Wistar. Em março de 2017, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP/JABOTICABAL, na área de Metabolismo Animal como bolsista da CAPES e sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz.

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos pelo apoio e companheirismo constante durante todo o tempo.

A todos os integrantes do LAFEQ pela paciência, orientação, ensinamentos e ajuda durante toda minha estadia.

Aos membros do Departamento Morfologia e de Fisiologia Animal que sempre estavam dispostos a ajudar.

As bancas de qualificação e defesa pelas contribuições e disponibilidade.

Ao programa de pós-graduação em Zootecnia da FCAV.

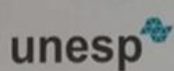
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CEUA	4
EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY ON PERFORMANCE AND BEHAVIORAL RESPONSES IN RATS.....	6
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	8
1. Introdução	8
2. Objetivo geral	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. Revisão de literatura.....	11
3.1 Exercício	11
3.2 Glicose e lactato	12
3.3 Testes comportamentais.....	13
3.3.1 Campo Aberto (CA).....	13
3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	14
3.3.3 Labirinto Aquático de Morris.....	15
4. Referências	16
1. Introdução	26
2. Material e métodos.....	28
2.1 Animais e manejo	28
2.2 Grupos e delineamento experimental.....	28
2.3 Protocolo de habituação à esteira	30
2.4 Testes comportamentais.....	31
2.4.1 Campo Aberto (CA).....	31
2.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	32
2.4.3 Labirinto Aquático de Morris (LA)	33
2.4.4 Teste de esforço máximo (Tmáx).....	33
2.4.5 Coleta de sangue.....	35
2.4.6 Análise lactato e glicemia	35
3 . Análise estatística.....	35
4. Resultados	36
4.1 Roda de corrida	36
4.2 Quantificação da massa corpórea.....	37

4.3	Campo Aberto	37
4.4	Labirinto em cruz elevado (LCE)	39
4.5	Labirinto aquático de Morris	40
4.6	Desempenho, $V_{m\acute{a}x}$, lactato e glicose	41
4.7	Correlações	44
5.	Discussão	45
6.	Conclusão	48
7.	Referências	50

CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



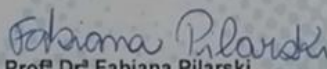
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**O exercício voluntário e a adaptabilidade à corrida de ratos Wistar em esteira**", protocolo nº 015434/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de novembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/01/2019 a 31/07/2019
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> linhagem Wistar
Nº de animais	40
Peso / Idade	80 a 90 g / 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Unesp, Campus Botucatu

Jaboticabal, 08 de novembro de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellano, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fca.v.unesp.br

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE RATOS SUBMETIDOS A ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E ISOLAMENTO SOCIAL

Isolamento social (IS) pode ser condição altamente estressante. As alterações associadas ao IS podem ser mitigadas ou até mesmo revertidas por mudanças no ambiente. Medidas para o enriquecimento ambiental (EA) podem ser implantadas por meio da exposição a estímulos motores. O exercício pode ser considerado um dos principais meios de EA, sendo capaz de prevenir comportamentos relacionados a depressão e ansiedade. Objetivou-se avaliar se a atividade física pode aumentar a capacidade atlética e reduzir possíveis modificações comportamentais induzidas pelo IS. Vinte ratos, com 35 dias de idade, foram distribuídos em dois grupos. O primeiro grupo permaneceu exclusivamente em caixas individuais, sem exercício voluntário (**I**, n = 10). Os ratos do segundo grupo foram alocados em caixas individuais com acesso livre a roda de corrida (**IR**, n = 10), 24 h/dia, 7 dias/semana. Ato contínuo, durante três semanas, ambos os grupos foram adaptados a correr na esteira. Aplicaram-se testes comportamentais 36 dias após o início do experimento tais como, campo aberto (**CA**), labirinto em Cruz Elevado (**LCE**) e labirinto aquático de Morris (**LA**). Após as avaliações comportamentais os ratos foram submetidos a dois testes de esforço máximo com intervalo de duas semanas entre eles (**T_{máx-1}** e **T_{máx-2}**). Quantificaram-se lactato e glicose plasmáticos. Aplicou-se análise de variância de uma via. Em relação aos testes comportamentais houve aumento da locomoção do grupo **I** no **CA**. Na análise intragrupos, em ambos os grupos, houve redução do tempo de permanência no braço aberto, na repetição realizada no **LCE**. Não foram encontradas diferenças no **LA**. No desempenho e velocidade máxima do **T_{máx-1}**, o grupo **IR** teve maiores resultados. Quando realizado correlação de Pearson houve resposta positiva entre o lactato basal e a permanência dos ratos no braço aberto do **LCE**. Ratos **IR** melhoraram a adaptação e o desempenho atlético na esteira, sem alterar respostas comportamentais importantes. A roda de corrida para roedores pode ser utilizada como enriquecimento ambiental em gaiolas para modelos experimentais.

Palavras-chaves: Enriquecimento ambiental, Ansiedade, Desempenho, Lactato, Roda de corrida

EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY ON PERFORMANCE AND BEHAVIORAL RESPONSES IN RATS

ABSTRACT

Social isolation (SI) can be a highly stressful condition. The changes associated with the SI can be mitigated or even reversed by changes in the environment. Measures for environmental enrichment (EE) can be implemented through exposure to motor stimuli. Physical activity can be considered one of the main means of EE, being able to prevent behaviors related to depression and anxiety. The objective was to evaluate whether voluntary exercise can increase athletic capacity and reduce possible behavioral changes induced by IS. Twenty 35-day-old rats were divided into two groups. The first group, remained exclusively in individual boxes, without voluntary exercise (I, n = 10). The rats of the second group were placed in individual boxes with free access to the running wheel (IR, n = 10), 24 h / day, 7 days / week. Continuous for three weeks, both groups were adapted to run on the treadmill. Behavioral tests were applied 36 days after the beginning of the experiment, such as open field (OF), elevated plus maze (EPM), and Morris water maze (MWM). After the behavioral evaluations, the rats were submitted to two tests of maximum effort with an interval of two weeks between them (Tmax-1 and Tmax-2). Plasma lactate and glucose were quantified. One-way analysis of variance was applied. Regarding behavioral tests, there was an increase in group I locomotion in the OF. In the intragroup analysis, in both groups, there was a reduction in the time spent in the open arm, in the repetition performed in the EPM. No differences were found in MWM. In the performance and maximum speed of Tmax-1, the IR group had greater results. When Pearson's correlation was performed, there was a positive response between the basal lactate and the permanence of the rats in the open arm of the EPM. IR rats improved fitness and athletic performance on the treadmill, without altering important behavioral responses. The rodent racing wheel can be used as environmental enrichment in cages for experimental models.

Keywords: Environmental enrichment, Anxiety, Performance, Lactate, Running wheel

LISTA DE ABREVIATURAS

CA - Campo aberto

LCE – Labirinto em cruz elevada

LA – Labirinto aquático de Morris

I – Grupo isolamento sedentário

IR – Grupo isolamento com roda de exercício

EBA – Frequência de entrada em braço aberto

EBF – Frequência de entrada em braço fechado

TBA – Tempo de permanência em braço aberto

Tmáx – Teste de esforço máximo

Tmáx-1 – Primeiro teste de esforço máximo

Tmáx-2 – Segundo teste de esforço máximo

D – Desempenho

I1 – Grupo I primeira repetição do teste

I2 – Grupo I segunda repetição do teste

IR1 – Grupo IR primeira repetição do teste/coleta

IR2 – Grupo IR segunda repetição do teste/coleta

IS – Isolamento social

SNC – Sistema nervoso central

Vmáx – Velocidade máxima

EA – Enriquecimento ambiental

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

A sociabilidade entre indivíduos pode produzir interações sociais positivas importantes para o desenvolvimento e bem-estar animal, sendo que a ausência do comportamento social é relacionada com enfermidades físicas e mentais. Neste sentido, vários animais de laboratório, incluindo roedores, são gregários e o isolamento social (IS) pode alterar seu comportamento. Ademais, estudos clínicos frequentemente utilizam roedores como modelo experimental, particularmente da linhagem Wistar. Entretanto, os resultados sobre os efeitos da restrição do comportamento social de roedores alojados em gaiolas são controversos.

Em ambiente laboratorial é possível submeter roedores a testes de comportamento tais como, Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e Labirinto Aquático de Morris, nos quais variações nos comportamentos exploratórios podem ser indicativos de medo e ansiedade, bem como revelar a capacidade de aprendizado e memória. Tais testes comportamentais são bem consolidados na experimentação animal e estudos especificamente sobre IS mostraram que a privação do comportamento social induziu aumento de ansiedade detectada a partir da aplicação destes testes (McCool; Chappel, 2009). Além disso, outros estudos reportaram depleção do neurotransmissor serotonina mensurada por meio do aumento do consumo de sacarose em ratos submetidos ao IS (Hong et al., 2012). Por outro lado, o IS induzido após o desmame, associado ao enriquecimento ambiental (EA) de ratos Wistar, não alterou a atividade exploratória dos animais (Tanás et al., 2015).

Sabe-se que o exercício beneficia o corpo melhorando as funções fisiológicas e cognitivas. Em relação às alterações comportamentais, alguns estudos associaram redução de ansiedade relacionada à prática de exercício físico. Entretanto, alguns fatores influenciaram os achados científicos, especialmente a idade dos ratos, tipo e intensidade do exercício (Hefner; Holmes, 2007).

No que tange à idade dos animais, diversos estudos em roedores evidenciaram que quando atividade física precoce é aplicada, em idade juvenil,

pode-se prevenir doenças melhorando a neurogênese, além de induzir hipertrofia e hiperplasia muscular protegendo o organismo a longo prazo. Além disso, esta prática pode promover alterações na musculatura e estrutura óssea, prevenindo dores e desgastes, associada também com redução do comportamento ansioso, avaliado por meio de testes comportamentais como o CA e LCE (Cartee et al., 2016; Radahmadi et al., 2015; Spirduso et al., 1988). Sheahan et al., (2015) mostraram que o exercício voluntário apresentou maior quantidade e intensidade de benefícios. Assim, cada vez mais pesquisadores têm trabalhado com exercício voluntário em roda de corrida que, além de apresentar melhores resultados, simula melhor a fisiologia humana. Okudan e Belviranlı (2017), usando protocolo de roda de exercício apontaram seu efeito ansiolítico por meio de testes comportamentais. Também, estudo avaliou exercício voluntário em ratos socialmente isolados com diferentes protocolos também obteve resultados que indicam diminuição do estresse provocado pelo exercício (Mazur et al., 2017).

A literatura sobre roedores também traz informações sobre a prática de exercício involuntário igualmente conhecido como exercício forçado, especialmente em esteira. Na utilização das esteiras em protocolos experimentais de exercício em roedores, a adaptação de ratos Wistar a estes dispositivos pode ser considerada fator limitante (Gobatto et al., 2001; Contarteze et al., 2007). Estudo recente do nosso grupo de pesquisa (Moranza et al., 2017) atingiu taxa de 75% de adaptação dos ratos Wistar, enquanto Gobatto et al., (2001) obtiveram 61% de seus animais adaptados ao exercício em esteira. Mesmo com a aparente dificuldade de se adaptar ratos Wistar ao exercício involuntário em esteira, poucos artigos relatam este problema ou indicam em sua metodologia qual foi o protocolo para a adaptação dos animais antes dos testes em esteira (Toval et al., 2020).

A esteira é frequentemente empregada para realização de testes de esforço para avaliação da aptidão física, também conhecida, em termos gerais, como condicionamento físico. Existem muitos estudos que utilizaram na metodologia a associação entre variáveis relacionadas ao desempenho atlético e ao comportamento. Assim, ratos diabéticos e controle que se exercitaram em intensidade moderada na esteira (15m/min; 5°; 30 min) por 5 semanas. O

comportamento tipo ansiedade avaliado pelos testes CA e LCE conclui-se que ratos diabéticos revelaram sinais de ansiedade leve, sendo que o treinamento físico reduziu o comportamento semelhante à ansiedade, tanto em diabéticos como nos ratos hígidos (Caliskan, et al., 2019).

A nossa hipótese foi que o IS altera o comportamento, bem como o exercício voluntário em roda pode mitigar estas alterações. Assim, para se avaliar possíveis alterações comportamentais, na presente pesquisa foram utilizados testes comportamentais amplamente difundidos na literatura, que avaliam ansiedade e capacidade exploratória, que são os testes CA e o LCE, além do labirinto aquático de Morris para avaliação da memória espacial. Para análise da aptidão física foram aplicados teste de esforço máximo em esteira onde foram avaliados o desempenho, velocidade máxima e lactato e glicose plasmática.

2. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar se a atividade física voluntária com uso de roda pode aumentar a capacidade atlética e atenuar possíveis modificações comportamentais provocadas pelo isolamento social e exercício involuntário.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar variáveis comportamentais tais como ansiedade, comportamento exploratório e o medo inato de roedores a lugares altos e abertos, bem como a memória espacial e mensurar a lactatemia produzida após testes de esforço máximo em esteira.

3. Revisão de literatura

3.1 Exercício

Exercício pode ser definido como atividade física planejada, estruturada, repetitiva e intencional (McArdle et al., 1998), caracterizado por gerar trabalho muscular e quantificado por variáveis tais como força, trabalho, potência ou velocidade de progressão, indicadores amplamente utilizadas em treinamentos físicos (Foss; Keteyan, 2000). O estímulo gerado pelo exercício induz estresse fisiológico para o organismo, caracterizado pela elevação das catecolaminas devido ao incremento da demanda fisiológica e energética (Nóbrega et al., 2006).

Convém destacar que o termo “estresse” descreve resposta inespecífica do organismo aos desafios, como situações que requerem ou potencialmente exigem que o indivíduo lute ou fuja, para lidar com condições ambientais adversas tais como temperaturas extremas ou para enfrentar desafios psicológicos (Borstel et al., 2017). Dentro deste conceito, o rompimento transitório da homeostase, produzida pelo exercício, provoca resposta do sistema nervoso central que eleva o tônus simpático periférico, causa liberação de catecolaminas, notadamente adrenalina, pela medula da adrenal, que atua sobre todos os sistemas fisiológicos tais como o cardiorrespiratório, metabolismo, hepático entre outros (Sales et al., 2019).

Não obstante, a prática crônica de exercício está relacionada à diversos benefícios associados ao sistema nervoso central (SNC) tais como, aumentar o aprendizado, a capacidade da memória em geral (Adlard; Cotman, 2004; Vaynman et al., 2004,) e a neurogênese (Van Praag et al., 1999; Holmes et al., 2004; Eadie et al., 2005). Ademais, alguns estudos mostraram que a prática de exercício possui potencial para prevenir enfermidades neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (Smith; Zigmond, 2003; Tillerson et al., 2003), a demência, a doença de Alzheimer (Cotman; Berchtold, 2002; Keloglan et al., 2019, Yu et al., 2006) e acidente vascular cerebral isquêmico (Stummer et al., 1994; Ding et al., 2006).

Sessões moderadas de exercício aeróbio podem melhorar amplamente a cognição durante toda a vida (Merritt; Rhodes, 2016), sendo que a atividade

física contínua pode elevar o desempenho de aprendizagem em ratos jovens, bem como em idosos e linhagens diferentes, além, do aumento da proliferação de neurônios (Van Praag et al., 1999; Fordyce; Farrar 1991). Ademais, modelos experimentais com roedores também descobriram que certas regiões do hipocampo aumentaram como resultado do exercício de correr em rodas (Merritt; Rhodes 2016).

Segundo Uysal et al (2015) exercício voluntário em roedores adolescentes de ambos os sexos promoveu impacto positivo não apenas no seu comportamento e condição orgânica geral, mas no próprio desempenho para realizar o exercício, visto que os roedores passaram a correr maiores distâncias, tendo impacto maior em fêmeas, principalmente na prevenção do desenvolvimento dos sintomas de depressão, da perda de memória e de células do hipocampo. Tal-krivisky et al (2015) demonstrou que, em roedores, o exercício voluntário teve bons resultados relacionados a alterações de humor e à manutenção do ciclo circadiano. Outros autores mostraram que a longo prazo desse tipo de exercício, apresentou benefícios no envelhecimento, tais como o atraso na atrofia muscular; redução da progressão de doenças crônicas, tais como cardiovasculares e metabólicas; manutenção e melhoram das funções cognitivas e motoras, além de melhor adaptabilidade ao estresse (Cartee et al, 2016; Mychasiuk et al, 2016; Shen et al, 2017).

3.2 Glicose e lactato

A realização de exercício depende do funcionamento de inúmeros músculos. A energia necessária para contração muscular é obtida a partir da hidrólise da ATP, com consequente liberação de fosfato inorgânico. O metabolismo anaeróbio de glicose, apesar de relativamente menos eficaz que o aeróbio, onde a produção de ATP é muito mais eficiente do ponto de vista da sua quantidade de produção, representa importante e rápida ferramenta de geração de energia. Quando a utilização de energia pela musculatura esquelética excede a capacidade de produção de ATP, a glicólise anaeróbia é estimulada, aumentando a produção de piruvato e lactato (Sales et al., 2019). O lactato não é apenas um produto residual do metabolismo celular, mas também

atua como substrato energético para a musculatura esquelética. Recentemente, revelou-se a possibilidade de os neurônios o utilizarem para a produção de energia e como neurotransmissor (De Oliveira et al., 2010). Assim, na presente dissertação nós utilizamos a concentração plasmática de lactato como indicador da utilização do metabolismo anaeróbio.

A glicose é normalmente quantificada devido a sua dinâmica durante o exercício para o fornecimento de substrato energético para musculatura esquelética. Assim, a glicemia pode variar de acordo com a necessidade de cada animal (Toval et al., 2020). Desta maneira, a glicemia pode ser o principal substrato energético que pode ser utilizado tanto pelo sistema nervoso central (Powers, 2000), bem como pela fibra muscular esquelética durante o exercício (Sales et al., 2019).

Embora possa ocorrer hiper ou hipoglicemia dependendo da intensidade e duração do exercício (Ferraz et al., 2008), geralmente tanto em seres humanos, cavalos, cães e roedores, durante esforço intenso, verifica-se incremento da biodisponibilidade de glicose (Simões et al., 1999; Ferraz et al., 2008; Cunha et al., 2009; Restan, et al., 2019). Tal fato está relacionado ao aumento da atividade de hormônios que regulam o metabolismo energético tais como as catecolaminas e glucagon que, ao serem liberados, provocam glicogenólise e neoglicogênese hepática, elevando a concentração de glicose plasmática.

3.3 Testes comportamentais

3.3.1 Campo Aberto (CA)

A partir de uma visão geral, métodos utilizados para avaliação comportamental de roedores são frequentemente empregados para determinação da emocionalidade, sendo que o teste de CA é classicamente utilizado para esta finalidade. O teste de CA, também conhecido como “*Open Field*”, foi desenvolvido por Hall (1934). Este teste tornou-se um dos instrumentos mais comumente utilizado na psicologia animal, bem como para avaliação de dor somática, sendo método simples com ampla aplicabilidade em diversos modelos experimentais (Geerse, et al., 2006). O teste do campo aberto mensura

alterações comportamentais dos indivíduos experimentais, colocados numa arena restrita por uma parede circular. Cada rato é colocado, individualmente, no centro da arena, e observadores “cegos” quanto aos tratamentos fazem a avaliação dos animais (Souza et al., 2006).

Assim, o teste de CA é utilizado para avaliar ansiedade e comportamento exploratório de ratos frente ao ambiente não familiar, com intuito de avaliar modificações comportamentais (Okudan et al., 2017; Belviranli et al., 2017; Ho et al., 2002). O teste de campo aberto consiste na medição do comportamento provocado pela colocação do rato em espaço novo e aberto. As variáveis indicativas do estado emocional frequentemente analisadas são a locomoção, levantar sobre duas patas (*rearing*), autolimpeza (*grooming*), tempo imóvel, defecação e micção. As variáveis mais comumente utilizadas como indicadores do estado emocional do animal são defecação e locomoção, onde alta reatividade emocional é geralmente inferido a partir de alta taxa de defecação, baixa atividade locomotora ou ambas, enquanto o padrão oposto sugere que o animal apresenta emocionalidade reduzida (Geerse, et al., 2006).

3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Desenvolvido por Handley e Mithani em 1984, o teste do Labirinto em Cruz Elevado é baseado na aversão inata de roedores a lugares abertos e altos e no conflito de aproximação-esquiva (Lister, 1990; File, 1990). O LCE é um labirinto consistido por dois braços abertos e dois braços fechados numa altura de aproximadamente 60 cm. Nos braços abertos, o roedor está sujeito à ansiedade induzida pela altura e ambiente novo. Entretanto, nos braços fechados, o animal não pode ver o ambiente, sentido segurança. O principal princípio do teste LCE é induzir comportamento semelhante ao da ansiedade por meio da aversão ao espaço aberto e, em menor grau, medo da altura. Um aumento tanto no tempo de permanência no braço aberto como no número de entradas no braço aberto pode ser interpretados como declínio no comportamento semelhante à ansiedade (Caliskan et al., 2019). Estes últimos autores realizaram um estudo onde ratos diabéticos e não diabéticos foram submetidos a treinamento físico na esteira. Após o período de treino, ao realizar LCE o tempo de permanência e

entradas totais no braço aberto foi maior no grupo que realizou treino. No entanto, nos ratos diabéticos treinados foi atenuado. O tempo de braço aberto ainda foi maior nos ratos diabéticos submetidos ao treino quando comparado os ratos diabéticos sedentários. Entretanto, a intensidade do efeito ansiolítico, no grupo diabético que treinou, foi menor em comparação aos animais não diabéticos.

3.3.3 Labirinto Aquático de Morris

O teste do Labirinto Aquático de Morris é utilizado para avaliar a capacidade de memória espacial em ratos. Ele consiste em uma piscina circular onde uma plataforma de vidro é colocada em local fixo, ficando submersa. Para que a água da piscina fique turva e consequentemente esconda a plataforma, é utilizado leite em pó ou outra substância que deixe a água turva. (Cassilhas et al., 2016; Wang et al., 2016). Camundongos, diferentes geneticamente, das cepas B6, 129S1, B6D2F1, D2 e B6129F1) foram submetidos a exercício voluntário em roda. Eles apresentaram neurogênese do hipocampo e aprendizado no labirinto aquático (Merritt; Rhodes, 2016).

4. Referências

ADLARD, P. A.; PERREAU, V. M.; ENGESSER-CESAR, C.; COTMAN, C. W. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. **Neuroscience Letters**, v. 363, n. 1, p. 43-48, 2004.

BELVIRANLI, M.; OKUDAN, N.; KABAK, B. The effects of acute high-intensity interval training on hematological parameters in sedentary subjects. **Medical Sciences**, v.5, n. 3, p. 15, 2017.

BORSTEL, U. K.; VISSER, E. K.; HALL, C. Indicators of stress in equitation. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 190, p. 43-56, 2017.

CALISKAN, H.; CALISKAN, H.; AKAT, F.; TATAR, Y.; ZALOGLU, N.; DURSUN, A. D.; BASTUG, M.; FICICILAR, H. Effects of exercise training on anxiety in diabetic rats. **Behavioural brain research**, v. 376, p. 112084, 2019.

CARTEE, G. D.; HEPPLER, R. T.; BAMMAN, M. M.; ZIERATH, J. R. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1034-1047, 2016.

CASSILHAS, R. C.; TUFIK, S.; DE MELLO, M. T. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 5, p. 975-983, 2016.

CONTARTEZE, R. V. L.; MANCHADO, F. D. B.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. D. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 3, p. 169-174, 2007.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.

CUNHA, R.R.; DE CARVALHO CUNHA V.N.; SEGUNDO, P.R.; MOREIRA, S.R.; KOKUBUN, E.; CAMPBELL, C.S.G.; JACÓ DE OLIVEIRA, R.; SIMÕES, H.G. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 27, n. 6, p. 351-357, 2009.

DE OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, N. M. D.; ARANTES, P. M. M.; ALENCAR, M. A. Qualidade de vida em idosos que praticam atividade física-uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 13, n. 2, p. 301-312, 2010.

DING, Q.; VAYNMAN, S.; AKHAVAN, M.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 823-833, 2006.

EADIE, B. D.; REDILA, V. A.; CHRISTIE, B. R. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. **Journal of Comparative Neurology**, v. 486, n. 1, p. 39-47, 2005.

FERRAZ, G. C.; D'ANGELIS, F. H. F.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; FREITAS, E. V. V.; LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 256-259, 2008.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**, p. 25-44, 1992.

FORDYCE, D. E.; FARRAR, R. P. Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. **Behavioural brain research**, v. 43, n. 2, p. 115-123, 1991.

FOSS, M. L.; KETEYIAN, S. J. **Fox: Bases Fisiológicas do Exercício e do Esporte**. Guanabara Koogan, 2000.

GEERSE, G.J.; VAN GURP, L. C.; WIEGANT, V. M.; STAM, R. Individual reactivity to the open-field predicts the expression of stress-induced behavioural and somatic pain sensitisation. **Behavioural brain research**, v. 174, n. 1, p. 112-118, 2006.

GOBATTO, C. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; LUCIANO, E.; KOKUBUN, E.; MELLO, M. A. R. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos Wistar. **Motriz**, v. 7, n. 1, p. S57-S62, 2001.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptoragonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HEFNER, K.; HOLMES, A. An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 2, p. 311, 2007.

HOLMES, M. M.; GALEA, L. A.; MISTLBERGER, R. E.; KEMPERMANN, G. Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: Circadian and dose-dependent effects. **Journal of Neuroscience Research**, v. 76, n. 2, p. 216-222, 2004.

HONG, S.; FLASHNER, B.; CHIU, M.; VER HOEVE, E.; LUZ, S.; BHATNAGAR, S. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 2, p. 269-275, 2012.

KELOGLAN, S.; SAHIN, L.; CEVIK, O.S. Long-term treadmill exercise upregulated hippocampal learning-related genes without improving cognitive behaviour in socially isolated rats. **Folia Morphologica**, v. 78, n. 4, p. 668-675, 2019.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

MAZUR, F.G.; OLIVEIRA, L. F. G.; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. S.; PÉRTILE, R. A. N.; VENDRUSCOLO, L. F.; IZÍDIO, G. S. Effects of physical exercise and social isolation on anxiety-related behaviors in two inbred rat strains. **Behavioural processes**, v. 142, p. 70-78, 2017.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Atividade física, saúde e envelhecimento. **Fisiologia Do Exercício–Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 605-36, 1998.

MCCOOL, B. A.; CHAPPELL, A. M. Early social isolation in male Long-Evans rats alters both appetitive and consummatory behaviors expressed during operant ethanol self-administration. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 2, p. 273-282, 2009.

MERRITT, J. R.; RHODES, J. S. Mouse genetic differences in voluntary wheel running, adult hippocampal neurogenesis and learning on the multi-strain-adapted plus water maze. **Behavioural brain research**, v. 280, p. 62-71, 2015.

MORANZA, H. G.; SCANAVACA JUNIOR, L.; MATAQUEIRO, M. I.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. C. Chronic administration of Bauhinia forficata link reduced exploratory activity without affecting blood glucose in healthy rats. Plant. Special Issue: **Phytotherapy**, v. 5, n. 5-1, pp. 27-32, 2017.

MYCHASIUK, R.; HEHAR, H.; MA, I.; CANDY, S.; ESSER, M. J. Reducing the time interval between concussion and voluntary exercise restores motor impairment, short-term memory, and alterations to gene expression. **European Journal of Neuroscience**, v. 44, n. 7, p. 2407-2417, 2016.

NÓBREGA, A. C. L. O conceito de efeitos sub agudos do exercício. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. Rio de Janeiro**, v. 20, n. 5, p. 85-86, 2006.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M. Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. **Neuroscience**, v. 360, p. 1-8, 2017.

POWERS, K. S. Metabolismo do Exercício. In: **Fisiologia do Exercício – Teoria e aplicação ao condicionamento ao desempenho**. Flórida: University of Flórida, p.45 v.3, 2000.

RADAHMADI, M.; ALAEI, H.; SHARIFI, M. R.; HOSSEINI, N. Effect of forced exercise and exercise withdrawal on memory, serum and hippocampal corticosterone levels in rats. **Experimental Brain Research**, v. 233, n. 10, p. 2789-2799, 2015.

RESTAN, A. Z.; DA SILVA, S. B.; CERQUEIRA, J. A.; CARFIOFI, A. C.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. C. Lactate and glucose thresholds and heart rate deflection points for Beagles during intense exercise. **American journal of veterinary research**, v. 80 n. 3, p. 284-293, 2019.

SALES, M. M.; SOUSA, C. V.; DA SILVA AGUIAR, S.; KNECHTLE, B.; NIKOLAIDIS, P. T.; ALVES, P. M.; SIMÕES, H. G. An integrative perspective of the anaerobic threshold. **Physiology & Behavior**, v. 205, p. 29-32, 2019.

SHEAHAN, T. D.; COPITS, B. A.; GOLDEN, J. P.; GEREAU IV, R. W. Voluntary exercise training: analysis of mice in uninjured, inflammatory, and nerve-injured pain states. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133191, 2015.

SHEN, Y.; HUANG, G.; MCCORMICK, B. P.; SONG, T.; XU, X. Effects of high-intensity interval versus mild-intensity endurance training on metabolic phenotype and corticosterone response in rats fed a high-fat control diet. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0181684, 2017.

SIMÕES, H. G.; CAMPBELL, C. S. G.; KOKUBUN, E.; DENADAI, B. S.; BALDISSERA, V. Blood glucose responses in humans mirror lactate responses

for individual anaerobic threshold and for lactate minimum in track tests. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 80, n. 1, p. 34-40, 1999.

SMITH, A. D.; ZIGMOND, M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism☆. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 1, p. 31-39, 2003.

SOUZA, J. P.; NOGUEIRA, G. M.; MATAQUEIRO, M. I.; QUEIROZ-NETO, A. Atividade colinesterásica cerebral e comportamento de ratos após exposição perinatal ao diclorovós. **Ciência Rural**, p. 501-508, 2006.

SPIRDUSO, W. W.; MACRAE, H. H.; MACRAE, P. G.; PREWITT, J.; OSBORNE, L. Exercise effects on aged motor function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 515, n. 1, p. 363-375, 1988.

STUMMER, W.; WEBER, K.; TRANMER, B.; BAETHMANN, A.; KEMPSKI, O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. **Stroke**, v. 25, n. 9, p. 1862-1869, 1994.

TAL-KRIVISKY, K.; KRONFELD-SCHOR, N.; EINAT, H. Voluntary Exercise enhances activity rhythms and ameliorates anxiety-and depression-like behaviors in the sand rat model of circadian rhythm-related mood changes. **Physiology e Behavior**, v. 151, p. 441-447, 2015.

TANAŚ, L.Z; OSTASZEWSKI, P; IWAN, A. Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. **Acta Neurobiol Exp**, Varsóvia, v. 75, p. 72-79, 2015.

TILLERSON, J. L.; CAUDLE, W. M.; REVERON, M. E.; MILLER, G. W. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

TOVAL A, et al. Hypothalamic Crh/Avp, plasmatic glucose and lactate remain unchanged during habituation to forced exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

UYSAL, N.; et al. Effectsofvoluntary and involuntaryexercise on cognitivefunctions, and VEGF and BDNF levels in adolescentrats. **Biotechnice Histochemistry**, v. 90, n. 1, p. 55-68, 2015.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 2580-2590, 2004.

YU, F.; KOLANOWSKI, A. M.; STRUMPF, N. E.; ESLINGER, P. J. Improving cognition and function through exercise intervention in Alzheimer's disease. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 38, n. 4, p. 358-365, 2006.

WANG, X. Q.; WANG, G. W. Effects of treadmill exercise intensity on spatial working memory and long-term memory in rats. **Life Sciences**, v. 149, p. 96-103, 2016.

CAPÍTULO 2 – Efeito da atividade física voluntária sobre o desempenho e respostas comportamentais em ratos

1. Introdução

Isolamento social crônico (IS) pode ser condição altamente estressante, com múltiplos efeitos neurocomportamentais em indivíduos da espécie humana, roedores e outros mamíferos. O IS pode provocar modificações endócrinas e comportamentais que resultam em condições clínicas relacionadas a ansiedade e depressão (Brenes et al., 2020). As alterações estruturais e funcionais que produzem estas condições envolvem várias estruturas cerebrais (Mumtaz et al., 2018), incluindo o hipocampo já que este além de atuar no controle hormonal tem um importante papel na memória e aprendizagem (Biggio et al., 2019).

As alterações associadas ao IS podem ser mitigadas ou até mesmo revertidas por mudanças no ambiente. Assim, medidas para o enriquecimento ambiental (EA) podem ser implantadas por meio da exposição sensorial, motora, estimulação cognitiva e social. A literatura revela que o EA pode reduzir a hiperatividade locomotora (Brenes et al., 2008), bem como comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (Brenes et al., 2009). EA também melhorou aprendizagem e memória (Mora-Gallegos et al., 2015), elevando a transmissão serotoninérgica na região do hipocampo e no córtex pré-frontal (Brenes et al., 2009).

O exercício físico pode ser considerado um dos principais meios de EA, sendo capaz de prevenir comportamentos relacionados a depressão e ansiedade, já que possui potencial para induzir alguns efeitos neuroquímicos, notadamente o incremento da neurotransmissão serotoninérgica (Lin; Kuo, 2013). Os resultado de pesquisa recente (Brenes et al., 2020) demonstraram que o EA associado ao exercício físico atenuou efeitos depressivos induzidos por estímulo estressante induzido pelo IS em ratos. Outro estudo revelou que o exercício de natação melhorou distúrbio de humor e comprometimento da memória, aprimorando a neurogênese, a produção de serotonina e inibindo apoptose em ratos com IS durante a adolescência (Park et al., 2020).

Baseado no pressuposto de que o exercício regular pode elevar a neurogênese, vários tipos de exercícios foram estudados (Okudan; Belviranlı, 2017). No entanto, Stranahan et al. (2006) observaram que o IS pode postergar os efeitos positivos induzidos pela roda de exercício voluntário, especificamente a neurogênese adulta. Em roedores, quando avaliados pelo teste de campo aberto (CA) ou labirinto em cruz elevado (LCE), o exercício involuntário na esteira provocou impacto sobre o comportamento, principalmente em fêmeas, que manifestaram maiores sinais de ansiedade. Ao passo que o exercício voluntário em roda pareceu estar associado com menor manifestação de ansiedade (Uysal et al., 2015). Outro estudo investigou o efeito neuroprotetor induzido pelo treinamento físico antes e após o IS (Leser; Wagner, 2015). Ademais, o condicionamento físico em ratos hipertensos, submetidos a exercício voluntário, foi incrementado por meio de ajustes na sinalização intracelular muscular (Lima et al., 2020), sendo que concentrações plasmáticas de lactato e glicose podem ser utilizados como biomarcadores musculares (Toval et al., 2020). Entretanto, até onde nosso conhecimento atingiu, o efeito do exercício voluntário em roda de corrida, sob condições de IS, sobre a aptidão aeróbia mensurado pela velocidade máxima e o comportamento que não foram estudados em ratos na fase de adolescência.

A hipótese do presente estudo é que o exercício voluntário pode aumentar a capacidade atlética e reduzir possíveis modificações comportamentais relacionadas com ansiedade, induzidas pelo isolamento social. Desta forma para se avaliar mudanças comportamentais foram utilizados testes comportamentais, CA e LCE, objetivando avaliar a capacidade exploratória e ansiedade. A memória e capacidade de aprendizado foram testadas por meio do uso da técnica do LA. Testes de esforço máximo em esteira foram aplicados para avaliação dos ajustes fisiológicos por meio da quantificação do desempenho, bem como da lactatemia e glicemia. Este estudo pode contribuir com informações sobre a utilização de roda de corrida em roedores, como enriquecimento ambiental, nos modelos experimentais, notadamente em delineamentos experimentais com exercício e programas de treinamento. A capacidade para habituação na esteira para realização de exercício forçado na esteira também foi avaliada.

2. Material e métodos

2.1 Animais e manejo

O experimento teve a duração de 64 dias, sendo realizado no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) do Laboratório de Farmacologia e Fisiologia do exercício (LAFEQ) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/ UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Utilizaram-se 20 ratos, machos, da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, com 21 dias de idade fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Imediatamente após a chegada ao DMFA os ratos foram submetidos a quarentena durante 21 dias. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura e luz artificial controlada num ciclo de claro:escuro invertido (luzes das 19:00 às 7:00 horas), com acesso à bebedouro de água e a ração para roedores, tendo seu peso quantificado a cada 3 dias até o primeiro teste de esforço.

2.2 Grupos e delineamento experimental

O fluxograma do experimento pode ser visualizado na **Figura 1**. Os ratos com 35 dias de idade foram distribuídos em dois grupos. O primeiro grupo, permaneceu exclusivamente em caixas plásticas individuais (40 x 33 cm), sem roda de exercício voluntário (**I**, n = 10). Já os indivíduos que compuseram o segundo grupo foram alocados em caixas individuais com roda de exercício (**IR**, n = 10). Estes ratos deste grupo permaneceram em gaiolas individuais, com acesso livre à roda de corrida, 24 h/dia, 7 dias/semana (**Figura 2**). Na roda de corrida, as distâncias percorridas foram quantificadas pelo número de voltas registradas por um sensor acoplado na roda voluntária.

Importante ressaltar que, durante os primeiros 15 dias, nenhum grupo andou na esteira. Contudo, neste período, o grupo **I** não realizou atividade espontânea, enquanto o grupo **IR** foi mantido somente na gaiola com roda de corrida. A partir do décimo sexto dia, os ratos dos grupos **I** e **IR** fizeram sessões de treino destinadas à adaptação em esteira rolante específica para roedores, por 3 semanas, sendo que após as sessões em esteira, todos ratos sempre

retornaram às seus respectivos alojamentos. Após o primeiro teste de esforço máximo os ratos do grupo **IR** são retirados permanentemente da gaiola com roda de exercício e passam a ficar em caixas padrões para o período de intervalo até o segundo teste de esforço máximo.

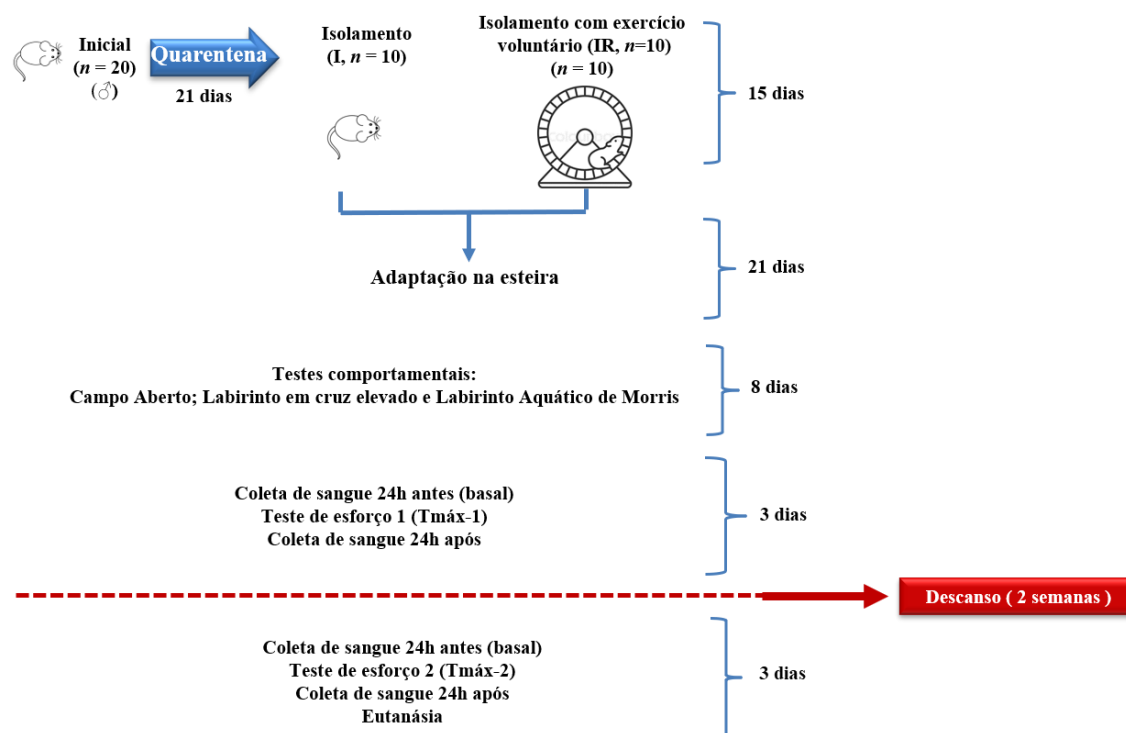


Figura 1. Fluxograma experimental.



Figura 2. Gaiola de exercício voluntário, local onde os ratos do grupo IR ($n=10$) permaneceram durante a fase de adaptação à esteira e testes comportamentais

2.3 Protocolo de habituação à esteira

Todos os animais foram submetidos à habituação na esteira. No primeiro dia desta etapa os ratos foram expostos à esteira desligada, por 15 min, com o intuito de promover habituação destes. No segundo dia os ratos foram submetidos à 5 min de aquecimento à 10m/min seguido de 10 min numa velocidade de 10m/min. A cada dois dias foi incrementado 2 m/min até completar os 21 dias, como revela a **Tabela 1**.

Tabela 1. Protocolo de Adaptação à esteira

Dia	Tempo de aquecimento (min)	Velocidade de aquecimento (m/min)	Tempo de treino (min)	Velocidade do treino (m/min)
1	5	0	10	0
2	5	10	10	10
3	5	10	10	10
4	5	10	10	12
5	5	10	10	12
6	5	10	10	14
7	5	10	10	14
8	5	10	10	16
9	5	10	10	16
10	5	10	10	18
11	5	10	10	18
12	5	10	10	20
13	5	10	10	20
14	5	10	10	22
15	5	10	10	22
16	5	10	10	24
17	5	10	10	24
18	5	10	10	26
19	5	10	10	26
20	5	10	10	28
21	5	10	10	28

2.4 Testes comportamentais

Conforme pode ser visualizado na **Figura 1**, os testes comportamentais foram aplicados 24 h após o período de 21 dias de adaptação à corrida na esteira. Neste período, após a realização de cada teste todos os animais retornaram aos respectivos ambientes, conforme previamente descrito no item 2.2.

2.4.1 Campo Aberto (CA)

O teste CA foi aplicado para avaliação da emocionalidade dos ratos que compuseram os dois grupos experimentais, sempre no período da manhã iniciando às 8 horas. Os animais foram colocados, individualmente, na arena, seguindo a sequência numérica pela qual os ratos foram marcados começando pelo grupo **IR** seguido pelo grupo **I**. A arena foi colocada numa sala separada e as variáveis contabilizadas com o auxílio de uma câmera de vídeo (**Figura 3**). O aparato é constituído de arena circular, com o fundo dividido em parcelas, usadas para quantificar a taxa de movimentação do animal, bem como o número de vezes que este fica em estação, a frequência de levantadas, imobilidade, *grooming* ou autolimpeza, frequência de defecação e micção durante cinco minutos, como indicado por estudo prévio (Omena, 2007). Depois de cada animal a arena é limpa com álcool 5% para remover o cheiro do animal anterior para evitar que influencie o próximo.



Figura 3. Campo aberto (Foto ilustrativa)

2.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Da mesma forma que o CA os ratos foram colocados individualmente iniciando com o grupo **IR** seguindo a mesma ordem. Avaliou-se a frequência de entrada em braços abertos (EBA) e fechados (EBF) e o tempo de permanência (TBA) em cada um deles durante cinco minutos. Este teste foi realizado durante a tarde iniciando sempre às 14 h, também em sala separada, e as avaliações realizadas por meio de câmera de vídeo (**Figura 4**), após cada animal o aparelho foi limpo da mesma forma que foi realizada no CA. O teste foi repedido após 24 horas.

Cabe informar que este equipamento é construído de madeira com braços abertos de 50 cm de comprimento e cerca de 10 cm de largura, e braços fechados, com parede de 40 cm de altura e elevação de 30 a 50 cm em relação ao chão. Os braços se atravessam formando uma cruz. Com a finalidade de se avaliar tolerância ao braço aberto (“one-trial tolerance” phenomenon), fenômeno que ocorre em roedores após exposições subsequentes ao LCE (Tucker; McCabe, 2017). Tal ocorrência é descrita em roedores (ratos e camundongos) após uma primeira exposição ao labirinto, sendo que os animais tendem a reduzir significativamente a exploração dos braços abertos em exposições subsequentes. Desta maneira, com intervalo de 24 h, os ratos dos grupos **I** e **IR** foram expostos duas vezes ao LCE.



Figura 4. Labirinto em cruz elevado (Foto ilustrativa)

2.4.3 Labirinto Aquático de Morris (LA)

Este teste avalia a memória espacial e o aprendizado dos ratos. Para isso, em cada parede foi realizada uma marcação em giz colorido. Foram necessários cinco dias de treino durante o período da manhã. Cada animal foi colocado sempre na mesma borda da piscina começando pelo grupo **IR**. Os animais tiveram 120 segundos para encontrar a plataforma submersa (20 cm de altura) na água turva (foi usado leite em pó) e, caso o tempo passasse sem que a plataforma fosse encontrada, o pesquisador guiava o rato gentilmente a esta, deixando-o permanecer por 10 s. No sexto dia os animais tiveram 120 s para encontrar a plataforma (**Figura 5**) (Muller et al, 2011). Durante todos os dias de treino, incluindo o sexto dia, foram cronometrados os tempos que cada rato levou para encontrar a plataforma.



Figura 5. Labirinto aquático de Morris

2.4.4 Teste de esforço máximo (T_{máx}).

O **T_{máx}-1** foi realizado na esteira um dia depois dos testes comportamentais (**CA**, **LCE** e **LA**). Inicialmente, estabeleceu-se aquecimento (10 m/min), com acréscimo de um metro por minuto a cada dois minutos até 20 m/min. A partir desse ponto o aumento foi de 2m/min, a cada três minutos (**Figura 7**), até que os ratos apresentassem sinais de exaustão, caracterizado quando o rato se recusasse a continuar correndo preferindo encostar na grade de choque (de 1mA) no final da esteira (**Figura 6**). Determinaram-se os tempos de permanência de cada animal, bem como a velocidade máxima em que os ratos atingiram imediatamente antes da exaustão. A esteira usada no experimento foi

uma esteira personalizada com 12 baias para ratos. Contudo, para cada grupo foram usadas 10 baias. Assim, todos os animais de cada grupo correram ao mesmo tempo começando pelo grupo **IR** seguido pelo grupo **I**. Também, os ratos foram pesados antes de cada teste de esforço para possibilitar o cálculo do desempenho (Hohl et al., 2009). Um segundo T_{máx} (**T_{máx}-2**) foi aplicado para verificação da manutenção da aptidão física dos grupos experimentais.

$$D = \sum D_i = \sum m_i \cdot V_i \cdot T_i = \sum m_i \cdot dt_i = m \cdot dt$$

Onde: D= desempenho do rato; D_i= desempenho do rato em cada etapa do teste de desempenho; m= massa do corpo; V_i= velocidade da fase; T_i= duração de corrida da fase; dt_i= distância percorrida na fase; dt= distância total percorrida pelo rato durante o teste.

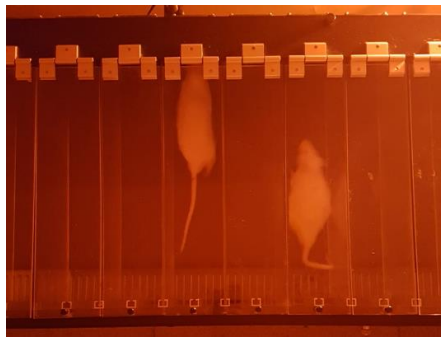


Figura 6. Esteira de exercício para roedores. Os animais estão correndo em pistas separadas.

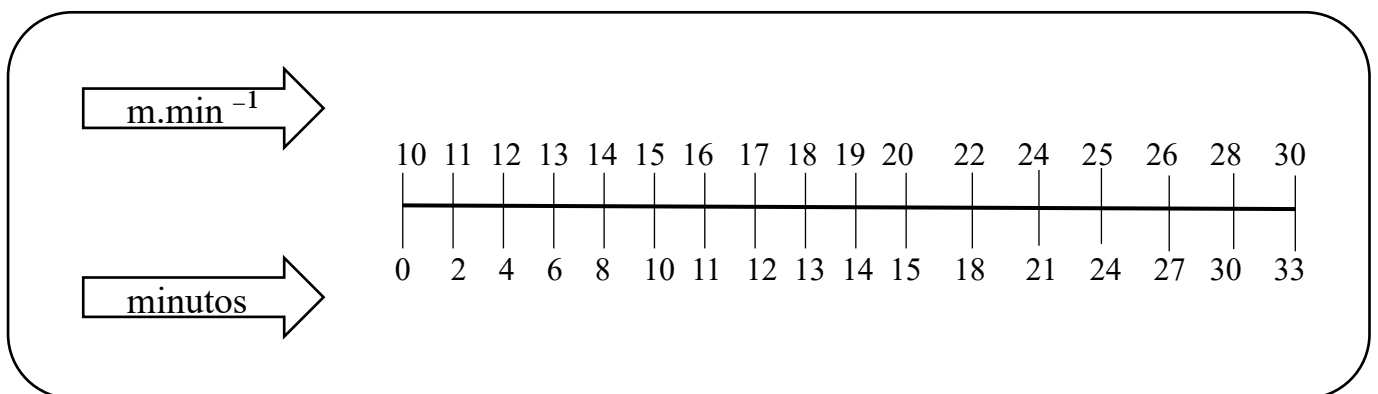


Figura 7. Teste de esforço máximo (T_{máx})

2.4.5 Coleta de sangue

A coleta da amostra sanguínea basal foi realizada com no mínimo 24 horas de antecedência do teste de esforço. Em seguida, houve uma coleta após o T_{máx} e outra coleta 24 horas após do T_{máx}. As coletas de sangue foram realizadas durante o período da manhã entre 8:00 e 11:00 e obtidas da extremidade distal da cauda dos ratos, que foram levemente lancetadas e imediatamente ordenhadas, para obtenção de 200µL de sangue. A amostra sanguínea foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL, contendo solução anticoagulante de 5µL de heparina sódica e 3µL de fluoreto a 1%. Assim, como nos outros testes, iniciou-se com o grupo **IR** e todos os animais de cada grupo tiveram sangue coletado durante este período. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 4° C por 10 min a 4600g para separação do plasma. Este foi utilizado para as quantificações das concentrações plasmáticas de lactato e glicose.

2.4.6 Análise lactato e glicemia

As amostras de plasma coletadas foram analisadas pelo método eletroenzimático em bioanalisador automático (YSI 2300 STAT PLUS, YSI Incorporated, OH, USA) para quantificação do lactato e glicose plasmáticas.

3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Plot 12.0. Para comparação do desempenho (**D**) entre os grupos utilizamos ANOVA de uma via. LCE foi avaliado pelo método de Student-Newman-Keuls. O lactato plasmático nos momentos relacionados ao **T_{máx}-1** e **T_{máx}-2** foram avaliados por análise de variância não paramétrica de Friedman para amostras repetidas no tempo. Quando necessário, foram aplicados os testes de Holm-Sidak para comparação das médias. Os testes t de "student" pareado ou não pareado foram utilizados para comparações intra e inter grupos, respectivamente. Aplicou-se correlação de Pearson entre as variáveis comportamentais e biológicas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Roda de corrida

A **figura 8** revela a quantidade de voltas diárias na fase exclusiva na roda de corrida e na fase de adaptação na esteira. Houve elevação do número de voltas, quando os animais passaram para a fase de adaptação na esteira em conjunção a roda de corrida (**Figura 8 B**).

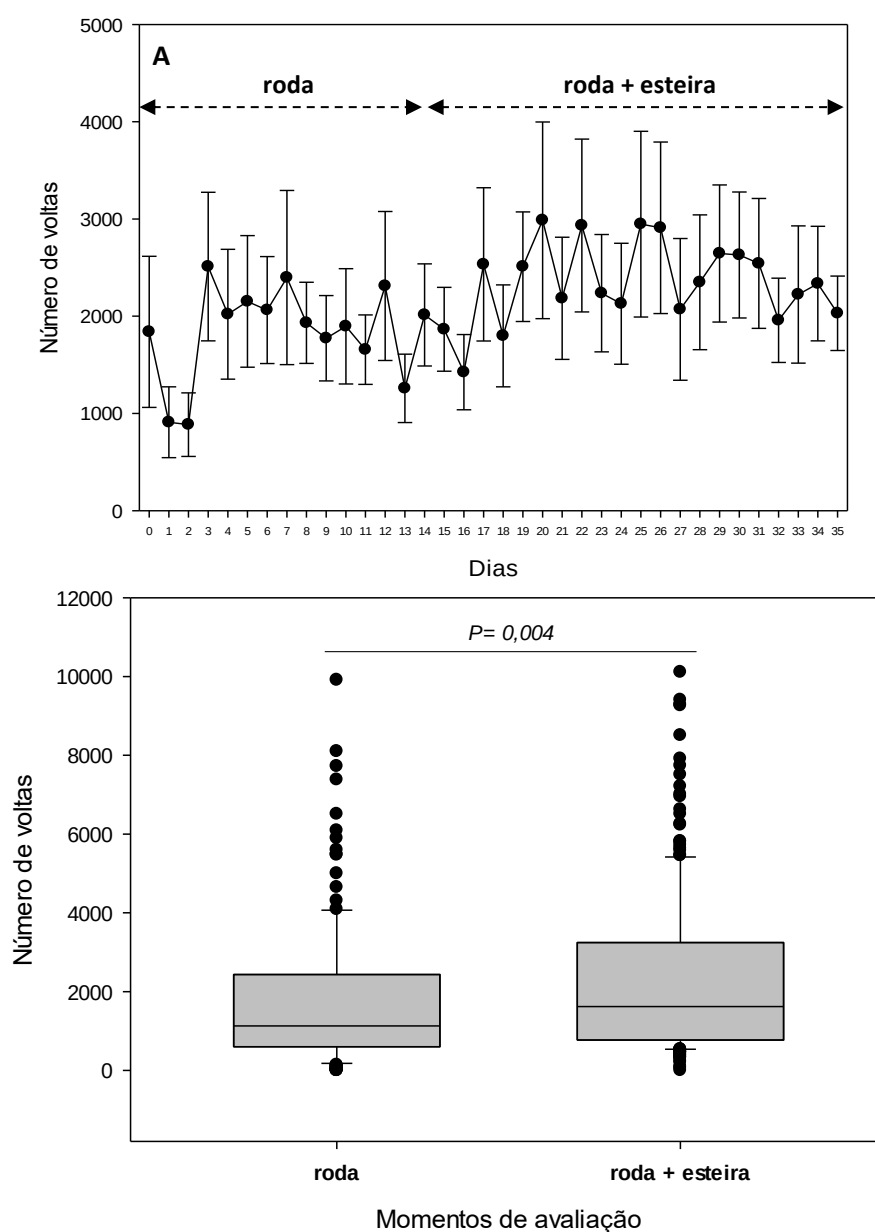


Figura 8. Avaliação da atividade física voluntária diária na roda de corrida de ratos Wistar sob isolamento social. A: avaliação diária; B: comparação entre roda e roda com a fase de adaptação na esteira.

4.2 Quantificação da massa corpórea

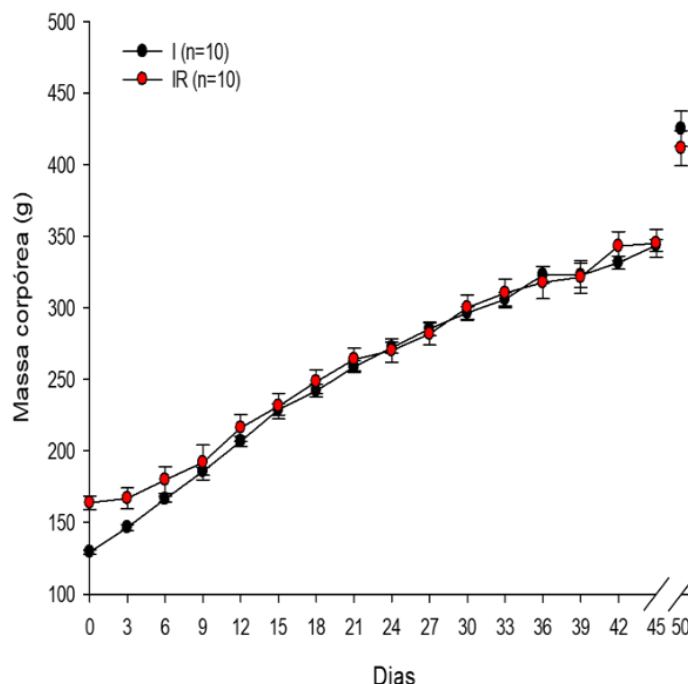


Figura 9. Evolução da massa corpórea de ratos Wistar ao longo do período experimental. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. I= isolamento sedentário; IR= isolamento com exercício voluntário.

A **Figura 9** revela que a massa corpórea aumentou somente ao longo do estudo para ambos os grupos ($P < 0,001$), sendo que não houve diferença entre eles.

4.3 Campo Aberto

O teste de campo aberto é referência clássica para se avaliar a emocionalidade e timidez de roedores. A **Figura 10** revela que a frequência de locomoção do grupo I foi maior em relação ao IR ($p = 0,022$). As demais variáveis, frequência de levantadas, tempo imóvel, *grooming*, defecação e micção não mostraram diferenças entre os grupos. No entanto, o grupo I revelou maior variabilidade individual em relação a medida defecação (**Figura 10 E**).

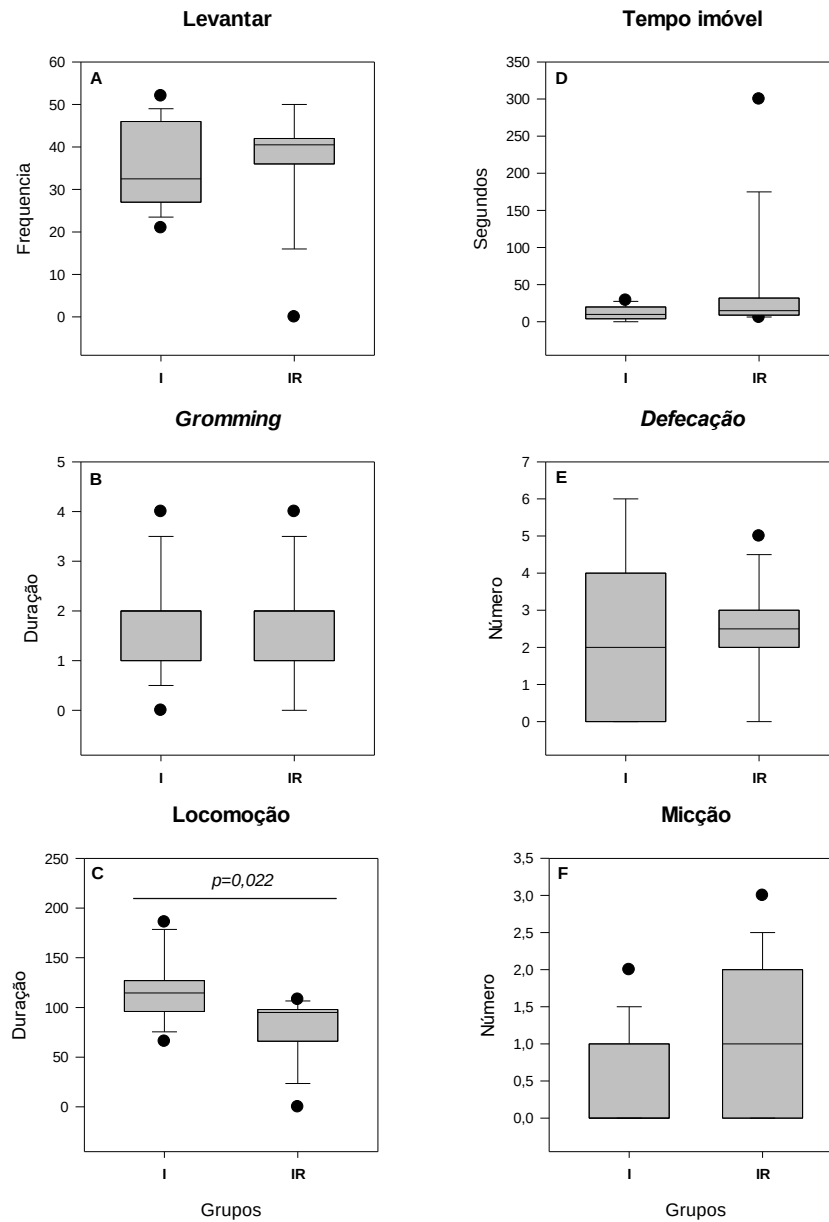


Figura 10. Evolução da massa corpórea de ratos Wistar ao longo do período experimental. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. **I**= isolamento sedentário; **IR**= isolamento com atividade física voluntária.

4.4 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O principal princípio do teste LCE é induzir comportamento semelhante à ansiedade pela aversão do braço aberto e, em menor grau, medo da altura imposta pelo dispositivo. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Porém, na análise intra-grupos, em ambos os grupos, houve redução ($P= 0,007$) do tempo de permanência no braço aberto, na segunda exposição realizada (**Figura11**).

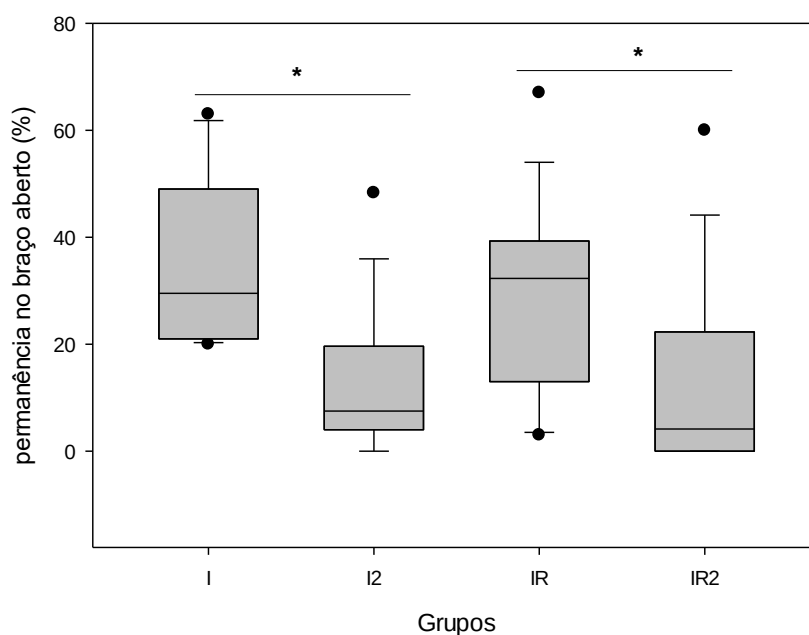


Figura 11. Teste de labirinto em cruz elevado. I= isolamento sedentário; IR= isolamento com atividade física voluntária.

4.5 Labirinto aquático de Morris

Para averiguação da memória espacial em roedores foi aplicado a técnica do labirinto aquático de Morris. Não houve diferença entre os grupos experimentais (**Figura 12**).

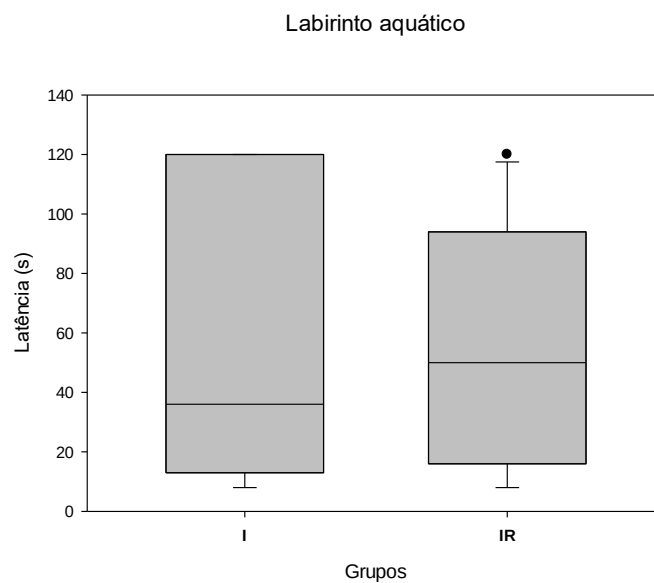


Figura 12. Latência dos ratos no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. **I**= isolamento sedentário; **IR**= isolamento com atividade física voluntária.

4.6 Desempenho, V_{máx}, lactato e glicose

Para avaliação da aptidão física dos ratos foram aplicados dois testes de esforço máximo (**T_{máx-1}** e **T_{máx-2}**), subsequentes, na esteira, com intervalo de duas semanas entre eles. Importante informar que para apresentação dos resultados de desempenho, V_{máx}, lactato e glicose os grupos foram nomeados como **I1**, **I2**, **IR1** e **IR2**, siglas referentes ao **T_{máx-1}** e **T_{máx-2}**, respectivamente. Os níveis de desempenho ficaram entre 96-242 (**T_{máx-1}**), 82-232 (**T_{máx-2}**), 217-456 (**T_{máx-1}**) e 144-259 kg m (**T_{máx-2}**), para os grupos **I** e **IR**, respectivamente. Informação importante, três ratos que compuseram o grupo **I** não correram na esteira, revelando incapacidade de adaptação a este dispositivo. Assim, a amostra apresentada neste item teve *n* amostral de 7 e 10 para os grupos **I** e **IR**, respectivamente. A **Figura 13A e 13 D** revela que os ratos que permaneceram em isolamento social, mas que realizaram atividade física voluntária, apresentaram maior desempenho e velocidade máxima no **T_{máx-1}**, em relação a todas as comparações, incluindo aquelas obtidas no **T_{máx-2}**, sendo que os valores de *P* foram 0,007 para **IR2**, sendo este maior que *P*<0,001 de **I1** e **I2**. **I1** e **I2** não mostraram diferenças entre si (*P*= 0,596). Em relação ao lactato e a glicemia (**Figura 13 B e 13C**), não houve diferença entre os grupos (*P*= 0,11 e 0,138 para o lactato e glicemia, respectivamente). No entanto, tanto para a condição **IR1** e **IR2** houve grande variabilidade nos valores glicêmicos individuais. A **Figura 14 A e B** mostra que nos **T_{máxs}** não houve diferença entre os grupos experimentais antes, após o esforço máximo e 24 h após.

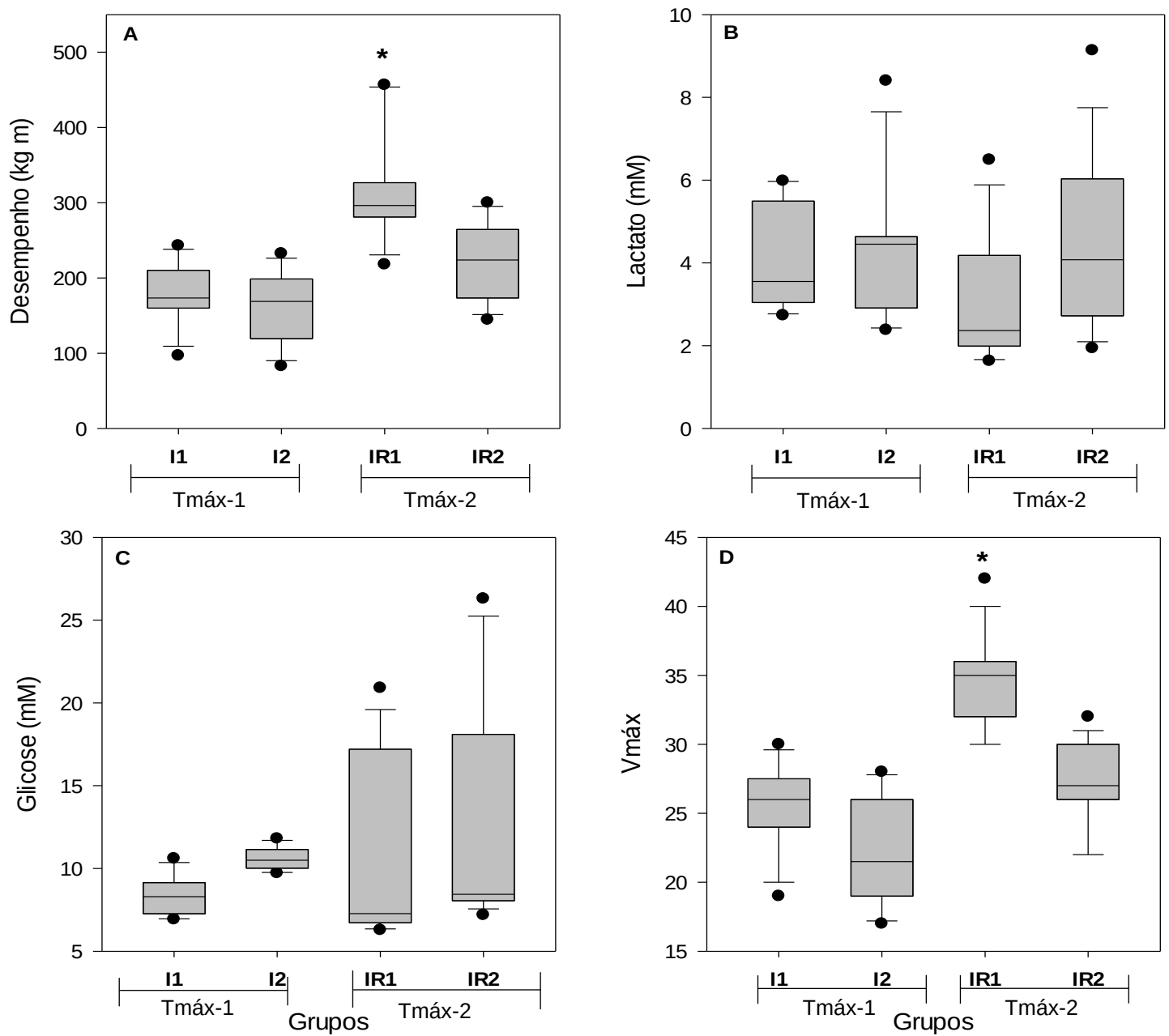


Figura 13. Variáveis de desempenho de ratos submetidos a dois testes de esforço máximo (**Tmáx-1** e **Tmáx-2**) com intervalo de 2 semanas entre eles. **I1**= isolamento sedentário no **Tmáx-1**; **I2**= isolamento sedentário no **Tmáx-2**; **IR1**= isolamento com atividade física voluntária no **Tmáx-1**. **IR2**= isolamento com exercício voluntário no **Tmáx-2**. Tanto o lactato como glicose foram quantificados imediatamente a exaustão, obtida em ambos os Tmáxs. Em A e D, * indica que o desempenho e a Vmáx foram maiores para o grupo IR no Tmáx-1.

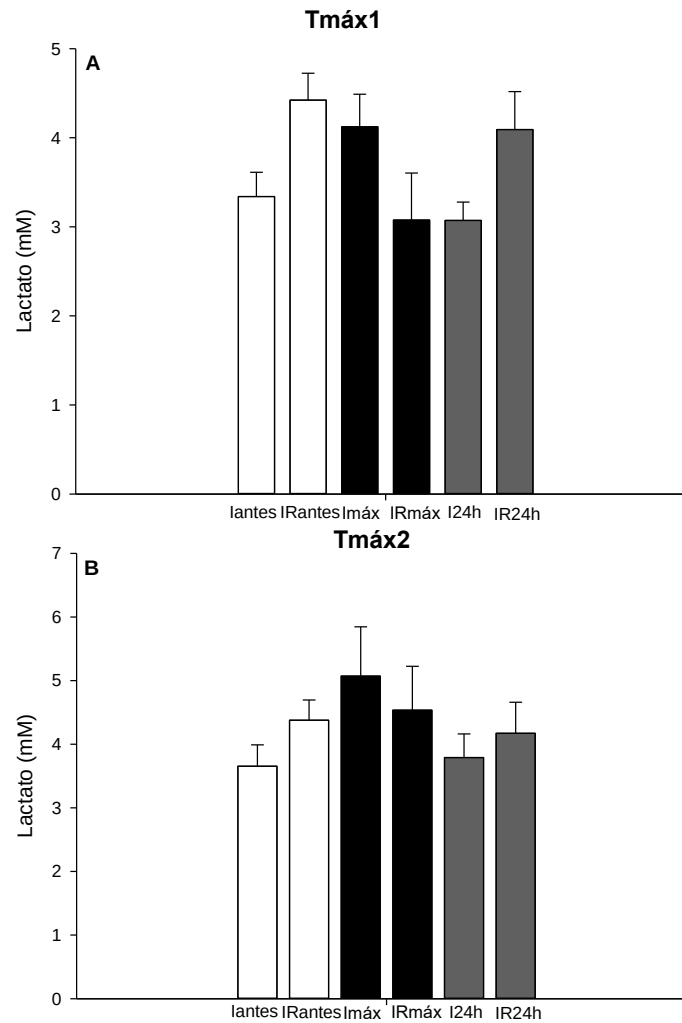


Figura 14. Lactatemia de ratos Wistar submetidos a dois testes de esforço máximo (**Tmáx-1** e **Tmáx-2**) com intervalo de 2 semanas entre eles. **I**= isolamento sedentário; **IR**= isolamento com atividade. O lactato foi quantificado antes, imediatamente a exaustão e 24 h após os Tmáxs.

4.7 Correlações

Objetivando verificar a relação entre as variáveis aqui estudadas foi aplicado correlação de Pearson. Com relação ao teste LCE, com os grupos avaliados conjuntamente, houve correlação positiva entre a variáveis lactato (basal), entradas no braço aberto e tempo de permanência no braço aberto (%) e, negativa com as estradas no braço fechado (**Figura 15**).

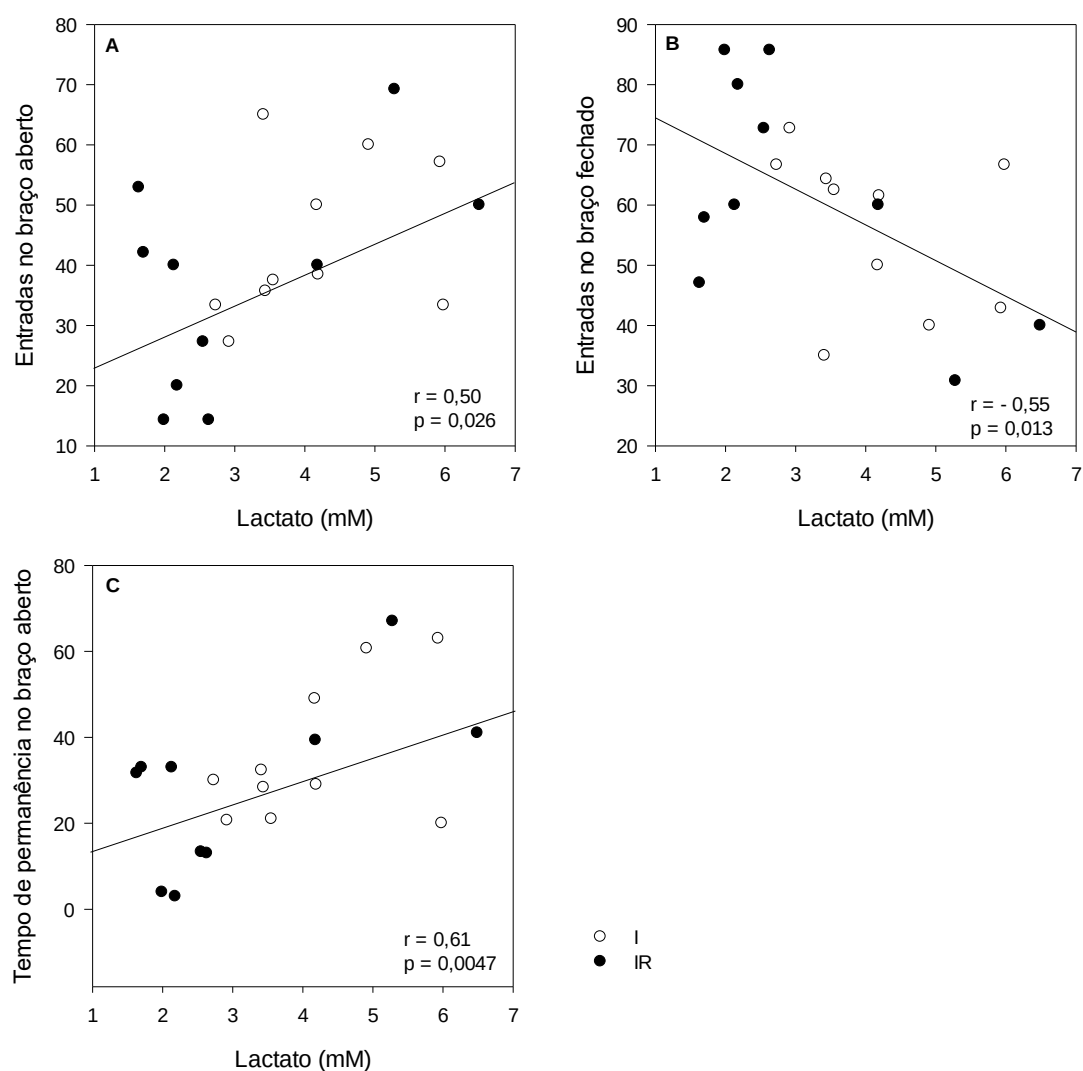


Figura 15. Correlações entre variáveis obtidas na primeira exposição do labirinto de cruz elevada (LCE) e o lactato basal. I= isolamento sedentário; IR= isolamento com atividade física voluntária.

5. Discussão

O principal achado deste estudo foi que ratos em isolamento social e submetidos a atividade física voluntária em roda apresentaram adaptações fisiológicas benéficas como a melhoria do desempenho e da velocidade máxima durante o primeiro teste de esforço máximo em esteira. O grupo **IR** demonstrou menos atividade locomotora e, ambos os grupos reduziram a entrada nos braços abertos. Abordados em conjunto, as adaptações do grupo **IR** sugerem que o exercício voluntário pode ser alternativa para o enriquecimento ambiental de ratos que precisem permanecer em isolamento social. Nossos achados devem facilitar pesquisas futuras sobre os efeitos do exercício crônico em ratos juvenis, bem como em relação ao desempenho emocional.

Apesar do amplo uso de esteiras em protocolos experimentais com ratos, o grau relativamente reduzido de habitualidade à esteira desta variedade de ratos, Wistar, pode ser fator limitante, como evidenciado por estudos recentes (Moranza et al., 2017; Toval et al., 2020) onde a taxa de adaptação dos ratos foi de 75-90%. Nossos resultados revelam que a prescrição de exercício voluntário pode ser alternativa para melhorar a taxa de adaptação de ratos, pois no grupo **IR** todos se adaptaram à esteira enquanto no grupo **I** só 70%. Por outro lado, cabe ressaltar que mesmo na roda pode ocorrer inadaptação à corrida, como revelado por estudo recente (Lima et al., 2020) que obteve taxa de adaptação de 76% dos ratos da linhagem *Fisher 344*, destacando que exercício voluntário pode ser condição que não induz resposta estressante no animal, pois trata-se de atividade natural de roedores.

Aqui, os resultados do grupo **IR** indicaram que estes animais tiveram comportamento exploratório menos intenso, revelado pelo menor número de locomoção na arena do CA, como também foi demonstrado por Ishikawa et al (2014) em que a aplicação de exercício voluntário de corrida imediatamente a fase de desmame impediu a atividade hiperlocomotora, e a vulnerabilidade ao estresse durante o período adulto. Este fato mostra que a atividade física voluntária, durante 5 semanas, pode contribuir para reduzir a ansiedade sob condições de isolamento social. Desta maneira, esta medida poderia ser utilizada como EA em roedores, já que a roda de corrida destinada a realização de atividade física voluntária pode fornecer estímulo motor, sendo que este

demonstrou reduzir a hiperatividade locomotora em resposta à novidade ao meio ambiente (Brenes et al., 2020).

O teste LCE é aplicado em roedores para induzir comportamento semelhante ao da ansiedade por meio da aversão ao espaço aberto. Roedores diagnosticados como “menos ansiosos” estão mais dispostos a explorar as regiões mais claras, abertas e elevadas do aparelho ao invés de permanecer nas regiões escuras e fechadas. Ambos os grupos, nas duas exposições com intervalos de 24h entre elas, os achados foram semelhantes, sendo que o tempo de permanência nos braços abertos não foram diferentes estatisticamente. Entretanto, o tempo de permanência no braço aberto foi reduzido para ambos os grupos na segunda exposição. A quantidade de entradas no braço aberto diminuiu aproximadamente 35% após o primeiro teste no aparelho, independentemente se os testes são realizados diariamente ou até mesmo semanalmente (Tucker; McCabe, 2017). Esta ocorrência segundo autor é conhecida como “fenômeno da tolerância”, fato que indica que após a exposição no LCE, os roedores diminuem significativamente a sua exploração aos braços abertos em exposições subsequentes e mesmo após a administração de agentes ansiolíticos, não foram efetivos no aumento da quantidade de tempo gasto em zonas ansiogênicas.

Modelos experimentais em roedores são utilizados para elucidar processos normais ou patológicos que influenciam na aprendizagem e memória. Assim, um método amplamente utilizado para avaliar a função cognitiva é o labirinto aquático de Morris, teste clássico para examinar a aprendizagem espacial e memória (Barnhart et al., 2015). Os dados obtidos no presente estudo indicaram que ambos os grupos tiveram a mesma memória espacial após 5 dias de treinamento no labirinto aquático.

Para quantificar o desempenho dos ratos foi utilizado modelo matemático previamente proposto num estudo prévio sobre *overtraining* (Hohl et al., 2009). Os autores relataram que desempenhos entre 70 e 230 kg m tornam a amostra de indivíduos (ratos) mais homogênea, reduzindo a variabilidade interindividual, no que tange a capacidade de exercício e potencial para aumentar a performance após prescrição de um programa de treino. Desta maneira, a maioria dos indivíduos do grupo I permaneceu dentro desta faixa. Entretanto, no grupo IR nós obtivemos indivíduos com desempenho maior que 300 kg m. Isso

claramente indica que atividade física voluntária na roda de corrida melhorou a aptidão física dos ratos. Sendo que o desempenho de vários ratos ultrapassou 300 kg.m pode não ser adequado o uso da roda de exercício uma vez que Hohl et al., (2009) preconizam que a partir de 300kg.m fica difícil a melhoria do desempenho, esse dado também pode indicar que apenas o uso da roda sem a esteira foi o suficiente para melhor o condicionamento desses animais. O fato de alguns animais terem desempenho maior que 300 kg.m é um provável indicador que o grupo não era homogêneo com ratos tendo melhor condicionamento que os demais, talvez se realizado um T_{máx} antes do início do experimento seria possível separar melhor os grupos. Além disso, o aumento da V_{máx} no grupo **IR** no **T_{max-1}** indica adaptação metabólica anaeróbia em resposta ao exercício voluntário que se manteve mesmo após o intervalo entre os T_{máx}s, isso pode indicar uma alteração estrutural da musculatura dos animais além das metabólicas, também pode-se considerar que o grupo **I** por somente ter sido exposto ao treino em esteira apresentou destreinamento entre os T_{máx}s.

Nossos resultados revelaram que a glicemia e lactatemia não aumentaram após os testes de esforço máximo em seguida o período de habituação na esteira. A elevação do condicionamento físico observado no grupo **IR** não foi sinalizada por ajustes na concentração plasmática de lactato, clássica indicadora que sinaliza mudanças fisiológicas intramusculares benéficas, induzidas pelo exercício crônico. Esperaríamos menores lactatemias após o **T_{máx-1}** no grupo submetido a atividade física voluntária, devido ao incremento do desempenho, já que o treinamento pode promover equilíbrio oxidativo acompanhado com redução do tônus simpático. Este último provocaria redução da mobilização da via glicolítica anaeróbia para produção de ATP. Outra mudança para promover a redução da lactatemia seria o aumento na expressão de transportadores monocarboxilato 1 (não quantificado no presente estudo), proteína que facilita o influxo de lactato para ser utilizado como substrato para a energia muscular (Lima et al., 2020; Manchado-Gobatto et al., 2020). Ademais, o aumento da aptidão física, observada na variável desempenho, poderia ser explicado pela familiaridade ou capacidade de acomodação dos ratos à esteira, devido à experiência prévia na roda de corrida, o que representaria melhoria da

eficiência mecânica, já que desempenho também pode ser melhorado pela economia do movimento (Coyle, 1995).

Realizaram-se correlações entre variáveis fisiológicas e comportamentais. A partir de perspectiva ampla, a concentração plasmática de lactato pode indicar indiretamente a atividade simpática, tendo em vista que as catecolaminas induzem a glicólise/glicogenólise hepática e muscular tendo potencial para aumentar a produção de lactato (Sales et al., 2019). Ademais, estabeleceu-se que o lactato plasmático é um robusto biomarcador de resposta ao estresse (Toval et al., 2020). No presente estudo, existiu correlação positiva moderada entre o lactato basal, e variáveis relacionadas ao LCE no que diz respeito a permanência dos ratos no braço aberto. Este achado pode sugerir que o lactato pode ser utilizado para avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em roedores, considerando a possível relação entre lactato e reação de luta e fuga o que pode indicar que os animais poderiam estar mais destemidos. Assim, estes animais teriam aumentado a capacidade de explorar ou, em alguns casos, a alta lactatemia poderia ser indicadora do nível de ansiedade fazendo os ratos permanecerem no braço fechado.

Em modelos experimentais com exercício físico, especialmente naqueles que envolvem exercício forçado que podem promover resposta estressante inespecífica, causada pelo manejo em geral e, até mesmo pelos métodos de coleta de sangue e pelo ambiente novo dos próprios dispositivos utilizados durante o estudo ou mesmo no número de animais utilizados pode não ser o suficiente para se obter resultados claros. Esta resposta inespecífica pode ser adicionada ao estresse físico decorrente de altas intensidades de exercício. Esta fonte adicional de estresse pode mascarar efeitos oriundos da atividade física regular (Toval et al., 2020).

6. Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho podemos sugerir que prescrever acesso livre a roda de corrida para a prática de atividade física voluntária, inclusive sob isolamento social, pode melhorar a taxa de adaptação e o desempenho atlético na esteira sem revelar respostas comportamentais inapropriadas importantes. Possivelmente, estes dispositivos podem ser

utilizados como enriquecimento ambiental em gaiolas para roedores para modelos experimentais em fisiologia do exercício e mitigação da ansiedade.

7. Referências

BARNHART, C. D.; YANG, D.; LEIN, P. J. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0124521, 2015.

BIGGIO, F.; BIGGIO, F.; MOSTALLINO, M. C.; TALANI, G.; LOCCI, V.; MOSTALLINO, R.; CALANDRA, G. SANNA E., BIGGIO, G. Social enrichment reverses the isolation-induced deficits of neuronal plasticity in the hippocampus of male rats. **Neuropharmacology**, v. 151, p. 45-54, 2019.

BRENES, J.C.; FORNAGUERA, J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. **Behavioural brain research**, v. 198, n. 1, p. 199-205, 2009.

BRENES, J. C.; RODRÍGUEZ, O; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 1, p. 85-93, 2008.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J.; SEQUEIRA-CORDERO, A. Environmental Enrichment and Physical Exercise Attenuate the Depressive-Like Effects Induced by Social Isolation Stress in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 804, 2020.

COYLE, E. F. Integration of the physiological factors determining endurance performance ability. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 23, n. 1, p. 25-64, 1995.

HOHL, R.; FERRARESSO, R. L.; DE OLIVEIRA, R. B.; LUCCO, R.; BRENZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. Development and characterization of an overtraining animal model. **Medicine and science in sports and exercise**, n. 41, p. 1155-1163, 2009.

ISHIKAWA, J.; OGAWA, Y.; OWADA, Y.; ISHIKAWA, A. Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. **Behavioural brain research**, n. 264, p. 197-206, 2014.

LESER, N.; WAGNER, S. The effects of acute social isolation on long-term social recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 124, p. 97-103, 2015.

LIN, T. W.; KUO, Y. M. Exercise benefits brain function: the monoamine connection. **Brain sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-53, 2013.

LIMA, T. C.; BARBOSA, M. A.; COSTA, D. C.; BECKER, L. K.; CARDOSO, L. M.; ALZAMORA, A. C. Fitness is improved by adjustments in muscle intracellular signaling in rats with renovascular hypertension 2K1C undergoing voluntary physical exercise. **Life Sciences**, p. 117549, 2020.

MANCHADO-GOBATTO, F. B.; MAROSTEGAN, A. B.; RASTEIRO, F. M.; CIRINO, C.; CRUZ, J. P.; MORENO, M. A.; GOBATTO, C. A. New insights into mechanical, metabolic and muscle oxygenation signals during and after high-intensity tethered running. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

MORA-GALLEGOS, A.; ROJAS-CARVAJAL, M.; SALAS, S.; SABORÍO-ARCE, A.; FORNAGUERA-TRÍAS, J.; BRENES, J. C. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. **Neurobiology of learning and memory**, v. 118, p. 96-104, 2015.

MORANZA, H. G.; SCANAVACA JUNIOR, L.; MATAQUEIRO, M. I.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G. C. Chronic administration of Bauhinia forficata link reduced exploratory activity without affecting blood glucose in healthy rats. **Plant. Special Issue: Phytotherapy**, v. 5, n. 5-1, pp. 27-32, 2017.

MULLER, A. P.; GNOATTO, J.; MOREIRA, J. D.; ZIMMER, E. R.; HAAS, C. B.; LULHIER, F.; PORTELA, L. V. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. **Hippocampus**, n. 21, p. 1082-1092, 2011.

MUMTAZ, F.; KHAN, M. I.; ZUBAIR, M.; DEHPOUR, A. R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1205-1222, 2018.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M. Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. **Neuroscience**, v. 360, p. 1-8, 2017.

OMENA, M. L. R. A. Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação do sistema nervoso central – Originárias do bioma caatinga. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.92-107, 2007.

PARK, H. S.; KIM, T. W.; PARK, S. S.; LEE, S. J. Swimming exercise ameliorates mood disorder and memory impairment by enhancing neurogenesis, serotonin expression, and inhibiting apoptosis in social isolation rats during adolescence. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 16, n. 2, p. 132, 2020.

SALES, M. M.; SOUSA, C. V.; DA SILVA AGUIAR, S.; KNECHTLE, B.; NIKOLAIDIS, P. T.; ALVES, P. M.; SIMÕES, H. G. An integrative perspective of the anaerobic threshold. **Physiology & behavior**, v. 205, p. 29-32, 2019.

STRANAHAN, A.M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 526-533, 2006.

TOVAL A.; VICENTE-CONESA, F.; MARTÍNEZ-ORTEGA, P.; KUTSENKO, Y.; MORALES-DELGADO, N.; GARRIGOS, D.; ALONSO, A.; DO COUTO B.R.; POPOVIC, M.; FERRAN, J. L. Hypothalamic Crh/Avp, plasmatic glucose and lactate remain unchanged during habituation to forced exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

TUCKER, L.B.; MCCABE, J.T. Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 13, 2017.

UYSAL, N.; KIRAY, M.; SISMAN, A. R.; CAMSARI, U. M.; GENCOGLU, C.; CETINKAYA, C.; BAYKARA, B.; AKSU, I. Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats. **Biotechnic&Histochemistry**, n. 90, p. 55-68, 2015.