UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

TATIANE EVELYN BARBOZA

Efeito do enriquecimento ambiental sobre o perfil cardiometabólico e estresse oxidativo no músculo e coração em ratos jovens e idosos

São Paulo
2015

TATIANE EVELYN BARBOZA

Efeito do enriquecimento ambiental sobre o perfil cardiometabólico e estresse oxidativo no músculo e coração em ratos jovens e idosos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Profª Drª Silvia Lacchini

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barboza, Tatiane Evelyn
Efeito do enriquecimento ambiental sobre o perfil cardiometabólico e estresse oxidativo no músculo e coração em ratos jovens e idoso / Tatiane Evelyn Barboza. -- São Paulo, 2015.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Silvia Lacchini.

Descritores: 1.Meio ambiente 2.Atividade motora 3.Estresse oxidativo 4.Envelhecimento 5.Coração 6.Músculo esquelético 7.Ratos

USP/FM/DBD-341/15

À minha querida avó Mariana (in memorian) com amor, admiração e gratidão por seu carinho, presença e incansável torcida pelo meu sucesso nos estudos e carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e oportunidades proporcionadas durante toda a pós-graduação.

Aos meus amados pais Vanderlei e Isabel, pelo amor, carinho, incentivo e apoio despendido ao longo da minha vida e também por valorizar e investir nos meus estudos e carreira profissional.

Aos meus queridos irmãos Júnior e Rafael, que mesmo sendo mais novos foram muito compreensivos em relação às horas de “monopólio” do computador e colaboraram com um ambiente favorável aos estudos.

Ao Michel querido amigo, parceiro e namorado, que já passou por um mestrado, superou todas as dificuldades e me incentivou nos momentos mais difíceis. Agradeço também pelo carinho, cuidado e compreensão durante a execução deste mestrado, mesmo à distância. Sou muito grata à sua mãe (Vera) e irmã (Melissa) por terem aberto as portas da casa e do coração para me receber em Porto Alegre.

À professora Silvia Lacchini, pela orientação, por ter tornado possível a execução deste trabalho, por ter acreditado no meu potencial e me proporcionado excelentes oportunidades de aprendizado durante este mestrado.

Aos colegas (“Lacchinetos”) parceiros e amigos de laboratório, pela amizade e parceria nos trabalhos, congressos e nas dezenas de “festinhas” legais: Thaís, “Tati 1”, Juliane, Cintia, Thulio, Rariane, “Tati 3”, Jéssica, Mônica, Patrick e Lucas.

À professora Adriane Belló-Klein, por ter aberto as portas de seu laboratório, por me fazer sentir parte do grupo e pelas sugestões e orientações sobre estresse oxidativo. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS pela ajuda nos experimentos, pelo aprendizado, por me ensinar na prática o sentido da palavra “colaboração” e pela amizade que tornou as horas de trabalho muito mais prazerosas: Rayane, Carla, Jéssica, Bruna, Cristina, Alexandre, Rafael Fernandes, Rafael Colombo, Rafaela Siqueira, Vanessa, Tânia, Angela e professor Alex.

À professora Katia D'Angelis, pelas sugestões, oportunidade de aprendizado e colaboração na análise de estresse oxidativo no músculo. Agradeço também aos colegas do laboratório de fisiologia da UNINOVE: Danielle e Filipe pela ajuda nas análises. Ao professor Rui Curi e o técnico Gilson Murata pelas sugestões e colaboração na análise das enzimas metabólicas.
Ao programa de Pós Graduação em Ciências – Fisiopatologia Experimental da FMUSP.
À CAPES pelo apoio financeiro durante a execução deste curso.

“Daquilo que é óbvio, daquilo que nos faz um tanto bem maior, daquilo que nos faz amadurecer diariamente:
A capacidade que a gente tem de olhar no olho, de agradecer, de poder dialogar, criticar com sensibilidade, com coragem.
Que a gente saiba valorizar cada momento nosso, porque todo mundo a já está automaticamente em extinção;
Só existe um de cada um de nós.”

Fernando Anitelli - “O Teatro Mágico”

RESUMO

Barboza, T.E. **Efeito do enriquecimento ambiental sobre o perfil cardiometabólico e estresse oxidativo no músculo e coração em ratos jovens e idosos** 2015. 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A maioria dos estudos explora o enriquecimento ambiental (EA) como uma forma de estudar o comportamento do animal, função cerebral e memória. Além disso, o EA pode estimular a atividade física voluntária. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto deste estímulo sobre o perfil de estresse oxidativo no coração, assim como nos parâmetros cardiometabólicos. O objetivo do presente estudo é verificar os efeitos da atividade física voluntária sobre os parâmetros cardiometabólicos e sobre o perfil de estresse oxidativo no coração e músculo sóleo de ratos jovens e velhos. Foram utilizados 32 ratos, machos, Wistar, separados em 4 grupos: jovens controle (JC), jovens com enriquecimento ambiental (JEA), velhos controle (VC), velhos com enriquecimento ambiental (VEA). Os animais foram mantidos em seus grupos por 6 semanas, sendo que após esse período todos os animais foram avaliados (teste de esforço, peso, glicemia). Os resultados demonstraram alterações na composição corporal: aumento da gordura marrom no grupo VEA comparado ao grupo VC e redução da gordura periepididimal no grupo VEA comparado ao grupo VC. Houve também uma melhora no desempenho físico (tempo de corrida e velocidade) observado no teste de esforço do grupo VE comparado ao VC. A enzima citrato sintase é menor no VC comparado ao JC, sendo que o EA faz desaparecer essa diferença, deixando o grupo VEA semelhante ao JEA. Em relação ao perfil de estresse oxidativo, houve redução dos pró-oxidantes no grupo JEA tanto no coração quanto no músculo sóleo; já no grupo VEA houve aumento da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e foi possível observar uma tendência de aumento na glutationa peroxidase (Gpx). O EA é capaz de alterar a composição corporal, melhorar a

performance e aumentar a SOD no grupo de ratos velhos. No grupo de ratos jovens reduz o dano oxidativo tanto no músculo sóleo quanto no coração, mas não provoca adaptações relevantes no sistema de defesa antioxidante enzimático.

Palavras chaves: Meio ambiente. Atividade motora. Estresse Oxidativo. Envelhecimento. Coração. Músculo Esquelético. Ratos.

ABSTRACT

Barboza, T.E. **Effect of environmental enrichment on the oxidative stress profile in heart and skeletal muscle in young and old rats.** 2015. 85f. Thesis (Master) – Medicine School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2015.

Most studies exploring environmental enrichment (EE) as a way to study the animal's behavior, brain function and memory. In addition the EE can stimulate voluntary physical activity however, little is known about the impact of stimulus Profile oxidative stress in the heart, as in cardiometabolic parameters. The aim of this study was to access the effects of voluntary physical activity (EE) on cardiometabolic parameters and the oxidative stress profile in soleus muscle and heart of young and old male rats. Thirty-two male Wistar rats were randomly assigned into four groups: young control (YC), young environmental enrichment (YE), old control (OC), old environmental enrichment (OE). After six weeks, the weight, stress test and blood glucose were evaluated in all groups. The data showed body composition changes: increased in the brown fat in OE group (0.072 ± 0.032) compared to OC group (0.051 ± 0.012); and reduced fat periepydidimal in OEA group (1.25 ± 0.48) compared to OC group (1.87 ± 0.63). We also observed a physical performance improvement (running time and speed) in the stress test of OE group (232.14 ± 102.50) compared to OC (51.67 ± 44.74). The enzyme citrate synthase was lower in OC compared to YC (P= 0.0020), indicating a deleterious effect of aging. EE has removed this difference, leaving the OE group similar to YE (P= 0.1529). Regarding the oxidative stress profile, there was a reduction of pro-oxidants in the heart (H_20_2, carbonyls, lipoperoxidation) and in the soleus muscle (carbonyls and lipoperoxidation) of YE group. In the OE there was a significant increase of the antioxidant superoxide dismutase enzyme (SOD) and we observed a increase trend in glutathione peroxidase (GPx). EE was capable of altering body composition (brown and periepydidimal fat), improved physical

performance and increased SOD in old mice group. In young group, oxidative damage reduced both in soleus muscle as in the heart, but does not caused significant adjustments in the enzymatic antioxidant defense system.

Key words: Environment. Motor activity. Oxidative Stress. Aging. Heart. Muscle, Skeletal. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pirâmide etária da população brasileira diferenciada por sexo – 1950-2050 17
Figura 2. Linhas de regressão linear de uma avaliação em corte transversal do declínio no VO2MÁX com a idade para um grande grupo de mulheres e homens empregados na National Aeronautics and Space Administration (NASA)/ Johnson Space Center (JSC) 19
Figura 3. Exemplos de antioxidantes enximáticos e antioxidantes não enzimáticos 25
Figura 4. Exemplo de ambiente enriquecido 27
Figura 5. Esquema ilustrando os efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido. 28
Figura 6. Cascata de eventos e adaptações produzidas pelo exercício aeróbico regular que reduzem a probabilidade de dano tecidual e adaptações diante do estresse oxidativo. 31
Figura 7. Resumo das alterações nos grupos jovens e velhos após a intervenção de 6 semanas com enriquecimento ambiental. 71
Figura 8. Ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio.. 72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores de peso corporal (g) dos grupos estudados 46
Gráfico 2. Valores da relação gordura marrom /peso corporal [(g/g) x 100] dos grupos estudados..... 47
Gráfico 3. Valores da relação gordura periepididimal/peso corporal [(g/g) x 100] dos grupos estudados..... 48
Gráfico 4. Níveis de glicemia no sangue (mg/dL) 48
Gráfico 5. Razão entre coração e peso corporal (g/g) nos grupos estudados 49
Gráfico 6. Valores de velocidade (km/h) (A e C) e tempo (s) (B e D) alcançados em esteira ergométrica durante o teste de desempenho físico (Teste Máximo) 50
Gráfico 7. Atividade da enzima citrato sintase (CS) (nmol.min-1gww-1) em homogeneizado de músculo sóleo..... 51
Gráfico 8. Atividade da enzima hexoquinase (nmol.min-1gww-1) em homogeneizado de músculo sóleo..... 51
Gráfico 9. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de carbonilas (determinação de proteínas modificadas oxidativamente) (nmoles/mg de proteína) em homogeneizado de tecido cardíaco 52
Gráfico 10. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL) (contagem por segundo por mg de tecido) em homogeneizado do tecido cardíaco..... 53
Gráfico 11. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio (H2O2) (nmoles/ mg de tecido) em homogeneizado de tecido cardíaco..... 54
Gráfico 12. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio (H2O2) (nmoles/ mg de tecido) em homogeneizado de tecido cardíaco..... 55
Gráfico 13. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (Unidades de SOD/ mg de tecido) em homogeinezado de tecido cardíaco..... 56

Gráfico 14. Atividade da enzima antioxidante Glutationa Peroxidase (GPx) (picomo por minuto/mg de proteína) em homogeneizado de tecido cardíaco 57
Gráfico 15. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de carbonilas (determinação de proteínas modificadas oxidativamente) (nmoles/mg de proteína) em homogeneizado de músculo (sóleo) 58
Gráfico 16. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL) (contagem por segundo por mg de tecido) em homogeneizado no músculo (sóleo)..... 59
Gráfico 17. Atividade da enzima antioxidante catalase (pmol/mg tecido) em homogeneizado do músculo sóleo..... 60
Gráfico 18. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (U SOD/mg proteína) em homogeneizado no músculo sóleo 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Envelhecimento, doenças cardiovasculares e alterações metabólicas. 16
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio 21
1.3 Enriquecimento ambiental 26
1.4 Atividade física voluntária e estresse oxidativo 29
2 JUSTIFICATIVA 34
3 HIPÓTESE 35
4 OBJETIVOS 36
4.1 Objetivo Geral 36
4.2 Objetivos Específicos 36
5. MATERIAIS E MÉTODOS 37
5.1 Considerações Éticas 37
5.2 Animais 37
5.3 Enriquecimento Ambiental 37
5.4 Coleta e pesagem dos tecidos 38
5.5 Avaliação Glicêmica 39
5.6 Teste de desempenho físico em esteira ergométrica 39
5.7.2 Atividade da hexoquinase 40
5.8 Avaliação do perfil de estresse oxidativo 40
5.8.1 Quantificação de proteínas 40
5.8.2 Dosagem de Carbonilas 41
5.8.3 Quimiluminescência (QL) 41
5.8.4 Medida de Peróxido de Hidrogênio (H_20_2) 42
5.8.5 Determinação da atividade da catalase 42
5.8.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) 43
5.8.7 Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx) 43
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45
7 RESULTADOS 46
7.1 Perfil cardiometabólico 46

7.2 Desempenho físico e enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo 49
7.3 Análises do perfil de estresse oxidativo 51
7.3.1 Análise do dano oxidativo no tecido cardíaco 51
7.3.2 Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco. .. 54
7.3.3 Análise do dano oxidativo no músculo sóleo..... 57
8 DISCUSSÃO..... 62
8.1 Medidas morfométricas..... 62
8.2 Glicemia..... 63
8.3 Desempenho físico 63
8.4 Atividade das enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo..... 64
8.5 Perfil de estresse oxidativo..... 65
9 CONCLUSÕES..... 73
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento, doenças cardiovasculares e alterações metabólicas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente há em torno de 605 milhões de pessoas com mais de 60 anos em todo o mundo. Estima-se que em 2050 essa população chegue a 2 bilhões (WHO, 2012). O que era no passado privilégio de alguns poucos, alcançar e/ou ultrapassar os 60 anos, passou a ser uma experiência de um número crescente de pessoas em todo o mundo (KALACHE et al., 1987; KALACHE et al., 1996).

Há três décadas, 65 anos de idade representava o início da velhice. No entanto, os gerontólogos apontam que isso mudou e até consideram a idade de 75 anos como o “jovem-velho” (KALACHE et al., 1996).

A pirâmide etária brasileira, apresentada na reunião da Organização das Nações Unidas (ONU), mostra que em 1950 possuía uma base extremamente larga, comparada ao topo estreito (Figura 1). Em 1980, apresentava uma forma clássica de pirâmide, onde o grupo etário mais velho era menor que o grupo etário anterior, embora a base da pirâmide tenha reduzido em relação à de 1950. Isso pode ser explicado pela queda das taxas de natalidade. A continuidade desta queda fez com que a pirâmide etária do ano 2000 apresentasse os três grupos etários mais jovens com percentagens menores que o grupo de 15 a 19 anos. As taxas menores de natalidade e mortalidade transformaram a estrutura etária da população, diminuindo a quantidade de crianças e aumentando, em um primeiro instante o grupo de adultos e, posteriormente, o grupo dos idosos. Já a forma da pirâmide de 2050 corrobora com este fato, uma vez que nesta época a estrutura etária da população brasileira deverá ter a forma de um retângulo e

a quantidade de idosos deverá ultrapassar a quantidade de crianças, principalmente no caso das mulheres (WONG; CARVALHO, 2006).

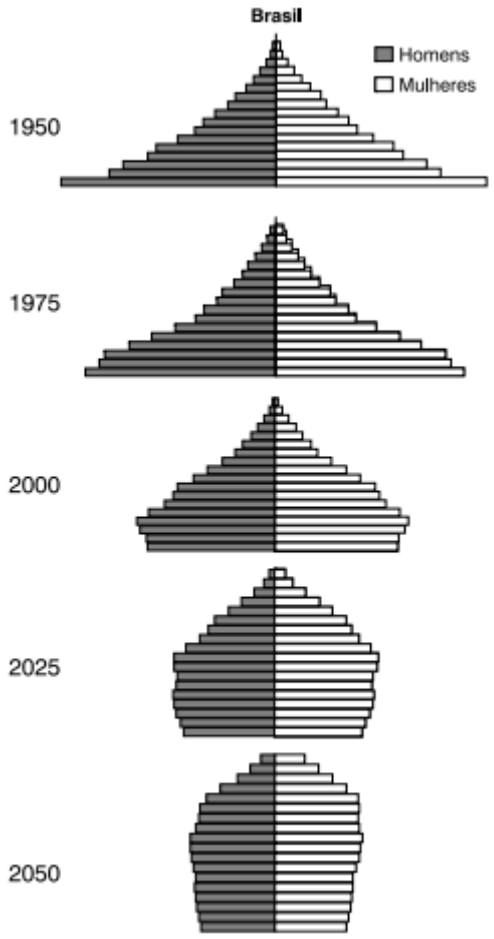

Figura 1. Pirâmide etária da população brasileira diferenciada por sexo – 1950-2050. Adaptado de Wong & Carvalho (2006).

Em geral, o processo de envelhecimento pode ser definido como uma deterioração progressiva das funções do organismo, que leva a uma menor capacidade para reagir, se adaptar a mudanças e preservar a homeostase. Por conseguinte, pessoas idosas possuem menor capacidade para suportar temperaturas extremas, infecções ou, em geral, as situações em que ocorre o estresse (DE LA FUENTE et al., 2011).

Uma vez que o processo de envelhecimento começa após a maturação reprodutiva, por volta dos 18 anos de idade em humanos, passa-se a maior parte do tempo de vida envelhecendo. Uma média mais elevada

de longevidade é conseguida pela manutenção de uma boa saúde e isso depende em média, de uma proporção de 25 % dos genes e em 75 % do estilo de vida e fatores ambientais (KIRKWOOD, 2008).

A principal característica de um organismo saudável é manter o equilíbrio funcional em todos os níveis; no entanto, com o envelhecimento, este equilíbrio pode falhar ou mudar. O acúmulo de alterações adversas com o passar do tempo, embora não deva ser considerado doença, aumenta significativamente o risco de doenças crônicas, como as cardiovasculares, que podem finalmente resultar em morte (KIRKWOOD, 2008).

As doenças cardiovasculares são consideradas o principal problema de saúde pública em todo o mundo, além disso, a prevalência dos fatores de risco como o diabetes melitus, obesidade e hipertensão, tem aumentado significativamente nos últimos anos (BRUM et al., 2004). A idade é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, não só porque prolonga a exposição do indivíduo a vários outros fatores de risco cardiovascular, mas também devido ao envelhecimento cardíaco intrínseco. O envelhecimento cardíaco intrínseco é definido como a degeneração dependente da idade, que progride lentamente e causa o declínio da função, o que torna o coração mais vulnerável ao estresse e contribui para o aumento da morbidade - principalmente hipertensão e diabetes - e mortalidade cardiovascular em idosos (DAÍ; RABINOVITCH, 2009). O diabetes e a hipertensão são altamente prevalentes na população idosa e ambos têm demonstrado acelerar a senescência cardiovascular (BRODSKY et al., 2004, KOSUGI et al., 2006).

Especificamente em corações de camundongos, a fibrose é mais comumente observada no subendocárdio ventricular, o que pode ser devido à exposição a um maior estresse da parede na camada do endocárdio (DAI et al., 2009). É possível encontrar alterações histológicas em corações de ratos velhos: fibrose subendocárdica e intersticial, mudança na hialina celular, vacuolização do citoplasma, o tamanho da fibra de cardiomiócitos, colapso de sarcômeros e mineralização. Essas mudanças podem ser designadas como cardiomiopatia associada com a idade (TREUTING et al.,

2008). A análise morfométrica demonstra hipertrofia de cardiomiócitos (aumento do tamanho das fibras miocárdicas), aumento da apoptose de cardiomiócitos e aumento da fibrose e deposição amilóide com o avançar da idade (YAN et al., 2007).

Visto que o envelhecimento causa alterações na função cardiovascular, também é possível observar um declínio na capacidade aeróbica. Há redução de 1% por ano na capacidade aeróbica de mulheres e homens adultos (Figura 2). Portanto, se fizéssemos uma projeção, é possível afirmar que por volta dos 100 anos de idade a capacidade aeróbia cai para um nível equivalente ao consumo de oxigênio em repouso.

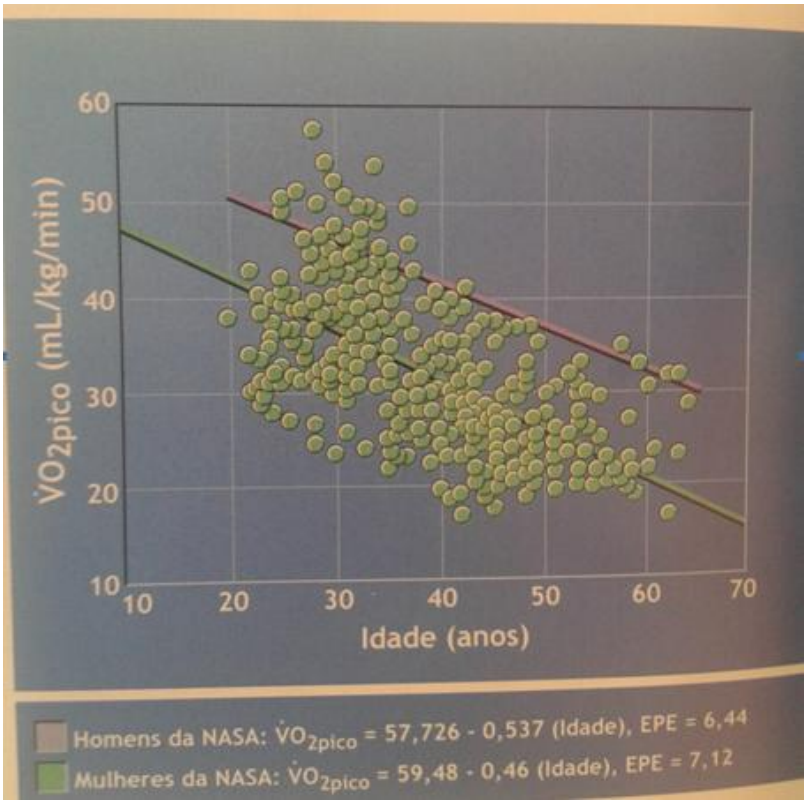

Figura 2. Linhas de regressão linear de uma avaliação em corte transversal do declínio no VO2MÁX com a idade para um grande grupo de mulheres e homens empregados na National Aeronautics and Space Administration (NASA)/ Johnson Space Center (JSC) (Mc Ardle et al., 2008 p. 900).

As medidas relacionadas ao desempenho melhoram rapidamente durante a infância e alcançam um pico entre o final da adolescência e os 30 anos. A partir daí há um declínio da capacidade funcional, com a

deterioração variando conforme a idade e dependendo das características genéticas e relacionadas ao estilo de vida (MC ARDLE et al., 2008). O aumento na expectativa de vida só pode ser considerado benéfico caso esteja associado com o envelhecimento saudável e funcional.

Spirduso (1995) relata que o exercício físico é uma forma muito eficiente de prevenir doenças típicas do envelhecimento, tanto para efeitos agudos quanto crônicos. Em relação aos efeitos agudos, após exercícios (moderado ou prolongado), a maioria das pessoas diz sentir-se bem, ou melhor, do que antes de começar a prática. Essa melhora está associada à diminuição dos níveis de estresse e ansiedade, melhora do humor, auto-conceito, auto-estima, auto-eficácia e imagem corporal. Para os efeitos crônicos, é possível ressaltar a prevenção de doenças típicas do envelhecimento, como a hipertensão, o diabetes e problemas ósteo-musculares, mas principalmente, a utilização do exercício físico como um meio de interação social.

Com o passar dos anos há declínio das funções centrais e periféricas relacionadas ao transporte e à utilização do oxigênio. Nas funções centrais ocorre a redução da frequência cardíaca máxima, consequentemente redução do débito cardíaco e complacência das grandes artérias em virtude das mudanças nas propriedades estruturais das paredes arteriais. Nas funções periféricas, a capacidade reduzida do fluxo sanguíneo para os membros inferiores é acompanhada da perda de massa muscular (VIGORITO; GIALLAURIA, 2014; MC ARDLE et al., 2008)

Durante o envelhecimento ocorrem algumas alterações fisiológicas no sistema neuromuscular que levam a um decréscimo da força muscular e consequente decréscimo da função muscular, aumentando, assim, a perda da densidade óssea mineral. Essas alterações contribuem para o aumento do número de quedas e fraturas ósseas na população idosa (GALLAGHER et al., 1997; FRONTERA et al., 2000). As mitocôndrias desempenham um papel principal, como um integrador de uma variedade de sinais dentro da célula; por esta razão, as mitocôndrias têm sido frequentemente estudadas como alvo para lutar contra o envelhecimento celular. Estudos sugerem que

as células musculares também apresentam a função mitocondrial prejudicada com o envelhecimento, pois a integridade da mitocôndria declina com a idade (HEPPLE, 2014; GOUSPILLOU et al., 2010; BALLABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005; COOPER et al., 1992). Fatores extrínsecos também podem modular a função mitocondrial no músculo durante o envelhecimento. Em particular, o estresse oxidativo é um fator que deprime a função respiratória *in vivo* (HEPPLE, 2014).

Ballaban e colaboradores (2005) discutem a questão sobre um déficit na atividade transportadora de elétrons na mitocôndria em razão do envelhecimento. As alterações na transcrição de componentes da cadeia transportadora de elétrons, com o envelhecimento, podem ter ocorrido antes do declínio da função mitocondrial; ou seja, presume-se que devam ocorrer antes do pico dos efeitos cumulativos dos mecanismos oxidantes. A teoria dos radicais livres associa a geração de espécies reativas de oxigênio no metabolismo aeróbio como um dos mecanismos aceitos para complementar as tentativas de explicações das causas do envelhecimento (BECKMAN; AMES, 1998).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos ou moleculares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os RL podem ser formados pela adição de um elétron a um elemento não-radical ou através da quebra de uma ligação covalente (SYMONS, 1996). Essa característica os torna altamente reativos e instáveis e, dessa forma, propiciam a iniciação de reações em cadeia por extrair um elétron de uma molécula próxima para completar seus próprios orbitais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Apesar de espécies reativas desempenharem um papel importante como moléculas de sinalização e controle em diversas vias

celulares, o desequilíbrio entre a sua produção e as defesas antioxidantes pode gerar efeitos danosos. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é chamado desequilíbrio ou desbalanço redox. O desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes, com aumento excessivo de oxidantes – espécies reativas de oxigênio (EROs), que leva a dano oxidativo, é chamado de estresse oxidativo (MARIN et al., 2013; JONES, 2006; KAUL et al., 1993).

A mitocôndria é essencial para a manutenção das funções e atividades celulares por exercer papéis importantes na produção de ATP pela fosforilação oxidativa, vias biossintéticas, homeostase redox celular e de íons, produção de oxigênio, sinalização, e regulação da morte celular programada (DAI et al., 2012). Além do processo de geração de ATP nas mitocôndrias, processos enzimáticos e não enzimáticos rotineiros levam à formação de EROS, que referem-se não somente aos radicais livres, mas também às moléculas que possuam aumentada reatividade (GAMALEY, 1999; WILSON, 2001).

Do oxigênio metabolizado em nosso organismo, aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Durante o processo de fosforilação oxidativa, o ânion superóxido (O_2^-) é a ERO mais abundantemente formada. A molécula de oxigênio pode sofrer oxidação e dar origem ao O_2^-• e ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOUEIZ, 2009).

As reações de oxidação com outras moléculas como lipídeos, proteínas e DNA, são promovidas pelas EROs, espécies reativas de nitrogênio e RL (GATÉ et al., 1999). As espécies reativas abrangem uma diversidade de moléculas, incluindo as formadas pela redução do oxigênio como o ânion radical superóxido (O_2^-•), o “não radical” peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH•), além de espécies como o óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$) e oxigênio singlet ($^1\Delta g$ O_2) (MURPHY; HOLMGREN, 2011). Cada uma destas moléculas é uma entidade química distinta, com diferentes cinéticas, taxa e local de produção, degradação e

características de difusão em sistemas biológicos (MURPHY; HOLMGREN, 2011). O H_2O_2 é menos reativo do que o $O_2•^-$, porém mais difusível, podendo atravessar a membrana plasmática. O OH• pode ser produzido a partir do H_2O_2 através da reação de Fenton, catalisado por elementos de transição como o Fe^2+. O OH• também pode ser gerado a partir do $O_2•^-$ ou H_2O_2 e elementos como Cu^+ e Fe^{2+} através da reação de Haber Weiss. OH• é a molécula oxidante mais reativa capaz de oxidar o DNA, lipídios e proteínas (GATÉ et al., 1999).

As NADPH oxidases são um grupo de enzimas associadas a membranas plasmáticas encontradas numa variedade de células de origem mesodérmica. A mais estudado destas é a NADPH oxidase dos leucócitos, que é encontrada em fagócitos e linfócitos B. Ela catalisa a produção de superóxido (O_2^-) por redução de um elétron de oxigênio, utilizando NADPH como doador de elétrons. O O_2^- gerado por esta enzima serve como material de partida para a produção de uma ampla variedade de EROS (CAO et al. 2014; BABIOR, 1999).

Estes oxidantes são usados pelos fagócitos para combater microorganismos invasores, mas também podem causar uma série de "danos colaterais" para os tecidos circundantes, assim que sua produção tem de ser bem regulada para se certificar de que eles só são gerados quando e onde forem necessários (BABIOR, 1999). EROs geradas por NADPH oxidases podem ser envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos no coração, tais como hipertrofia, apoptose, insuficiência cardíaca e adaptação hipóxica (KURODA; SADOSHIMA, 2010). O aumento do estresse oxidativo endotelial com o envelhecimento é um resultado de uma produção aumentada de enzimas intracelulares da NADPH oxidase e desacoplamento da eNOS, a partir da respiração mitocondrial, na ausência de aumentos apropriados nas defesas antioxidantes regulada por fatores de transcrição relevantes (DONATO et al., 2015).

A produção dessas espécies reativas é contrabalanceada por agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam como um sistema de defesa neutralizando os radicais livres e as espécies reativas (GRIEVE et

al., 2004). O termo antioxidante se aplica a toda espécie química capaz de remover radicais livres tanto através de uma reação direta quanto pela sua conversão em uma espécie neutra ou menos reativa. Estas substâncias possuem a propriedade de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio às EROS sem se transformarem em moléculas instáveis. As defesas antioxidantes podem ser definidas como defesas primárias, secundárias e terciárias. Defesas primárias são as que atuam na prevenção da formação dos radicais livres. Já as defesas secundárias removem ou inativam as EROS já formadas. E, finalmente, as defesas terciárias atuam na remoção e no reparo das moléculas oxidadas, particularmente importantes para a integridade do DNA (CHABOT, 1998).

Entre as principais enzimas pode-se citar a superóxido dismutase mitocondrial e citosólica (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD) e extracelular (EC-SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GPx), e peroxirredoxinas, entre outras. Atuando de forma não enzimática, existem antioxidantes como a glutationa reduzida (GSH) e outros pares tióis/dissulfetos como TRx–(SH) 2/TRx–SS e cisteina/cistina, ascorbato, *α*- tocoferol e ácido úrico (MURPHY; HOLMGREN, 2011; GRIEVE et al., 2004).

Antioxidantes enzimáticos, tais como a SOD, a GPx e a CAT são seletivos para EROs em particular (Figura 3). A SOD atua prevenindo a formação de um oxidante mais potente, o $ONOO^-$, dismutando o $O_2•^-$ em O_2 e H_2O_2, geralmente degradado pela CAT ou GPx (GATÉ et al., 1999). A GPx é importante para a proteção contra o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, prevenindo a peroxidação lipídica. Essa enzima apresenta atividade catalítica sobre a oxidação da glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG). Ainda, a GSH pode remover certos radicais de O_2 diretamente e auxiliar na reciclagem das vitaminas C e E. A CAT converte o H_2O_2 em água e O_2 (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2012).

ANTIOXIDANTES	
ENZIMÁTICOS	**NÃO ENZIMÁTICOS**
Superóxido Dismutase	Vitamina C
Catalase	Vitamina E
Glutationa peroxidase	Glutationa
Peroxirredoxinas	Ácido úrico
Reparação do DNA	Carotenóides
	Flavonóides

Figura 3. Exemplos de antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos.

O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante determina o estado redox, que possui papel importante na otimização da função celular. O estado redox e/ou balanço redox representa o potencial oxidação/redução presente no interior da célula e é regulado similarmente ao pH, sendo comumente avaliado através da relação entre a GSH e a GSSG ou outros compostos tiol/dissulfeto. Além de um bom indicador de estresse oxidativo sistêmico, e um bom indicador de risco de doenças, esta relação tem sido utilizada em vários estudos para indicar a produção de radicais livres durante o exercício (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, de acordo com a teoria de oxidação-inflamação do envelhecimento, a base da deterioração relacionada com a idade dos sistemas homeostáticos e da sua comunicação é o estresse oxidativo crônico. Esta dose é aumentada mais ou menos, dependendo, em parte, do grau de controle da oxidação e inflamação do sistema imunológico de cada sujeito, a qual é relacionada com a capacidade funcional das suas células imunitárias (DE LA FUENTE; MIQUEL, 2009). Portanto, analisar as funções das células e seu estado

redox é conveniente para testar os efeitos de estratégias baseadas em melhorar vários fatores ambientais e estilo de vida para retardar o processo de envelhecimento (DE LA FUENTE, 2008).

Para a avaliação indireta do dano oxidativo, é possível dosar alguns produtos moleculares mais comuns de alvos da oxidação, que incluem produtos finais da peroxidação de lipídios (hidroperóxidos lipídicos - LO). A lipoperoxidação ocorre em ácidos graxos poliinsaturados, sendo iniciado por um OH• quando este captura um átomo de hidrogênio de um carbono da cadeia de ácidos graxos. Essa reação ocasiona um rearranjo molecular com a geração de subprodutos também reativos, induzindo assim a propagação da peroxidação lipídica (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009).

Essa peroxidação ainda pode induzir a reação de outras cadeias de ácidos graxos laterais gerando uma reação em cadeia. Em proteínas, ocorre a formação de carbonilas e perda de grupamentos tióis livres levando a perda da função devido à oxidação. As reações de oxidação podem ocorrer em aminoácidos principalmente através dos sítios de ligação com metal, levando a alterações na transdução de sinais, sistemas de transporte e atividades enzimáticas. A oxidação de proteínas pode ser responsável pelo menos em parte pela aterosclerose, pelos danos da isquemia-reperfusão e também pode estar associada com o envelhecimento (GRIEVE et al., 2004). A avaliação de mudanças no estado redox através da glutationa também pode ser utilizada para representar o estresse oxidativo, uma vez que a GSH é o principal antioxidante tecidual que converte equivalentes redutores do H_2O_2 em água (RYAN et al., 2011).

1.3 Enriquecimento ambiental

A garantia de uma alta precisão nos resultados em experimentos com animais foi determinada pelos níveis elevados de padronização na ciência de animais de laboratório, especialmente no que diz respeito à genética, higiene e meio ambiente, incluindo alimentação e a de alocação. Além disso,

este alto nível de padronização tem sido o grande responsável pela diminuição no número de animais utilizados em pesquisas experimentais em muitos países nos últimos anos (OLSSON; DAHLBORN, 2002).

O enriquecimento ambiental como um conceito experimental foi proposto pela primeira vez por Donald Hebb, em 1947. O ambiente enriquecido tem como referência o tipo padrão de gaiola e a disposição de diversos estímulos aos animais, como acessos a rodas de correr, vivência em grupos, e ambientes contendo brinquedos (Figura 4) (WILL et al., 2004; TAKUMA et al., 2011). Em animais de laboratório também foi demonstrado que o enriquecimento ambiental é capaz de reduzir a resposta ao estresse em camundongos (MEIJNER et al., 2007). Contudo, a compreensão deste efeito sobre o comportamento de roedores de laboratório se torna necessária, visto que não se sabe se este pode representar nova variável nos estudos normalmente conduzidos.

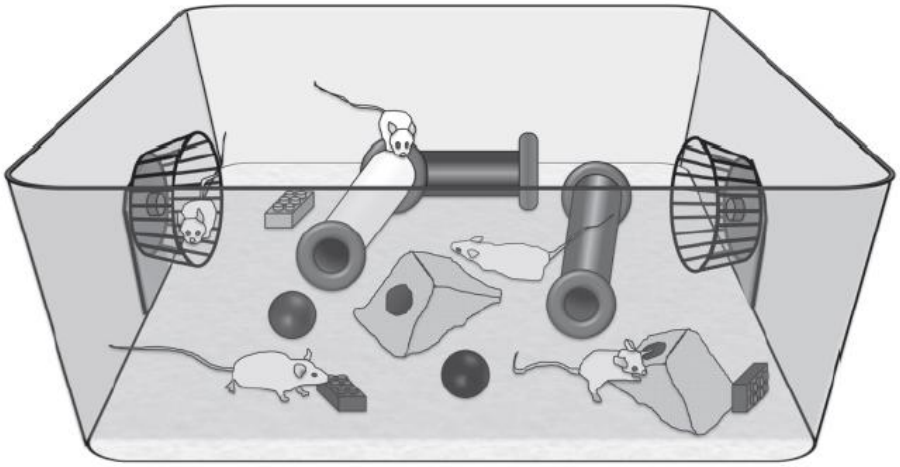

Figura 4. Exemplo de ambiente enriquecido (Takuma et al., 2011).

A mudança periódica dos objetos e a posição dos mesmos trazem “complexidade” ou “novidade” para os animais. Além disso, tem sido descrito como um processo contínuo de melhora cognitiva, sensório-motora e / ou atividade física (Figura 5) (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Esse ambiente induz o animal à prática de atividade física voluntária, ou seja, diferente dos protocolos tradicionais em esteira ou natação, em que o animal

é forçado a fazer determinada atividade. Nesse modelo, o animal utiliza a roda de correr e/ou interage com os brinquedos conforme a sua vontade (ARIDA et al., 2004).

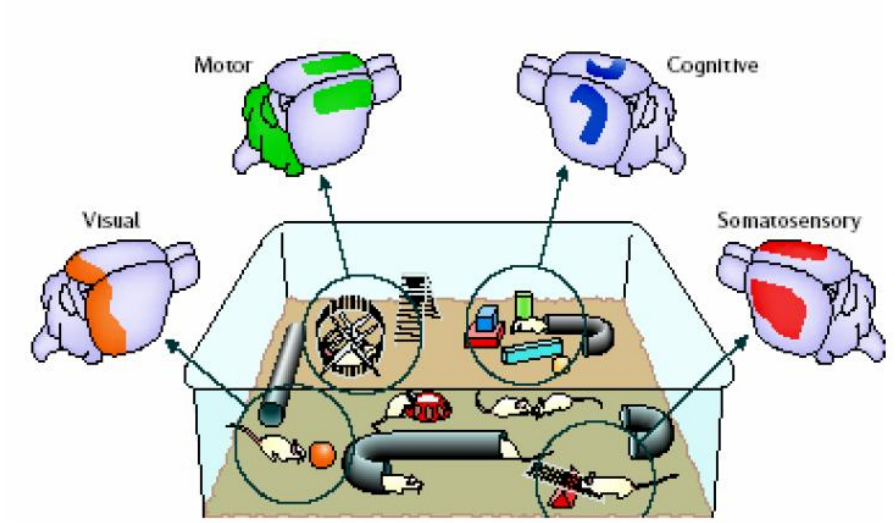

Figura 5. Esquema ilustrando os efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido (Nithianantharajah & Hannan, 2006).

Em geral, os efeitos positivos do enriquecimento ambiental manifestam-se nas modificações moleculares, celulares e funcionais, que levam a uma melhora geral no bem-estar fisiológico e físico dos animais que participam desta estratégia (DE LA FUENTE et al., 2011; MATTSON et al., 2001; VAN PRAAG et al., 2000). Estudos têm demonstrado que o enriquecimento ambiental geralmente é acompanhado de ganhos na função cerebral, principalmente os associados à aprendizagem e à memória (BONACCORSI et al., 2013; MONTAROLO et al., 2013; ADLARD et al., 2005; HILL et al., 2004; FORDYCE; FARRAR, 1991). Em ratos, a estimulação ambiental pode resultar no aumento do comportamento exploratório (LEVITSKY; BARNES, 1972) e melhorar déficits cognitivos, preservando assim a integridade tecidual após danos cerebrais (PASSINEAU et al., 2001).

Na década de 60, Krech e colaboradores mostraram que roedores expostos ao ambiente enriquecido podem ter algumas estruturas e funções

do encéfalo alteradas. Desde então, outros trabalhos têm mostrado que o córtex cerebral de animais expostos ao ambiente enriquecido apresenta uma maior espessura em comparação com animais que vivem em condições padrão de laboratório (ROSENZWEIG et al., 1968; ROSENZWEIG; BENNETT, 1996; LIMA et al., 1999). Evidências demonstraram também que a estimulação ambiental pode colaborar na recuperação após o evento isquêmico, aumentando o número de neurônios (BRIONES et al., 2004)

O estímulo neonatal previne a perda neuronal associada à idade (PHAM et al., 1999). Outro estudo verificou que aos 27 meses de idade, os ratos do ambiente enriquecido apresentaram melhor desempenho na memória de trabalho espacial do que os ratos do ambiente padrão. Nesse estudo, ratos enriquecidos tinham 66% a mais no critério de memória de trabalho do que os ratos criados de forma padrão (KOLB, 1998). Ratos velhos são caracterizados, entre outros aspectos pela perda de neurônios no hipocampo, aumento dos níveis de corticosterona plasmática e redução dos receptores glutamatérgicos (SAPOLSKY et al., 1985). Alguns estudos que trabalharam com enriquecimento ambiental em neonatos apontam/ demonstraram que os efeitos do enriquecimento ambiental podem persistir durante a maturidade (PHAM et al., 1999; WOOD et al., 2005).

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, Azar e colaboradores (2012) realizaram um estudo com ratas fêmeas Sprague-Dawley e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com o objetivo de verificar se um programa de enriquecimento não social seria eficaz na redução da frequência cardíaca ou pressão arterial sistólica. Neste estudo os animais eram expostos ou não a protocolos de estresse e enriquecimento ambiental. No entanto, os autores verificaram que o programa de ambiente enriquecido não reduziu os indicadores fisiológicos do estresse em ratos Sprague-Dawley ou SHR e também não houve alterações significativas na nem pressão arterial nem na frequência cardíaca.

1.4 Atividade física voluntária e estresse oxidativo

O treinamento físico promove o aumento transitório de EROs, que desempenham um papel fundamental, pois agem como uma alavanca no processo de adaptação muscular (MORTELETTE et al., 2010). A prática regular de atividade física pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, e alguns dos efeitos benéficos do exercício devem-se ao seu efeito sobre a função mitocondrial (DAI; RABINOVITCH; UNGVARI, 2012). Durante a atividade física, a musculatura intensifica o metabolismo energético estimulando a respiração celular, aumentando a captação de oxigênio e produzindo maior quantidade de ATP e, consequentemente, aumentando a produção mitocondrial de EROs, como o O_2^{-}• pela xantina oxidase e, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (FLOHÉ, 2009; JI, 1999; LAMBERTUCCI et al., 2007; SELMAN, 2002).

Em resposta ao aumento de EROs, ocorre o aumento da produção e atividade de enzimas antioxidantes. Isso ocorre devido ao pré-condicionamento, no qual as células são expostas a um estado de desbalanço redox que exige a amplificação de uma resposta antioxidante que irá prevenir a formação endógena de EROs ao aumentar a atividade de enzimas mitocondriais (Figura 6) (DE LISIO et al., 2011).

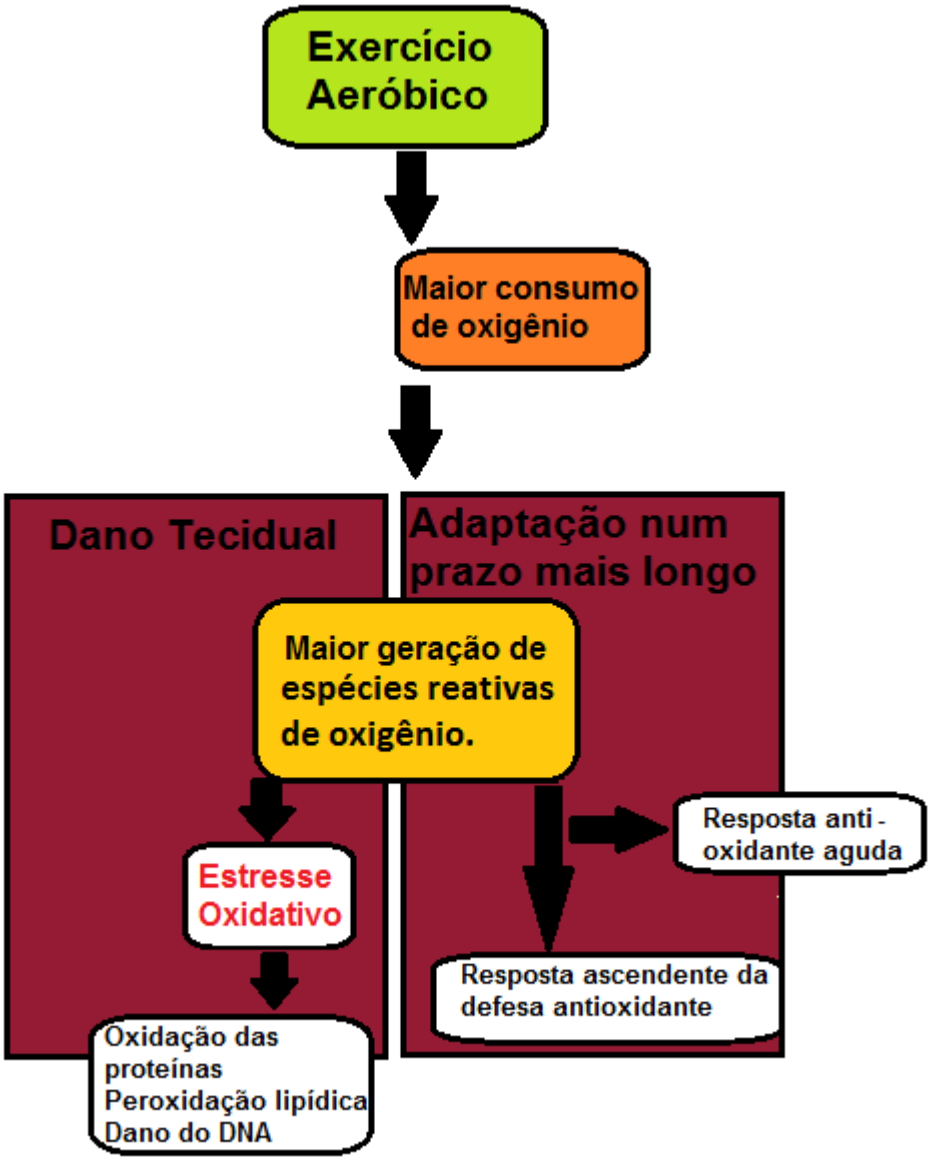

Figura 6. Cascata de eventos e adaptações produzidas pelo exercício aeróbico regular que reduzem a probabilidade de dano tecidual e adaptações diante do estresse oxidativo. (McArdle et al. 2008 ADAPTADO).

Há evidências da interação entre os efeitos protetores do enriquecimento ambiental e o estresse oxidativo. Fernández e colaboradores (2004) relacionou a melhora cognitiva e motora de ratos velhos pelo enriquecimento com a redução simultânea do estresse oxidativo, sugerindo um possível mecanismo de ação do enriquecimento ambiental.

Herring e colaboradores (2010) mantiveram ratas sob habitação padrão e enriquecido a partir do dia 30 até 5 meses de idade. Os autores

chamaram tal programa de estimulação física e cognitiva. A estimulação ambiental foi capaz de atenuar os processos pró-oxidativos e desencadeou os mecanismos de defesa antioxidantes, tal como indicado por biomarcadores diminuídos para oxigênio reativo e espécies de nitrogênio, a regulação negativa de mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, a diminuição da expressão das caspases pró-apoptóticas, e supra-regulação de SOD1 e SOD2. Entretanto, Servais e colaboradores (2003), em estudo semelhante com ratas nos seus primeiros meses de vida, não encontraram resultados significativos em relação aos processos pró-oxidativos.

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, com ratos Lou/C, se verificou que atividade física voluntária em longo prazo não foi capaz de alterar o consumo de O_2 nem a medida de H_2O_2. Em contraste, as atividades da glutationa peroxidase e da catalase foram aumentadas significativamente, apesar da ausência de alteração na capacidade oxidativa. Os autores concluíram que a capacidade anti-oxidante do músculo pode ser significativamente melhorada por atividade física voluntária prolongada executada na roda de correr, sem a necessidade de um aumento na capacidade oxidativa mitocondrial.

Estudos que analisaram o balanço redox em ratos que participaram de um protocolo de enriquecimento ambiental verificaram que o aumento da produção de proteínas suprime a produção de oxirradicais, tais como a glutationa, e a homeostase do cálcio celular, e estabiliza e inibe a cascata bioquímica apoptótica (DRINGEN et al., 2000; MATTSON et al., 2001). Em contraste, Hoffman e Pervaiz (2009) estudaram as doenças inflamatórias do intestino (onde as proteínas apoptóticas e os níveis de TNF-alfa são elevados) e observaram que a atividade física voluntária em rodas de correr, durante 16 semanas melhora a capacidade antioxidante (GPx e CAT) e reduz a expressão de TNF-alfa nos linfócitos intestinais, mas não reduz a expressão de proteína pró-apoptótica após exercício agudo .

Em relação à função cerebral, Arnaiz e colaboradores (2004) apresentaram evidências de que ratos de 27 meses de idade em um ambiente enriquecido mostram um melhor desempenho em memória de

trabalho espacial do que os ratos criados em ambientes padrão da mesma idade. Como o óxido nítrico regula a respiração mitocondrial, os autores acharam relevante medir o efeito do ambiente enriquecido na atividade dos complexos mitocondriais da cadeia respiratória, considerando que mudanças importantes na taxa de respiração devem ocorrer em associação com a plasticidade sináptica. Foi apontado que a atividade enzimática do complexo I foi 80% maior em ratos de ambiente enriquecido, em comparação com o grupo controle. Os autores concluíram que um ambiente amplamente enriquecido impede ratos velhos da deficiência associada ao envelhecimento da cognição espacial, plasticidade sináptica e produção de óxido nítrico.

2 JUSTIFICATIVA

Muitas estratégias têm sido propostas para permitir a manutenção de uma excelente função cardíaca com o envelhecimento, o que resulta em uma melhor qualidade de vida e, consequentemente, maior longevidade dos indivíduos. Corroborando com esta ideia o presente trabalho utilizou como estratégia à disposição de diferentes objetos (alternados semanalmente) que estimulassem os animais a realizar atividade física voluntária. Diferente dos protocolos tradicionais de treinamento físico, onde o animal é forçado a fazer determinada atividade, neste estudo os animais foram expostos a um ambiente enriquecido para realizarem atividade física conforme a sua vontade. A maioria dos estudos trabalha com as rodas de correr, no entanto, são meios caros de estimular atividade física voluntária, ainda mais quando se pretende implementar o ambiente enriquecido como uma rotina no biotério. Por isso, o presente trabalho utilizou materiais simples, fáceis de encontrar e de baixo custo, como bolinhas de papel e rolos de papelão.

A atividade física estimulada no presente trabalho poderia ser relacionada a atividade física voluntária de idosos, como por exemplo: dançar no clube da terceira idade ou caminhadas semanais na praça, quarteirão ou praia como atividades prazerosas que, embora de baixa intensidade, pudessem proporcionar benefícios cardiovasculares.

3 HIPÓTESE

Considerando os achados da revisão da literatura relacionando os benefícios do exercício físico nas variáveis que compõem o estresse oxidativo em jovens e velhos, a hipótese do presente estudo é que o enriquecimento ambiental, como uma forma de atividade física voluntária, é capaz de promover uma adaptação no perfil de estresse oxidativo no coração e músculo esquelético (sóleo) – diminuindo o dano oxidativo causado pelo envelhecimento e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, esperamos encontrar alterações na composição corporal e desempenho físico dos animais que participaram da intervenção.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar se o enriquecimento ambiental, ao estimular a atividade física voluntária, gera adaptações cardiometabólicas (glicose, gorduras marrom e periepididimal) e alterações no perfil de estresse oxidativo no coração e no músculo esquelético (sóleo) em uma linhagem de ratos amplamente utilizada, wistar, diferenciada conforme a idade.

4.2 Objetivos Específicos

- Relacionar os dados da atividade das enzimas antioxidantes com o dano oxidativo no coração e músculo esquelético de ratos jovens e velhos que participaram ou não do enriquecimento ambiental.
- Relacionar os efeitos do enriquecimento ambiental como atividade física voluntária relacionando os parâmetros de estresse oxidativo e adaptações cardiometabólicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética com o seguinte registro: CEUA-ICB/USP: 075/2011.

5.2 Animais

Os grupos de animais foram mantidos em gaiolas padrão para ratos, mantendo-se até 5 animais para os grupos de ratos adultos jovens e até 3 animais para os grupos de ratos velhos. Os ratos adultos jovens iniciaram o estudo com 3,5 meses, enquanto os velhos iniciaram o estudo com 15,5 meses de idade. O estudo transcorreu por 6 semanas, representando mais 1,5 meses, obtendo-se ao final, animais com 5 meses para os grupos de ratos adultos jovens e 17 meses para os ratos velhos. Os animais foram separados nos seguintes grupos: jovem controle (JC), jovem com enriquecimento ambiental (JEA), velho controle (VC) e velho com enriquecimento ambiental (VEA).

Antes de se dar início ao estudo, os animais foram pesados e submetidos a teste de desempenho físico em esteira ergométrica, de forma a saber qual capacidade física estes animais apresentavam antes do início do estudo. Este teste de desempenho foi repetido no meio do protocolo (semana 3) e ao final do protocolo (semana 6). Ao final do protocolo, os animais foram pesados, eutanasiados os tecidos coletados.

5.3 Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento foi utilizado para atender às necessidades dos ratos Wistar e estimular atividade física voluntária. Para isso, foram proporcionados aos animais alguns objetos como rolos de papelão e bolinhas de papel. Para manter a atenção dos animais, a cada semana era mudado o objeto apresentado, alternando-se os rolos de papelão e as bolinhas de papel. Assim, na semana 1 foi utilizado rolo de papelão, na semana 2 foram utilizadas bolinhas de papel, na semana 3 novamente o rolo de papelão, e assim por diante. Este protocolo foi seguido até a sexta semana, vale ressaltar que todos os dias os objetos eram trocados devido ao seu desgaste (WILL et al., 2004 adaptado).

5.4 Coleta e pesagem dos tecidos

Após o término do protocolo experimental, os animais foram deixados em jejum de 6 horas para a medida da glicemia de jejum. Após esse procedimento, os animais foram pesados e eutanasiados com sobrecarga de anestésico (xilazina 20mg/kg e ketamina 100mg/kg). Posteriormente, foram coletados os seguintes tecidos: ventrículos direito e esquerdo, gordura branca visceral (periepididimal), gordura branca subcutânea (ventral) e gordura marrom. Todos estes tecidos foram pesados em balança de precisão (Denver instrumentals XP 60) e anotados.

Os valores obtidos para o peso de cada tecido e de cada animal foram tabulados em planilhas de Excel e posteriormente foram normalizados pelo peso corporal de cada animal.

Assim, calculamos:

[peso do tecido (g) / peso corporal (g)] x 100

Esta fórmula nos representa o valor percentual de cada tecido para o animal estudado. As amostras foram congeladas em freezer – 80˚C logo

após a coleta e pesagem. As análises do estresse oxidativo foram realizadas com o coração e músculo (sóleo).

5.5 Avaliação Glicêmica

A glicemia foi obtida utilizando-se lâminas de bisturí estéreis, glicosímetro portátil Accu-Chek® e fitas apropriadas Accu-Chek®. A coleta de sangue foi realizada momentos antes da eutanásia. Para tal, realizou-se pequeno corte na cauda do animal e uma gota de sangue foi coletada para a medida de glicemia.

5.6 Teste de desempenho físico em esteira ergométrica

Para a obtenção do desempenho físico dos animais, realizou-se teste máximo em esteira ergométrica (Inbramed, Millenium) adaptada para ratos. O teste iniciou-se com velocidade de 0,3 km/h e consistiu no aumento gradual da velocidade (0,3 km a cada 3 minutos) até a exaustão do animal (RODRIGUES et al., 2007 adaptado).

Foram realizados três testes durante o protocolo de enriquecimento ambiental: o primeiro ocorreu no início do protocolo, para determinar a capacidade física inicial dos grupos; o segundo ocorreu na terceira semana e o último ao término do protocolo experimental, ambos com finalidade de observar alterações na capacidade física decorrente da atividade física voluntária promovida pelo protocolo. Os animais não foram adaptados à esteira previamente aos testes de esforços para não interferir no programa de estímulo com o enriquecimento ambiental.

5.7 Atividade das enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo

A atividade das enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo foi realizada em colaboração com o laboratório do Prof Dr Rui Curi. Esta análise foi selecionada como um marcador metabólico nos permitindo ou não associar a melhora na performance ao protocolo de atividade física voluntária. O tecido utilizado foi o músculo sóleo.

5.7.1 Atividade da citrato sintase

A citrato sintase foi analisada como descrito por Alp e colaboradores (1976). O meio de ensaio consistiu de 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 0,2 mM de DTNB, 0,1 mM de acetil-CoA, 0,5 mM de oxaloacetato e 0,05% de Triton X-100. O volume total do ensaio foi de 165 e 10 µL do homogenato foi adicionado. O ensaio foi iniciado pela adição de oxaloacetato.

5.7.2 Atividade da hexoquinase

A análise da hexoquinase foi realizada conforme descrito por Crabtree & Newsholme (1972). O meio de ensaio consistiu em 75 mM de Tris-HCl, 7,5 mm de MgCl2, 0,8 mM de EDTA, 1,5 mM de KCl, 4 mM 2 mercaptoetanol, 0,4 mM de NADP +, ATP 2,5 mM, 1 mM de glucose, 1,4 unidades de desidrogenase de glicose-6-fosfato , 0,05% de Triton X-100. O volume total do ensaio foi de 165 µL e 10 µL do homogenato foi adicionado. O ensaio foi iniciado pela adição de glicose.

5.8 Avaliação do perfil de estresse oxidativo

5.8.1 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

5.8.2 Dosagem de Carbonilas

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (REZNICK; PACKER, 1994). O tecido utilizado foi homogeneizado de tecido cardíaco e músculo sóleo. A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas será medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: Guanidina (6M) em HCl (2,5M) pH= 2,5; 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em HCl (2,5M); TCA 20%; TCA 10%; Etanol - acetato de etila 1:1 (V/V). Paralelamente foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm. Os resultados estão expressos em nmoles por mg de proteína.

5.8.3 Quimiluminescência (QL)

O método consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. O tecido utilizado foi homogeneizado de

tecido cardíaco. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintilation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, a fim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu de uma solução reguladora (KCl 140mM e fosfatos 20mM) em pH 7,4. Foi realizada uma leitura inicial, considerando a emissão de luz basal pelo homogeneizado. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de terc-butila a 400mM. Foi medida a emissão de luz e, desta, descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama (mg) de proteína, para o homogeneizado de tecido (GONZALEZ et al. 1991).

5.8.4 Medida de Peróxido de Hidrogênio (H_20_2)

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. O tecido (coração) foi incubado por 60 minutos em tampão fosfato 10 mM (NaCl 140 mM e dextrose 5mM). O sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mM e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados estão expressos em nmoles de H_2O_2 por mg de proteína (PICK; KEISARI 1980).

5.8.5 Determinação da atividade da catalase

A atividade da enzima catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, a atividade da catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O método consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm. A análise foi realizada com homogeneizado de tecido cardíaco e músculo sóleo. Os resultados estão expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1984).

5.8.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A técnica baseia-se na capacidade de inibição da auto-oxidação do pirogalol pela SOD. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol. Foi utilizada uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mM; EDTA a 1mM, e HCl para atingir o pH 8,2), pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM) e catalase a 30μM. Para que os valores de inibição, dados em percentagem, foram transformados em unidade de SOD, foi utilizado um fator de calibração. A análise foi realizada com homogeneizado de tecido cardíaco e músculo sóleo. O resultado foi dado em unidade de SOD por mg de proteína (MARKLUND, 1985).

5.8.7 Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução da GSSG à GSH. Foi observada a diminuição de absorbância do NADPH a 340nm.A análise foi realizada com

homogeneizado de tecido cardíaco. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por mg de proteína (FLOHÉ; GUNZLER 1984).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média±EPM. O teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilks. Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores, seguida do pós-teste de Bonferroni.

7 RESULTADOS

7.1 Perfil cardiometabólico

Os resultados apresentados a seguir foram expressos em média ± EPM. De forma geral, os resultados nos evidenciam padrões de resposta ao enriquecimento ambiental diferentes entre jovens e velhos. O enriquecimento ambiental não alterou o peso corporal dos animais (Gráfico 1), sendo que os ratos velhos apresentaram-se mais pesados que os ratos jovens, como esperado.

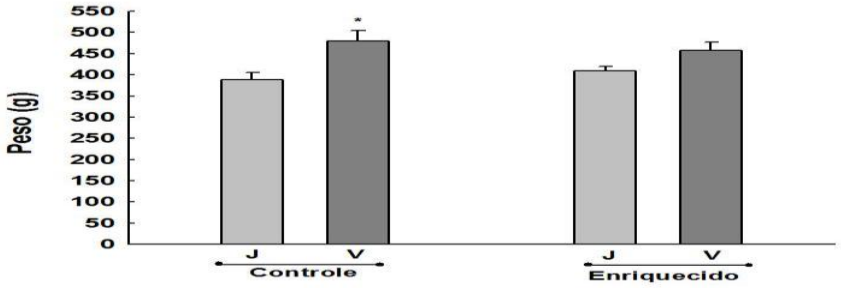

Gráfico 1. Valores de peso corporal (g) dos grupos estudados. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; Enriquecido= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

Quanto aos tecidos adiposos, a gordura branca subcutânea, a gordura branca periepididimal e a gordura marrom, apresentaram importante variação apenas na gordura marrom e gordura branca periepididimal (Gráfico 5 e Gráfico 6). É possível observar que a gordura marrom se apresenta em maior tamanho nos animais jovens e, como esperado, reduzida nos animais velhos controles. Contudo, nos animais jovens o enriquecimento ambiental foi capaz de reduzir esta gordura e aumentá-la nos animais velhos (Gráfico 2).

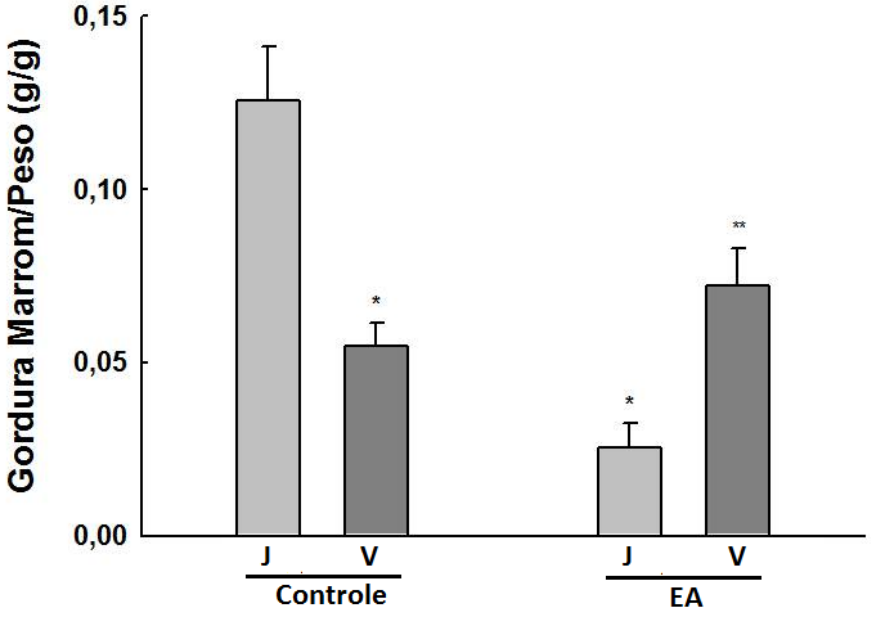

Gráfico 2. Valores da relação gordura marrom /peso corporal [(g/g) x 100] dos grupos estudados. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. * Diferente do J controle **Diferente do V Controle. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. Significância P≤0,05.

Entre os grupos de animais jovens não há diferença significativa na relação gordura periepididimal/peso corporal. Entretanto, no grupo de animais velhos é possível observar redução desta relação no grupo VEA comparado ao grupo VC (Gráfico 3).

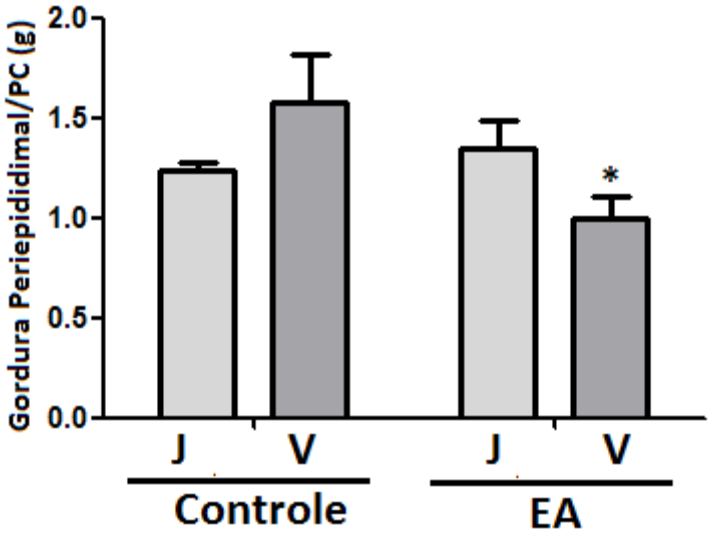

Gráfico 3. Valores da relação gordura periepididimal/peso corporal [(g/g) x 100] dos grupos estudados. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. * Diferente do V controle. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. Significância P≤0,05.

Em relação à glicemia avaliada não foi observada diferença significativa entre os grupos. De forma geral, os animais mantiveram-se euglicêmicos, variando as médias entre 110 a 125mg/dL (Gráfico 4).

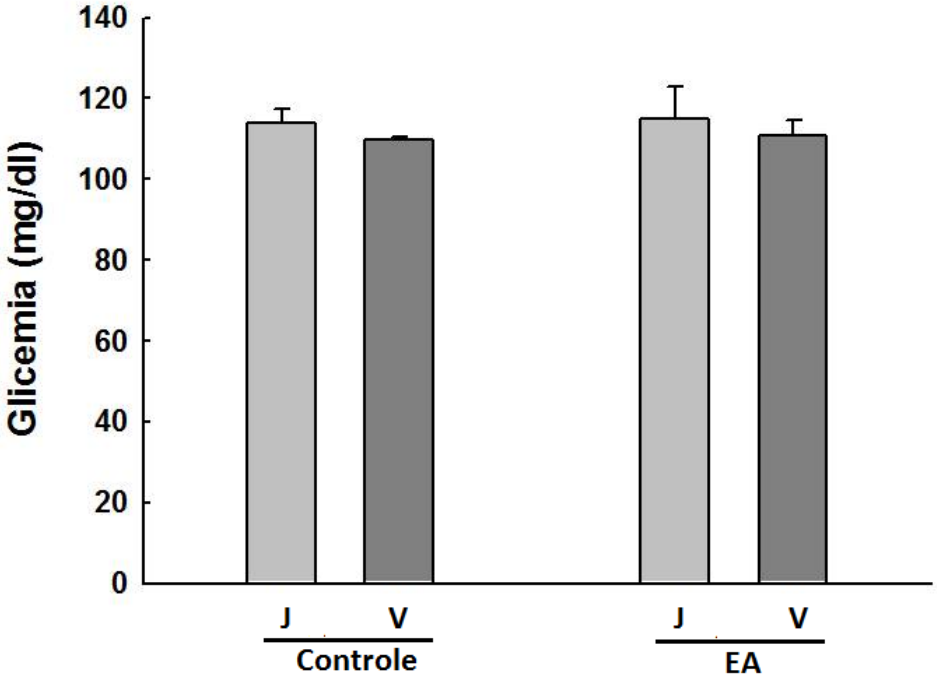

Gráfico 4. Níveis de glicemia no sangue (mg/dL). As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. Significância *P≤0,05.*

A razão coração/peso corporal não demonstrou diferenças significativas (Gráfico 5) nem nos animais jovens, nem nos velhos.

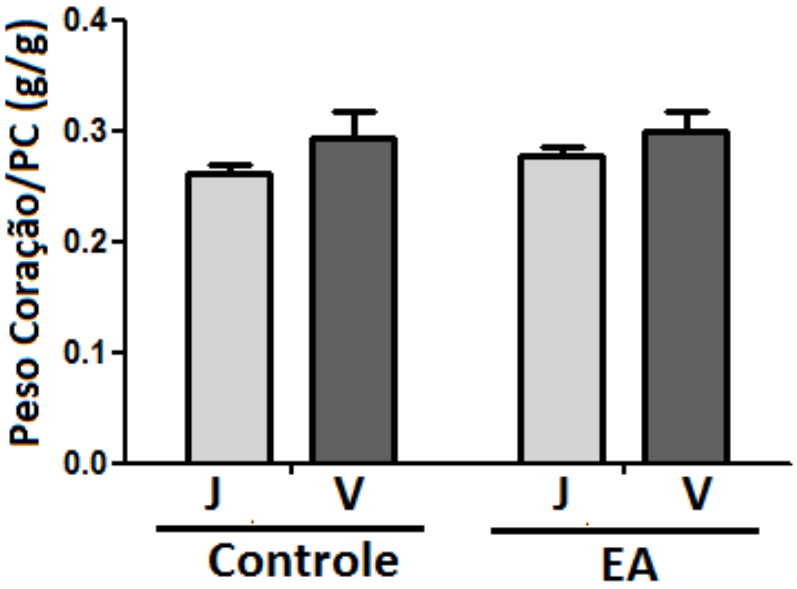

Gráfico 5. Razão entre coração e peso corporal (g/g) nos grupos estudados. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho. EA: Enriquecimento ambiental. Significância P≤0,05.

7.2 Desempenho físico e enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo

A avaliação do desempenho físico apresentou resultados extremamente relevantes, visto que mostrou diferentes padrões de resposta entre jovens e velhos. O Gráfico 6 A e C apresenta as velocidades atingidas durante os testes de desempenho 1 (semana 0), 2 (semana 3) e 3 (semana 6) de estudo. É possível observar que os jovens não apresentaram alteração de desempenho na esteira durante todo o estudo, nem de velocidade alcançada (Gráfico 6A) e nem de tempo de corrida (Gráfico 6B). Já os animais do grupo VEA apresentaram alteração de desempenho na esteira, ou seja, aumento de velocidade alcançada e tempo de corrida (Gráfico 6C) nos testes 2 e 3 comparados ao grupo VC (Gráfico 6D).

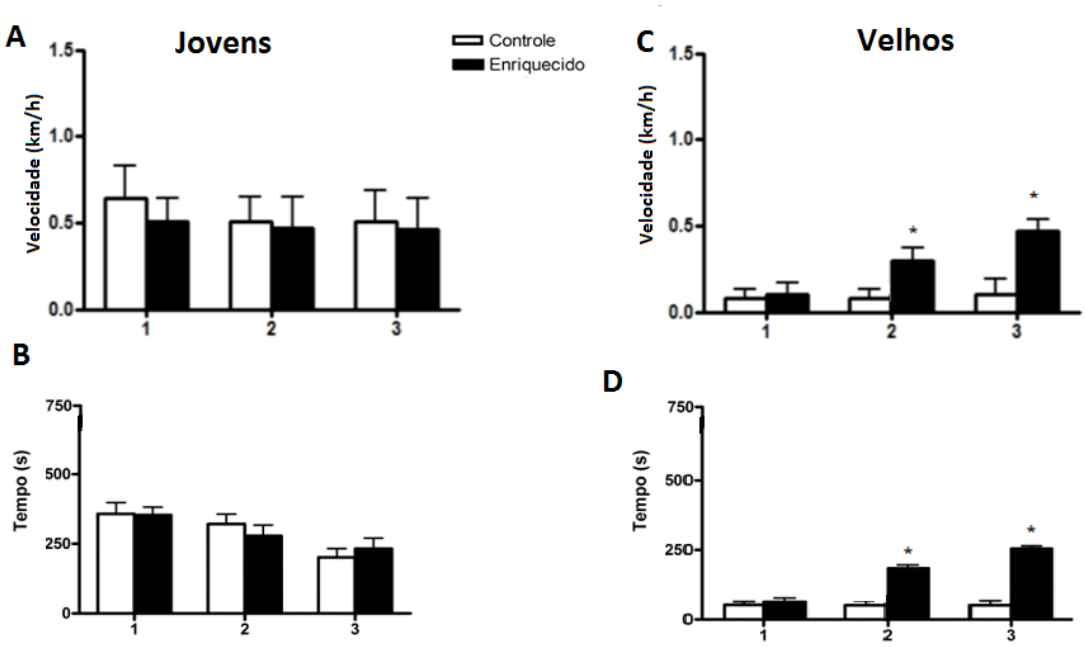

Gráfico 6. Valores de velocidade (km/h) (A e C) e tempo (s) (B e D) alcançados em esteira ergométrica durante o teste de desempenho físico (Teste Máximo). A e C - São mostrados os testes em separado para jovens (A) e velhos (C). B e D - São mostrados os testes em separado para jovens (B) e velhos (D) *Diferente do 1. As barras apresentam média±EMP. 1, 2, 3 correspondem aos períodos em que foram realizados o teste de esforço. 1: início do estudo; 2: no meio do estudo e 3: no final do estudo. Enriquecido= Enriquecimento Ambiental. Significância P≤0,05.

A enzima citrato sintase mostrou atividade reduzida no grupo VC comparado ao JC, o que seria esperado para indivíduos velhos. No entanto, esta redução desaparece com o enriquecimento ambiental, não havendo diferença significativa entre os grupos VEA e JEA (Gráfico 7).

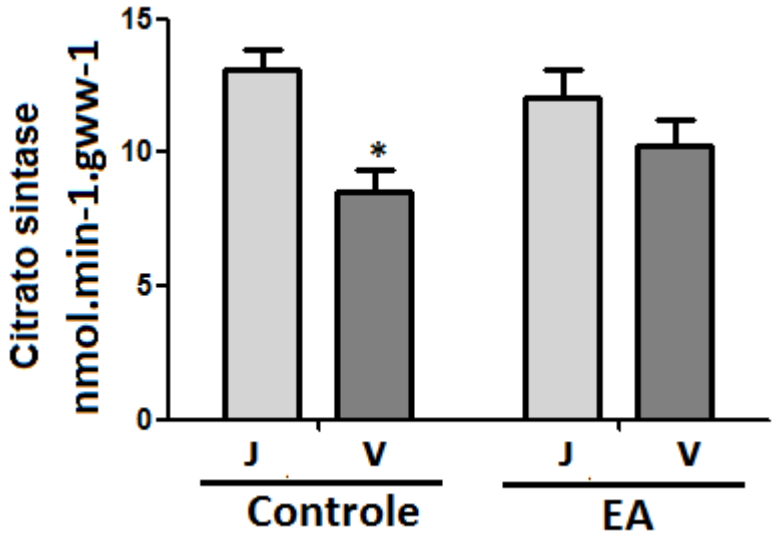

Gráfico 7. Atividade da enzima citrato sintase (CS) (nmol.min-1gww-1) em homogeneizado de músculo sóleo. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho. EA: Enriquecimento ambiental. *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

Quando avaliamos a atividade da enzima hexoquinase, não observamos diferenças entre os grupos, nem para os animais jovens, nem para os velhos (Gráfico 8).

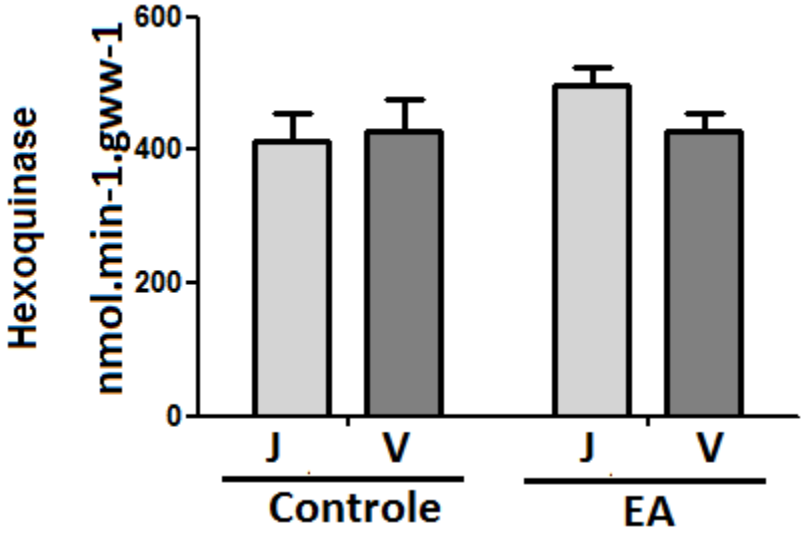

Gráfico 8. Atividade da enzima hexoquinase (nmol.min-1gww-1) em homogeneizado de músculo sóleo. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho. EA: Enriquecimento ambiental. Significância *P≤0,05.*

7.3 Análises do perfil de estresse oxidativo

7.3.1 Análise do dano oxidativo no tecido cardíaco

Em relação ao perfil de estresse oxidativo, analisando os pró-oxidantes é possível observar que as carbonilas (determinação de proteínas

modificadas oxidativamente) se apresentam reduzidas no VC comparado ao JC. Por outro lado, o EA foi capaz de reduzir o dano às proteínas nos ratos jovens (grupo JEA - Gráfico 9).

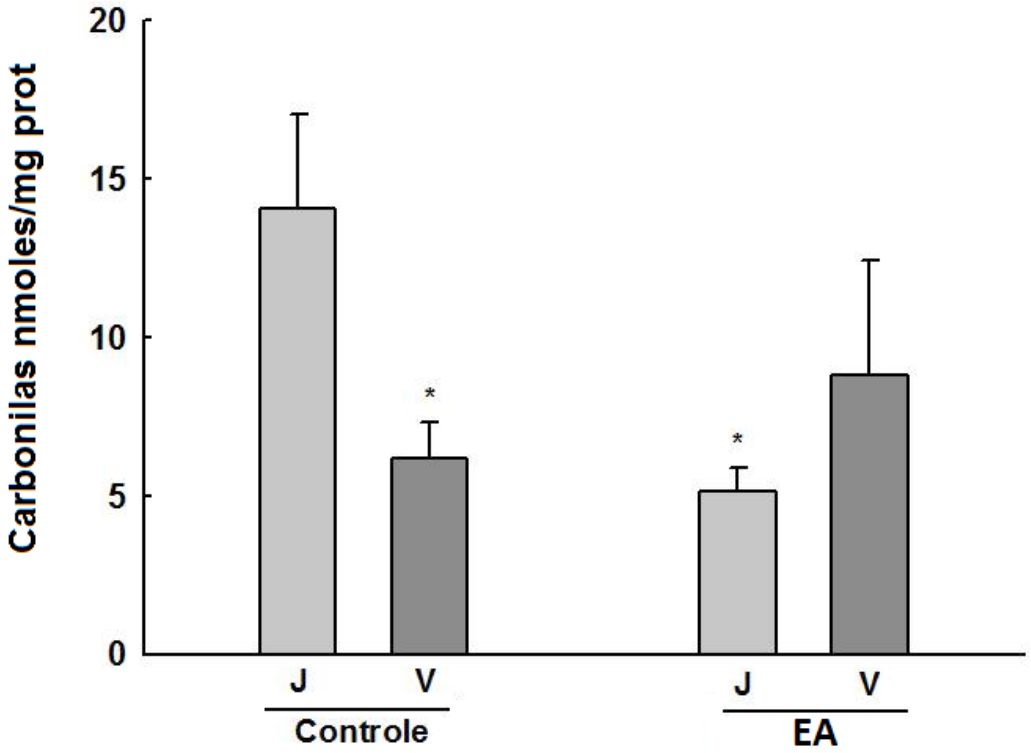

Gráfico 9. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de carbonilas (determinação de proteínas modificadas oxidativamente) (nmoles/mg de proteína) em homogeneizado de tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; Enriquecido= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

A quimiluminescência (QL), um indicador de peroxidação lipídica, mostrou redução da peroxidação lipídica nos grupos VC, JEA e VEA comparados ao grupo JC. Entretanto o grupo VEA se encontra aumentado comparado aos grupos JEA e VC (Gráfico 10).

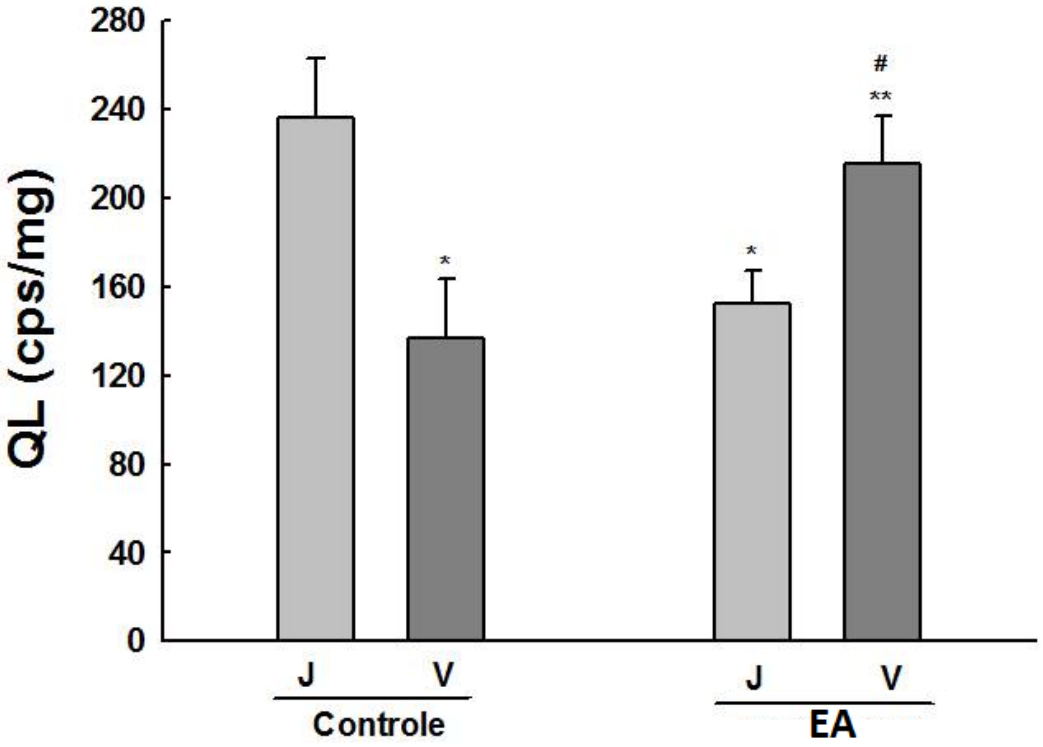

Gráfico 10. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL) (contagem por segundo por mg de tecido) em homogeneizado do tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental *Diferente do J controle. ** Diferente do V controle. # Diferente do JEA. Significância P≤0,05.

Na análise de H_2O_2 foi possível verificar uma redução no grupo JEA comparado ao JC. Os demais grupos (VC e VEA) também possuem valores de H_2O_2 significantemente menores comparados ao JC (Gráfico 11).

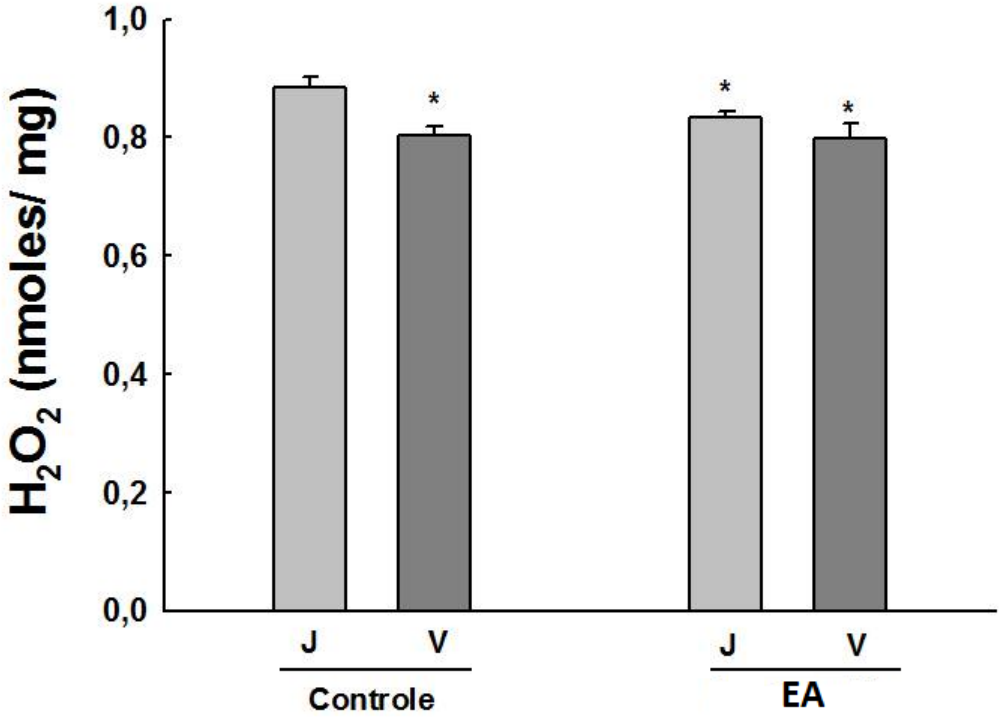

Gráfico 11. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio (H2O2) (nmoles/ mg de tecido) em homogeneizado de tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

7.3.2 Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco.

Em relação às enzimas antioxidantes, conforme demonstrado a seguir, a atividade da enzima catalase (CAT) encontra-se reduzida nos grupos JEA e VEA comparada aos grupos JC e VC (Gráfico 12).

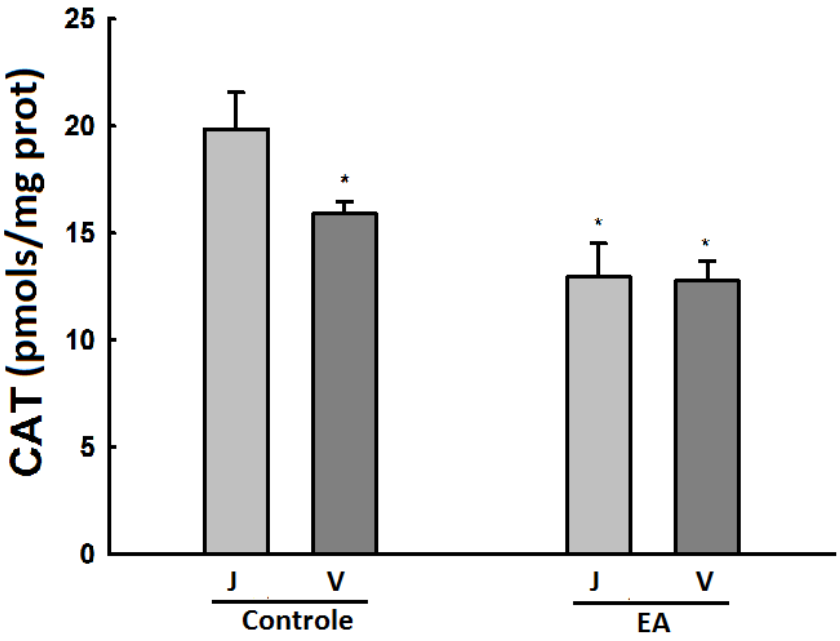

Gráfico 12. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de peróxido de hidrogênio (H2O2) (nmoles/ mg de tecido) em homogeneizado de tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental * Diferente do J Controle. Significância P≤0,05.

O resultado da SOD mostrou aumento significativo no grupo VEA comparado ao VC. Além disso, o grupo VC apresenta-se reduzido comparado ao grupo JC (Gráfico 13).

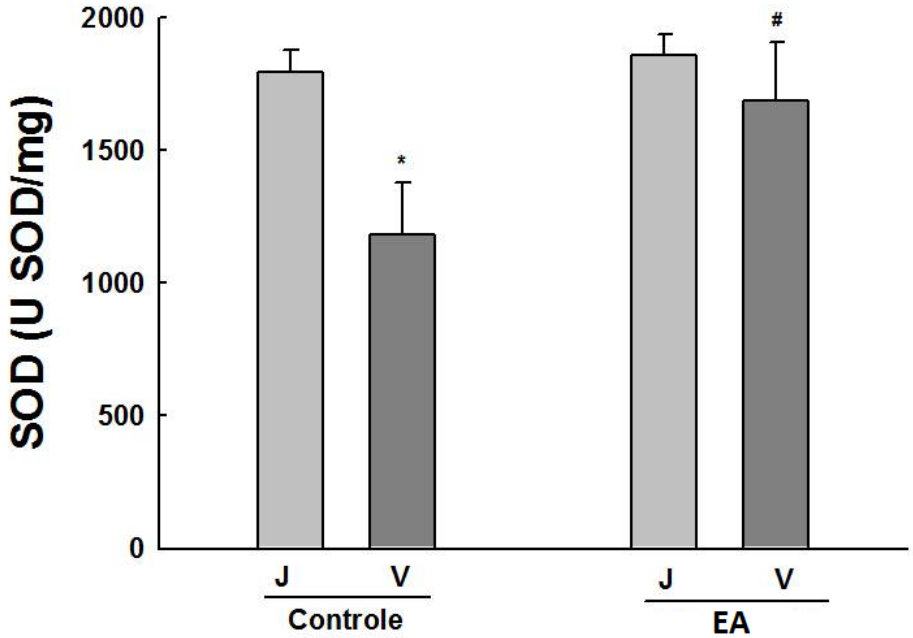

Gráfico 13. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (Unidades de SOD/ mg de tecido) em homogeinezado de tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle.# Diferente do V controle. Significância P≤0,05.

A atividade da enzima antioxidante GPx não apresentou diferença significativa entre os grupos. Contudo, é possível observar uma tendência de aumento nos grupos enriquecidos, especialmente nos velhos, onde o grupo VEA apresenta um aumento de 30% em relação ao VC. Talvez se tivéssemos um número maior de amostra para esta análise teríamos conseguido encontrar diferença estatística (Gráfico 14).

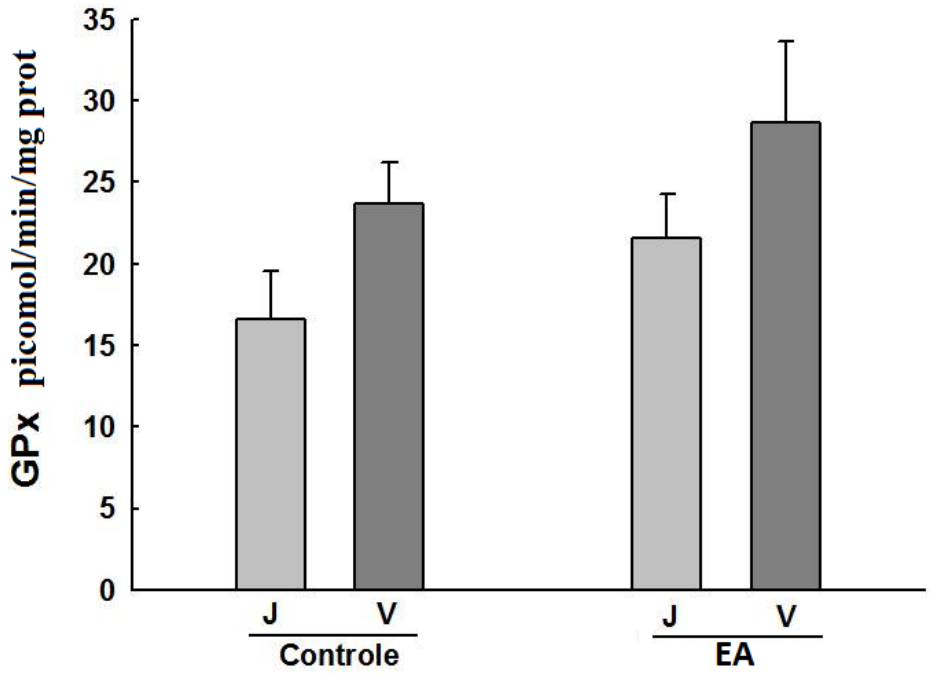

Gráfico 14. Atividade da enzima antioxidante Glutationa Peroxidase (GPx) (picomo por minuto/mg de proteína) em homogeneizado de tecido cardíaco. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 4 a 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. Significância P≤0,05.

7.3.3 Análise do dano oxidativo no músculo sóleo

Assim como no tecido cardíaco, no músculo (sóleo) a carbonila apresenta-se reduzida no grupo VC comparado ao JC. Com o EA é possível observar redução do dano às proteínas no grupo JEA (Gráfico 15). Como observado nos corações, o músculo sóleo dos velhos também não apresentou resposta favorável (de redução) após o EA.

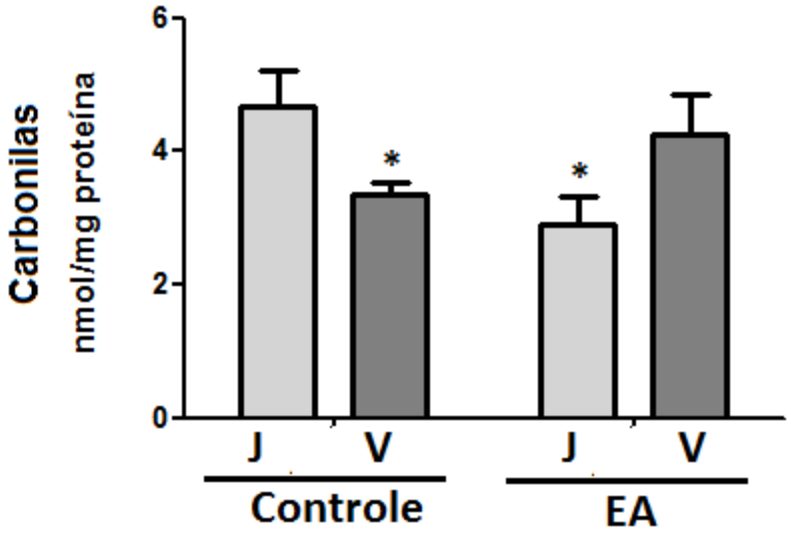

Gráfico 15. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de carbonilas (determinação de proteínas modificadas oxidativamente) (nmoles/mg de proteína) em homogeneizado de músculo (sóleo). As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

Diferente do resultado da QL no coração, no músculo sóleo não há diferença entre os grupos VC e JC. No entanto, o EA é capaz de reduzir a lipoperoxidação no grupo JEA (Gráfico 16).

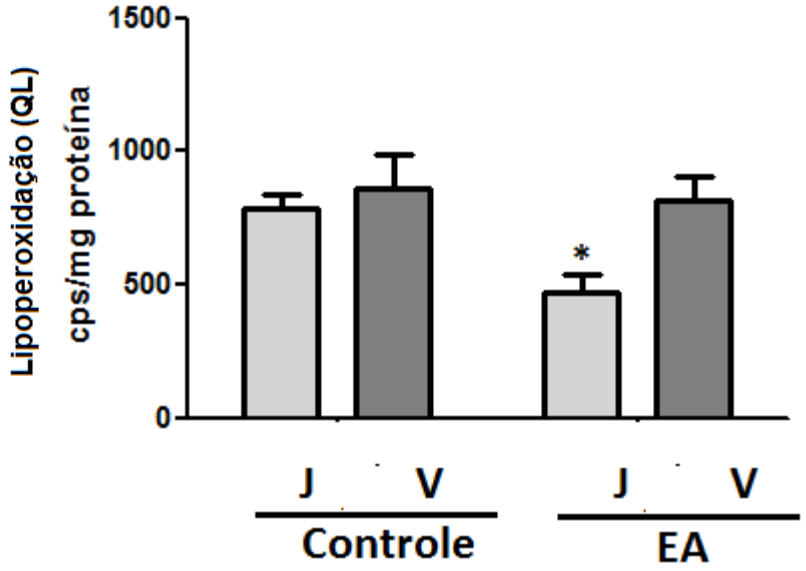

Gráfico 16. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de Lipoperoxidação por Quimiluminescência (QL) (contagem por segundo por mg de tecido) em homogeneizado no músculo (sóleo). As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental *Diferente do J controle. Significância P≤0,05.

A enzima antioxidante catalase reduz no nos grupos JEA e VEA comparada aos seus respectivos grupos controles. Além disso, a atividade da catalase encontra-se menor no grupo JEA comparada ao grupo VEA (Gráfico 17).

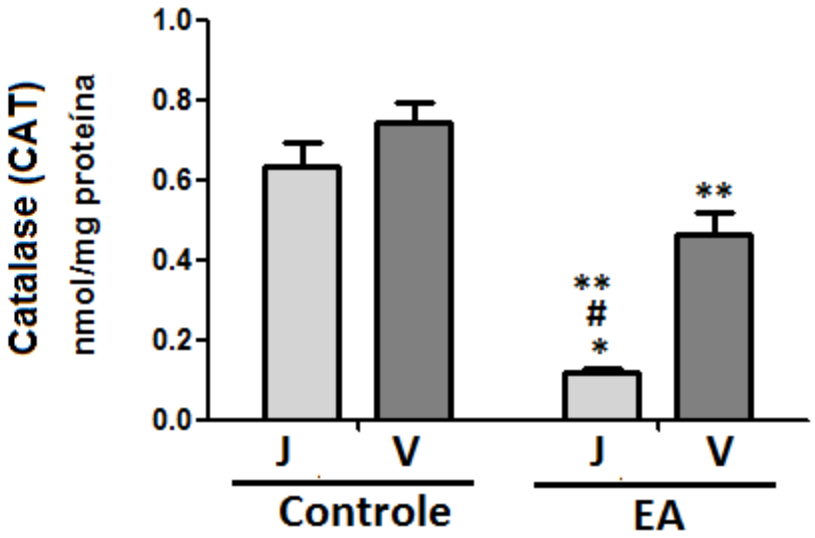

Gráfico 17. Atividade da enzima antioxidante catalase (pmol/mg tecido) em homogeneizado do músculo sóleo. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental * Diferente do J Controle. ** Diferente do V Controle. # Diferente do VEA Significância P≤0,05.

Já a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) encontra-se menor no grupo JEA comparado ao JC. No grupo VEA o resultado é semelhante ao encontrado no coração, pois há um aumento da atividade da SOD neste grupo comparado ao VC (Gráfico 18).

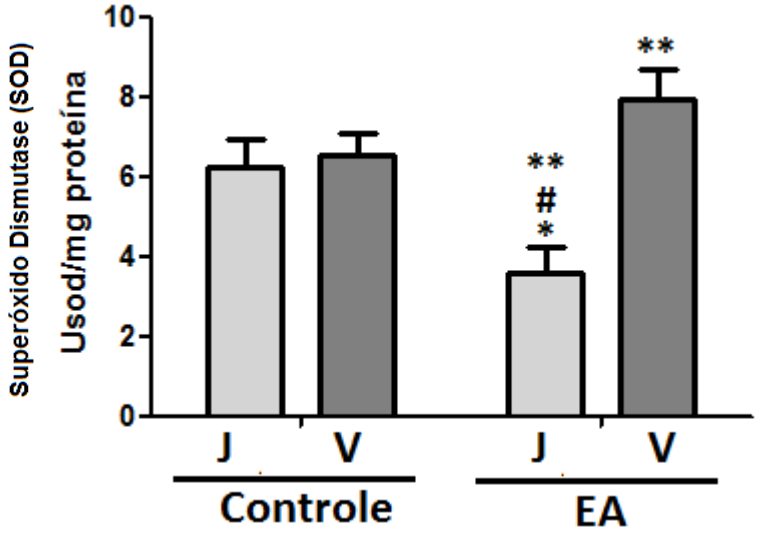

Gráfico 18. Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (U SOD/mg proteína) em homogeneizado no músculo sóleo. As barras apresentam média±EMP. Foi analisado estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de 2 vias e aplicado o pós-teste de Bonferroni, com n= 7 animais. J= jovem; V= velho; EA= Enriquecimento Ambiental. *Diferente do J controle.**Diferente do V controle. # Diferente do VEA. Significância P≤0,05.

8 DISCUSSÃO

8.1 Medidas morfométricas

O aumento significativo do peso do grupo de ratos velhos comparado aos jovens já era esperado. Com o passar do tempo, há tendência a ganho de peso pelo aumento do tecido adiposo e perda de massa muscular e óssea (HUGHES et al., 2004). No entanto, o protocolo de enriquecimento ambiental utilizado neste estudo não foi capaz de alterar o peso dos animais. Nesse sentido, Araújo e colaboradores (2010) disponibilizou por 8 meses tubos de PVC para enriquecer as caixas dos ratos em um biotério de criação e também não encontrou alterações significativas no peso.

Em relação aos tecidos adiposos, foi possível observar um resultado até então pouco explorado em trabalhos com enriquecimento ambiental. A gordura marrom se apresenta em maior tamanho nos animais jovens. Contudo, nos animais jovens que participaram da intervenção, o enriquecimento ambiental foi capaz de reduzir de forma importante esta gordura. O adipócito marrom tem como principal característica regular a produção de calor e consequentemente a temperatura corporal, ou seja, ser termogênico (VIRTANEN et al., 2009). A alta concentração de citocromo oxidase das mitocôndrias contribui para a coloração mais escurecida do tecido adiposo; essa proteína permite que esse tecido utilize ácidos graxos como substrato para a produção de calor (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Esse tecido está relacionado com a manutenção da temperatura corporal, o que pode explicar o fato de estar aumentada nos ratos jovens comparados aos ratos velhos, já que a termorregulação sofre a influência do processo de envelhecimento (OH-ISHI et al., 1996).

A avaliação da gordura visceral baseou-se na relação gordura periepididimal/peso corporal, sendo que observamos que o EA é capaz de reduzir esta relação nos ratos velhos. Se levarmos essa relação para

humanos, veremos que, com o envelhecimento, a distribuição da gordura corporal se acentua no tronco e menos nos membros. Dessa forma, a gordura abdominal eleva o risco para doenças metabólicas, sarcopenia e declínio de funções (HUGHES et al., 2004). Matsudo e colaboradores (2000) relatam que, o aumento da gordura corporal total e redução do tecido muscular pode ocorrer principalmente devido a diminuição da taxa de metabolismo basal e do nível de atividade física. Voltando ao nosso modelo experimental, observamos que os animais jovens não apresentam alteração em função do EA, mas a gordura periepididimal reduz nos ratos velhos. Nesse sentido, Fiatarone-Singh (1998) relata que com o envelhecimento há aumento da gordura peripiedidimal, e nosso estudo mostra que o EA é capaz de reduzir esta gordura, apresentando um efeito benéfico neste grupo estudado.

8.2 Glicemia

Armario e colaboradores (1986) mostrou que ratos submetidos a protocolo de estresse (expostos a urina de gato) tinham os níveis de glicemia alterados. Além disso, Perez e colaboradores (1997) detectaram níveis anormais de glicose em ratos submetidos a outro tipo de estresse, mantidos em gaiolas individuais. No nosso estudo a glicemia não se mostrou diferente entre os grupos JEA, JC, VEA e VC, o que pode ser explicado pelo fato dos animais não terem sido submetidos a protocolos estressantes e não terem sido alojados em gaiolas individuais.

8.3 Desempenho físico

São escassos na literatura estudos que avaliam o desempenho físico de animais submetidos ao enriquecimento ambiental. No presente estudo, podemos observar que o EA não foi capaz de promover aumento na velocidade alcançada, nem no tempo de corrida nos testes de esforço dos animais jovens. Já os animais do grupo VEA apresentaram alteração de desempenho na esteira, ou seja, aumento de velocidade alcançada e tempo de corrida nos testes 2 e 3 comparados ao grupo VC. O grupo VC não mostrou diferença significativa entre os testes (1, 2, 3), e esse resultado se deve também ao envelhecimento associado ao sedentarismo, confirmando os achados em outros estudos que submeteram ratos idosos a protocolo de teste de esforço semelhante ao nosso (WRIGHT, 2014; ENOKA, 1997). Matsudo (2002) relata que o exercício físico não consegue interromper o processo de envelhecimento biológico, mas pode reduzir o seu impacto sobre o desempenho. Dessa forma, verificamos que a atividade física voluntária nos animais velhos, mesmo que não seja semelhante àquela obtida em protocolos de treinamento físico, promoveu uma melhora do desempenho em esteira.

8.4 Atividade das enzimas marcadoras do metabolismo oxidativo

A atividade da citrato sintase (CS) tem sido usada como um biomarcador da densidade mitocondrial do músculo esquelético e sua capacidade oxidativa celular. A literatura descreve que o exercício físico pode induzir o aumento da atividade da citrato sintase (BISHOP et al., 2014; KOLTAI et al., 2012; OGURA et al. 2011). No presente estudo, a atividade da enzima citrato sintase é mais elevada no grupo JC em comparação com o grupo VC. Com a intervenção através de EA, pode-se ver que a diferença entre os grupos de jovens e velhos desaparece. Koltai et al. (2012), em um estudo com ratos submetidos a treinamento físico moderado em esteira, descobriu que há redução da atividade da enzima CS no grupo de ratos sedentários em comparação com os animais do grupo jovem sedentário, que

foi revertida pelo exercício. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos em camundongos (OGURA et al. 2011, LEICK et al. 2010, BETIK et al. 2009, KLITGAARD et al., 1985). Em um estudo transversal com seres humanos, Rimbert et al. (2004) constataram que a atividade da CS foi menor nos idosos sedentários e ativos comparativamente com indivíduos jovens sedentários e ativos correspondentes para a atividade diária avaliada pelo questionário Baecke. Em nosso estudo, esta redução só aparece no grupo VC comparado com o JC. Também em humanos, Crane (2010) e colaboradores descobriram que a atividade reduzida da CS tem sido relatada em idosos em comparação com indivíduos jovens igualmente ativos. Embora nosso estudo não tenha demonstrado essa redução no grupo VEA em comparação com o grupo JEA, é possível observar que a diferença entre as idades desapareceu após a exposição ao EA. Nesse caso, o grupo VEA apresentou atividade da CS semelhante ao JEA, o que indicaria que a atividade física voluntária atua na prevenção dos efeitos deletérios do envelhecimento celular.

Não é possível identificar diferença significativa na análise da atividade da hexoquinase. Existem poucos estudos relacionando o envelhecimento, o treinamento físico e atividade da hexoquinase. Na literatura é possível encontrar que o treinamento físico moderado foi capaz de aumentar a atividade desta enzima (LEICK, 2010; GULVE et al., 1993; SANCHEZ, 1991); o contrário do observado em nosso estudo. Talvez o modelo de atividade física voluntária de baixa intensidade utilizada em nosso estudo não foi o suficiente para causar alterações significativas na atividade desta enzima.

8.5 Perfil de estresse oxidativo

A partir de uma revisão de literatura atual verificamos que o nosso estudo é o primeiro a analisar o perfil de estresse oxidativo de ratos jovens e

velhos expostos ao modelo simples e acessível de enriquecimento ambiental. Verificamos que o perfil de estresse oxidativo de ratos jovens e velhos responde de maneira diferente à intervenção com o protocolo de EA, podendo estar associado a adaptações de enzimas antioxidantes e redução do dano oxidativo, como será detalhado a seguir.

Harman e colaboradores (1956) propôs pela primeira vez a teoria dos radicais livres do envelhecimento, mostrando que a produção de EROs é um dos principais determinantes de dano. Os efeitos deletérios de EROs em várias células e órgãos podem conduzir um declínio funcional dependente da idade, levando a doenças degenerativas (NAVARRO; BOVERIS, 2007).

As concentrações de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio, apresentaram-se reduzidas após 6 semanas de protocolo de atividade física voluntária no grupo JEA. As concentrações de H_2O_2 nos grupos VC e VEA se apresentaram menores comparadas ao JC. Porém, entre os grupos VC e VEA não verificamos diferença significativa. Acreditamos que essa redução encontrada no grupo JEA comparado ao JC se deve a uma adaptação no sistema de defesa não enzimático no tecido cardíaco.

Uma das vias de eliminação do peróxido de hidrogênio é a sua conversão em água e oxigênio pela enzima catalase. No presente estudo, no tecido cardíaco, a atividade dessa enzima encontra-se reduzida de forma significativa nos grupos JEA e VEA comparados ao JC. Já no músculo sóleo também é possível encontrar redução significativa do grupo VEA comparado ao VC. A expressão de catalase varia em tecidos diferentes do mesmo animal estando particularmente concentrada no fígado e nos eritrócitos. O encéfalo, o coração e os músculos esqueléticos apresentam pequenas quantidades desta enzima (HALLIWELL, 1991; FERREIRA, 1997). Talvez por causa da redução da quantidade de peróxido de hidrogênio no grupo JEA, não seja necessário o aumento da atividade da enzima catalase, ou outra enzima antioxidante esteja agindo, ou há ação do sistema de defesa antioxidante não enzimático.

Analisando a enzima antioxidante SOD, que catalisa a formação do peróxido de hidrogênio a partir de ânion superóxido, observamos um aumento da sua atividade apenas no grupo VEA (tanto no tecido cardíaco quanto no músculo sóleo). Vaanholt e colaboradores (2008) submeteram vários grupos de animais de 2 a 26 meses a atividade física voluntária com rodas de correr. Os autores relataram que a atividade enzimática de SOD e GPx se apresentou diminuída com a idade, mas que a atividade física voluntária foi capaz de aumentar os níveis de SOD no fígado.

Durrant e colaboradores (2009) submeteram ratos jovens e ratos velhos à atividade física voluntária através das rodas de correr. Os autores verificaram que a atividade física não só aumentou a atividade total de SOD em aortas de ratos velhos, mas também melhorou o aumento da expressão da subunidade p67 da NADPH-oxidase e o aumento da atividade da NADPH-oxidase nas aortas dos ratos velhos. Eles também relacionaram o aumento da atividade antioxidante da SOD com a restauração da perda associada à idade da dilatação vascular endotélio-dependente por supressão do estresse oxidativo. Com base neste estudo, em comentário à edição do Journal of Physiology, Lombard (2009) descreve que os efeitos benéficos da atividade física voluntária nos ratos velhos são mediados através de mecanismos pró-oxidantes e anti-oxidantes. A autora faz uma analogia da atividade física voluntária às longas caminhadas do idoso na beira da praia, ou seja, à prática de atividade física por lazer.

A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutationa (GSH) como doador de elétrons (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A atividade da enzima antioxidante Gpx foi analisada apenas no coração e não mostrou alterações significativas entre os grupos; talvez se o tamanho amostral fosse maior para esta análise, seria possível encontrar diferença significativa, pois, embora os desvios se apresentem elevados, há tendência no aumento (30%) da atividade da Gpx nos grupos JEA e VEA e que explicaria dois resultados:

- O aumento significativo da SOD no grupo VEA que não foi acompanhado do aumento do peróxido de hidrogênio. Talvez a GPx esteja agindo na remoção do peróxido de hidrogênio, por isso não há diferença significativa na concentração de H_2O_2 no grupo VEA e também não há alteração na atividade da enzima catalase neste grupo.

- A redução da concentração de peróxido de hidrogênio no grupo JEA não é acompanhada pelo aumento da atividade da enzima catalase. Se não é a catalase que está removendo o peróxido de hidrogênio, talvez seja a enzima GPx, já é possível observar uma tendência a aumento na atividade da GPx no grupo JEA.

A literatura descreve que o envelhecimento aumenta a lipoperoxidação (DE ANGELIS et al., 1997; GUARNER; RUBIO-RUIZ, 2012; SIQUEIRA et al., 2005). Entretanto, no tecido cardíaco encontramos o grupo VC com valores de lipoperoxidação reduzidos comparados ao JC; esta diferença não foi encontrada no músculo sóleo. Após 6 semanas de EA houve um aumento significativo da lipoperoxidação nos animas velhos no tecido cardíaco; este aumento não ocorre no músculo sóleo. Se observarmos a atividade das enzimas antioxidantes nos ratos velhos controles, verificamos que estas também se apresentam de forma reduzida, indicando que se há dano reduzido não há motivo para o aumento de defesa antioxidante. No entanto, vale ressaltar que o peróxido de hidrogênio pode ser reduzido através da reação de Fenton (Fe^{2+}/ CU^{+}) ou Haber Weiss para um radical hidroxil (OH •), sendo este uma das espécies mais reativas. Assim, estarão expostos a maior risco de dano oxidativo os ácidos nucleicos mitocondriais, lipídios e proteínas (DAI; RABINOVITCH, 2009). Sendo assim, uma hipótese para explicar o aumento da lipoperoxidação no grupo VEA (tecido cardíaco) seria que o peróxido de hidrogênio foi reduzido através de algumas das reações descritas e formado mais radical hidroxil e este esteja agindo no aumento da lipoperoxidação. As análises de estresse oxidativo foram realizadas em todos os grupos somente no final do estudo, talvez se houvesse uma análise temporal do estresse oxidativo durante a intervenção poderíamos entender melhor o tempo e a sequência em que ocorreram as

alterações; ou se o tempo de intervenção com EA fosse maior, poderíamos encontrar redução na lipoperoxidação no grupo VEA.

Já nos ratos jovens a análise de dano por quimiluminescência mostrou que a lipoperoxidação reduziu de forma significativa nos ratos jovens que participaram do protocolo de EA, tanto no tecido cardíaco quanto no músculo sóleo. Nas membranas, a lipoperoxidação se inicia com a reação do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular com a ERO, promovendo, dessa forma, a perda da seletividade na troca iônica e formação de produtos citotóxicos, provocando em muitos casos a morte celular (HERSHKO, 1989). Corroborando com os nossos resultados é possível encontrar redução de lipoperoxidação em outros modelos de EA (rodas de correr). Cechetti e colaboradores (2012) utilizaram o protocolo de EA com rodas de correr 3 vezes na semana durante 12 semanas em camundongos machos jovens submetidos à isquemia cerebral. Eles verificaram que o EA foi capaz de reduzir a lipoperoxidação lipídica no córtex cerebral dos animais enriquecidos.

Da Silva e colaboradores (2009) compararam o efeito de diferentes modelos de exercício aeróbio (corrida contínua, treinamento intervalado e corrida em declive) sobre parâmetros de estresse oxidativo de camundongos. Os animais foram treinados durante 8 semanas. Os resultados deste estudo mostraram redução na lipoperoxidação e carbonilas dos grupos treinados nos modelos de corrida em declive e corrida contínua, juntamente com um aumento expressivo da enzima antioxidante SOD. No nosso estudo, o dano à proteína avaliada através das carbonilas se mostra reduzido de forma significativa no grupo JEA comparado ao grupo JC, tanto no tecido cardíaco quanto no músculo sóleo.

Griebasch e colaboradores (2008) verificaram no modelo de ratos jovens (Sprague-Dawley) com trauma cerebral, que apenas 7 dias de estímulo de atividade física voluntária em rodas de correr foi capaz de reduzir as carbonilas no tecido cerebral, em especial no hipocampo. Szabo e colaboradores (2010) verificaram que 14 dias de atividade física voluntária por si só é capaz de reduzir significativamente as carbonilas no tecido

cerebral, em especial no lado ipsilateral do córtex no modelo de ratos jovens (Sprague-Dawley) com trauma cerebral.

Os ratos do grupo VC, assim como na medida de lipoperoxidação, se mostraram com valores de carbonilas reduzidos comparado aos JC, sendo este resultado mantido após 6 semanas de exposição ao EA. A SOD também se mostrou reduzida no grupo VC comparado ao JC, talvez neste caso seja possível que o grupo VC esteja com níveis de ânion superóxido aumentados, o que explicaria o H_20_2, a QL e carbonilas reduzidas no grupo VC. Neste estudo não foi possível quantificar o ânion superóxido.

Sumarizando, embora a literatura mostre que o efeito deletério do envelhecimento causaria o aumento do dano oxidativo no grupo de ratos VC, não foi possível observar isto no presente estudo, já que o grupo VC apresentou menor dano no coração (carbonilas e QL) e no músculo sóleo (carbonilas) comparado ao grupo JC. Na análise do tecido cardíaco, é possível observar que as enzimas antioxidantes (CAT e SOD) também encontram-se reduzidas neste grupo; desta forma, se há menor dano oxidativo no grupo VC faz sentido encontrar menor defesa antioxidante, já que não há necessidade de aumento da atividade enzimática se os danos apresentam-se menores. No entanto, um dado interessante do nosso trabalho se refere ao aumento da atividade da SOD com o EA nos ratos velhos, tanto no tecido cardíaco quanto no músculo sóleo (Figura 7). A SOD reduzida no VC comparado ao JC pode estar relacionada ao aumento dos níveis de ânion superóxido no grupo VC, o que explicaria a QL e carbonila reduzidas. Entretanto, encontramos o aumento da SOD, mas não encontramos o aumento da concentração de H_20_2, sendo possível que este tenha reagido com algum metal (Fe2+/Cu+) e gerado radical hidroxil, o que explicaria o aumento da lipoperoxidação no grupo VEA (Figura 8). No grupo de ratos JEA houve redução do dano oxidativo tanto no tecido cardíaco (carbonilas, QL, H_20_2), quanto no músculo sóleo (carbonilas e QL). Em relação às enzimas antioxidantes (CAT e SOD), é possível observar redução no tecido cardíaco e no músculo no grupo JEA comparado ao grupo JC. Embora em estudos com treinamento físico seja possível observar o

aumento da defesa antioxidante enzimática, neste estudo com atividade física voluntária de baixa intensidade não foi possível observar resultado semelhante no grupo de ratos jovens. Se o EA foi capaz de reduzir o dano oxidativo e concomitantemente houve redução das enzimas antioxidantes, podemos relacionar que se há menos pró-oxidantes não há necessidade de maior atividade dos antioxidantes enzimáticos (Figura 6). Neste caso a redução do dano oxidativo pode estar relacionado a defesa antioxidante não enzimática que não foi possível analisar neste estudo.

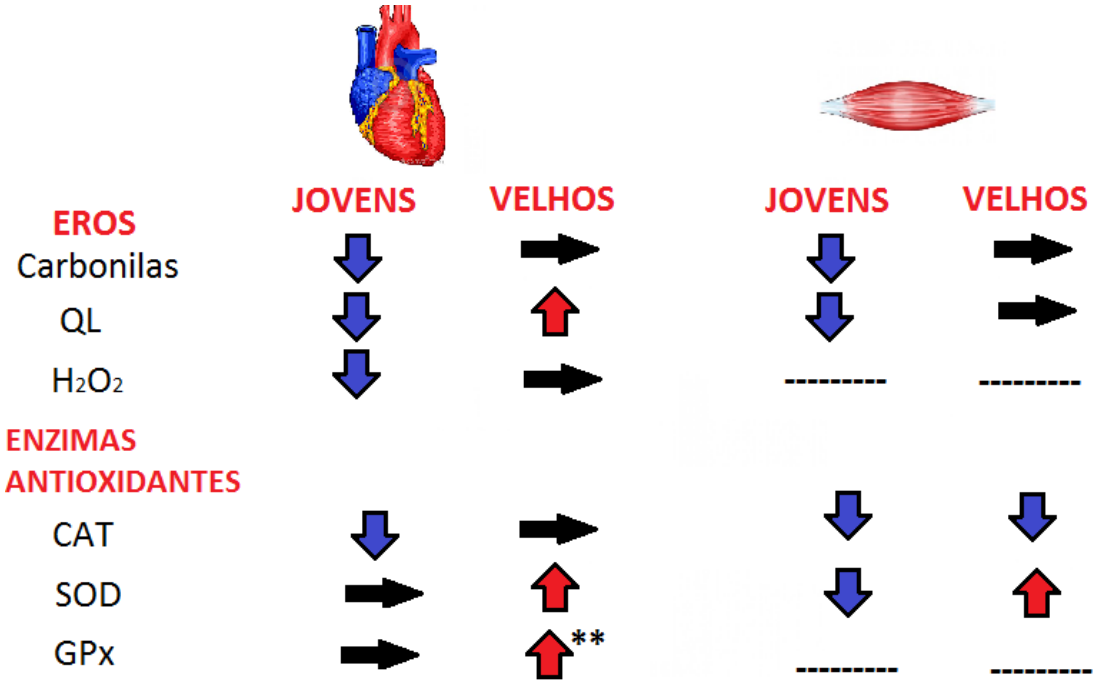

Figura 7. Resumo das alterações nos grupos jovens e velhos após a intervenção de 6 semanas com enriquecimento ambiental. EROS= espécies reativas de oxigênio, QL= quimiluminescência (quantifica lipoperoxidação), H_20_2 = peróxido de hidrogênio, CAT= catalase, SOD= superóxido dismutase, Gpx: glutationa peroxidase. Seta azul= reduziu significativamente, seta vermelha= aumentou significativamente, seta preta= não houve alteração significativa.**seta vermelha= tendência a aumento, mas não foi considerado estatisticamente significante. ---------- = Não foi analisado.

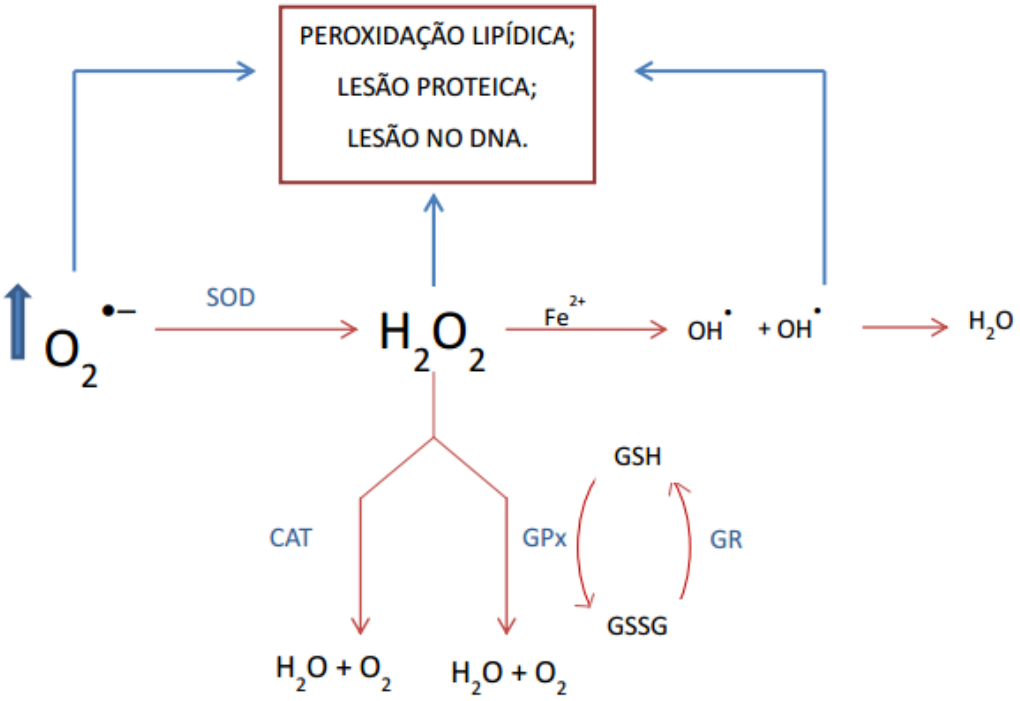

Figura 8. Ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio. Gentilmente cedida por Becker e colaboradores.

9 CONCLUSÕES

O nosso modelo de enriquecimento ambiental foi eficiente como uma forma de atividade física voluntária, uma vez que houve melhora da performance (tempo e velocidade) no teste de esforço em esteira no grupo de ratos velhos. Além disso, o EA foi capaz de aumentar a atividade da enzima citrato sintase no grupo VEA, deixando-a semelhante ao do grupo JC o que confirma que os achados neste estudo se referem ao estímulo da atividade física voluntária. Corroborando com a revisão de literatura apresentada neste estudo, a atividade física voluntária reduziu o dano oxidativo (QL, H_20_2 e Carbonilas) nos ratos jovens, tanto no tecido cardíaco quanto no músculo sóleo. No entanto, esta redução não é acompanhada pelo aumento da defesa antioxidante enzimática que a maioria da literatura descreve. Contudo, a redução do dano pode estar associada à defesa antioxidante não enzimática que não foi possível avaliar neste estudo. Em relação aos pró-oxidantes, os ratos jovens respondem melhor que os ratos velhos. Porém, seria interessante fazer uma análise temporal do efeito da atividade física voluntária em ambos os grupos e deixá-los mais tempo expostos ao enriquecimento ambiental. O pesquisador deve estar atento com o implemento do enriquecimento ambiental nos biotérios, pois dependendo do protocolo experimental pode ser um viés para seu estudo. Mesmo um modelo simples como o utilizado neste estudo (bolinhas e tubos de papel) é capaz de provocar alterações cardiometabólicas e alterações no perfil de estresse oxidativo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLARD, P. A. et al. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 27, n. 17, p. 4217-4221, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol**, v. 105, p.121–126, 1984.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Citrate Synthase. **Biochem J**, v. 154, p.689-700, 1976.

APOR, P.; RADI, A. Physical exercise, oxidative stress and damage. **Orvosi Hetilap**, v. 147, n. 22, p. 1025-1031, 2006.

ARAÚJO, F. T. M. et al. Adoção da técnica de enriquecimento ambiental no biotério de Produção do centro de pesquisas rené rachou / fiocruz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL, 2, 2010, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: UFMG, 2010. p. 138.

ARIDA, R. M. et al. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neurosci Lett**, v. 364, n. 3, p.135-138, 2004.

ARMARIO, A.; MONTERO, J. L.; BALASCH, J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. **Physiology and Behavior**, v. 37, p. 559-561, 1986.

ARNAIZ, S. L. et al. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. **Mol Aspects Med**, v. 25, p. 91-101, 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**,v. 93, p.1464-1476, 1999.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, p. 483-495, 2005.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev,** v.78, p. 547-581.

BETIK, A. C. et al. Exercise training from late middle age until senescence does not attenuate the declines in skeletal muscle aerobic function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v. 297, p. 744-755, 2009.

BISHOP, D. J.; Granata, C.; Eynon, N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, p. 1266-1275, 2014.

BONACCORSI, J. et al. System consolidation of spatial memories in mice: effects of enriched environment. **Neural Plast**, v. 2013, n. 956312, p. 1-12, 2013. Open access. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>. Acesso em:12 set. 2014.

BOUEIZ, A.; HASSOUN, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. **Microvasc Res**, v. 77, n. 1, p. 26-34, 2009.

BRIONES, T. L. et al. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. **Wadowska M.Brain Res**, v. 6, p. 137-146, 2004.

BRODSKY, S. V. et al. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. **Circ Res**, v.94, n. 3, p. 377–384, 2004.

BRUM, P. C. et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev. paul. Educ. Fís**, v.18, p.21-31, 2004.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CAO, W. L. et al. Potential role of NADPH oxidase in pathogenesis of pancreatitis. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 5, p. 169-177, 2014.

CECHETTI, F. et al. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 65, 119-128, 2012.

CHABOT, F. et al. Reactive oxygen species in acute lung injury. **Eur Respir J**, v. 11, n. 3, p. 745-757, 1998.

COOPER, J. M.; MANN, V. M.; SCHAPIRA, A. H. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. **J Neurol Sci**, v.113, p.91-98, 1992.

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v.126, p. 49-58, 1972.

CRANE, J. D. et al. The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 65A, n. 2, p. 119–128, 2010.

DA SILVA, L. A. et al. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 1, p. 60-65, 2009.

DAI, D. F. et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. **Circulation**, v. 119, n. 21, p. 2789–2797, 2009.

DAI, D. F.; RABINOVITCH, P. S. Cardiac Aging in Mice and Humans: the Role of Mitochondrial Oxidative Stress. **Trends Cardiovasc Medics**, v. 19, n. 7, p. 213-220, 2009.

DAI, D. F.; RABINOVITCH, P. S.; UNGVARI, Z. Mitochondria and Cardiovascular Aging. **Circ Res**, v. 110, n. 8, p. 1109-1124, 2012.

DE ANGELIS, K. L. D. et al. Exercise training in aging: hemodynamis, metabolic, and oxidative stress evaluations. **Hypertension**, v. 30, p. 767-771, 1997.

DE LA FUENTE, M. et al. Strategies to Improve the Functions and Redox State of the Immune System in Aged Subjects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 36, p.3966-3993, 2011.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. An update of the oxidation-Inflammation theory of aging: The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 26, p. 3003-3026, 2009.

DE LA FUENTE, M.; Role of neuroimmunomodulation in aging. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 4-6, p. 213-223, 2008.

DE LISIO, M. et al. Exercise training enhances the skeletal muscle response to radiation-induced oxidative stress. **Muscle Nerve**, v. 43, p. 58–64, 2011.

DONATO, A. J. et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 2, p.22-28, 2015.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem**, v. 267, p.4912-4916, 2000.

DURRANT, J. R. et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. **J Physiol**, v. 587.13, p. 3271-3285, 2009.

ENOKA, R. M. Neural adaptations with chronic Physical activity. **J. Biomechanics**, v. 30, n. 5, p. 447-455, 1997.

FERNÁNDEZ, C. I. et al. Enviromental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: issues for a therapeutic approach in human aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 53-57, 2004.

FIATARONE-SINGH, M. A. Body composition and weight control in older adults. In: LAMB, D. R.; MURRAY, R. **Perspectives in exercise science and sports medicine:** exercise, nutrition and weight control. v. 111. Carmel: Cooper, 1998. p. 243-288.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dyn Med**, v. 8 p. 1-25, 2009.

FLOHÉ, L., GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. Methods **Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FLOHÉ, R. B. et al. Commentary: oxidative stress reconsidered. **Genes Nutr**, v. 4, p. 161–163, 2009.

FRONTERA, W. R. et al. Skeletal muscle fiber quality in older men and women. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, p. 611-618, 2000.

GALLAGHER, D. et al. Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. **J Appl Physiol**, v.83, p. 229-239, 1997.

GAMALEY, I. A.; KLYUBIN, I. V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. **Int Rev Cytol**, v. 188, p. 203-255, 1999.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed & Pharmacother**, v. 53, p. 169-80, 1999.

GOLBIDI, S.; BADRAN, M.; LAHER, I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Exercise in Diabetic Patients. **Exp Diabetes Res**, 941868, 2012.

GONZALEZ, F. B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.10, n. 2, p. 93-100, 1991.

GOUSPILLOU, G. et al. Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. **Biochim Biophys Acta**, v. 179, p. 143-151, 2010.

GRIESBACH, G. S. et al. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. **Neuroscience**, v. 154, p. 530–540, 2008.

GRIEVE, D. J. et al. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. **Heart Lung Circ**, v. 13, p.132–138, 2004.

GUARNER, V.; RUBIO-RUIZ, M. E. Aging, Metabolic Syndrome and the Heart. **Aging Dis**, v. 3, n. 3, p. 269-279, 2012.

GULVE E. A. et al. Effects of wheel running on glucose transporter (GLUT4) concentration in skeletal muscle of young adult and old rats. **Mech Ageing Dev**, 67, 187-200, 1993.

HALLIWELL, B. Reative oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med**, v. 91, n. 3C, p. 14S-22S, 1991.
HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology Medicine. Oxford- NY: **University Press**, 2007. 888p.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

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

HEPPLE, R. T. Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. **Front Aging Neurosci**, v.10, p. 6-11, 2014.

HERRING, A. et al. Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with alzheimer-like pathology, **Brain Pathology**, ZURICH, v. 20, n. 1, p. 166175, 2010.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PERVAIZ, N.; GUAN, J. Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF-alpha in intestinal lymphocytes. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 4, p. 498-506, 2009.

HUGHES, V. A. et al. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 475-482, 2004.

JI, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222, n. 3, p. 263-292, 1999.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 8 p. 1865-1879, 2006.

KALACHE, A.; VERAS, R. P.; RAMOS, L. R. O envelhecimento da população mundial. Um desafio novo. **Rev Saúde Públ**, S. Paulo, v. 21, n. 3, p. 200-210, 1987.

KALACHE, A. Envelhecimento no contexto internacional, a perspectiva da Organização Mundial de Saúde. In: 1º Seminário Internacional: Envelhecimento Populacional: uma agenda para o final do século. **Anais...** Brasília: Ministério da Previdência e Assistência Social, Secretaria da Assistência Social, 1996.

KAUL, N. et al. Free radicals and the heart. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.30 p. 55-67, 1993.

KIRKWOOD, T. B. L. Gerontology: healthy old age. **NATURE**, v. 455, p. 739-740, 2008.

KLITGAARD, H. et al. Morphological and biochemical changes in old rat muscles: effect of increased use. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 1409-1417, 1985.

KOLB, B., 1998. Brain plasticity and behavioral change. In: Sabourin, M., Craik, F., Robert, M. (Eds.), Advances in Psychological Sciences, vol. 2, XXVI

KOLTAI, E. et al. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. **Am J Physiol Regul Integr Comp PhysioL**, v. 303, p. 127-134, 2012.

KOSUGI, R. et al. Angiotensin II receptor antagonist attenuates expression of aging markers in diabetic mouse heart**. Circ J**, v. 70, n. 4, p. 482–488, 2006.

KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. **J Comp Physiol Psychol**, v. 53, p. 509-519, 1960.

KURODA, J.; SADOSHIMA, J. NADPH oxidase and cardiac failure. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 5, p. 314-320, 2010.

LAMBERTUCCI, R. H. et al. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 267-275, 2007.

LEICK, L. et al. JanPGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. **Exp Gerontol**, v. 45, p. 336-342, 2010.

LEVITSKY, D. A.; BARNES, R. H. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: longterm effects. **Science**, v.176, p. 68-71, 1972.

LIMA, J. G.; OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, S. S. Effects of early concurrent protein malnutrition and environmental stimulation on the central nervous system and behavior. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 439-448, 1999.

LOMBARD, J. H. Reduced oxidant stress, increased NO-dependent vasodilatation, and improved endothelial function with voluntary exercise in old mice: another excuse for long walks on the beach. **J Physiol**, v. 587 (Pt 13): 3059. 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n. 1, p.265-275, 1951.

MARIN, D. P. et al. Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. **Int Immunopharmacol**, v. 17 p. 462-7, 2013.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autooxidation, in: **Handbook of methods for oxygen radical research**. CRC. Boca Raton: Press. p. 243–247, 1985.

MATSUDO, S. M., MATSUDO, V. K.; NETO, T. L. B. The impact of aging on anthropometric, neuromotor, and metabolic variables of physical fitness. **Rev. Bras. Ciên. e Mov**, v. 8, p. 21-32, 2000.

MATTSON, M. P. et al. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 7, p. 757-778, 2001.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. L.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 6º ed.

MEIJER, M. K. et al. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. **Lab Anim**, v. 41, p. 161-173, 2007.

MONTAROLO, F. et al. Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerates amyloid plaque formation in APP(Swe)/PS1(L166P) mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.

MORTELETTE, H. et al. Effect of exercise training on respiration and reactive oxygen species metabolism in eel red muscle. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, n. 3, p. 201–205, 2010.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am J Physiol Cell**, v. 292, n. 2, p. 670–686, 2007.
NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006.

OGURA, Y. et al. Effects of ageing and endurance exercise training on alpha-actinin isoforms in rat plantaris muscle. **Acta Physiol** (Oxf), v. 202, p. 683-690, 2011.

OH-ISHI, S. et al. Swimming training improves brown-adipose-tissue activity in young and old mice. **Mech Ageing Dev**, v. 89, n. 2, p. 67-78, 1996.

OLSSON, I. A.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of “environmental enrichment”. **Laboratory Animals**, v.36, n. 3, p.243–270, 2002.

PASSINEAU, M. J.; GREEN, E. J.; DIETRICH, W. D. Therapeutic effects environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. **Experimental Neurology**, v.168, n.2, p. 373-384, 2001.

PÉREZ, C. et al. Individual housing influences certain biochemical parameters in the rat. **Lab Anim**, v. 31, p. 357-361, 1997.

PHAM, T. M. et al. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hipocampal NGF in the nonhandled rats. **Behav Brain Res**, v. 103, n.1, p. 63-70, 1999.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, 233, 357-363, 1994.

RIMBERT, V. et al. Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. **Faseb J**, v. 18, p. 737-739, 2004.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 6, p. 38, 2007.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behav Brain Res**, v. 78, n. 1, p. 57-65, 1996.

RYAN, M. J. et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. **Free Radic Biol Med**, v. 51 p. 38–52, 2011.

SANCHEZ, J. et al. Enzymatic adaptations to treadmill training under the influence of naftidrofuryl acid in diaphragm and limb muscles of old rats. **Arch Int Physiol Biochim Biophys**, v. 99, p. 129-134, 1991.

SAPOLSKY, R. M. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. **The journal of neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 1228-1232, 1985.

SELMAN, C. et al. Antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. **Arch Biochem Biophys**, v. 401, n. 2, p. 255-261, 2002.

SERVAIS, S. et al. Effect of voluntary exercise on H_2O_2 release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 1, p. 24-32, 2003.

SIQUEIRA, I. R. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 23, n. 8, p. 663-671, 2005.

SPIRDUSO, W. W.; FRANCIS, K. L.; MACRAE, P. G. Physical dimensions of aging. 2. ed. **Human Kinetics**, 373p., 1995.

SYMONS, M. C. R. Radicals generated by bone cutting and fracture. Free Radical **Biology and Medicine**, v. 20, n. 6, p. 831–835, 1996.

SZABO, Z. et al. Voluntary exercise may engage proteasome function to benefit the brain after trauma. **Brain Res**, v. 23, p. 1325-1331, 2010.

TAKUMA, K.; AGO, Y.; MATSUDA, T. Preventive effects of an enriched environment on rodent psychiatric disorder models. **J Pharmacol Sci**, v. 117, n. 2, p. 71 – 76, 2011.

TREUTING, P. M. et al. Reduction of age-associated pathology in old mice by overexpression of catalase in mitochondria. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 63, n. 8, p. 813–822, 2008.

VAANHOLT, L. M. ET AL. Protein synthesis and antioxidant capacity in aging mice: effects of long-term voluntary exercise. **Physiol Biochem Zool**, v. 81, n. 2, p. 148-157, 2008.

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

VIGORITO, C.; GIALLAURIA, F. Effects of exercise on cardiovascular performance in the elderly.**Front Physiol**, v. 5, p. 5-12, 2014.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**, v. 360, n. 15, p. 1518-1525, 2009.

WHO. World Health Organization. **Care and independence in older age.** Disponível em: < http://www.who.int/ageing/en/index.html >. Acesso em: 10 de outubro de 2013.

WILL, B. et al. Recovery from brain injury animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training. **Progress In Neurobiology**, v. 72, p.167-182, 2004.

WILSON, J.N.; PIERCE, J.D.; CLANCY, R.L. Reactive oxygen species in acute respiratory distress syndrome. **Heart Lung**, v. 30, n. 5, p. 370-375, 2001.

WONG, L. L. R; CARVALHO, J. A. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. **R Bras Est Pop**, v. 23, n. 1, p. 5-26, 2006.

WOOD, D. A. et al. Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell. **Brain Research**, v. 1042, n. 2, p. 176-183, 2005.

WRIGHT, K. J. et al. Exercise training initiated in late middle age attenuates cardiac fibrosis and advanced glycation end-product accumulation in senescent rats. **Exp Gerontol**, v. 50, p. 9-18, 2014.

YAN, L. et al. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 247–258, 2007.