

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO EXERCÍCIO FÍSICO EM
CAMUNDONGOS: PARÂMETROS PERIFÉRICOS INDICADORES DE
RESISTÊNCIA À INSULINA E SINALIZAÇÃO HIPOCAMPAL**

Porto Alegre, 2007

ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO EXERCÍCIO FÍSICO EM
CAMUNDONGOS: PARÂMETROS PERIFÉRICOS INDICADORES DE
RESISTÊNCIA À INSULINA E SINALIZAÇÃO HIPOCAMPAL**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica,
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas- Bioquímica.**

Orientadora: Prof^a. Lia Regina Bevilaqua Muller

Co-orientador: Prof^o. Marcos Luiz Santos Perry

Porto Alegre, 2007

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, muito obrigado por tudo que fizeram por mim para eu poder chegar até aqui, devo tudo a eles;

A minha família, em especial as minhas irmãs e a Dô e Jussa, que me apoiaram e sempre acreditaram em mim;

Ao professor Perry, por toda a confiança, conhecimento e orientação desta Dissertação, uma pessoa que aprendi a admirar muito;

A prof^a. Lia, pela grande ajuda em toda a parte de sinalização;

Aos colegas de todos os laboratórios por onde passei principalmente 27 e 26;

Ao prof. Diogo, prof. Roska e Marcelo Dietrich por serem mais do que chefes e companheiros de trabalho, mas sim amigos;

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica;

Aos meus “irmãos” de sempre Eric, Mello, Renato e Adriano;

A Mayumi Toba, por todo o apoio, carinho e companheirismo durante minha formação;

A Liane Rotta pela indicação para trabalhar com o Prof. Perry;

Ao CNPq pela bolsa cedida.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| APRESENTAÇÃO..... | VII |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 FATORES AMBIENTAIS E SOCIEDADE MODERNA | 4 |
| 1.1.1 DIETA HIPERLIPÍDICA..... | 5 |
| 1.1.2 EXERCÍCIO FÍSICO..... | 7 |
| 1.2 FATORES AMBIENTAIS E METABOLISMO CORPORAL..... | 10 |
| 1.2.1 TECIDOS PERIFÉRICOS..... | 10 |
| 1.2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL..... | 12 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 14 |
| 1.3.1 OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 2. ARTIGO CIENTÍFICO..... | 15 |
| 3. DISCUSSÃO..... | 35 |
| 4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS..... | 40 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 41 |

RESUMO

A obesidade é uma epidemia em todo o mundo, além de ser um fator envolvido em muitas doenças como a resistência à insulina e diabetes tipo II. Verificamos o efeito da dieta hiperlipídica (HF) e exercício físico sobre sinalização em hipocampo e sobre parâmetros periféricos indicadores de resistência à insulina. Camundongos CF-1 foram mantidos por 5 meses nos tratamentos (HF e exercício físico). Analisamos o imunoconteúdo de AKT, pAKT Ser473, ERK 1/2, pERK 1/2, CREB e pCREB em hipocampo. O triacilglicerol sérico (TAG), o colesterol e o HDLc foram determinados no sangue e o TAG e o glicogênio no fígado. Os tratamentos não alteraram as proteínas totais (AKT, ERK 1/2 e CREB) no hipocampo. HF causou aumento no estado de fosforilação de AKT ser473 ($p=0.05$). O exercício causou aumento no estado de fosforilação em ERK 1/2 ($p=0.03$) e em CREB ($p=0.05$). Além disso, o exercício reverteu o efeito prejudicial da HF, em aumentar a concentração de TAG hepático ($p=0.05$) e diminuir a concentração de glicogênio ($p=0.05$), além de impedir o ganho de tecido adiposo na região abdominal. Estes dados fornecem evidências dos efeitos da HF e do exercício físico na sinalização hipocámpica e sobre parâmetros periféricos indicadores de resistência à insulina.

Palavras chave: sinalização hipocámpica, exercício físico, dieta hiperlipídica

ABSTRACT

Obesity is an epidemic all around the world and is a factor involved in many diseases as insulin resistance and diabetes type II. The present study examined the effect of high fat diet (HF) and physical exercise on peripheral tissue and hippocampus signaling. CF-1 mice were maintained for 5 months in treatments (high fat diet and physical exercise). We analyzed AKT, pAKT Ser473, pAKT thr308, ERK 1/2, pERK 1/2, CREB and pCREB immunoccontent in hippocampus. Serum triacylglycerol (TAG), Cholesterol and HDLc were analyzed in serum and TAG and glycogen were assayed in liver. Treatments did not alter total proteins (AKT, ERK 1/2 and CREB) in hippocampus. HF caused an increased in phosphorylation status of AKT ser473 ($p=0.05$), but not in pAKT thr308. Exercise caused an increased in phosphorylation status in ERK 1/2 ($p=0.03$) and CREB ($p=0.05$). Furthermore, exercise was able to invert the harmful effect of HF, as the increased fatty liver ($p=0.05$) and decreased glycogen liver ($p=0.05$), and impede of gain of weight fat in abdominal region. These data provide evidences for the effects of HF diet and exercise on peripheral tissue and hippocampus signaling.

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação é constituída por introdução, artigo científico, discussão, conclusões e referencias bibliográfica.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade tem aumentado rapidamente na sociedade ocidental e existe um grande interesse na etiologia desta doença, que já é considerada uma síndrome do século XXI (Arner, 2003). Fatores como estilo de vida, dieta e genética contribuem para o desenvolvimento desta doença (Bains et al, 2004). A obesidade é caracterizada por Schrauwen (2000b) como um maior aumento da ingestão de comida em relação ao gasto calórico pelo indivíduo em determinado tempo, o que resulta em balanço energético positivo e aumento de peso.

No Brasil, segundo dados do IBGE (2002-2003), as estatísticas apontam que 40% da população está acima do peso e desses, 25% destes indivíduos apresentam obesidade e este percentual vem crescendo com o passar dos anos. Nos Estados Unidos (EUA) houve um aumento de 50% no número de pacientes diabéticos nos últimos 10 anos (Arner, 2003).

O excesso de peso, principalmente se relacionado com aumento de adiposidade visceral, é apontado como um dos principais causadores de doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemias, liberação de adipocitocinas e resistência à insulina (Kahn e Flier, 2000). A resistência à insulina é o principal causador de diabetes mellitus tipo II, além disto, resistência à insulina está relacionada com uma série de fisiopatologias como hiperglicemia, diminuição da oxidação da glicose, liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo, etc. (fig. 1) (Schwartz e Potre Jr, 2005).

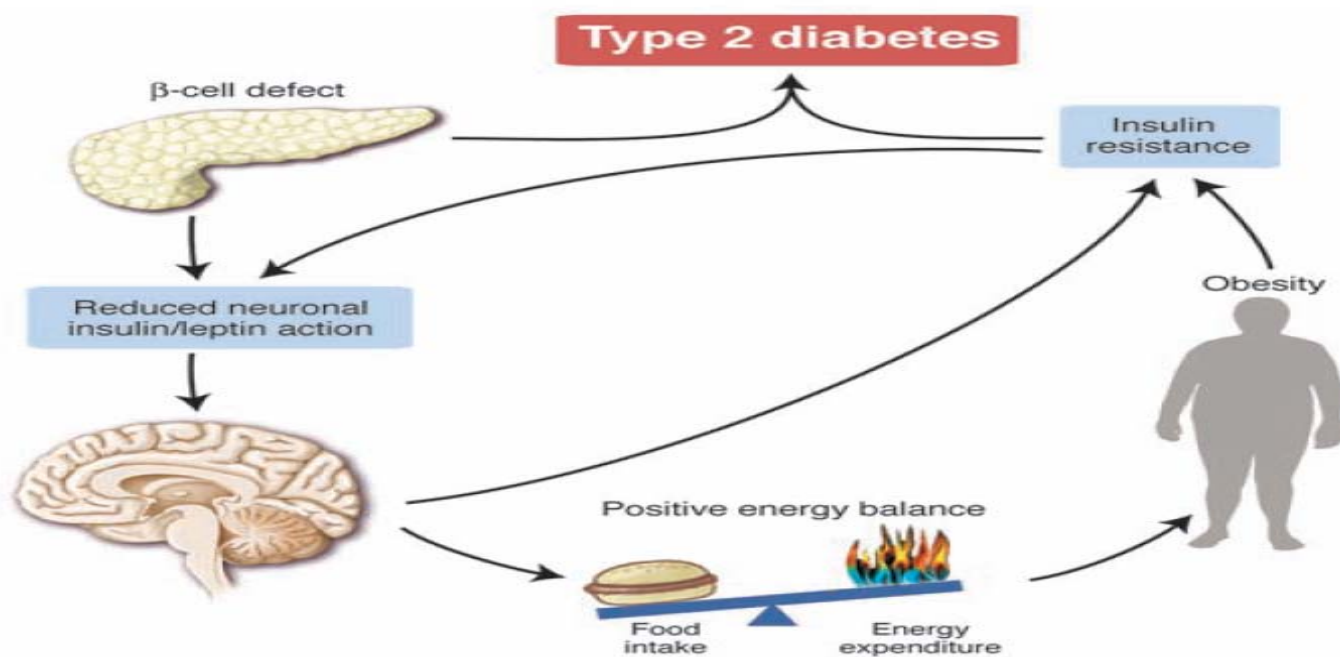


Fig. 1. Esquema geral de possíveis causas de diabetes mellitus tipo II. O aumento do consumo de alimentos e uma diminuição do gasto calórico provocados por uma diminuição dos efeitos de hormônios como insulina e leptina no sistema nervoso central e tecidos periféricos, podem causar diabetes (adaptado de Schwartz et al 2005).

Desde o surgimento dos *Homo Sapiens*, nos anos de 150.000-10.000 AC, até os dias atuais, ocorreram muitas mudanças no que se refere às condições e ao estilo de vida das pessoas, e isto está relacionado com o metabolismo e fisiologia do corpo humano (Prentice, 2006).

Em 1962, foi proposta por Nell a teoria do gene econômico, para explicar o porquê do grande aumento de obesidade e doenças correlacionadas. Esta teoria propõe que os indivíduos da era paleolítica, durante a sua vida passava por ciclo de grande atividade física para caça e obtenção de alimentos, e por ciclo de repouso para absorção destes alimentos; ocorriam também períodos de fome quando não obtinham sucesso nessa busca pelo alimento (estiagem

prolongadas) (Fig. 1.2). Estes períodos então selecionariam os indivíduos que teriam os genes mais adaptados a esta realidade, que conseguiam degradar as reservas energéticas mais rapidamente para geração de energia durante a caça, que conseguiam digerir e absorver mais eficazmente os alimentos e, além disso, armazenar energia para sobreviver a possíveis períodos de escassez de comida (Chakravarathy e Booth, 2004). Esses indivíduos então sobreviveriam e transcreveriam seus genes, mais aptos a esta realidade, para seus descendentes. Portanto, segundo MacGarry (2002), estes genes econômicos na atualidade poderiam estar atuando “contra nossa saúde”.

Na sociedade atual, estamos observando uma grande mudança no perfil tanto das formas de trabalho como na alimentação. Em países ocidentais, se observa um grande aumento na oferta de alimentos, principalmente industrializados e junto a isso, um grande desenvolvimento tecnológico, que diminui as necessidades de exercício físico para as atividades diárias. Autores propõem que esta diferença entre “idade da pedra e era espacial” em relação à busca de alimentos e atividade provocariam o surto de obesidade da sociedade ocidental (Slentz et al, 2007).

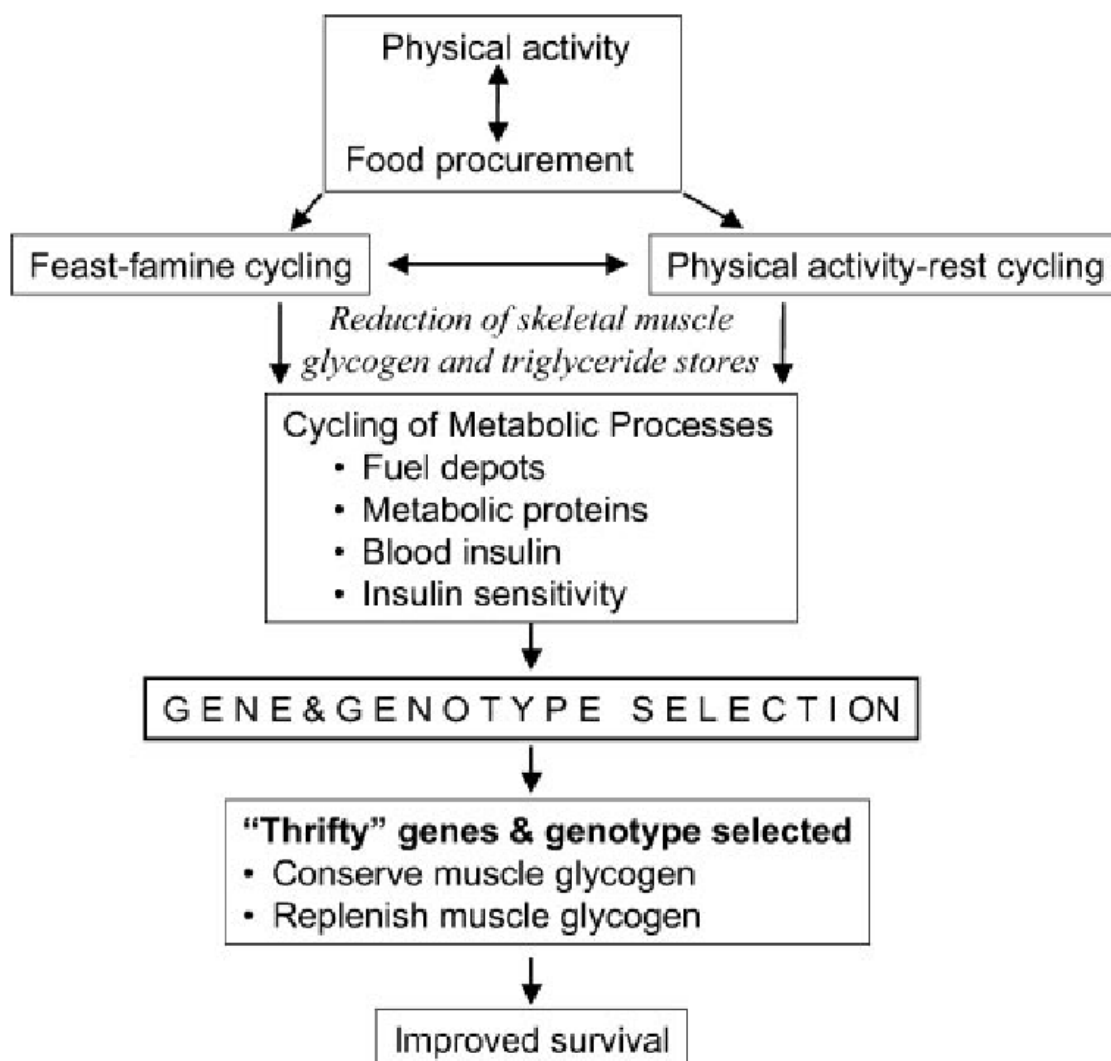


Fig 1.2. Esquema representativo mostrando o possível processo de ciclos de exercício físico para busca do alimento e de repouso ou fome, que selecionariam os indivíduos com a característica genética apropriada para aumentar a absorção, metabolização e armazenamento dos alimentos aumentando sua sobrevivência. Teoria do gene econômico (Adaptado de Chakravarathy e Booth, 2004).

1.1 FATORES AMBIENTAIS E SOCIDADE MODERNA

O avanço tecnológico nas últimas décadas e uma mudança radical no estilo de vida, ambos priorizando o menor esforço possível, trouxe consigo uma

plêiade de obesidade. Além dos avanços tecnológicos, a necessidade de trabalho impõe a obrigatoriedade de conquistar e manter empregos, gerando estresse e afastando os cuidados com a saúde, destacando-se a negligência na alimentação e afastamento da prática esportiva (Collins et al, 2004). Portanto, a grande maioria da população tem se caracterizado por realizar refeições rápidas e de baixa qualidade, onde a grande concentração de lipídios, principalmente ácidos graxos saturados e glicídios simples são os principais nutrientes encontrados (Sandu et al, 2005).

A associação de obesidade e diabetes tipo II tem sido relatada porque um aumento da gordura corporal é relacionado com resistência à insulina (Kahn e Flier, 2000). Em ratos e humanos obesos existe uma hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Woods, 2003), provocadas principalmente pela dieta rica em lipídios. Portanto a união de sedentarismo e dieta hiperlipídica podem levar ao desenvolvimento de obesidade, que esta sendo proposta como o fator desencadeador de uma série de enfermidades como doenças cardiovasculares, hipertensão, resistência à insulina e doenças relacionadas com o sistema nervoso central (SNC) (Unger e Orci, 2001; Molteni, 2004).

1.1.1 DIETA HIPERLIPÍDICA

Devido aos fatores discutidos acima, a dieta da sociedade ocidental é muito rica em calorias e principalmente de lipídeos. Nos EUA, 34% a 38% da ingestão calórica total derivam de lipídeos. No Canadá este número cresce para 42%. Sem dúvida esta excessiva quantidade de lipídios contribui para a obesidade, para o desenvolvimento de certos tipos de câncer, e para o surgimento de doenças cardiovasculares (Fourmestraux et al, 2004; Van Gaal

et al, 2006). Muitos estudos relatam que a dieta rica em lipídeos saturados aumenta o colesterol total, triacilglicerol séricos (TAG), pressão arterial e resistência à insulina (Tremblay, 2004).

Riccardi (2004) relata que estudos laboratoriais com humanos e animais demonstram que um aumento da ingestão na proporção de gordura está relacionado a um aumento no peso. Woods (2003) constatou que ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica estavam apenas 10% mais pesados que ratos submetidos à dieta controle, mas apresentavam um aumento muito grande de tecido adiposo.

A associação entre alimentação rica em lipídeos e sobrepeso não está limitada à alta concentração dos mesmos na dieta e sim também a uma diminuição na oxidação de origem endógena e exógena, aumentando o armazenamento de gordura corporal, de indivíduos propensos à obesidade. Schrauwen (2000a) diz que uma dieta hiperlipídica não aumenta imediatamente a oxidação destes lipídios, (mas contribui para o armazenamento do tecido adiposo) aumentando sim o armazenamento principalmente no tecido adiposo, causando assim um balanço lipídico positivo, além de mostrar que dieta rica em lipídeos é responsável por aumentar o consumo de alimentos. Por outro lado, indivíduos obesos, mas que mantêm seu peso estável, apresentam uma maior oxidação de lipídios para prevenir um ilimitado aumento de peso (Riccardi 2004). Em ratos, uma dieta rica em lipídios aumenta atividade da Carnitina palmitoil-transferase I (CPTI) no músculo esquelético (Schrauwen, 2000a). Unger (2003) demonstra que o aumento da ingestão de lipídeos aumenta a disponibilidade de ácidos graxos para os tecidos. Em indivíduos que são sensíveis a leptina isto causa um aumento no

PPAR-alfa, que por sua vez vai estimular a síntese de CPTI e acil CoA oxidase. Isto não acontece em ratos que não são sensíveis a leptina e há um aumento da lipogênese, da lipoperoxidação e da síntese de ceramidas. Cameron-Smith et al (2003) mostra que mesmo uma dieta hiperlipídica por um curto período, 5 dias, é capaz de aumentar a síntese de enzimas chaves de transporte e de oxidação de ácidos graxos em músculo esquelético.

A prevenção e tratamento da obesidade passam por uma reeducação alimentar, onde uma diminuição da ingestão de lipídios saturados (Riccardi, 2004) e aumento da atividade física (Kibenge, 2002), são essenciais para se atingir os objetivos.

1.1.2 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico causa um rápido aumento no gasto calórico, é recomendado no tratamento da obesidade por aumentar a sensibilidade à insulina em tecido adiposo e músculo esquelética (Horowitz, 2003).

No trabalho de Estadella (2003) todos os grupos de ratos que receberam dieta hiperlipídica estavam com maior peso que os grupo controles; e o exercício físico conseguiu reverter a hipertrigliceridemia apresentada pelo grupo que recebeu dieta hiperlipídica e permaneceu sedentário, além de normalizar os níveis séricos de insulina e leptina.

A atividade física, principalmente de longa duração aumenta a sensibilidade à insulina; e o estilo de vida sedentário é responsável por, pelo menos, 25% da incidência de diabetes tipo II (Strackowski, 2000). Segundo Lee (2002), o exercício aumenta a expressão do principal transportador de

glicose muscular e do tecido adiposo, o Glut 4, independente da dieta, enquanto que dieta hiperlipídica diminui a expressão desta proteína .

Algumas enzimas relacionadas com o metabolismo celular já foram identificadas por alterar sua atividade em resposta ao exercício físico como a AM proteína cinase (AMPK) (Iglesias, 2002). Sua atividade é estimulada pelo aumento da razão AMP/ATP em resposta a estresses como o exercício físico, hipóxia ou jejum prolongado. Esta proteína aumenta a translocação de Glut 4 para membrana celular e aumenta a β -oxidação. Ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica apresentavam resistência à insulina e após receber um ativador desta cinase tiveram uma maior resposta à insulina que ratos controles. Isto sugere que AMPK poderia ter um papel na resistência a insulina (Iglesias, 2002).

Uma diminuição do peso corporal é um importante fator no tratamento da síndrome metabólica e diabetes tipo II, porque aumenta a sensibilidade e metabolização glicose em tecidos periféricos (Riccardi, 2004). O exercício físico foi capaz de inibir o ganho de peso, aumentar HDLc, diminuir aterosclerose em ratos velhos ou submetidos a dieta hiperlipídica (Tsutsumi et al, 2001; Pérez-Martin et al, 2001), mostrando portanto um efeito protetor em relação a estes efeitos.

O exercício exaustivo, quando depleta as reservas de glicogênio, pode aumentar a oxidação de lipídeos em indivíduos submetidos a uma dieta hiperlipídica, que poderia ser explicado por uma menor secreção de insulina, o que aumentaria a lipólise, segundo Schrauwen (2000b). O exercício físico e o jejum aumentam a concentração de ácidos graxos plasmáticos e a oxidação dos mesmos pelo tecido muscular (Unger e Orci, 2001).

No sistema nervoso central (SNC) os fatores ambientais, entre eles exercício físico, aumentam a neurogênese (Llorens-Mártin, Trejo e Torres-Aleman, 2006), a proteção à injúrias (Carro et al, 2001), a atividade cerebral (Cotman et al, 2002), o transporte de IGF1 para o cérebro (Carro et al, 2002) e aumenta a sensibilidade à leptina e à insulina no SNC (Flores et al, 2006) como mostrado na fig. 1.3. O exercício físico é descrito como fator benéfico para uma série de enfermidades e para a manutenção da saúde; mas os mecanismos exatos de que forma isso ocorre ainda não estão elucidados.

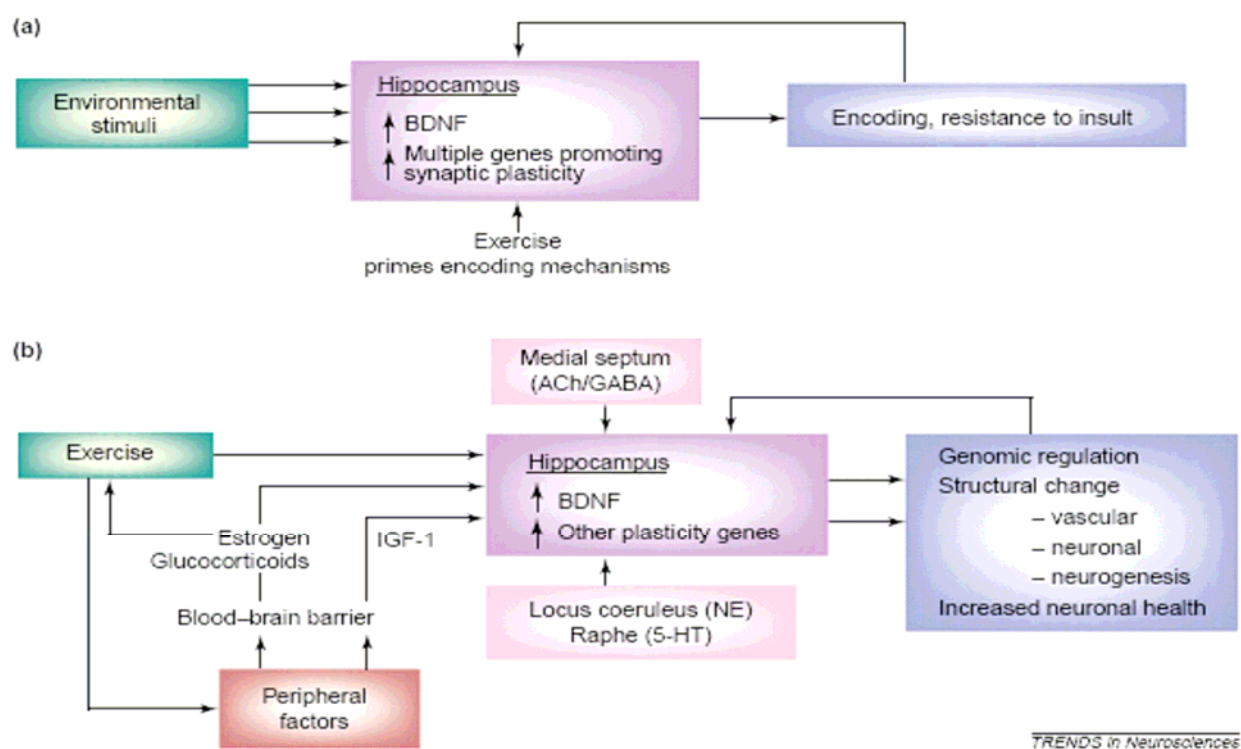


Fig.1.3. Esquema representativo dos efeitos como neurogênese, proteção à insultos, aumento no transporte de hormônios provocados pelos estímulos ambientais (a) e pelo exercício físico (b) no SNC (adaptado de Cotman et al, 2002).

1.2 FATORES AMBIENTAIS E METABOLISMO CORPORAL

O metabolismo corporal é finamente regulado pelas necessidades fisiológicas de nutrientes, aumentando ou diminuindo a produção energética de acordo com as necessidades celulares. As células do organismo de mamíferos utilizam carboidratos, lipídios e proteínas para produção energética. Portanto, a oferta e a oxidação desses nutrientes são essenciais para manutenção da vida. As relações com que estes nutrientes são ofertados também podem modular de que forma as células utilizam estes nutrientes.

Segundo Schrauwen (2000a) uma dieta hiperlipídica, durante sete dias, aumentou em 47% a utilização de lipídeos como fonte energética, o que leva a crer que a depleção de glicogênio hepático é um fator preponderante na utilização de gordura como fonte energética. Durante o exercício a concentração de ácidos graxos livres poderá aumentar em até oito vezes (Foss, 1998).

Modelos de efeitos ambientais presentes na nossa sociedade estão sendo estudados para entender de que forma atuam no metabolismo dos tecidos corporais. Um dos principais modelos estudados são as dietas ricas em lipídeo e o exercício físico. Muitos fatores apontam que esta dieta pode causar resistência à insulina e o exercício físico pode atuar protegendo destes efeitos (Park et al, 2001 e Cotman, 2005)

1.2.1 TECIDOS PERIFÉRICOS

Todos os tecidos corporais necessitam energia para síntese e liberação de hormônios, síntese de novas substâncias, o que é regulado pela atividade de cada tecido. O músculo esquelético necessita de muita energia, seja pela

sua atividade, seja pela sua grande massa no corpo. A atividade metabólica do músculo esquelético e do tecido adiposo é regulada por hormônios, como insulina e leptina, pela disposição de nutrientes e pela atividade física (Scheen, 2002)

O músculo esquelético pela sua grande quantidade de massa é o principal local de ação da insulina e também o principal tecido que oxida carboidratos e ácidos graxos. Uma diminuição da utilização de glicose pelo músculo contribui para o desenvolvimento do diabetes tipo II (Cameron-Smith et al, 2003). Portanto, uma dieta rica em lipídeos poderia levar a uma resistência à insulina também por diminuir a disposição de glicose para o músculo esquelético (Straczkowski, 2000). Aumento na concentração intramiocelular de triglicerídeos leva a uma maior utilização de lipídeos e menor de glicose durante o exercício pelo músculo sóleo (Straczkowski, 2000), o que poderia ser causado por uma maior utilização deste durante a atividade.

O tecido adiposo branco, durante muitos anos, foi considerado somente um tecido de armazenamento de energia, mas hoje em dia é considerado um órgão endócrino por sintetizar e secretar uma série de hormônios como leptina e adiponectina e uma série de substâncias com função sinalizadora como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Arner, 2001).

O tecido adiposo corporal se divide em dois grandes grupos: o tecido adiposo abdominal e o tecido adiposo subcutâneo. Muito mais que diferenças anatômicas, estes dois tecidos apresentam diferenças fisiológicas (Reilly e Rader, 2003). O tecido adiposo abdominal é muito mais relacionado com doenças cardiovasculares, por ser um tecido muito mais sensível a ação de substâncias lipolíticas, como a epinefrina (Pérez-Martin et al, 2001). Isto causa

um aumento na liberação de ácidos graxos livres para o fígado, favorecendo a esteatose hepática e conseqüente resistência á insulina. Possíveis conseqüências deste efeito são uma maior liberação de ácidos graxos livres, gliconêogênese hepática e diminuição da utilização de glicose pelo músculo esquelético (Pérez-Martin et al, 2001).

1.2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O metabolismo do SNC também é afetado por fatores ambientais como dieta e exercício físico. Isso é mostrado por alterações na síntese de proteínas após a realização de exercício físico em ratos, além de dieta hiperlipídica causar alterações relacionadas com a cognição (Greenwood e Winocur, 2005).

O SNC tem a função de regular e controlar a produção de hormônios e a atividade celular dos tecidos. O hipotálamo é responsável por regular o apetite, via ativação ou inibição de neurônios secretores de hormônios orexigênicos como, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) ou anorexigênicos como proopiomelanocortina (POMC) no núcleo arqueado (Palou et al, 2000).

O hipocampo está relacionado com sistemas de aprendizado e memória e uma de suas funções é de sintetizar proteínas intracelulares e sinápticas relacionadas com estes processos (Frank et al, 2004). Algumas vias de sinalização no hipocampo e no córtex relacionadas com estas funções já são conhecidas como a via da proteína cinase B (Akt).

Esta via é ativada por fatores de crescimento e insulina, que após a sua ligação a seus receptores no hipocampo ativam a fosfatilinositol-3-cinase que por sua vez ativa a Akt (Lawlor e Alessi, 2001), com a conseqüente ativação de

uma proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Cowan e Storey, 2003). Esta proteína tem a função de no núcleo celular, modular a ação de outra proteína conhecida por aumentar a síntese de proteínas e hormônios relacionados com a função cognitiva a elemento responsivo a ligação de cAMP (CREB) (Shen et al, 2001).

A homeostasia energética de curto prazo, no estado alimentado, é regulada pelos níveis de insulina, glicose e ácidos graxos livres, via aumento da malonil-CoA e Acil-Coa de ácidos graxos de cadeia longa, parte do mecanismo seria via inibição da AMP cinase, enzima que inativa a acetil-Coa carboxilase. O controle em longo prazo da homeostasia energética, no estado alimentado, é principalmente exercida pela leptina, em função da massa de tecido adiposo (Rosseti, 2006). O SNC utiliza como principal fonte energética à glicose, apesar de outras fontes energéticas serem utilizadas (Muller et al, 2006). Portanto, a regulação dos níveis de glicose e seu metabolismo afetam diretamente as funções reguladas pelo SNC. Muitos estudos relacionam os níveis glicêmicos com enfermidades e alterações nos níveis de aprendizado (Gallacher et al, 2005).

Portanto, os fatores ambientais relacionados com dieta e atividade física são fundamentais na regulação e na atividade de todos os sistemas fisiológicos do organismo e devem ser estudados para uma melhor compreensão de seus efeitos no metabolismo corporal.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo, durante 5 meses, em parâmetros hepáticos, sanguíneo, massa de tecido adiposo e hipocampo em camundongos.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre o teste de tolerância a glicose;
- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre a concentração hepática de glicogênio;
- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre a concentração hepática de TAG;
- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre a concentração de colesterol total, HDLc, e TAG sanguíneo;
- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre tecido adiposo abdominal;
- Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico espontâneo sobre a fosforilação das proteínas Akt, ERK 1/2 e CREB em hipocampo.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido à revista Neurochemical Research

Título: DIFFERENT EFFECT OF HIGH FAT AND PHYSICAL EXERCISE IN
THE HIPPOCAMPAL SIGNALING

Authors: Alexandre Pastoris Muller¹, Martín Cammarota², Marcelo de Oliveira Dietrich¹, Luis Valmor Portela¹, Liane N. Rotta^{3,4}, Diogo Onofre Gomes de Souza¹, Iván Izquierdo², Lia R. M. Bevilaqua² Marcos Luiz Santos Perry^{1*}

1-Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2-Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica

do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3-Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

4-Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Running head: High fat and exercise on brain signaling

*Corresponding author: Marcos Luiz Santos Perry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – ANEXO, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, phone/FAX: +55 51

3308 5560/ +55 51 3308 5540, email: mlsperry@excite.com

ABSTRACT

Obesity is an epidemic disease that may affect brain function. Here, we evaluated the effect of five months of high fat diet (HF) and physical exercise on peripheral parameters and brain signaling. Serum triacylglycerol, cholesterol, and HDLc and, liver triacylglycerol and glycogen concentrations were evaluated. Also, AKT, pAKT Ser473, ERK 1/2, pERK 1/2, CREB and pCREB immunocent were analyzed in hippocampus. HF diet induced an obese phenotype. Treatments did not alter total signaling proteins, but HF caused an increased in phosphorylation status of AKT ser473 ($p \leq 0.05$). Alternatively, exercise caused an increased in phosphorylation status in ERK 1/2 ($p = 0.03$) and CREB ($p \leq 0.05$). Exercise also reversed the harmful effect of HF, i.e., increased fatty liver ($p \leq 0.05$) and fat gain in abdominal region. In conclusion, the effects of exercise and HF diet on brain signaling did not come to get a single pathway modulated by AKT/PKB.

Keywords: high fat diet, physically exercise, hippocampus signaling, obesity, peripheral tissue.

1. INTRODUCTION

Obesity is becoming an epidemic in many western countries, particularly in United States. Both environmental and genetic factors MAY contribute to excessive body weight gain, overweight and obesity, and all the associated comorbidities [1]. Obesity associated with abdominal fat deposits is a major risk factor for insulin resistance, type II diabetes, and syndrome X (metabolic syndrome). Thus lifestyle interventions aiming to control the body weight gain have been proposed to prevent obesity and associated comorbidities [2]. Physical exercise, a low cost lifestyle intervention, is known to increase insulin sensitivity, decrease body-weight, and improve blood lipids profile [3]. Moreover, there is accumulating evidence that physical exercise has a beneficial effect on brain function through incompletely recognized mechanisms [4]. Hormones and neurotrophins, as well as proteins involved in the intracellular signaling pathways, are putative brain targets modulated by the effects of exercise and diet [5,6,7,].

A classical signaling pathway that could be regulated by hormones and neurotrophins, is AKT/PKB \rightarrow ERK 1/2 \rightarrow CREB pathway. AKT/PKB-mediated intracellular signaling is a key regulator of cell cycle, apoptosis and cellular responses to insulin in brain [8]. By phosphorylation, AKT can be activated and translocated to the nucleus to regulate gene transcription. Moreover, AKT interacts with other kinases as the MAPK family members ERK1/2, and the Cyclic-AMP response element binding protein (CREB) [9]. Recent observations indicate that MAPK/ERK-associated signaling plays an essential role in cell differentiation and proliferation, and also in long term synaptic plasticity [10].

When activated by MAPKK, ERK translocates to the nucleus and regulates gene transcription via phosphorylation of different transcription factors, including CREB, which is known to be involved in long-term plasticity events within the brain [10]. A high fat diet (HF), another type of lifestyle associated intervention, triggered impairment of CREB activation in brain hippocampus and the performance of animals in spatial learning tasks. However, voluntary exercise reversed the harmful effects of HF diet [4,11].

The aim of this study was to evaluate putative effects of a HF and exercise on metabolic parameters and hippocampal AKT→ERK 1/2→CREB signaling pathway.

2. Experimental Procedure:

2.1. Animal and Diet

CF-1 Male mice, 2 months old, were maintained in a 12-h light/dark cycle at 22–24°C. Mice were maintained during five months after being assigned to one of four groups ($n= 4-6$ each group): Control diet/sedentary (CDS); Control diet/exercise (CDE); High fat diet/sedentary (HFS); High fat/exercise (HFE). Animals engaged in voluntary physical activity had free access to a running wheel during all time of treatments. Animals engaged in voluntary physical activity had free access to running wheel throughout the treatment. They ran about 3000m per day. Diets containing a standard vitamin and mineral mix with all essential nutrients were provided *ad libitum*. The HF diet contains 60 % energy from saturated fat and CD contains 15 % of energy from saturated fat.

2.2. Glucose Tolerance Test (GTT)

An intraperitoneal injection of glucose (2 mg/g body weight) was performed in 6h fasted mice after 5 months of treatment (at 2:00 P.M). Blood

glucose was monitored with glucose oxidase method (Labtest, Brazil/MG) at 0, 30, 60 and 120 min after glucose injection.

2.3. Blood Biochemical Evaluation

Two weeks later GTT, animals were death by decapitation. Blood was collected and centrifuged at $2.500 \times g/10$ min. Serum was stored at -20°C until assayed. The serum triacylglycerol (TAG), total cholesterol, HDLc cholesterol was measured using commercial kits (Labtest, MG, Brazil). The reactions were performed in the Labmax equipment (Labtest, MG, Brazil).

2.4. Liver Measurements and Fat Pad Weights

Liver was dissected and between 90-110 mg of liver were homogenized 1:10 with saline 0.9 %; 20 μL were used to determine liver TAG. Liver glycogen was determined by the colorimetric method described by Krisman [13]. Fat tissues from retroperitoneal and epididymal regions were dissected and weighted as described Parekh et al [14].

2.5. Hippocampus Preparation and Western blot analysis

Hippocampus was rapidly dissected and stored at -70°C . Hippocampus homogenates were prepared in buffer (NaF 50mM, Tris 20mM, sucrose 0.32mM, ortovanadate 1mM, EDTA mM, EGTA 1mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM). They were centrifuged; supernatants collected and total protein was measured by Bradford protein assay. For western blot analysis, 30 μg of protein samples was separated by electrophoresis on a 10 % polyacrilamide gel and electrotransferred to PVDF membrane. Non-specific binding sites were blocked with in Tween–Tris buffered saline (100 mM Tris–HCl, pH 7.5, containing 0.9 % NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5 % albumin for 2 hours. Membranes were then incubated for overnight at 4°C polyclonal antibody

against AKT, pAKT ser473 (Cell Signalling, 1:1000), CREB, pCREb (Upstate, 1:2000), ERK 1/2, pERK 1/2 (Upstate, 1:500). After rinsing three times for 10 min each with TTBS, membranes were incubated with secondary antibody (1:15000 dilution, anti-rabbit, Santa Cruz) during 2h at room temperature. After rinsing four times for 10 min each with TTBS, membranes were incubated with peroxidase-conjugated for 5 minutes at room temperature, then display on autoradiographic film by chemiluminescence; signals were digitally scanned and then quantified using using Opitquant version 02.00 (Packard Instrument Company). This procedure was repeated by at least three times.

2.6. Statistical Analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. Difference between all groups was analyzed by using ANOVA post-hoc Duncan. For analyzing differences between treatments we used a UNIANOVA test was used. For analyze GTT we used repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Values were considered statistically different when $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Body weight, fat pads weight, lipids serum and liver measurements

Body weight, fat pads weight, serum and liver biochemical analysis are demonstrated in table 1. The values are expressed as mean \pm S.E.M. HFS group presented increased fat pads weight in epididymal and retroperitoneal regions as compared to others groups ($p < 0.05$) but no increment in total body weight. The HFS group also showed a high liver TAG concentration compared to others groups ($p < 0.05$). CDE showed an increased in serum TAG compared to HFE ($p < 0.05$).

Total cholesterol and HDLc were not altered in all groups (data not shown). HFS group had lower hepatic glycogen concentration than other groups ($p < 0.05$).

3.2. GTT

The results of GTT are presented in fig. 1A. At 30 min there was an increase in serum glucose levels in both HFS and HFE groups (19 % and 50 % respectively), although this increase was not statistically different. At 60 min HFS serum glucose levels remained high compared to all other groups ($p = 0.05$, 37 %).

3.3. Immunoccontent of AKT and pAKT in Hippocampus.

The total AKT immunoccontent was not different among groups, but HF enhanced the phosphorylation of AKT in the ser473 residue (fig.1b, $p < 0.05$).

3.4. Immunoccontent of ERK 1/2 and pERK 1/2Creb, pCreb Hippocampus.

Considering that pAkt Ser473 was modified by diet, we also evaluated other proteins involved in this signaling pathway. Total immunoccontent of the ERK1/2 (fig 2 A) and CREB (fig 2 B) did not change with diet, but exercise HFE increased phosphorylation status of pERK1/2 ($p = 0.03$, fig 2 A) and CREB ($p = 0.05$, fig 2 B).

4. DISCUSSION

In this study we have evaluated the effects of both high fat diet and exercise, and their interaction, on metabolic parameters and hippocampal AKT → ERK 1/2 → CREB signaling pathway. Exercise prevented fat deposition and triglycerides accumulation in the liver of HF diet treated mice. Similarly,

Gauthier et al [15] showed that exercise completely prevents the accumulation of lipid as macrovesicles in liver of rats under high fat diet.

Increasing interest in the etiology of fat liver has been highlighted because of the strong association between triglycerides accumulation in hepatocytes and the development of insulin resistance. Thus the mechanisms involved in exercise-induced prevention of fat liver are likely to be good targets for research-based new drugs discoveries. Research has recently been spurred by the finding that an association exists between the accumulation of TAG in tissues other than adipocytes and the development of a state of insulin resistance [16].

Circulating glucose levels appear to play a role in the control of cerebral signaling. Thus, we search for changes in blood glucose homeostasis caused by diet and exercise by using a glucose tolerance test (GTT). HFS group showed an increased blood glucose level at 60 min ($p=0.05$). Moreover, increased AKT ser473 phosphorylation state was observed in hippocampus from HFS and HFE groups. Clodfelder-Miller et al [17] demonstrated that physiological variations in serum glucose and insulin levels affected brain AKT phosphorylation/dephosphorylation status in hippocampus. Moreover, streptozotocin induced hyperglycemia caused a persistent AKT hyperphosphorylation state, a possible mechanism involved in the detrimental effects of high glucose level on brain function [17]. Accordingly, humans and animal studies have shown impairments of synaptic plasticity, spatial learning and brain morphological changes associated with fluctuations in the circulating glucose concentration. Glutamate-receptor subtypes, second-messenger systems and protein kinases have been suggested to be involved [18,19,20,21].

Concerning the interaction between glucose homeostasis and hippocampus signaling, we speculate that although not statistically different in all times evaluated during the GTT, the increased glucose levels observed at 30 min in HFS (19 %) and HFE (50 %) groups could account in some degree for the increased phosphorylation of AKT ser473. On the other hand, it is possible that the effects observed here were not related to the impairment in blood glucose homeostasis but associated with overall changes caused by long-term HF diet consumption [22,23].

The preliminary postulation that the effects of exercise and HF diet come to get a single pathway modulated by AKT/PKB was not confirmed. Thus, exercise (five months) increased phosphorylation of MAPK/ERK and CREB-associated signal transduction and had no effect on pAKT, while HF did not changed ERK and CREB phosphorylation but increased pAKT. Previous results by Ding et al. [24] demonstrated that five days of exercise not affected pAKT levels in hippocampus, which is in accordance with the lack of effects observed here after five months of exercise. MAPK/ERK is a sub family of serine/threonine protein kinases that transduce extracellular stimuli into diverse intracellular responses. MAPK/ERK is activated in response to many different stimuli, including growth factors, cytokines and high synaptic activity. The activation of MAPK/ERK may cause a hyperphosphorylation of CREB [9], which is in line with our findings.

In conclusion, we demonstrated that long-term HF intake caused increase phosphorylation of hippocampal AKT and that exercise increased hippocampal ERK 1/2 → CREB signaling. The physiological relevance of these findings for the brain health remains to be elucidated.

5. REFERENCES

1) Hendrickx H, McEwen B, der Ouderaa F (2005). Metabolism, mood and cognition in aging: The importance of lifestyle and dietary intervention. *Neurobiology of Aging*. 26S: S1--S5.

2) Chakravarthy M, Booth F (2004). Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* . 96:3--10.

3) Bhattacharya A, Rahman M, Sun D et al (2005). The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr*. 135:1124--1130.

4) Molteni R, Wu A, Vaynman S et al (2004). Exercise reverses the harmful effect of consumption of high fat diet and behavioral plasticity associated on the of brain- derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 123: 429-440.

5) Adlard P, Victoria P, Viorela P et al (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer’s disease. *The Journal of Neuroscience*. 25:4217--4221.

6) Cotman C, Berchtold N (2002). Exercise: a behavioural intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*. 25:295—301.

7) Van Praag H, Shubert T, Zhao C et al (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 25:8680--5.

8) Lawlor A, Alessi D (2001). PKB/AKT: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 114:2903-2910.

9) Morikawa E, Ueyama E, Serba E (2004). Fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/ p38) in the mouse hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*. 16:105--112.

10) Cowan KJ, Storey KB (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*. 206:1107--15.

11) Hetman M, Gozdz A (2004). Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem*. 271:2050-5.

12) Shen H, Tong L, Balazs R, Cotman CW (2001). Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 107:219--29.

13) Krisman R (1962). A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem*. 4:17--23.

14) Parekh PI, Petro AN, Miller JM et al (1998) Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism*. 77:1089--1096.

15) Gauthier M, Couturier K, Latour J et al (2003). Concurrent exercise prevents high fat- diet induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*. 94:2127--2134.

16) Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799--806.

17) Clodfelder-Miller B, De Sarno P, Zmijewska A et al (2005). Physiological and pathological changes in glucose regulate brain AKT and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 280:39723--31.

(18) Gispen WH, Biessels GJ (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23:542--549.

(19) Perros P, Frier BM (1997). The long-term sequelae of severe hypoglycemia on the brain in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 29:197--202.

20) Parkes M, White KG (2000). Glucose attenuation of memory impairments. *Behav. Neurosci.* 114:307--319.

21) Messier C (2004). Glucose improvement of memory: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 490: 33--57.

22) Mielke J, Taghibiglou C, Liu L et al (2005) A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *Journal of Neurochemistry*; 93:1568--1578.

23) Prada O, Zecchin H, Gasparetti A et al (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.*146:1576--1587.

24) Ding Y, Li J, Yao W et al (2006). Exercise preconditioning upregulates cerebral integrins and enhances cerebrovascular integrity in ischemic rats. *Acta Neuropathol.*112: 74--84.

LEGENDS OF FIGURES:

Fig 1. Glucose tolerance test and western blot of AKT. HF induces a change in phosphorylation status of AKT. A) 6h-fasted mice were given an intraperitoneal injection of glucose (2 mg/g of body wt). Blood samples were taken at the times indicated from the tail vein of the same animal. We used repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Results are expressed as means \pm S.E.M.* indicates difference in serum glucose levels at 60 min in HFS ($p=0.05$) compared to all others groups. B) Representative immunoblots of pAKT and AKT and corresponding densitometric measurements in hippocampus of pAKT. Results are expressed as mean \pm S.E.M. UNIANOVA was used to analyze. HF diet increased a phosphorylation status of AKT ser473 in both groups with this treatments ($p<0.05$). CDS (control diet sedentary, n=4-6); CDE (control diet exercise n=4-6); HFS (high fat diet sedentary n=4-6); HFE (high fat diet exercise n= 4-6).

Fig 2. Exercises induce a change in phosphorylation status of ERK 1/2 and CREB. Representative immunoblots of ERK 1/2, CREB, pERK 1/2 and pCREB. Histograms with respective densitometry analyses of pERK 1/2 and pCREB. Results are expressed as mean \pm S.E.M. UNIANOVA was used to analyze. A) Exercise increased a phosphorylation status of ERK 1/2 in exercise groups ($p=0.03$). B) Exercise increased a phosphorylation status of ERK 1/2 in exercise groups ($p=0.05$). * indicates difference in exercise groups in relation to sedentary groups. CDS (control diet sedentary, n=6); CDE (control diet exercise n=6); HFS (high fat diet sedentary n=6); HFE (high fat diet exercise n=6).

Figura 1.

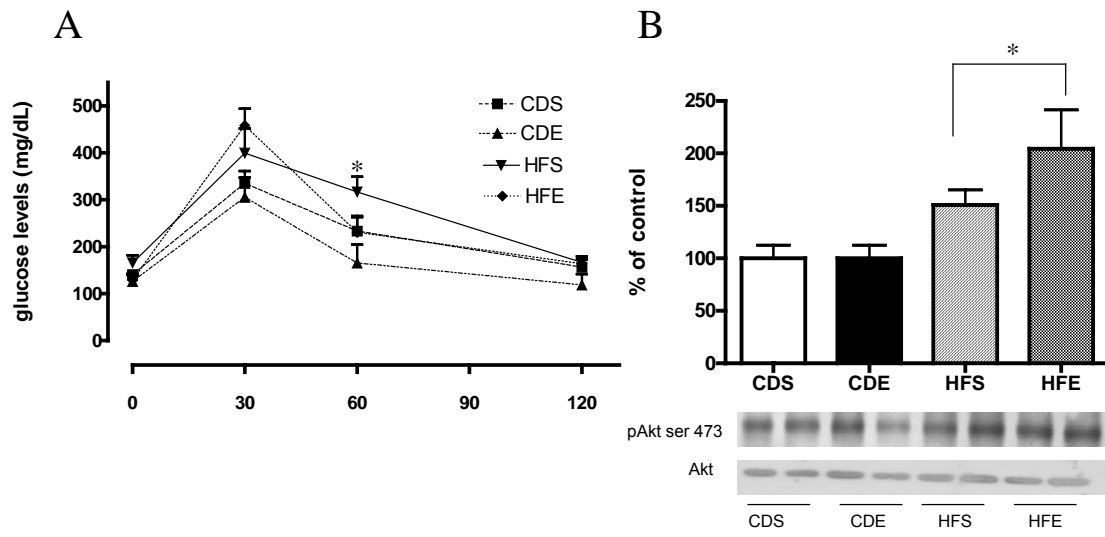


Figura 2.

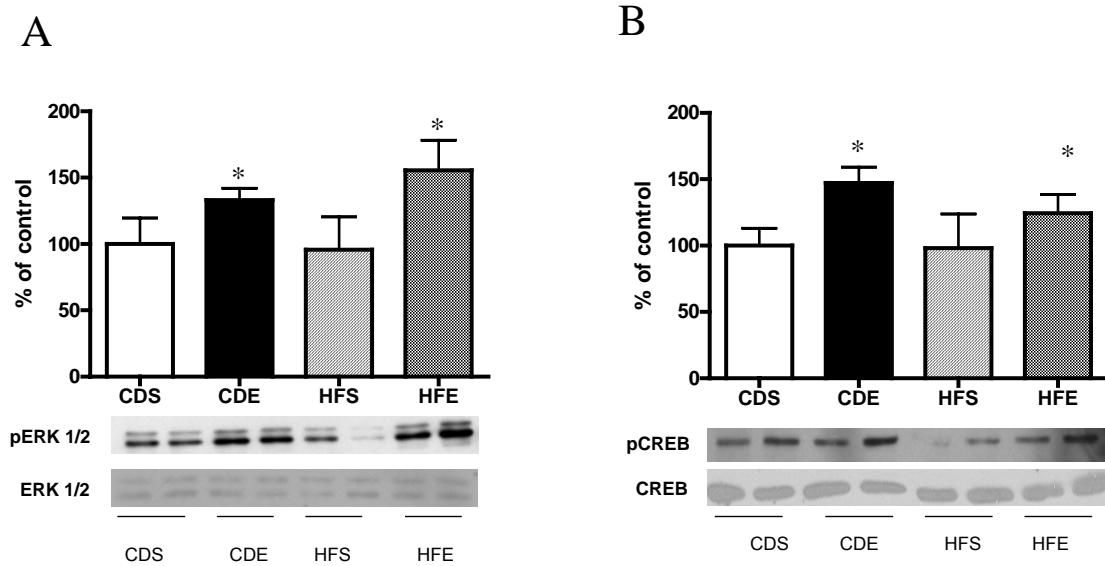


Tabela 1.

| | Body | Fat pad | Fat pad | Triacylglycerol | Liver | Liver |
|-----|------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Weight | Retroperitoneal | Epidimimal | serum | Triacylglycerol | Glycogen |
| | (g) | | | mg% | mg% | mg% |
| CDS | 49.7±2.6 | 0.9 ± 0.2 | 2.5 ± 0.4 | 170 ± 19 ^{a,b} | 3 ± 0.4 | 2.3 ± 0.3 |
| CDE | 45.8 ± 1.6 | 0.8 ± 0.1 | 1.7 ± 0.3 | 188 ± 20 ^a | 2.6 ± 0.2 | 2.63 ± 0.2 |
| HFS | 50.3 ± 1.7 | 2.3 ± 0.1 ^a | 3.6 ± 0.3 ^a | 137.8 ± 12 ^{a,b} | 4.9 ± 0.4 ^a | 1.29 ± 0.3 ^a |
| HFE | 47 ± 2.1 | 1.1 ± 0.2 | 2.4 ± 0.5 | 114.4 ± 22 ^b | 3.8 ± 0.7 | 2.26 ± 0.5 |

3 DISCUSSÃO

O avanço tecnológico, o aumento do lazer sedentário e a opção por uma dieta hiperlipídica associado a fatores genéticos são responsáveis pela plethora de obesidade em nossos dias (Chakravarty e Booth, 2003). Em nosso estudo verificamos de que forma dieta hiperlipídica e exercício físico se relacionavam com fatores do metabolismo de tecidos periféricos e sinalização no SNC.

Os estudos que utilizam fatores ambientais como dieta e exercício físico, via de regra, analisam de que forma estes parâmetros afetam os tecidos periféricos como músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (Portillo et al, 1999). Observa-se uma escassez de estudos relacionando estes fatores ambientais ao SNC.

Em nosso estudo foi observado que os animais que receberam dieta hiperlipídica, independente de permanecer sedentário ou realizar exercício físico, por um período de 5 meses, apresentavam um aumento de 37 e 50% na glicemia, respectivamente, no tempo 30 minutos em TTG (fig1) e um aumento estatisticamente significativo no grupo dieta hiperlipídica sedentário em relação ao grupo dieta controle exercício ($p=0,05$) no tempo 60 minutos (fig1A). Postulamos que, por um longo período, como ocorrido em nosso trabalho, estas alterações no metabolismo da glicose poderiam afetar a ação de algumas proteínas cerebrais nos animais submetidos a dieta hiperlipídica.

Gong (2005) mostrou que uma hiperfosforilação pode alterar o estado fisiológico de uma enzima. No estudo de Clodfelder-Miller et al (2005) é relatado que uma hiperglicemia aguda causa uma hiperfosforilação da Akt, o que poderia estar relacionado com déficit cognitivo observado em pacientes diabéticos.

A Akt é uma proteína descrita com a função de aumentar a sobrevivência celular e relacionada com a neurogênese em SNC. Para atuar de uma maneira adequada esta proteína necessita ser fosforilada para ativar ou inibir outras enzimas e ser desfosforilada para encerrar o ciclo fisiológico de sua ação (Lawer e Alessi, 2001).

Avaliamos o estado de fosforilação de Akt no resíduo serina 473 , além do imunoconteúdo total desta proteína (fig 1B) em hipocampo.

A proteína total não foi afetada nem pela dieta hiperlipídica nem pelo exercício físico. Já no resíduo ser 473, ocorreu um aumento significativo no estado de fosforilação da Akt nos grupos que receberam dieta hiperlipídica independentemente do exercício, o que poderia mostrar um efeito da alteração na regulação da glicemia em alterar o estado de fosforilação fisiológico desta proteína de acordo com os dados de Clodfelder-Miller et al (2005).

Para verificar se outras enzimas da via clássica de sinalização da Akt poderiam também ser afetadas pelos fatores ambientais, o imunoconteúdo total e o estado de fosforilação de duas proteínas envolvidas nesta via de sinalização, uma MAP cinase (ERK 1/2) e CREB no hipocampo.

A dieta hiperlipídica, em nosso trabalho, não alterou nem conteúdo total nem o estado de fosforilação destas duas proteínas de sinalização. No estudo de Molteni et al 2004 ocorreu uma diminuição na fosforilação de CREB por dieta hiperlipídica. Molteni et al 2004 mostraram que ratos alimentados por dois meses com uma dieta hiperlipídica apresentaram uma menor fosforilação de CREB em hipocampo em relação ao grupo controle normolipídico. A diferença entre nosso estudo e o de Molteni et al (2004) pode ser devido ao fato que em nosso estudo os animais foram submetidos à dieta por cinco meses, além de

os animais ser de espécies diferentes. O estudo de Carvalheira et al 2003, mostrou que apesar de animais obesos e hiperglicêmicos terem alterado algumas vias de sinalização em hipotálamo, a fosforilação de Erk 1/2 não foi alterada por estes parâmetros, de acordo com os dados de nosso trabalho.

O exercício físico, quando analisado independentemente de dieta, foi capaz aumentar o estado de fosforilação tanto de Erk 1/2 ($p=0,03$) como de CREB ($p=0,05$), apesar de não alterar o conteúdo total destas proteínas (fig 3). Os trabalhos de Chen e Russo-Neudaut (2005) e Shen et al (2001) apresentaram também um aumento no estado de fosforilação destas proteínas. Estes resultados podem auxiliar na explicação ainda pouco conhecida no que diz respeito à ação do exercício físico no SNC.

Estas proteínas, ERK1/2 e CREB, estão relacionadas com a síntese de neurotrofinas envolvidas no aprendizado e memória, um dos reconhecidos efeitos do exercício físico (Ding et al, 2006), mas que ainda não existem mecanismos concretos de que forma o exercício provoca estes efeitos. Craft et al (2004) propõe que o exercício físico é capaz de regular enzimas no córtex cerebral e hipocampo, duas regiões cerebrais conhecidas por terem funções cognitivas. Nosso trabalho corrobora com estes achados de outros autores mostrando que o exercício físico aumenta o estado de ativação destas duas proteínas.

A dieta hiperlipídica é um modelo utilizado em estudos em animais para verificar de que forma este fator presente em nossa sociedade afeta a fisiologia dos tecidos corporais. Este modelo gera obesidade, resistência à insulina, e alteração do metabolismo da glicose (Bhattacharya et al, 2005).

No presente trabalho, assim como no trabalho de Estadella (2003), mostrou que, apesar de os animais apresentarem a mesma massa corporal total entre todos os grupos (Tabela 1), o grupo HFS apresentou maior massa de tecido adiposo abdominal (Tabela 1, $p \leq 0,05$). O aumento do tecido adiposo abdominal é considerado um fator relacionado com doenças cardiovasculares e resistência à insulina (Park et al, 2001). Portanto, nosso trabalho mostra que o exercício físico foi capaz de reverter este efeito provocado pela dieta hiperlipídica no grupo dieta hiperlipídica exercício (Tabela 1, $p \leq 0,05$).

A obesidade devida a um aumento do tecido adiposo abdominal é mais deletéria do que a decorrente do aumento do tecido adiposo subcutâneo, esta diferença é devida em parte pelo fato do tecido adiposo visceral apresentar maior concentração de receptores β -adrenérgicos, maior liberação de TNF α , e pelo fato de seus capilares constituírem as veias que são tributárias da veia porta. (Arner, 2001). Nosso estudo mostrou que a dieta hiperlipídica aumentou a concentração de TAG hepático no grupo dieta hiperlipídica sedentário (tabela 1, $p \leq 0,05$). A concentração de TAG hepático é considerada um fator no desenvolvimento de fibrose e disfunção do fígado (Scheen e Luyckx, 2002). O exercício físico foi capaz de reverter este efeito provocado pela dieta no grupo dieta hiperlipídica exercício (tabela 1, $p \leq 0,05$), mostrando mais uma vez um efeito protetor do exercício físico relacionado com os efeitos da dieta hiperlipídica. Além destes fatores relacionados com a saúde o exercício físico foi capaz de reverter no grupo dieta hiperlipídica exercício (tabela 1, $p \leq 0,05$), a diminuição na concentração hepática de glicogênio no grupo dieta hiperlipídica sedentário (tabela 1, $p \leq 0,05$). O glicogênio hepático é

fundamental para a manutenção da glicemia e também um fator limitante para o desempenho nos esportes (Hawley, Tipton e Millard-Stafford, 2006).

Analisamos parâmetros sanguíneos nos animais. Verificamos que, surpreendentemente os animais do grupo dieta hiperlipídica sedentário apresentavam uma menor concentração de TAG se comparado com o grupo de dieta controle exercício (tabela 1, $p \leq 0,05$). De acordo com Colombo (2003) isso poderia ser explicado por um maior aumento na deposição de TAG no fígado, o que diminuiria a sua concentração sanguínea, como apresentado em nosso trabalho. Outros parâmetros analisados no sangue como colesterol total e HDLc não foram alterado nem por dieta nem por exercício físico (dados não mostrados).

A compreensão de como o sedentarismo e dietas hiperlipídicas, ou com elevado conteúdo de açúcares simples são de fundamental importância para esclarecer a plétora de obesidade, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares e acidentes vascular-cerebral.

4 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Dieta hiperlipídica causou um aumento, mas não significativo na glicemia no TTG nos grupos dieta hiperlipídica aos 30 min, e um aumento aos 60 min na glicemia do grupo dieta hiperlipídica sedentário e em relação ao grupo dieta controle sedentário;
- A dieta hiperlipídica, independente do exercício físico, causou um aumento no estado de fosforilação na proteína Akt no resíduo ser 473 nos grupos dieta hiperlipídica em hipocampo, mas não causou um aumento no resíduo thr 308 e no imunoconteúdo total desta proteína;
- O exercício físico, independente da dieta, causou um aumento no estado de fosforilação das proteínas Erk 1/2 e CREB em hipocampo, mas não causou um aumento no imunoconteúdo total desta proteína;
- Dieta hiperlipídica causou um aumento na concentração de TAG hepático no grupo dieta hiperlipídica sedentário;
- Dieta hiperlipídica causou uma diminuição na concentração de glicogênio hepático no grupo dieta hiperlipídica sedentário;

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNER P. Free fatty acids – do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 3, n. 1, 2001.

ARNER P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 14, p. 137-145, 2003.

BAINS R. K., WELLS S. E., FLAVELL D. M., FAIRHALL K. M., STROM M., TISSIER P. L., ROBINSON I. C. A. Visceral obesity without insulin resistance in late-onset obesity rats. *Endocrinology*. v. 146, p. 2666-2679, 2004.

BHATTACHARYA A, RAHMAN M. M., LAWRENCE R., MEJIA W., MCCARTER R., O'SHEA M., FERNANDES G. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. *J Nutr*. v. 135, p. 1124-30, 2005.

CAMERON-SMITH D., BURKE L. M., ANGUS D. J., TUNSTALL R. J., COX G. R., BONEM A., HAWLEY J. A., HARGREAVES M. A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Clin. Nutr*. v. 77, p. 313-318, 2003.

CARRO E., TREJO J. L., BUSIGUINA S., TORRES-ALEMAN I. Circulating Insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercises against brain insults of different etiology and anatomy. *The Journal of Neuroscience*. v.21, p. 5678-5684, 2001.

CARRO E., TREJO J. L., GOMEZ-ISLA T., LEROITH D., TORRES-ALEMAN I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med*. 2002. v. 8, p. 1390-7, 2002.

CHAKRAVARATHY M. V., BOOTH F. W. Eating exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol*. V 96, p 3-10, 2004.

CHEN M. J., RUSSO-NEUSTADT A. A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res*. v. 13, p. 181-93, 2005

CLODFELDER-MILLER B, DE SARNO P., SZMIJESKA A. A., SONG L., LOPES R. S. Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. v. 280, p. 39723-31, 2005.

CRAFT L. L., PERNA F.M., The Benefits of Exercise for the Clinically Depressed. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. v 6, p. 104-111, 2004.

COTMAN C. W., BERTCHOLD N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance a brain health and plasticity. *TRENDS in neuroscience*. v. 25, p 295-301, 2002.

COLOMBO C., HALUZIK M., CUTSON J. J., DIETZ K. R., MARCUS-SAMUELS B., VINSON C., GAVRILOVA O., REITMAN M. L. Opposite effects of background genotype on muscle and liver insulin sensitivity of lipotrophic mice. Role of triglyceride clearance. *J Biol Chem*. v. 278, p. 3992-9, 2003.

COWAN K. J., STOREY K. B. Mitogen-activated protein kinase: nem signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 1107-1113, 2003.

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

ESTADELLA D., OYAMA L. M., DAMOSO A. R., RIBEIRO R. B., OLLER C. M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, v. 20, p. 218-224, 2004.

FRANK L. M., STANLEY G. B., BROWN E. N. Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments. *J Neurosci*. v. 24, p. 7681-9, 2004.

FLORES M. B.S., FERNADES M. F.A., ROPELLE E. R., FARIA M. C., UENO M., VELLOSO L. A., SAAD Mario J. A., CARVALHEIRA José B. C. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of wistar rats. *Diabetes*, v. 55, p. 2554-361, 2006.

FOURMESTRAUX V., NEUBAUER H., POUSSIN C., FARMER P., FALQUET L., BURCELIN R., DELORENZI M., THORENS B.. Transcript profiling suggests that differential metabolic adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes. *The journal of Biological Chemistry*. v. 279, p. 50743-50753, 2004.

GALLACHER J. E. J., PICKERING J., ELWOOD P. C., BAYER A. J., YARNELL J. W., BEN-SHLOMO Y. Glucoregulation has greater impact on cognitive performance than macro-vascular disease in men with type 2 diabetes: Data from the Caerphilly study. *European Journal of Epidemiology*. v. 20, p. 761-768, 2005.

GONG C. X., LIU F., GRUNDKE-IQBAL I., IKQBAL K. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation.. *J Alzheimers Dis*. v. 9, p.1-12, 2006.

GREENWOOD C. E., WINOCCUR G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol Aging*. v. 26, p S42-S45, 2005.

HOROWITZ, J. F. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. v. 14, p. 386-392, 2003.

IGLESIAS, M. A., YE J. M. FRANGIOUDAKIS G., SAHA A. K, TOMAS E., RUDIEMAN N. B. COONEY G. J, KRAEGEN E. W. AICAR Administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes*, v. 51, p. 2886-2894, 2002.

KAHN, B. B; FLIER, J. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Invest.* v. 106, p. 473-481, 2000.

KIBENGE, M. T; CHAN C. B. The effects of high-fat diet on exercise-induced changes in metabolic parameters in Zucker fa/fa rats. *Metabolism*. v. 51, p. 708-715, 2002.

LAWLOR M. A., ALESSI D R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* v. 114, p 2903-10, 2001.

LEE, J.S; BRUCE, C.R; TUNSTALL R.J; SMITH, D. C; HÜGEL, H; HAWLEY, J.A. Interaction of exercise and diet on glut-4 protein and gene expression in type I and type II rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, v. 175, p. 37-44, 2002.

LLORENS-MÁRTIN M, TREJO L J., TORRES-ALEMAN I. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus*. v.16, p. 480-90, 2006.

MACGARRY D. J. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 51, 7-18, 2002.

MOLTENI R., WU A., VAYNMAN, YING Z., BARNARD R. J. GÓMEZ-PINILLA F. Exercise reverses the harmful effects of consumption high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. v. 123, p. 429-440, 2004.

MULLER A. P., ROTTA L. N., KAWANO C., NESZCZINSKI D., SCHWEIGERT I. D., LONDERO L. G., GRAVINA F. S., SILVEIRA C. K. B., SOUZA C. G., BATTU C. E., GONÇALVES C., SOUZA D. O., PERRY M. L., S. Effect of 2-deoxy-dglucose on metabolism in rats cerebral cortex slices. *Neurochem Res*, v.31, p. 417-422, 2006.

NELL J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*. v. 14, p. 353-62, 1962.

PALOU, A; SERRA, F; BONET, M.L; PICÓ, C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *European Journal of Nutrition*, v. 39, p. 127-144, 2000.

PÉREZ-MARTIN, A; RAYNAUD, E; MERCIER, J. Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise. *Obesity reviews*, v. 2 p. 47-59, 2001.

PORTILLO, M.P; SIMÓN, E; GARCÍA-CALONGE, M.A; DEL BARRIO, A.S. Effect of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous WAT. *European Journal of Nutrition*, v. 38, p.177-182, 1999.

PRENTICE A. M. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int J Epidemiol.* v. 35, p. 93-9, 2006.

REILLY M. P., RADER D. J., The metabolic syndrome. More than the sum of its parts? *Circulation.* v. 108, p. 1546-1551, 2003.

RICCARDI, G; GIACCO, R; RIVELLESE, A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, v. 23, p. 447-456, 2004.

SANDU O., SONG K., CAI W., ZHENG F., URIBARRI J., VLASSARA H.. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are limited to high glycotoxin intake. *Diabetes*, v. 54, p. 2314-2319, 2005.

SCHEEN A. J; LUYCKX F. H. Obesity and liver disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 16, p. 703-716, 2002.

SCHRAUWEN P, WAGENMAERKERS A. J., VAN MARKEN L. W., SARIS W. H. WESTERTERP K. R. Increase in fat oxidation on a high-fat diet is accompanied by an increase in triglyceride-derived fatty acid oxidation. *Diabetes*, v. 49, p.640-646, 2000a.

SCHRAUWEN P., WESTERTERP K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. 417-427, 2000b.

SCHWARTZ M. W., POTRE Jr D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*. v. 307, p. 375-379, 2005.

SHEN H., TONG L., BALAZS R., COTMAN C. W. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience*. v. 107, p. 219-29, 2001.

STRACZKOWSKI M., KOWALSKA I., DZIENIS S. S., STEPIEN A., SKIBINSKA E., SZELACHOWSKA M., KINALSKA I. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*. v. 27, p. 19-23, 2001.

SLENTZ C. A., HOUMARD J. A., KRAUS W. E. Modest exercise prevents the progressive disease associated with physical inactivity. *Exerc. Sport Sci Rev*. v. 35, p. 18-23, 2007.

TREMBLAY A. J., LAMARCHE B., PICHE M. E., NADEAU A., BERGERON J., ALMERAS N., TREMBLAY A., LEMIEUX S. Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation and components of the insulin resistance syndrome. *Metabolism*, v. 53, p. 310-317, 2004.

TSUTSUMI, K. KUSUNOKI, M. HARA, T. OKADA K. SAKAMOTO, S. OHNAKA, M. NAKAYA, Y. Exercise improved accumulation of visceral fat and simultaneously impaired endothelium-dependent relaxation in old rats. *Biol. Pharm. Bull.* v. 1, 88-91, 2001.

UNGER, R. H. The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol.* v. 63, p. 333-347, 2003.

UNGER R. H., ORCI L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *The FASEB Journal*, v. 15, p. 312-321, 2001.

VAN GAAL L. F., MERTENS I. L., DE BLOCK C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular diseases. *Nature*. v. 444, p. 875-880, 2006.

WOODS S. C., SEELEY R. J., RUSSHING P. A., D'ALESIO D., TSO P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *American Society for Nutritional Sciences*, v. 133, p. 1081-1087, 2003.

HE W., LAM T. K. T., OBICI S., ROSSETTI L. Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nature Neuroscience*. v. 9, p. 227 – 233, 2006.