

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA

**Dieta Hiperpalatável e Exercício Físico Modulam a Expressão dos
Transportadores de Monocarboxilatos (MCTs) no Hipocampo de
Camundongos**

Andressa Wigner Brochier

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

**Dieta Hiperpalatável e Exercício Físico Modulam a Expressão dos
Transportadores de Monocarboxilatos (MCTs) no Hipocampo de
Camundongos**

Andressa Wigner Brochier

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Wigner Brochier, Andressa

Dieta Hiperpalatável e Exercício Físico Modulam a Expressão dos Transportadores de Monocarboxilatos (MCTs) no Hipocampo de Camundongos / Andressa Wigner Brochier. -- 2016.
60 f.

Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Dieta Hiperpalatável. 2. Exercício Físico. 3. Metabolismo Energético Cerebral. 4. Metabolismo Mitocondrial. I. Valmor Cruz Portela, Luis, orient. II. Título.

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 FATORES AMBIENTAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	1
1.1.1 OBESIDADE, DIABETES E DIETAS HIPERPALATÁVEIS	1
1.1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	2
1.2 INSULINA E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	4
1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL ..	6
1.3.1 LANÇADEIRA DE LACTATO ASTRÓCITO-NEURÔNIO.....	6
1.3.2 TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS	9
1.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL	11
1.4.1 COMPLEXO DA PIRUVATO DESIDROGENASE	12
1.4.2 CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO E CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS	13
1.5 NEUROINFLAMAÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
1.5.1 OBJETIVO GERAL	17
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17

PARTE II

CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO EM PREPARAÇÃO	19
--	----

PARTE III

1. DISCUSSÃO	43
2. CONCLUSÃO	48
3. PERSPECTIVAS	48
4. REFERÊNCIAS	49

PARTE I

RESUMO

O alto consumo de dietas hiperpalatáveis (HP) ricas em lipídios e carboidratos simples associado a hábitos sedentários são fatores que contribuem para o desenvolvimento de sobrepeso e obesidade. Estas alterações, promovem um estado proinflamatório, causam resistência periférica à insulina e ainda prejudicam o metabolismo cerebral. A glicose é considerada o principal substrato energético para o cérebro. No entanto, em condições de alta demanda energética outros substratos como corpos cetônicos e lactato, por exemplo, podem servir como alternativa energética. A teoria da lançadeira de lactato astrócito-neurônio (do inglês ANLS) propõe que o aumento da captação da glutamato pelos astrócitos aumenta a atividade glicolítica e a produção de lactato, que por sua vez é exportado dos astrócitos para o espaço extracelular via transportadores de monocarboxilados (MCTs) do tipo 1 e 4. Os transportadores MCT do tipo 2 presentes nos neurônios internalizam o lactato para que ele seja convertido em piruvato. A enzima piruvato desidrogenase (PDH) converte o piruvato em acetil-CoA dentro da matriz mitocondrial. Sendo assim, o lactato e outras substâncias em equilíbrio com o piruvato são direcionados para o metabolismo oxidativo. Assim, a PDH conecta o metabolismo citosólico e mitocondrial. Por outro lado, o aumento do metabolismo oxidativo é associado com o aumento de vazamento de prótons e com a produção de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria. Conseqüentemente, pode haver uma menor produção de ATP pela mitocôndria. Neste estudo, os efeitos de uma dieta hiperpalatável (HP) e do exercício físico em parâmetros metabólicos no hipocampo e na memória foram investigados. Foram avaliados: os níveis de lactato, o imunoconteúdo dos MCTs e da PDH e atividade mitocondrial no hipocampo de camundongos. Camundongos C57BJ machos com 30 dias receberam uma dieta HP durante cinco meses e, praticaram atividade física voluntária durante o último mês. Os grupos foram: CDS (dieta controle sedentário), CDE (dieta controle exercício), HPS (dieta HP sedentário) e HPE (dieta HP exercício), (n=15 animais/grupo). Os resultados mostraram um aumento no imunoconteúdo de MCT 1 e 4 causados pela dieta e pelo exercício físico. O exercício físico causou um aumento na expressão de PDH. A expressão do MCT2 não apresentou diferença significativa entre os grupos. Não foram observadas alterações na memória no teste do Y-maze. No entanto, houve um aumento no nível de lactato em microdialisado de hipocampo no grupo HPE após a exposição ao teste. Não foi observada diferença significativa no metabolismo mitocondrial basal, e nem no potencial de membrana mitocondrial. A ativação do complexo II mitocondrial pelo succinato aumentou a produção de H₂O₂ no grupo HPS. Esse efeito foi revertido pelo exercício físico. Os resultados demonstram que o exercício e a dieta HP aumentaram a expressão dos MCTs 1 e 4, enquanto que a expressão de PDH apenas aumentou pelo exercício. Isto sugere uma adaptação da maquinaria metabólica hipocampal em resposta a estes estímulos ambientais.

ABSTRACT

The high consumption of saturated fats and simple sugar diets associated with sedentary habits are factors that contribute to the development of overweight and obesity. These consequences produce a pro-inflammatory state, resulting in periphery insulin resistance and damage the cerebral metabolism. The glucose is considered to be the main energetic substrate to the brain, other particular substrates, like ketonic bodies and lactate, may work as alternative energy sources during moments of high energetic demand. The theory of Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle suggests that the increased uptake of glutamate by the astrocyte enhance the glycolytic activity and the production of lactate, which is exported from the astrocyte to the extracellular space via monocarboxylate transporters (MCTs) type 1 and 4. The MCTs type 2 residing inside the neurons accumulates lactate, which is converted into pyruvate. Furthermore, the dehydrogenase pyruvate enzyme (PDH) convert the pyruvate to Acetyl-CoA inside the mitochondrial matrix. Thus, the lactate and other substances in equilibrium are directed to the oxidative metabolism. This way, the PDH connects the cytosolic and mitochondrial metabolism. On the other hand, the increased oxidative metabolism is associated with the leakage of protons and with the hydrogen peroxide production by the mitochondria. Consequently, the ATP production might be reduced. In this study, the effects of a palatable diet and physical exercise in metabolic parameters in the hippocampus and memory were investigated. Were evaluated: lactate levels, the expression of MCTs and PDH and mitochondrial activity in the hippocampus. Male C57BJ mice with 30 days received a HP diet for five months and practiced voluntary physical activity during the last month. The groups were: CDS (control diet sedentary), CDE (control diet exercise), HPS (HP diet sedentary) and HPE (HP diet exercise), (n = 15 animals / group). The results showed an increase in immunocontent of MCT 1 and 4 caused by diet and exercise. The physical exercise caused an increase in PDH expression. The expression of MCT2 had no relevant impact among the groups. No changes were observed in memory in the Y-maze test even though it was observed an increase in lactate levels in hippocampal microdialysate of the HPE group after the exposure to test. There was no significant difference in basal mitochondrial metabolism nor in the mitochondrial membrane potential. The activation of the mitochondrial complex II by succinate increased H₂O₂ production in the HPS group. This effect was reversed by exercise. The results show that the exercise and the HP diet increased the expression of MCTs 1 and 4, while the PDH expression only increased by exercise. This suggests an adaptation of the hippocampal metabolic machinery in response to these environmental stimuli.

1. Introdução

1.1 Fatores Ambientais e o Sistema Nervoso Central

1.1.1 Obesidade, Diabetes e Dietas Hiperpalatáveis

A obesidade e suas comorbidades têm um alto custo econômico para os sistemas de saúde, ela afeta a qualidade de vida dos indivíduos, causa efeitos neuropsicológicos importantes, e, além disso, é uma causa de mortalidade entre indivíduos jovens (Barness et al., 2007; Bray et al., 2016). Ela possui uma natureza multifatorial resultante de fatores genéticos, fisiológicos, comportamentais, socioculturais e ambientais que levam a um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético durante um longo período de tempo (Bray et al., 2016; Keith et al., 2006). Entre os principais fatores ambientais que resultam em obesidade estão o excesso de calorias consumidas, principalmente em dietas ricas em açúcares e gorduras e o sedentarismo (Hall et al., 2012).

O gasto energético é geralmente avaliado em termos do gasto calórico em repouso em relação a um aumento da demanda energética fisiológica como pelo desenvolvimento corporal ou atividade física, ou em relação a doenças como cânceres e imunodeficiências (Hall et al., 2012). Tanto do ponto de vista fisiológico como em patologias o efeito termogênico dos alimentos também deve ser levado em conta.

A ingestão de alimentos e o gasto energético são controlados por sistema neural complexo envolvendo regiões cerebrais (hipotálamo) e sistema periférico de saciedade (trato gastrointestinal e hormônios pancreáticos). Alimentos altamente palatáveis e calóricos interrompem a regulação do apetite e, além disso, são capazes de induzir prazer e recompensa pelo seu consumo.

A dieta hiperpalatável (ou de cafeteria) tem sido demonstrada como uma forma consistente de aumentar o peso corporal e induzir a obesidade em modelos animais. Além disso, alimentos com alto teor de gordura podem induzir dependência em função da recompensa do cérebro e contribuir para o desenvolvimento da obesidade (de Macedo et al., 2016).

A obesidade e o sobrepeso são fatores capazes de levar ao desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes, síndrome metabólica (Sandu et al., 2005) e doenças neurodegenerativas (Kalmijn et al., 1997). O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante da secreção deficiente de insulina ou resistência à ação da insulina, ou ambas (Gispén and Biessels, 2000). O diabetes tipo I é caracterizado por uma destruição autoimune das células β -pancreáticas, causando uma deficiência na produção de insulina, enquanto que o diabetes tipo II é caracterizado pela resistência à insulina e, geralmente, ocorre em indivíduos obesos, com sobrepeso ou com adiposidade visceral (1997). Atualmente sabe-se que indivíduos com DM têm até trez vezes mais chances de desenvolver doença de Alzheimer ou outras demências (Talbot et al., 2012a). Por outro lado, a prática regular de algum tipo de atividade física melhora o perfil metabólico, aumenta a sensibilidade à insulina e diminui os fatores de risco para diabetes mellitus (Spielman et al., 2016).

1.1.2 Exercício Físico e o Sistema Nervoso Central

Os efeitos benéficos do exercício físico para a saúde física e mental têm sido bem estabelecidos na literatura científica nos últimos anos. O exercício físico regular é capaz de prevenir e de controlar a progressão de uma série de doenças crônicas, principalmente doenças cardíacas, pulmonares e

endócrinas, como o Diabetes. Além disso, estudos demonstram que a atividade física é capaz de melhorar a atividade cerebral e a função cognitiva (Penedo and Dahn, 2005; Baker et al., 2010). Os mecanismos envolvidos nestes benefícios incluem a redução do estresse oxidativo, aumento da sensibilidade cerebral a insulina, melhora da vascularização e do metabolismo energético, aumento da neurogênese e sinaptogênese (Chen et al., 2016). Também, os estudos sugerem que o exercício físico é capaz de modular mecanismos de neurotransmissão cerebral e sinalização neurotrófica (Cotman and Berchtold, 2002).

De acordo com estas propriedades neuroprotetoras, a atividade física tem sido considerada aliada na prevenção e na diminuição da progressão de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e o Parkinson por estimular a atividade de sistemas antioxidantes enzimáticos, e a expressão e liberação de fatores como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Paillard et al., 2015). Por outro lado, fatores genéticos, estilo de vida sedentário e o estresse crônico prejudicam a sinalização de BDNF, o que pode contribuir para patogênese da síndrome metabólica e suas repercussões cerebrais (Marosi and Mattson, 2014). No entanto, a administração de BDNF no cérebro aumenta a sensibilidade à insulina periférica melhorando o metabolismo da glicose (Nakagawa et al., 2000). Ainda, o BDNF estimula a biogênese mitocondrial e melhora a bioenergética neuronal permitindo a formação de sinapses e a reparação de DNA dos neurônios (van Praag et al., 2014; Yang et al., 2014).

Nosso grupo, por sua vez, demonstrou que o exercício físico foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina periférica e no hipocampo por meio da

ativação da via da fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3K). A ativação desta via aumenta a plasticidade hipocampal e também a memória e o aprendizado (Muller et al., 2008, 2011). Ainda a ativação da via PI3K pela administração intracerebral de insulina foi capaz de regular a produção de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria e o potencial de membrana mitocondrial. Desta maneira é possível sugerir que a melhora da sinalização cerebral da insulina tem impacto positivo na função mitocondrial, incluindo os mecanismos neuroenergéticos. Em contrapartida, quando esta sinalização está deficiente, como no caso do diabetes e envelhecimento cerebral, ela exerce um impacto negativo na atividade mitocondrial evidenciado pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e mecanismos associados à neurodegeneração (Muller et al., 2012).

1.2 Insulina e o Sistema Nervoso Central

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido, principalmente, pelas células β -pancreáticas responsável pela homeostase da glicose periférica. No início dos anos 60, estudos demonstraram que a Insulina é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e que o sistema nervoso central possui receptores específicos para esse hormônio (IRs) (Ghasemi et al., 2013). As áreas do cérebro com maior concentração desses receptores são no bulbo olfatório, no córtex, hipocampo, hipotálamo e cerebelo (Ghasemi et al., 2013). Quando a insulina se liga a seus receptores ela ativa diversas cascatas de sinalização incluindo a via da fosfatidilinositol-3- fosfato quinase (PI3K \rightarrow Akt \rightarrow GSK3 β) (Avruch, 1998; Talbot et al., 2012a).

A insulina pode promover a utilização de glicose em algumas áreas cerebrais. A homeostase energética global do sistema nervoso central é

sensível a níveis de insulina, além do controle da ingestão de alimentos e o gasto energético. Além da regulação do metabolismo energético, a insulina é responsável por outras importantes funções no cérebro como efeitos neuromodulatórios importantes para o desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Park, 2001). Um exemplo disso, são os efeitos moduladores na neurotransmissão glutamatérgica via receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) (Muller et al., 2011).

Entretanto, nos últimos anos, estudos têm demonstrado que problemas relacionados a alterações na sinalização cerebral do receptor de insulina podem causar prejuízos cognitivos e morte neuronal (Lannert and Hoyer, 1998). Este mecanismo, seria um fator envolvido na patofisiologia da doença Alzheimer, e outras demências (Correia et al., 2011). Desta maneira, estratégias farmacológicas e comportamentais para aumentar a sensibilidade cerebral à insulina poderiam ter efeitos neuroprotetores e prevenir mecanismos de neurodegeneração.

Por outro lado, estudos demonstram que o consumo de dietas enriquecidas com lipídios e carboidratos, além de causar alterações metabólicas periféricas associadas à resistência à insulina, também poderiam causar alterações morfológicas e funcionais cerebrais por meio do prejuízo na sinalização de insulina (Battú et al., 2012; Muller et al., 2008). Além disso, estas dietas causam um aumento persistente de espécies reativas de oxigênio, o que pode alterar a função mitocondrial e contribuir para a resistência à insulina (Cheng et al., 2010).

1.3 Metabolismo Energético do Sistema Nervoso Central

1.3.1 Lançadeira de lactato astrócitos-neurônios

O cérebro é um órgão que necessita de grandes quantidades de energia para seu funcionamento normal. Ele, apesar de representar apenas 2% da massa corporal de um humano adulto, consome aproximadamente 20% do oxigênio e 25% da glicose (Bélanger et al., 2011). A Glicose é o substrato energético mais utilizado pelo cérebro. Entretanto, em determinadas circunstâncias o cérebro possui a capacidade de utilizar outros substratos energéticos, como corpos cetônicos durante o desenvolvimento ou no jejum prolongado ou o lactato durante períodos de intensa atividade física ou cerebral (Schelp and Burini, 1995).

No cérebro a glicose é quase inteiramente oxidada a CO_2 e água pela Glicólise, pelo ciclo do ácido tri-carboxílico (TCA) seguido de fosforilação oxidativa. Mas, de fato, uma grande variedade de intermediários metabólicos formados a partir da Glicose no cérebro podem ser oxidados para produção de energia como, por exemplo, o lactato e piruvato (Zielke et al., 2009). Na figura abaixo são apresentados os possíveis destinos metabólicos da glicose no cérebro.

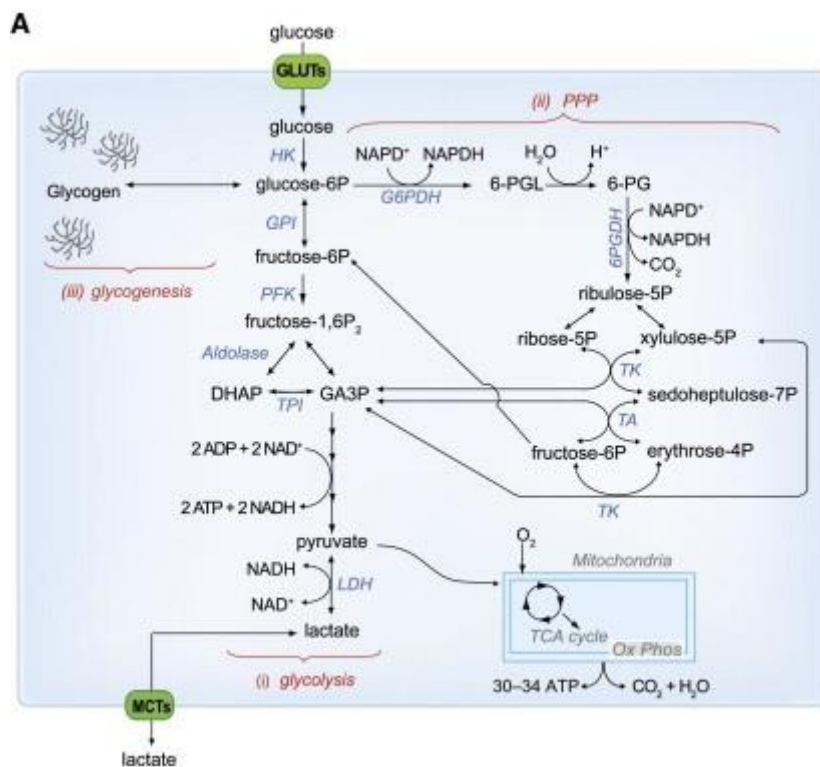


Figura 1: Representação das vias de utilização da glicose no cérebro. Adaptado de Bélanger et al., 2011.

O Lactato é um substrato energético para os neurônios e pode ser utilizado alternativamente, por essas células, para sustentar a transmissão sináptica, (Smith et al., 2003). Nos processos de aprendizado, o lactato é essencial para a formação da memória de longa duração e para a manutenção da potenciação a longo prazo (LTP) (Suzuki et al., 2011). Além disso, o metabolismo cerebral requer o compartilhamento de substratos energéticos. Como foi dito anteriormente a utilização dos substratos energéticos é dependente da atividade cerebral. Neste sentido, o glutamato parece exercer um papel importante tanto na ativação das vias metabólicas como na oferta de substratos energéticos para os neurônios (Pellerin and Magistretti, 1994).

O glutamato é considerado principal neurotransmissor excitatório no cérebro. Ele atua em receptores ionotrópicos e metabotrópicos localizados na

sinapse, e o término da sua sinalização se dá por meio da recaptação por transportadores neuronais e astrocitários. De maneira geral, os transportadores astrocitários são responsáveis pela captação de aproximadamente 95% do glutamato (Zhou and Danbolt, 2014).

Os astrócitos respondem ao aumento do neurotransmissor excitatório glutamato, aumentando a utilização de glicose e a produção de lactato (Pellerin and Magistretti, 1994). A glicose captada pelos astrócitos é engajada na via glicolítica com a produção de lactato, que por sua vez é liberado para o espaço sináptico para ser captado pelos neurônios e oxidado para produção de energia. Esta comunicação metabólica entre astrócito-neurônio baseada na transferência do lactato foi descrita como lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS, do inglês *Astrocyte-neuron lactate shuttle*"; verificar figura 2). É interessante destacar que o aumento da glicólise e a produção de lactato, ocorrem apesar da existência de níveis suficientes de oxigênio para que a fosforilação oxidativa ocorra (Pellerin and Magistretti, 2003). Ainda, o aumento da atividade neuronal leva a um aumento da concentração do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica, o que ativa os transportadores envolvidos na recaptação desse neurotransmissor, principalmente por uma via dependente de sódio (Na^+) e acoplada ao consumo de ATP (Pellerin and Magistretti, 2012). Assim, regulando as concentrações de glutamato os astrócitos também exercem um papel central nos mecanismos de cooperação metabólica e na regulação da demanda energética cerebral. Embora os neurônios tenham alta demanda energética, eles têm a capacidade de realizar uma reprogramação metabólica eficiente o que desencadeia, por exemplo, até uma preferência pelo

lactato em relação à glicose, quando há ambos substratos presentes (Bélanger et al., 2011).

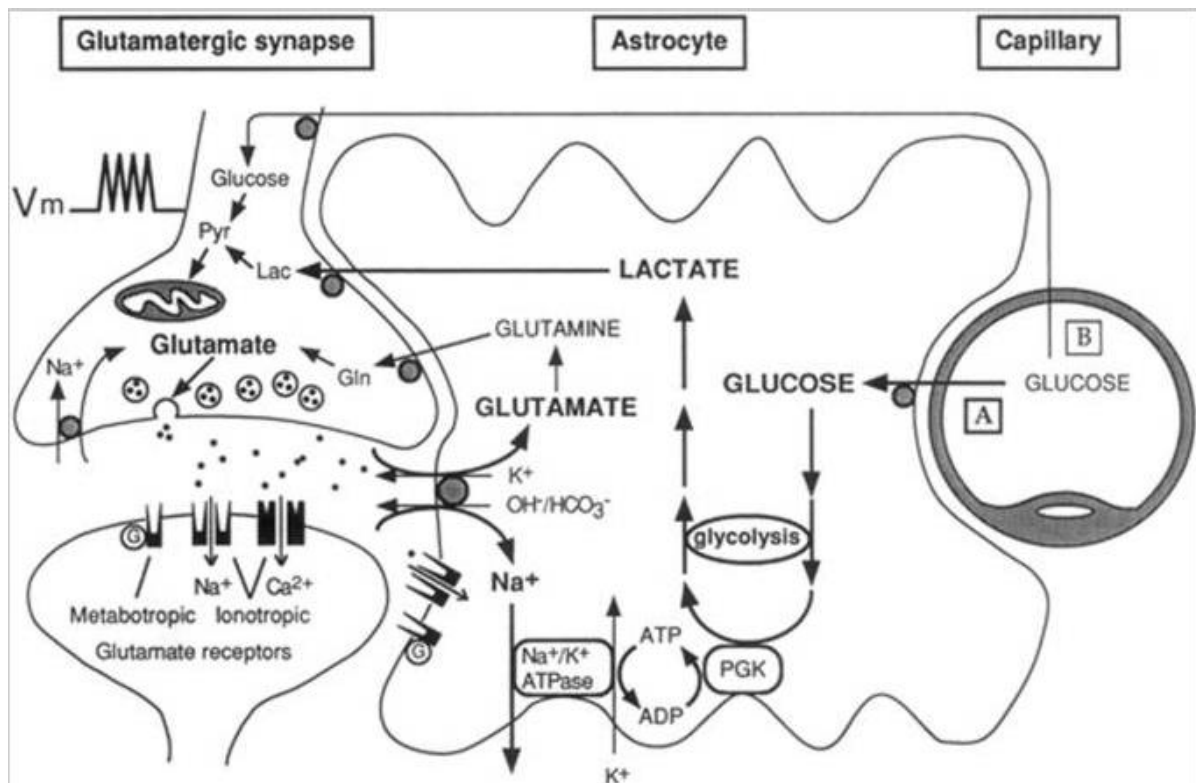


Figura 2: Representatividade da lançadeira de lactato Neurônio-Astrócito. Adaptada de Pellerin and Magistretti, 1994.

1.3.2 Transportadores de monocarboxilatos - MCTs

A troca do lactato entre as diferentes células cerebrais dá-se devido à existência de transportadores específicos com diferentes cinéticas. Estes transportadores são os chamados transportadores de monocarboxilatos (MCTs), que além do lactato são capazes de transportar piruvato, e corpos cetônicos. Os MCTs são proteínas de membrana cuja atividade também está ligada ao fluxo de prótons. Eles pertencem a uma família com 14 subtipos encontrados em vários tecidos. No cérebro, está descrita a presença de três isoformas: MCT1, MCT2 e MCT4. Os MCTs 1 e 4 são mais expressos em

astrócitos, enquanto o MCT2 está mais expresso em neurônios (Pierre and Pellerin, 2005).

Como foi dito anteriormente é interessante considerar as propriedades cinéticas desses transportadores porque esta propriedade ajuda a determinar o fluxo do lactato entre os astrócitos e neurônios. Estas propriedades cinéticas são demonstradas pela Constante de Michaelis-Menten (K_m) de cada transportador; o K_m é a propriedade que indica afinidade/estabilidade da enzima pelo substrato, quanto maior o valor de K_m , menor a afinidade pelo substrato. Assim, o MCT2 é um transportador de elevada afinidade (K_m de 0,7 mmol/L), enquanto os MCTs 1 e 4 possuem menor afinidade (K_m de 3,5 e 34 mmol/L, respectivamente) para o lactato. Estas propriedades cinéticas favorecem uma maior captação de lactato pelos neurônios e uma maior liberação desse substrato pelos astrócitos (Pellerin and Magistretti, 2012). A expressão desses transportadores de monocarboxilatos pode ser regulada por diversos mediadores da sinalização molecular nas células cerebrais, a figura 3 ilustra a localização dos transportadores. Fatores como a Insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) causam um aumento na expressão e transcrição do MCT2 em culturas de neurônios corticais via estimulação da via de sinalização da fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) (Chenal et al., 2008). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também é capaz de regular positivamente a expressão neuronal do MCT2 (Robinet and Pellerin, 2010). Como relatado anteriormente, estudos têm demonstrado que o exercício é capaz de aumentar os níveis de BDNF e de IGF-1 mediando a plasticidade cognitiva o que potencialmente implica na modulação no sistema neuroenergético via ANLS (Ding et al., 2006).

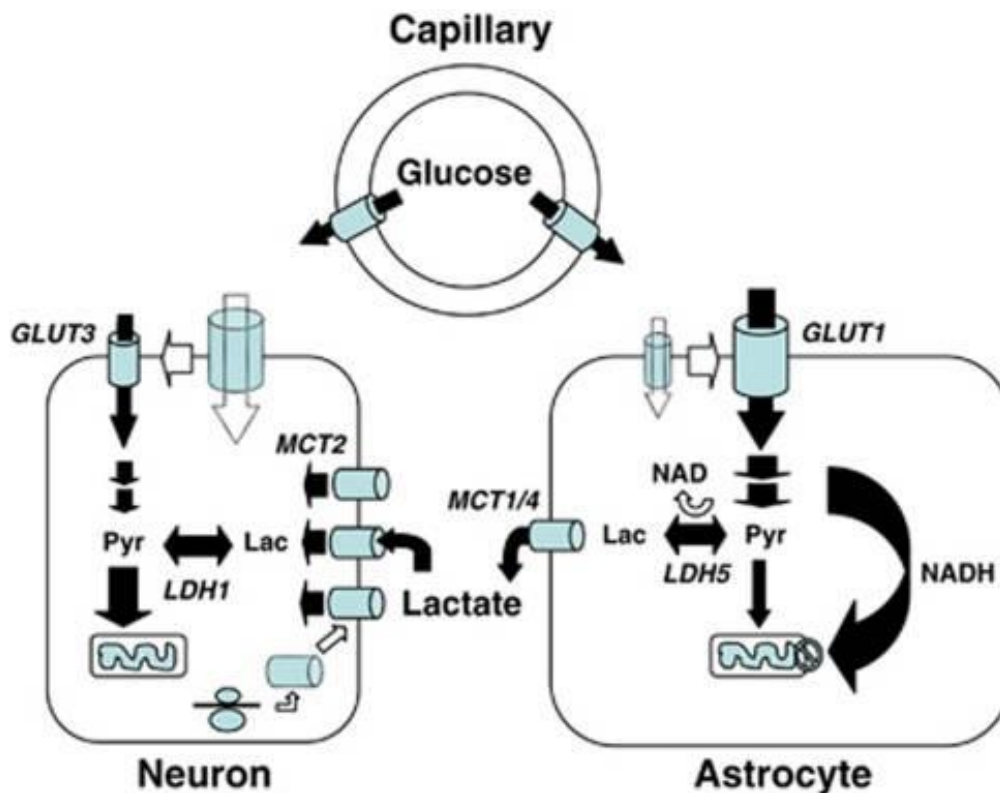


Figura 3: Importância dos MCTs e a regulação das suas expressões no ANLS.

Adaptada de Pellerin and Magistretti, 2012.

1.4 Metabolismo Mitocondrial

As mitocôndrias são consideradas organelas centrais no metabolismo energético oxidativo nos eucariotos. Elas possuem duas membranas: a membrana mitocondrial externa e a membrana mitocondrial interna. Entre elas existe o espaço inter membranas, e no compartimento interno a matriz mitocondrial. A membrana mitocondrial externa é considerada livremente permeável a íons e pequenas moléculas, já a membrana mitocondrial interna é impermeável a íons e moléculas; as únicas espécies que conseguem atravessar essa membrana utilizam transportadores específicos. A membrana

interna aloja os complexos da cadeia respiratória e a ATP-sintase. A matriz mitocondrial contém o complexo da piruvato desidrogenase e as enzimas do ciclo do ácido cítrico (Michael M. Cox and David L. Nelson, 2011).

1.4.1 Complexo da Piruvato Desidrogenase

O cérebro obtém maior parte da sua energia do metabolismo da glicose, e o complexo da piruvato desidrogenase (PDH) desempenha um papel regulador chave durante a oxidação da glicose. O Complexo da Piruvato Desidrogenase é constituído de três enzimas diferentes: piruvato-desidrogenase (E1), diidrolipoiltransacetilase (E2), diidrolipoil-desidrogenase (E3) e se localiza nas mitocôndrias das células eucarióticas (Jha et al., 2012).

A reação geral catalisada pelo complexo da PDH é uma descarboxilação oxidativa, um processo de oxidação irreversível, no qual um grupo carboxil é removido do piruvato na forma de uma molécula de CO_2 e os carbonos remanescentes são convertidos ao grupo acetil do acetil-CoA (Michael M. Cox and David L. Nelson, 2011).

O complexo da PDH é fundamental para a manutenção da euglicemia durante períodos de jejum. A atividade do complexo deve estar aumentada logo após as refeições e reduzida durante o jejum. A atividade do complexo é regulada por *feedback* negativo dos produtos acetil-CoA e NADH^+ e por um equilíbrio entre a inativação pela piruvato desidrogenase quinase (PDK) e ativação da piruvato desidrogenase fosfatase (PDP). No estado alimentado, o complexo da PDH está desfosforilado e ativado para a oxidação da glicose. No estado de jejum, o complexo está altamente fosforilado e inativo de modo a

poupar compostos de três carbonos, os quais podem ser novamente convertidos em glicose (Jeoung and Harris, 2008).

1.4.2 Ciclo do Ácido Cítrico e Cadeia Transportadora de elétrons

O Acetil-CoA produzido pelo complexo da PDH, é o principal substrato para o Ciclo do Ácido Cítrico, uma via catabólica central, na qual os compostos derivados da degradação de carboidratos, triglicerídeos e proteínas são oxidados a CO_2 , com maior parte da energia de oxidação temporariamente armazenada nos transportadores de elétrons FADH_2 e NADH^+ . Durante o metabolismo aeróbico, estes elétrons são transferidos ao O_2 , e a energia do fluxo de elétrons é capturada na forma de ATP (Michael M. Cox and David L. Nelson, 2011). A cadeia transportadora de elétrons consiste em uma série de transportadores e complexos que agem sequencialmente. O fluxo de elétrons ao longo da cadeia reduz o O_2 no complexo IV.

Parte do oxigênio é convertido em espécies reativas de oxigênio (EROs), e o sistema de transporte de elétrons mitocondrial é considerado como a principal fonte geradora dessas espécies. O equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes determina o grau de estresse oxidativo nas células, afetando membranas celulares, proteínas e DNA, portanto, uma regulação rigorosa é necessária para manter o funcionamento celular normal. Um desequilíbrio desse sistema pode causar danos celulares (Floyd and Hensley, 2002; Nicholls and Budd, 2000).

As mitocôndrias de cérebros que apresentam Doença de Alzheimer possuem um potencial de membrana reduzido, aumento na permeabilidade e produção em excesso de espécies reativas de oxigênio, que danificam

proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, o que pode contribuir para a neurodegeneração (Onyango et al., 2016).

A espécie mais abundante é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de H_2O_2 também envolve o potencial de membrana mitocondrial e consumo de oxigênio. O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patofisiologia do Diabetes Mellitus tipo II. Além disso, estudos demonstram a associação entre a resistência à insulina com o aumento da produção de EROs (Baynes, 1991). A sinalização de insulina sustenta a integridade da cadeia transportadora de elétrons, além disso, as EROs produzidas pela mitocôndria servem como segundo mensageiro e aumentam a sensibilidade à insulina, através da modificação oxidativa do receptor de insulina (IR). No entanto, a exposição crônica a níveis elevados de EROs é capaz de promover resistência à insulina por meio da disfunção mitocondrial (Cheng et al., 2010).

Quando ocorre deficiência na sinalização de insulina (envelhecimento, doença de Alzheimer ou Diabetes Mellitus) ocorre um aumento da produção de H_2O_2 , o que contribui para déficits neurológicos e doenças neurodegenerativas, tendo isso em vista uma sinalização de insulina íntegra é necessária para atividade mitocondrial e metabolismo normal (Muller et al., 2013).

Com isso, estratégias para melhorar a sinalização de insulina cerebral e a função mitocondrial podem ser úteis para manter o equilíbrio normal do estado redox e evitar o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. E o exercício físico se mostra como uma eficiente estratégia para retardar a disfunção mitocondrial por meio de mecanismos que estimulam a biogênese mitocondrial no cérebro e melhorar a capacidade oxidativa (Steiner et al., 2011).

1.5 Neuroinflamação

Inflamação é a resposta do organismo a estímulos prejudiciais, essa resposta pode se apresentar de diversas maneiras: neuroendócrina, hematopoiética e imunológica. A resposta imunológica é a inicial, ela é constituída de células sanguíneas (leucócitos), citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. As citocinas e as quimiocinas são pequenas proteínas importantes na regulação da inflamação, são exemplos de citocinas o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e as Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) que facilitam as reações inflamatórias por diversos tipos celulares (Barzilaym and Freedland, 2003).

Processos inflamatórios têm sido associados com alterações no metabolismo celular cerebral. A ativação de diferentes tipos de células imune do cérebro, como a microglia e os astrócitos, é um evento fundamental na neuroinflamação. A microglia é a principal célula do sistema imune cerebral, ela sintetiza fatores importantes para manutenção dos tecidos, ajuda a manter a plasticidade dos circuitos neuronais e contribui para a proteção e o remodelamento de sinapses. Essas funções da microglia são mediadas pela liberação de fatores tróficos como o BDNF, que é importante na formação da memória e do aprendizado. Após a ativação por fatores patológicos a microglia migra para o local da lesão, no qual ela inicia a sua resposta imune. Enquanto que os Astrócitos são os principais envolvidos na manutenção da função neuronal, eles medeiam a neuroinflamação recebendo e amplificando os sinais inflamatórios da microglia (Farina et al., 2007; Lee and MacLean, 2015).

A ativação da microglia e a produção de citocinas inflamatórias são relacionadas com o desenvolvimento da resistência à insulina e a amplificação

dessas respostas pelos astrócitos gera neurotoxicidade, fator que pode conduzir a doenças neurodegenerativas (Yin et al., 2016).

Estudos demonstram que existe uma associação entre o acúmulo de gordura corporal (proveniente da associação entre o consumo de dietas ricas em lipídios e carboidratos e o sedentarismo) e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes melitus tipo II com consequente ativação de resposta inflamatória periférica via interleucinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), a partir disso, é lógico supor que a prática de atividade física pode melhorar os marcadores de inflamação (Barzilaym and Freedland, 2003) (Greenfield and Campbell, 2006).

E importante considerar que muitas vezes, pessoas engajadas em atividades física regular continuam sendo expostas a dietas não saudáveis. Desta maneira elas poderiam não se beneficiar das adaptações causadas pelo exercício físico. Assim, neste trabalho pretendemos avaliar estas interações.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da dieta hiperpalatável e do exercício físico voluntário e no sistema energético cerebral e na função cognitiva.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar os efeitos da dieta hiperpalatável e do exercício físico voluntário no imunoconteúdo de MCTs, no hipocampo;

2.2.2. Avaliar a função cognitiva e os níveis de lactato durante teste cognitivo

2.2.3. Investigar os efeitos da dieta hiperpalatável e do exercício físico voluntário na função mitocondrial e no imunoconteúdo da PDH;

2.2.4. Avaliar os efeitos da dieta hiperpalatável e do exercício físico voluntário na neuroinflamação.

PARTE II

1. Artigo científico em elaboração

Hyperpalatable diet and physical exercise modulates the expression of glial monocarboxylate transporters MCT1 and 4

Andressa W. Brochier^a, Clarissa B. Haas^a, Afonso Kopczynski de Carvalho^a,
Eduardo R. Zimmer^a, Eduardo Kalinine^a, Luc Pellerin^b, Luis V. Portela^a
Alexandre P. Muller^c.

^a Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas- Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP
90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Département de Physiologie, Université de Lausanne. Rue du Bugnon 7,
1005, Lausanne, Switzerland

^c Unidade de Ciências da Saúde, Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do
Exercício Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC. Av. Universitária,
1105 - Bairro Universitário, CEP: 88806-000, Criciúma, Santa Catarina, Brazil.

*Corresponding author:

Alexandre Pastoris Muller, PhD

Universidade do Extremo Sul Catarinense

Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício-LAFIBE

Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário, CEP: 88806-000

Criciúma, Santa Catarina, Brazil.

E-mail: alexandrep.muller@gmail.com

Telephone: 48 34312773

Keywords: Hyperpalatable diet, physical exercise, lactate, monocarboxylate transporters, mitochondrial function.

Abstract

Hyperpalatable diets (HP) seem to impair brain metabolism and cognitive function, whereas regular physical exercise has an apparent opposite effect. Here, we combined a long-term exposure to HP diet and physical exercise, and evaluated the impact on cognitive performances as well as on specific metabolic parameters. For this purpose, we assessed the extracellular lactate concentration, expression of monocarboxylate transporters (MCTs) and pyruvate dehydrogenase (PDH), as well as the mitochondrial function in the hippocampus. Male C57BL/6J mice, thirty days old, were fed four months with HP or a control diet. Then, they were divided in the following groups: control diet sedentary (CDS), control diet exercise (CDE), HP diet sedentary (HPS), and HP diet exercise (HPE) (n=15 per group), and were engaged for an additional thirty-day period of exercise and HP diet. Relative to the control situation, exercise increased MCT1, MCT4 and PDH levels, while the HP diet increased MCT1 and MCT4 levels. The production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) stimulated by succinate in hippocampal homogenates were not significantly different between groups. ADP phosphorylation and the maximal respiratory rate induced by FCCP showed similar responses between groups, implying a normal mitochondrial function. Also, extracellular brain fluid lactate levels were increased in the HPE group compared to other groups soon after performing the Y-maze task. However, such enhanced lactate levels were not associated to improved memory performance. In summary, hippocampal expression levels of some

MCTs (1 and 4) were increased by physical exercise and HP diet, whereas PDH was only increased by exercise. These observations indicate that a hippocampal metabolic reprogramming takes place in response to these environmental factors.

Introduction

Beyond genetic components, sedentary habits and high intake of diets enriched in fat and sugar are significant contributors to the overweight and obesity epidemics in western societies. Such undesirable conditions increase the risk for the development of insulin resistance, diabetes, and neurodegenerative diseases (Mokdad et al., 2003; Sandu et al., 2005; Kalmijn et al., 1997). This is paralleled by metabolic disturbances, which affects the capacity of peripheral tissues and brain to generate the energy necessary to sustain their function.

The high energetic supply needed to support brain function is mostly satisfied by glucose (Pellerin and Magistretti, 2003). However, in conditions of high metabolic demands, other energetic substrates like lactate and ketone bodies can serve as additional energy substrates (Schelp and Burini, 1995). For instance, lactate is essential for long-term memory (Suzuki et al., 2011), and during moderate or intense exercise, in which case, the adult brain is able to consume high amounts of lactate, at the expense of glucose (Dalsgaard et al., 2004; Smith et al., 2003). In addition, there is strong evidence for a metabolic coupling between neurons and the supporting cells of the glial network linking energy metabolism and glutamate recycling (Belanger et al., 2011). The astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) proposes that lactate represents a key metabolic substance interconnecting astrocytes and neurons in order to

maintain the energetic homeostasis of the tripartite glutamatergic synapse (Pellerin et al., 2005).

The possibility of shuttling lactate between brain cell types is determined by the expression of specific transporters named monocarboxylate transporters (MCTs), which regulate lactate influx and efflux. Interestingly, it was reported that metabolic regulatory hormones and neurotrophic factors known to cross the blood-brain barrier and enter the brain could influence the expression and activity of cerebral MCTs (Aubert et al., 2005; Chenal et al., 2008; Pierre et al., 2007). Regarding the cell-type distribution in the central nervous (CNS) system, MCT1 is predominantly expressed by astrocytes and oligodendrocytes, whereas MCT2 is expressed neurons, particularly on axons and dendrites. In contrast, MCT4 is solely expressed by astrocytes (Pellerin et al., 2005).

The pyruvate dehydrogenase (PDH) enzyme catalyzes the irreversible conversion of pyruvate to acetyl-coA within the mitochondrial matrix. This reaction drives cytosolic pyruvate and other 3-carbon metabolites in equilibrium with pyruvate, including lactate, to oxidative metabolism in the mitochondria (Halim et al., 2010; Margineantu et al., 2002). The oxidative phosphorylation reactions in the mitochondrial internal membrane are usually coupled with the leakage of protons and the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2), with its physiological or pathological significance being dependent on a variety of endogenous and exogenous factors (Muller et al., 2013; Votyakova and Reynolds, 2001). For instance, insulin resistance, pro-inflammatory status, high intake of diets enriched in fat and sugar (high palatable), and sedentary lifestyle functionally disturb neuronal and glial cells by mechanisms involving altered mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), exacerbated H_2O_2 production, and

deficient neuroenergetic coupling (Kilbride et al., 2008; Russell et al., 2002). Moreover, higher is the dissipation of the proton gradient through the mitochondrial internal membrane instead of through ATP synthase, higher is H₂O₂ production, and consequently, lower is ATP production. Remarkably, physical exercise is recognized as an easily achievable and low-cost strategy to improve the energetic machinery and to maintain brain H₂O₂ at physiological levels thereby avoiding cell damage, increasing neurotrophic signaling, and improving cognitive performance (Nichol et al., 2007). However, although in humans a physically active lifestyle is recommended to oppose the negative effects of unhealthy diets on various neurobiological mechanisms, individuals continually being exposed to HP diets might not experience the exercise benefits on brain function.

In this study, we combined a long-term exposure to HP diet and physical exercise, in an attempt to unravel their impact on memory as well as on some hippocampal metabolic parameters that could be correlated with cognitive performance. More specifically, we assessed in the hippocampus the levels of extracellular lactate, expression of MCTs and PDH, as well as the mitochondrial function.

Materials and Methods

Animals, diet and exercise protocol

Male C57BL/6J mice, one month old, were obtained from Foundation for Health Science Research (FEPPS, Porto Alegre/RS, Brazil). Animals (4-5 per cage) were placed into a controlled temperature room (22°C ± 1) under a 12h light/12h dark cycle (lights on at 7 am) and had free access to food and water.

Mice were kept during 5 months, receiving HP or control diet. At the end of the fourth month of diet treatment, a group of animals were enrolled in voluntary exercise for one month (for experimental design please see figure 1A). Animals in voluntary exercise had free access to a running wheel, which has an automated distance travelled recorder. The groups were defined as control diet sedentary (CDS, n=15); control diet exercise (CDE, n=15); hyperpalatable diet sedentary (HPS, n=15); and hyperpalatable diet exercise (HPE, n=15). The HP diet was composed of 57% carbohydrates (34% condensed milk, 15% in starch and 8% sucrose), 25.3% protein, 10% fat (soybean oil), 5% salt, 2.7% fibers and vitamins (Dietrich et al., 2007). All experiments were in agreement with the Committee on the Care and Use of Experimental Animal Resources, UFRGS, Brazil number 22436.

Glucose tolerance test

Animals (n=15 per group) were submitted to a glucose tolerance test after the experimental intervention (diet and/or exercise). They received an intraperitoneal injection of glucose in solution (2 mg/g body weight), which was performed in 12 h fasted mice. Blood was collected by a small puncture on the tail immediately before (0 min), 30, 60, and 120 minutes after the injection. At each time, glucose was measured by a glucosimeter (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA). We analyzed the area under the curve (AUC) to obtain a profile of the peripheral glucose sensitivity.

Surgical procedure and microdialysis

A guide cannula for microdialysis was placed in the dorsal hippocampus at 2 mm posterior to the bregma, 2 mm right of the midline and a 1 mm hole was made in the cranial bone (n=4 per group). Seven days after surgery, the

animals were submitted to microdialysis in order to collect extracellular cerebral fluid through BASi Brain Microdialysis Probes (ref MD-2200-BR2, USA). After one hour of habituation to microdialysis artificial extracellular fluid (aECF); (124 mM NaCl, 3 mM KCl₂, 1 mM MgSO₄ 7H₂O, 26 NaHCO₃, 2 mM CaCl₂ H₂O, 1 mM glucose, buffered at pH 7.4), samples were collected in three blocks of 10 minutes to analyze lactate basal level (Kalinine et al., 2014). After that, the animals were submitted to a Y-maze task, during 10 minutes, and then, samples were collected in three blocks of 10 minutes to analyze the animal's recovery from the test. These samples were used to evaluate lactate levels using a commercially available colorimetric assay (Katal, Brazil).

Y-maze task

Spatial memory performance was evaluated using a Y-maze test (n=12 per group). Perfect alternations were defined as exploration of all three arms sequentially given 3 opportunities independent of a right or left arm choice at initiation. Results were calculated as the percentage of the number of perfect alternations divided by total opportunities (considered 100%). The apparatus consists in a radial-arm maze with three identical arms (arms = 40 cm in length x 9 cm in width x 16 cm in wall height with an arm angle of 120°). The animals were placed at the intersection of the arms and chose randomly which arm to enter during 10 minutes. Arm entry was considered when all animal's legs were in the arm (arm entry required all 4 legs of the mouse to enter an arm) (Kaczmarczyk et al., 2013).

Mitochondrial H₂O₂ production and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The mitochondrial production of hydrogen peroxide (H₂O₂) was assessed with the Amplex Red oxidation method (n=6 per group). Animal's hippocampi

were rapidly removed and homogenized in 'Sucrose Medium' (320 mM sucrose, 1mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, pH 7.4). As a strategy to improve the capacity of the homogenate to generate H₂O₂, a standard respiration buffer (100 mM KCl, 75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 5mM phosphate, 0.05 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) (Sims and Blass, 1986) supplemented with 10 μ M Amplex Red and 2 units/mL horseradish peroxidase was used. The basal H₂O₂ level was measured without the presence of substrate in the incubation medium, while succinate was used as substrate to stimulate mitochondrial respiration. We used ADP to analyze the functional capacity of mitochondria to produce ATP and the proton ionophore FCCP (Carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy-phenylhydrazone, a reversible inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation) to estimate the maximal mitochondrial electron transport system capacity. Fluorescence was monitored at excitation (563 nm) and emission (587 nm) wavelengths with a Spectra Max M5 microplate reader (Molecular Devices, USA). The $\Delta\Psi_m$ was measured by using the fluorescence signal of the cationic dye, safranin-O. Hippocampal homogenates were incubated in high K⁺ respiration buffer supplemented with 10 μ M safranin O. Fluorescence was detected with an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 586 nm (Spectra Max M5, Molecular Devices). Data are reported as arbitrary fluorescence units (AFUs) (Muller et al., 2013).

Western blotting

For western blot analysis, 30 μ g of protein from hippocampal homogenates (n=8 per group) were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and electrotransferred to PVDF membranes as previously reported (Muller et al., 2011). Antibodies against MCT1 (1:1000) (provided by

the laboratory of Dr. Pellerin and characterized in (Pierre et al., 2000), MCT4 (Santa Cruz 1:200), MCT2 (Alpha Diagnostics 1:1000), PDH and tubulin (Cell Signaling Technology, 1:1000) were used.

Body mass

The body weight of each mouse was measured during four months of diet and also during the month of exercise (n= 15 group). Then, animals were euthanized by decapitation. Blood was collected and centrifuged at 5000 x g/10 min to obtain serum samples, which were stored at -20°C. Fat tissue from mesenteric and epididymal regions were dissected and weighed as previously described (Dietrich et al., 2007).

Inflammatory parameters

The serum was collected while the hippocampi were dissected and homogenized in PIK buffer (1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 400 µM sodium vanadate, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, and 0.1% phosphatase inhibitor cocktails I and II; Sigma-Aldrich, USA). The homogenate was centrifuged, and the supernatant was collected. The total protein content was measured with a modified Lowry method (Peterson, 1977). The homogenates (n = 5 per group) were stored at -70°C. IL-1β and TNF-α assays were performed using commercially available ELISA kits (R&D Systems references DY401 and DY410). The protocol was conducted according to the instructions of the manufacturer.

Statistical Analysis

Results were calculated and expressed as the mean ± S.E.M. To analyze the differences between groups, we used one-way analysis of variance

(ANOVA) followed by a post-hoc Tukey test; or Student's t-test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Exercise increases the expression of MCTs and PDH

The experimental design with the different tests and interventions is illustrated in Figure 1. Our results shown that exercise increase MCT1 expression in the control and HP diet (*CDE, HPS and HPE > CDS, $p < 0.05$). In addition, MCT1 levels were increased in HPE diet compared to HPS diet group (HPE > HPS $p < 0.05$) (Figure 1B). MCT2 expression was not significantly affected by either physical exercise or diet interventions (Figure 1C). MCT4 levels of the CDE group were significantly higher than those of the CDS group (* CDE > CDS, $p < 0.05$). Furthermore, MCT4 expression was increased in both HP groups compared to CDS (HPE and HPS > CDS, $p < 0.05$) (Figure 1D). The expression of PDH was significantly increased in exercised compared to sedentary groups (*CDE and HPE > CDS and HPS $p < 0.05$) (Figure 1E).

Hippocampal extracellular lactate levels and spatial memory

Brain extracellular fluid lactate levels were significantly increased in the HPE group compared to other groups 10 min after exposure to the Y-maze task (* HPE > CDS, CDE and HPS, $p < 0.05$) (Figure 1F). Memory performance in the Y-maze task was not significantly different between groups (Figure 1G).

Mitochondrial H_2O_2 production and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The H_2O_2 production induced by succinate was not significantly different between groups (Figure 2A). The addition of ADP and FCCP decreased H_2O_2 production (Figure 2A). The change in $\Delta\Psi_m$ induced by succinate and succinate

+ ADP was not different between groups. Also, the capacity to dissipate the proton gradient with FCCP was not significantly different between groups (Figure 2B). This observation implies that mitochondrial properties involved in energy production (oxidative phosphorylation of ADP), and in reactive oxygen species production were not significantly altered by exercise nor HP diet interventions.

Effects of exercise and HP diet on body mass, glucose homeostasis (GTT), as well as on IL-1 β and TNF- α levels

The levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α measured in the serum and in hippocampal homogenates were not altered by exercise or HP diet (Table 1). As expected, the HPS group showed an increase in body weight compared to the CDS group (* HPS > CDS, $p < 0.05$, Table 1). The exercised groups showed similar body weight compared to the CDS group. Thirty-days of voluntary exercise were able to revert the effects of the HP diet on epididymal fat pad at the level found in the CDS group (*CDE < CDS and *HPE < HPS, $p < 0.05$) (Table 1). A similar effect of exercise was observed in the mesenteric fat pad (* HPE < HPS and HPS > CDS, $p < 0.05$, Table 1). The area under the curve for the GTT was higher in the HPS group compared to the other groups (* HPS > CDS, CDE and HPE, $p < 0.05$, Table 1).

Discussion

The present study revealed that five months of HP diet increased the expression of MCT1 and MCT4 in hippocampal homogenates. Interestingly, thirty-days of physical exercise have similar effects on MCT1 and MCT4 expression but also increase the PDH expression in the hippocampus of mice. In addition, animals fed five months with a HP diet and engaged in thirty-days of

exercise exhibited an increase of extracellular levels of lactate in the hippocampus after being submitted to a spatial memory task. Physical exercise and HP diet interventions neither affected the mitochondrial H_2O_2 production and $\Delta\Psi_m$ nor the levels of pro-inflammatory cytokines. As expected, physical exercise decreased the adiposity (visceral and epididymal) in HP fed animals, as well as increased the insulin sensitivity.

Physical exercise has been shown to increase MCT1 and MCT4 expression in skeletal muscle (Yoshida et al., 2004), and in accordance with the reported benefits of exercise on different systems, we searched for similar adaptations at the cerebral level, and more specifically in the hippocampus, a brain area involved in spatial memory function. To the best of our knowledge, our data provide the first experimental evidence that long-term voluntary exercise training induces an enhancement in the expression of glial MCTs (1 and 4) but not in the neuronal transporter MCT2. Furthermore, exercise also increased PDH expression, suggesting that it might increase oxidative metabolism in neuronal mitochondria, which putatively influences the generation of energy. Therefore, it can be postulated that PDH is a molecular target of the processes induced by exercise in hippocampal neurons. Moreover, together with the expression profile of neuronal and glial MCTs observed following exercise, it supports the concept of exercise modulating the neuroenergetic status (Cotman et al., 2007). Indeed, the kinetic properties of the glial transporters MCT1 and 4 would favor the release of lactate in the extracellular space where it can be taken up by neuronal MCT2 to be metabolized in mitochondria.

The effect of unhealthy diets and obesity on cerebral MCT expression has raised attention in the last few years. Interestingly, mice fed a high fat diet exhibited increased expression of MCT1, 2 and 4 in the hippocampus (Pierre et al., 2007) suggesting that MCTs respond to variations in the peripheral metabolic state albeit the exact consequences for brain function are not clear. To unravel a putative functional consequence for the brain exposed to a HP diet, we showed that hippocampal extracellular lactate levels were increased in all groups after being exposed to the Y-maze task. Surprisingly, the HPE group showed the highest concentration of lactate as compared to all other groups. However, this modification in brain metabolism did not correlate with any improvement on the memory performance. It is important to consider the evidence suggesting that prior to the appearance of cognitive deficits, there are subtle neurochemical and morphological alterations that could not be detected. Alternatively, alterations in the cognitive status may require more prolonged HP diet exposition. Thus, our findings did not rule out a possible harmful effect of the HP diet on cognitive function as already observed by others (McNay et al., 2010; Molteni et al., 2002; Stranahan et al., 2008).

There is a clear association between the accumulation of fat and the development of insulin resistance (Saltiel and Kahn, 2001) with the subsequent activation of the pro-inflammatory response through IL-1 β and TNF- α release (Greenfield and Campbell, 2006; Yan et al., 2012). In this study, the exercise reduced the accumulation of fat in the mesenteric and epididymal tissues caused by the HP diet, as well as improved the peripheral insulin sensitivity. However, neither the HP diet nor exercise caused significant changes in the levels of pro-inflammatory cytokines in the blood and brain homogenates, which

indicate no effects or response mediated by inflammatory cytokines. Overall, our data argue in favor of mechanisms involving lactate transfer from glia to neurons and in pyruvate oxidation in neurons activated by exercise and HP diet. Although, the expression of PDH, the rate-limiting step for pyruvate entry into the Krebs cycle, is similar in astrocytes and neurons, its activity is several times higher in neurons compared to astrocytes (Halim et al., 2010).

In summary, the levels of hippocampal MCT1 and MCT4 expression were increased by physical exercise and a HP diet, whereas the expression of PDH was only increased by exercise. These observations suggest that a metabolic reprogramming in response to specific environmental factors can take place in the brain, but it does not appear to provide a specific benefit for spatial memory.

Acknowledgments: This work was supported by Brazilian agencies and grants: CNPq (4011645/2012-6), CAPES, FAPERGS-PPSUS, INCT-Excitotoxicity and Neuroprotection. Brasil- Switzerland Program for Science and Technology -CNPq.

References

- Aubert A, Costalat R, Magistretti PJ, Pellerin L. 2005. Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45):16448-53.
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6):724-38.
- Chenal J, Pierre K, Pellerin L. 2008. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Eur J Neurosci* 27(1):53-65.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30(9):464-72.
- Dalsgaard MK, Quistorff B, Danielsen ER, Selmer C, Vogelsang T, Secher NH. 2004. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J Physiol* 554(Pt 2):571-8.
- Dietrich MO, Muller A, Bolos M, Carro E, Perry ML, Portela LV, Souza DO, Torres-Aleman I. 2007. Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *Neuromolecular Med* 9(4):324-30.
- Greenfield JR, Campbell LV. 2006. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? *Curr Diabetes Rev* 2(2):195-211.

- Halim ND, McFate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchkina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A. 2010. Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58(10):1168-76.
- Kaczmarczyk MM, Machaj AS, Chiu GS, Lawson MA, Gainey SJ, York JM, Meling DD, Martin SA, Kwakwa KA, Newman AF and others. 2013. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology* 38(9):1553-64.
- Kalinine E, Zimmer ER, Zenki KC, Kalinine I, Kazlauckas V, Haas CB, Hansel G, Zimmer AR, Souza DO, Muller AP and others. 2014. Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. *Horm Behav* 66(2):383-92.
- Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. 1997. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 42(5):776-82.
- Kilbride SM, Telford JE, Davey GP. 2008. Age-related changes in H₂O₂ production and bioenergetics in rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):783-8.
- Margineantu DH, Brown RM, Brown GK, Marcus AH, Capaldi RA. 2002. Heterogeneous distribution of pyruvate dehydrogenase in the matrix of mitochondria. *Mitochondrion* 1(4):327-38.
- McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. 2010. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 93(4):546-53.

- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. 2003. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 289(1):76-9.
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F. 2002. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112(4):803-14.
- Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV. 2011. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21(10):1082-92.
- Muller AP, Haas CB, Camacho-Pereira J, Brochier AW, Gnoatto J, Zimmer ER, de Souza DO, Galina A, Portela LV. 2013. Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. *Exp Neurol* 247:66-72.
- Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW. 2007. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res* 184(2):124-32.
- Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP, Pierre K. 2005. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 79(1-2):55-64.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 2003. How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J Physiol* 546(Pt 2):325.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83(2):346-56.

- Pierre K, Parent A, Jayet PY, Halestrap AP, Scherrer U, Pellerin L. 2007. Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice. *J Physiol* 583(Pt 2):469-86.
- Pierre K, Pellerin L, Debernardi R, Riederer BM, Magistretti PJ. 2000. Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100(3):617-27.
- Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, Feldman EL. 2002. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 16(13):1738-48.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865):799-806.
- Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. 2005. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes* 54(8):2314-9.
- Schelp AO, Burini RC. 1995. [Control of supply and use of energy substrates in the encephalon]. *Arq Neuropsiquiatr* 53(3-B):690-7.
- Sims NR, Blass JP. 1986. Expression of classical mitochondrial respiratory responses in homogenates of rat forebrain. *J Neurochem* 47(2):496-505.
- Smith D, Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA. 2003. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(6):658-64.
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal

synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18(11):1085-8.

Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144(5):810-23.

Votyakova TV, Reynolds IJ. 2001. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79(2):266-77.

Yan L, DeMars LC, Johnson LK. 2012. Long-term voluntary running improves diet-induced adiposity in young adult mice. *Nutr Res* 32(6):458-65.

Yoshida Y, Hatta H, Kato M, Enoki T, Kato H, Bonen A. 2004. Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. *J Appl Physiol* (1985) 97(2):527-34.

Figure legends:

Figure 1: Effects of diet and exercise on metabolic related parameters in hippocampus, and cognitive performance. a) Representative Western blot bands. The protocol comprises five-months HP diet along with last one-month physical exercise training. b) MCT1 protein expression levels (* CDS < other groups; & HPE > HPS, $p < 0.05$ $n = 6-8$). c) MCT 2 expression levels. d) MCT4 expression levels (* CDS < other groups; & HPE > HPS, $p < 0.05$ $n = 6-8$). e) Pyruvate dehydrogenase expression levels (CDE and HPE > CDS and HPS, $p < 0.05$ $n = 6-8$). f) Extracellular cerebral fluid levels of lactate during the Y-maze task (* HPE > other groups, $p < 0.05$ $n = 4$ per group). g) Cognitive performance on the Y-maze task $n = 12$. Results expressed as the mean \pm S.E.M. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Figure 2: Assessment of mitochondrial parameters on hippocampal homogenates. a) H_2O_2 production by the hippocampal homogenate challenged with succinate, succinate + ADP, and FCCP ($n = 6$). b). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) induced by succinate, succinate + ADP, and FCCP ($n = 6-8$). Results expressed as the mean \pm S.E.M. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Figure 1

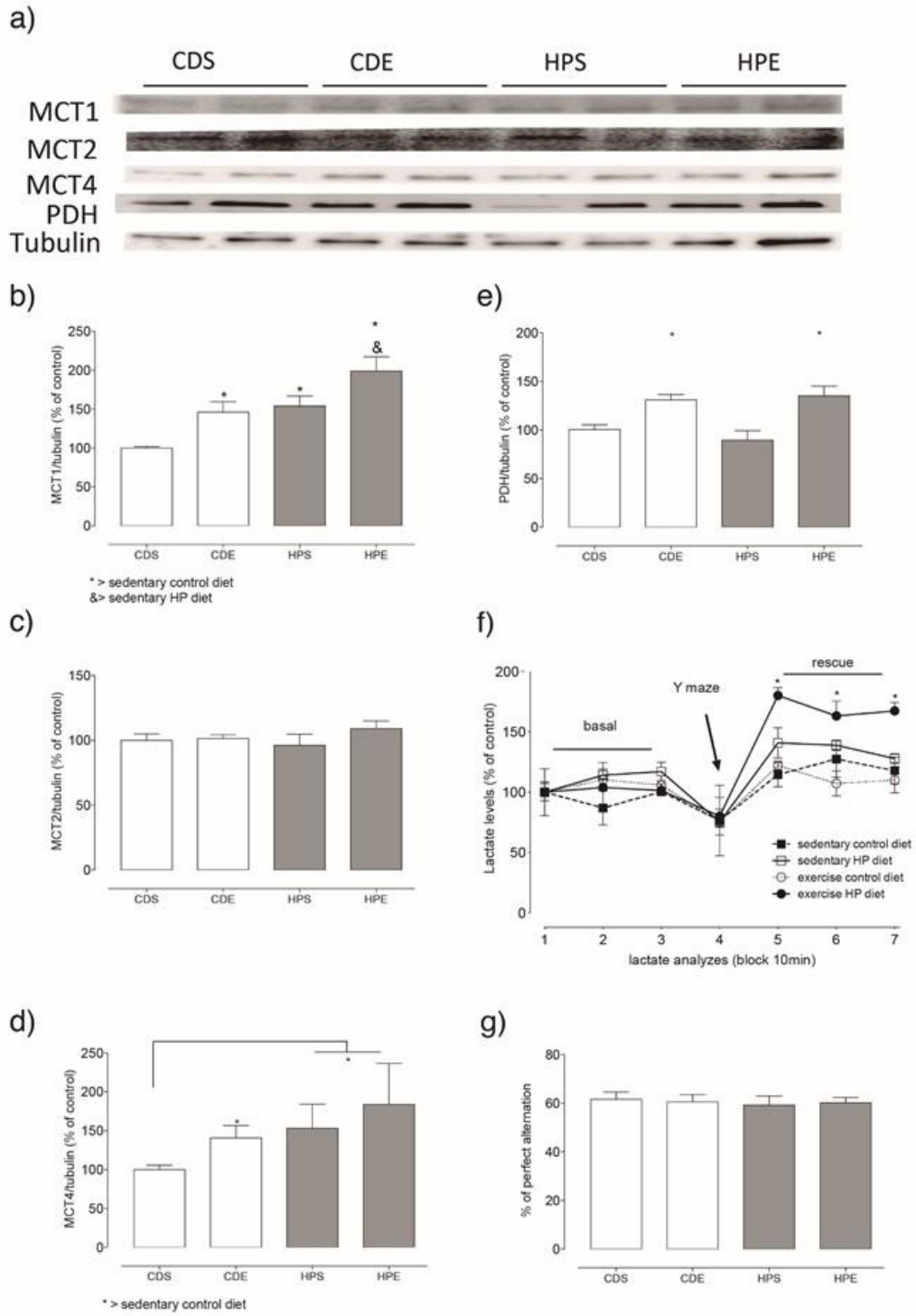


Figure 2

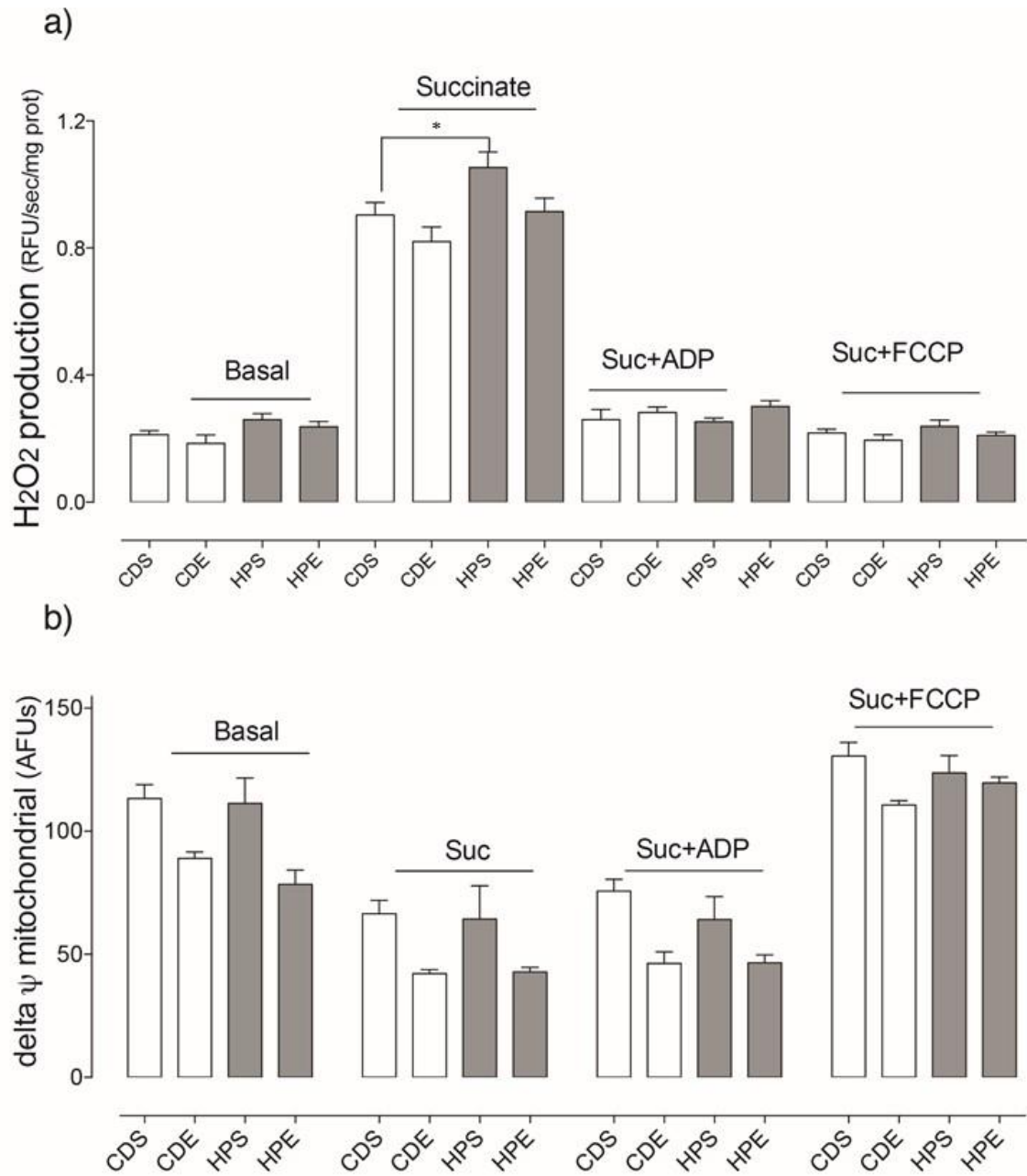


Table 1: Cytokines, body weight, fat pads and area under curve (AUC)

		CDS	CDE	HPS	HPE
IL-1β ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Serum	0.274 \pm 0.011	0.256 \pm 0.023	0.258 \pm 0.015	0.237 \pm 0.042
	Hippocampus	0.059 \pm 0.012	0.063 \pm 0.009	0.064 \pm 0.023	0.062 \pm 0.005
TNF-α ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Serum	0.162 \pm 0.020	0.150 \pm 0.020	0.163 \pm 0.021	0.127 \pm 0.022
	Hippocampus	0.039 \pm 0.007	0.043 \pm 0.004	0.042 \pm 0.016	0.039 \pm 0.003
Weight (g)		29.41 \pm 0.79	30.58 \pm 0.84	34.69 \pm 1.69*	32.47 \pm 1.24
Mesenteric fat pad (g)		0.18 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	1.14 \pm 0.20*	0.50 \pm 0.12
Epididymal fat pad (g)		1.17 \pm 0.06	0.78 \pm 0.07	3.37 \pm 0.54*	2.05 \pm 0.24
AUC		919 \pm 34	872 \pm 61	1059 \pm 31*	924 \pm 38

Values are shown as mean \pm SEM. * = p < 0.05

Parte III

1. Discussão dos resultados

Um hábito cada vez mais comum na sociedade atual, o consumo de dietas ricas em lipídios e carboidratos pode causar o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e diabetes. Essas doenças metabólicas periféricas também impactam no metabolismo cerebral e podem ser facilitadoras para o aparecimento de prejuízos cognitivos como déficits de memória. Por outro lado, intervenções simples no estilo de vida como a prática de atividade física podem trazer benefícios à saúde física e mental e, se contrapor aos efeitos indesejáveis da obesidade e de dietas não saudáveis. Entretanto, os efeitos do exercício físico e os de dietas não saudáveis no cérebro ainda carecem de mecanismos mais esclarecedores. Considerando isso, desvendar estes mecanismos neurobiológicos tem sido uma busca constante e fonte de investigação por diferentes grupos de pesquisa. Este trabalho colabora com este campo de investigação explorando um importante mecanismo de cooperação metabólica envolvendo neurônios e astrócitos.

Os resultados desse trabalho demonstraram que o consumo de uma dieta hiperpalatável aumentou o imunoconteúdo dos transportadores de monocarboxilatos 1 e 4 (MCT1 e 4) no hipocampo de camundongos (Figuras 1B e 1D). Como dito previamente, estes MCTs são predominantemente expressos nos astrócitos. Os animais submetidos ao protocolo de exercício físico também demonstraram aumento do imunoconteúdo de MCT1 e 4 no hipocampo e também, um aumento no imunoconteúdo da piruvato desidrogenase (PDH) (Figura 1E). Além disso, os animais que consumiram a dieta hiperpalatável e fizeram exercício físico, exibiram um aumento de lactato em líquido extracelular microdialisado de hipocampo, logo após serem

submetidos ao teste de memória, conforme demonstrado na figura 1F. Especula-se que este aumento poderia representar uma resposta metabólica astrocitária mais proeminente causada ao estímulo ambiental. Coincidentemente, o grupo HPE foi o que apresentou maior aumento de MCTs 1 e 4. No entanto, todos os grupos tiveram desempenho semelhante no teste y-maze (figura 1G).

O efeito de dietas não saudáveis e da obesidade na expressão dos MCTs tem ganhado atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Animais que consumiram uma dieta rica em gordura saturada apresentaram um aumento na expressão dos MCTs 1, 2 e 4 no hipocampo (Pierre et al., 2007), esse dado sugere que a expressão dos MCTs responde a variações no metabolismo periférico, entretanto, as consequências dessa resposta ainda não estão bem esclarecidas na literatura. Para avaliar uma possível consequência funcional no cérebro exposto à dieta HP, nós submetemos os animais ao teste comportamental de alternância espontânea no Y-maze, esse teste avalia memória de trabalho espacial dos animais, no qual é permitido ao animal a exploração livre dos três braços do aparato e a alternância espontânea é calculada (Wolf et al., 2016). Ele foi utilizado por ser o aparato experimentalmente compatível com a execução combinada da microdiálise. Não foi observada nenhuma diferença significativa no desempenho dos animais no teste, entretanto a possibilidade de que prejuízos na memória possam ser detectados pelo uso de testes comportamentais mais sensíveis ou específicos não deve ser descartada; também, é importante levar em conta que antes do aparecimento de déficits cognitivos, existem alterações morfológicas e neuroquímicas muito sutis que podem não se refletirem em alterações comportamentais. Além disso, alterações no estado cognitivo podem exigir uma

exposição mais prolongada à dieta HP. Assim, os nossos resultados não descartam um possível efeito nocivo da dieta HP na função cognitiva como já observado por outros (McNay et al., 2010; Molteni et al., 2002; Stranahan et al., 2008).

Após a realização do teste comportamental os animais do grupo HPE mostraram um aumento da concentração de lactato no espaço extracelular. Considerando que esses animais apresentaram também um aumento na expressão dos MCTs astrocitários, pode-se especular que o desafio a um novo ambiente tenha aumentado o metabolismo glicolítico dos astrócitos e conseqüentemente levando a maior liberação de lactato para o espaço extracelular. Este conceito, esta de acordo com a teoria do ANLS. Assim é possível que a neurotransmissão glutamatérgica desempenhe um papel importante na reprogramação metabólica em animais tratados com HPE.

Existem trabalhos na literatura que demonstram que o exercício físico é capaz de aumentar a expressão de MCT1 e 4 no músculo esquelético e no músculo cardíaco (Bonen, 2001; Scariot et al., 2016; Yoshida et al., 2004); o nosso trabalho busca avançar no entendimento das adaptações do organismo frente ao estímulo do exercício em nível cerebral, mais especificamente da região hipocampal. Os resultados demonstram que o exercício voluntário induziu um aumento na expressão dos MCTs gliais (1 e 4) mas não teve efeito no transportador neuronal MCT2. Desta maneira, podemos propor que a maquinaria metabólica hipocampal astrocitária é modulada pelo exercício físico. O perfil de expressão dos MCTs neuronais e gliais observado após o protocolo de exercício aplicado corrobora com o conceito de que o exercício físico é capaz de alterar o metabolismo neuroenergético (Cotman et al., 2007).

De fato, as propriedades cinéticas dos MCTs 1 e 4 favorecem a liberação de lactato no espaço extracelular para posterior captação pelo MCT2 neuronal e utilização pelas mitocôndrias.

O protocolo de exercício, mostrou ainda, um aumento na expressão da enzima PDH. O complexo da PDH é distribuído heterogeneamente na matriz mitocondrial e catalisa a oxidação irreversível do piruvato a acetil-CoA, essa reação é limitante da velocidade, sob condições aeróbicas para a remoção oxidativa do piruvato; o complexo da PDH, ainda, é altamente regulado (Stacpoole, 2012). O aumento da expressão dessa enzima sugere que o metabolismo oxidativo nas mitocôndrias pode estar aumentado, o que consequentemente influencia na geração de energia. Tendo isso em vista, pode-se considerar que a PDH é um alvo molecular aos processos induzidos pelo exercício tanto nos neurônios como astrócitos hipocâmpais.

Estudos demonstram que a obesidade e o diabetes, causados pelo consumo de dietas HP, alteram a função mitocondrial o que se reflete principalmente na redução da capacidade metabólica oxidativa, da produção de energia e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio devido ao aumento de vazamento de prótons e disfunção da membrana mitocondrial (Newsholme et al., 2012). Por sua vez o exercício físico aumenta a biogênese mitocondrial e aumenta a capacidade metabólica oxidativa (Dietrich et al., 2008). Os resultados desse trabalho demonstram que a dieta HP aumentou a produção de H_2O_2 mitocondrial estimulada pelo succinato em homogeneizados de hipocampo. No entanto, o exercício físico reduziu a produção de H_2O_2 ao nível do grupo controle (conforme demonstrado na figura 2A). Não houve efeitos significativos da dieta HP ou do exercício físico no potencial de

membrana mitocondrial basal e com a incubação com os substratos adicionados (figura 2B, página 46). Assim, uma dieta enriquecida em gordura saturada e açúcar contribui para o aumento de H₂O₂ no cérebro (Cheng et al., 2010).

Confirmando os efeitos benéficos do exercício físico no metabolismo periférico, foi demonstrado que houve uma diminuição nos níveis de gordura epididimal e visceral nos animais que consumiram a dieta HP e fizeram exercício. No teste de tolerância a glicose (TTG), os animais sedentários que consumiram dieta HP apresentaram um aumento da área sob a curva (AUC), que se refere a uma menor capacidade de manter a homeostasia da glicemia (ver tabela 1, página 47). No entanto, o exercício físico diminuiu a AUC no TTG indicando um aumento da sensibilidade à insulina e melhor capacidade de se adaptar a um excesso de glicose.

Há uma clara associação entre o acúmulo de gordura e o desenvolvimento de resistência à insulina (Saltiel and Kahn, 2001) com a subsequente ativação da resposta pró-inflamatória através de IL-1 β e liberação de TNF- α (Greenfield and Campbell, 2006; Yan et al., 2012). Neste estudo, o exercício físico apresentou os efeitos periféricos esperados, no entanto, nem a dieta HP e nem exercício físico causaram alterações significativas nos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos homogeneizados de cérebro e de sangue, o que indica que nenhum efeito ou resposta encontrados foram mediados por citocinas inflamatórias, neste modelo experimental.

No geral, dados apresentados argumentam a favor de mecanismos que envolvem a transferência de lactato dos astrócitos aos neurônios e na oxidação de piruvato em neurônios ativados por exercício e HP dieta. Embora,

a expressão da PDH, o passo limitante da velocidade para a entrada de piruvato no ciclo de Krebs, seja semelhante em astrócitos e neurónios, a sua atividade é várias vezes maior nos neurônios (Halim et al., 2010).

2. Conclusão

Em resumo, os níveis de expressão de MCT1 e MCT4 no hipocampo foram aumentadas pela dieta HP e pelo exercício físico, ao passo que a expressão de PDH foi aumentada apenas pelo exercício. Essas observações sugerem que uma reprogramação metabólica em resposta a fatores ambientais específicos pode ocorrer no cérebro.

3. Perspectivas

3.1. Avaliar o efeito da dieta e do exercício em outras enzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial;

3.2. Avaliar a expressão de mRNA dos MCT's;

3.3. Investigar o efeito prolongado da dieta HP em testes de memória espacial e de reconhecimento e no perfil de liberação de lactato;

3.4. Investigar os níveis de glutamato e a atividade de proteínas astrocitárias envolvidas no metabolismo do glutamato.

3.5. Avaliar os efeitos de fármacos sensibilizadores de Insulina (Metformina) em animais submetidos à dieta hiperpalatável no metabolismo energético cerebral;

4. Referências

- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 31–48.
- Baker, L.D., Frank, L.L., Foster-Schubert, K., Green, P.S., Wilkinson, C.W., McTiernan, A., Plymate, S.R., Fishel, M.A., Stennis Watson, G., Cholerton, B.A., et al. (2010). Effects of Aerobic Exercise on Mild Cognitive Impairment. *Arch. Neurol.* 67, 71–79.
- Barnes, L.A., Opitz, J.M., and Gilbert-Barnes, E. (2007). Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 3016–3034.
- Barzilaym, J.I., and Freedland, E.S. (2003). Inflammation and its relationship to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and endothelial dysfunction. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 1, 55–67.
- Battú, C.E., Rieger, D., Loureiro, S., Furtado, G.V., Bock, H., Saraiva-Pereira, M.-L., Pessoa-Pureur, R., Gonçalves, C.-A., and Perry, M.-L.S. (2012). Alterations of PI3K and Akt signaling pathways in the hippocampus and hypothalamus of Wistar rats treated with highly palatable food. *Nutr. Neurosci.* 15, 10–17.
- Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405–412.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738.
- Bonen, A. (2001). The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86, 6–11.
- Bray, G.A., Frühbeck, G., Ryan, D.H., and Wilding, J.P.H. (2016). Management of obesity. *Lancet Lond. Engl.*
- Chen, W.-W., Zhang, X., and Huang, W.-J. (2016). Role of physical exercise in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* 4, 403–407.
- Chenal, J., Pierre, K., and Pellerin, L. (2008). Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Eur. J. Neurosci.* 27, 53–65.
- Cheng, Z., Tseng, Y., and White, M.F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 589–598.
- Correia, S.C., Santos, R.X., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P.I., and Smith, M.A. (2011). Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing Res. Rev.* 10, 264–273.

- Cotman, C.W., and Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., and Christie, L.-A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
- de Macedo, I.C., de Freitas, J.S., and da Silva Torres, I.L. (2016). The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2016, 7238679.
- Dietrich, M.O., Andrews, Z.B., and Horvath, T.L. (2008). Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10766–10771.
- Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2006). Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823–833.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145.
- Floyd, R.A., and Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 23, 795–807.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., and Ahmadiani, A. (2013). Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.* 47, 145–171.
- Gispén, W.H., and Biessels, G.-J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.
- Greenfield, J.R., and Campbell, L.V. (2006). Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: “cause or effect”? *Curr. Diabetes Rev.* 2, 195–211.
- Halim, N.D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchkina, L.G., Patel, M.S., Jeoung, N.H., Harris, R.A., Schell, M.J., and Verma, A. (2010). Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58, 1168–1176.
- Hall, K.D., Heymsfield, S.B., Kemnitz, J.W., Klein, S., Schoeller, D.A., and Speakman, J.R. (2012). Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 95, 989–994.
- Jeoung, N.H., and Harris, R.A. (2008). Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E46-54.

Jha, M.K., Jeon, S., and Suk, K. (2012). Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 393–403.

Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* 42, 776–782.

Keith, S.W., Redden, D.T., Katzmarzyk, P.T., Boggiano, M.M., Hanlon, E.C., Benca, R.M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J.L., Fontaine, K.R., et al. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: Exploring the roads less traveled. *Int. J. Obes.* 30, 1585–1594.

Lannert, H., and Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112, 1199–1208.

Lee, K.M., and MacLean, A.G. (2015). New advances on glial activation in health and disease. *World J. Virol.* 4, 42–55.

Marosi, K., and Mattson, M.P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 89–98.

McNay, E.C., Ong, C.T., McCrimmon, R.J., Cresswell, J., Bogan, J.S., and Sherwin, R.S. (2010). Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 546–553.

Michael M. Cox, and David L. Nelson (2011). *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (Artmed).

Molteni, R., Barnard, R.J., Ying, Z., Roberts, C.K., and Gómez-Pinilla, F. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 112, 803–814.

Muller, A.P., Cammarota, M., Dietrich, M. de O., Rotta, L.N., Portela, L.V., Souza, D.O., Izquierdo, I., Bevilaqua, L.R.M., and Perry, M.L.S. (2008). Different effect of high fat diet and physical exercise in the hippocampal signaling. *Neurochem. Res.* 33, 880–885.

Muller, A.P., Gnoatto, J., Moreira, J.D., Zimmer, E.R., Haas, C.B., Lulhier, F., Perry, M.L.S., Souza, D.O., Torres-Aleman, I., and Portela, L.V. (2011). Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21, 1082–1092.

Muller, A.P., Zimmer, E.R., Kalinine, E., Haas, C.B., Oses, J.P., Martimbianco de Assis, A., Galina, A., Souza, D.O., and Portela, L.V. (2012). Physical exercise exacerbates memory deficits induced by intracerebroventricular STZ

but improves insulin regulation of H₂O₂ production in mice synaptosomes. *J. Alzheimers Dis. JAD* 30, 889–898.

Muller, A.P., Haas, C.B., Camacho-Pereira, J., Brochier, A.W., Gnoatto, J., Zimmer, E.R., de Souza, D.O., Galina, A., and Portela, L.V. (2013). Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. *Exp. Neurol.* 247, 66–72.

Nakagawa, T., Tsuchida, A., Itakura, Y., Nonomura, T., Ono, M., Hirota, F., Inoue, T., Nakayama, C., Taiji, M., and Noguchi, H. (2000). Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes* 49, 436–444.

Newsholme, P., Gaudel, C., and Krause, M. (2012). Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 235–247.

Nicholls, D.G., and Budd, S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80, 315–360.

Onyango, I.G., Dennis, J., and Khan, S.M. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies. *Aging Dis.* 7, 201–214.

Paillard, T., Rolland, Y., and de Souto Barreto, P. (2015). Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. *J. Clin. Neurol. Seoul Korea* 11, 212–219.

Park, C.R. (2001). Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 311–323.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2003). Food for thought: challenging the dogmas. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1282–1286.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166.

Penedo, F.J., and Dahn, J.R. (2005). Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. *Curr. Opin. Psychiatry* 18, 189–193.

Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* 94, 1–14.

Pierre, K., Parent, A., Jayet, P.-Y., Halestrap, A.P., Scherrer, U., and Pellerin, L. (2007). Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice. *J. Physiol.* 583, 469–486.

Robinet, C., and Pellerin, L. (2010). Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 286–298.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.

Sandu, O., Song, K., Cai, W., Zheng, F., Uribarri, J., and Vlassara, H. (2005). Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes* 54, 2314–2319.

Scariot, P.P.M., Manchado-Gobatto, F. de B., Torsoni, A.S., Dos Reis, I.G.M., Beck, W.R., and Gobatto, C.A. (2016). Continuous Aerobic Training in Individualized Intensity Avoids Spontaneous Physical Activity Decline and Improves MCT1 Expression in Oxidative Muscle of Swimming Rats. *Front. Physiol.* 7, 132.

Schelp, A.O., and Burini, R.C. (1995). [Control of supply and use of energy substrates in the encephalon]. *Arq. Neuropsiquiatr.* 53, 690–697.

Smith, D., Pernet, A., Hallett, W.A., Bingham, E., Marsden, P.K., and Amiel, S.A. (2003). Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 658–664.

Spielman, L.J., Little, J.P., and Klegeris, A. (2016). Physical activity and exercise attenuate neuroinflammation in neurological diseases. *Brain Res. Bull.* 125, 19–29.

Stacpoole, P.W. (2012). The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell* 11, 371–377.

Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D., and Davis, J.M. (2011). Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 111, 1066–1071.

Stranahan, A.M., Norman, E.D., Lee, K., Cutler, R.G., Telljohann, R., Egan, J.M., and Mattson, M.P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18, 1085–1088.

Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823.

Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., et al. (2012a). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338.

Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., et al. (2012b). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* *122*, 1316–1338.

van Praag, H., Fleshner, M., Schwartz, M.W., and Mattson, M.P. (2014). Exercise, Energy Intake, Glucose Homeostasis, and the Brain. *J. Neurosci.* *34*, 15139–15149.

Wolf, A., Bauer, B., Abner, E.L., Ashkenazy-Frolinger, T., and Hartz, A.M.S. (2016). A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PloS One* *11*, e0147733.

Yan, L., DeMars, L.C., and Johnson, L.K. (2012). Long-term voluntary running improves diet-induced adiposity in young adult mice. *Nutr. Res. N. Y. N* *32*, 458–465.

Yang, J.-L., Lin, Y.-T., Chuang, P.-C., Bohr, V.A., and Mattson, M.P. (2014). BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Neuromolecular Med.* *16*, 161–174.

Yin, F., Sancheti, H., Patil, I., and Cadenas, E. (2016). Energy Metabolism and Inflammation in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.*

Yoshida, Y., Hatta, H., Kato, M., Enoki, T., Kato, H., and Bonen, A. (2004). Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *97*, 527–534.

Zhou, Y., and Danbolt, N.C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm. Vienna Austria* *1996* *121*, 799–817.

Zielke, H.R., Zielke, C.L., and Baab, P.J. (2009). Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *J. Neurochem.* *109 Suppl 1*, 24–29.

(1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* *20*, 1183–1197.