UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE DE RIBEIRÃO PRETO

MACARIO AROSTI REBELO

Efeito do treinamento aeróbio contínuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose

RIBEIRÃO PRETO

2021

MACARIO AROSTI REBELO

Efeito do treinamento aeróbio continuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose

Versão Original

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-graduação em Educação Física e Esporte.

Área de Concentração: Atividade Física e Esporte

Orientadora: Profa. Dra. Camila de Moraes

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Rebelo, Macario Arosti
Efeito do treinamento aeróbio continuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose. Macario Arosti Rebelo. -Ribeirão Preto,2021.
44p.

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Educação Física e Esporte.
Orientador: Prof. Dra. Camila de Moraes

1. Exercício Físico. 2. Memória. 3. Frutose. I. Efeito do treinamento aeróbio continuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose

REBELO, M. A. **Efeito do treinamento aeróbio contínuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose.** 2021, 45f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr, _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr, _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr, _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTO

À FAPESP pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa (#2017/27042).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 07
2 REVISÃO DA LITERATURA 09
2.1 Influência dos hábitos alimentares sobre as condições de saúde 09
2.2 Efeitos deletérios do consumo de frutose sobre a memória 11
2.3 Exercício físico como intervenção para o aprimoramento da memória 12
3 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA 16
3.1 Objetivo geral 16
3.2 Objetivos específicos 16
4 MATERIAIS E MÉTODOS 17
4.1 Animais e condições de manutenção 17
4.2 Protocolo experimental 17
4.3 Adaptação ao exercício físico e teste incremental máximo 18
4.4 Protocolo de exercício físico e determinação do domínio de intensidade do esforço ... 19
4.5 Avaliação da memória espacial e aprendizagem 21
4.6 Teste de tolerância à insulina e teste de tolerância à glicose 23
4.7 Eutanásia e obtenção de sangue e tecidos 23
4.8 Avaliação das vias de sinalização do hipocampo 24
4.8.1 Quantificação dos fatores neurotróficos no hipocampo por western blot 24
4.8.2 Quantificação dos fatores de angiogênese e de inflamação no hipocampo por imunohistoquimica 25
4.9 Análise estatística 25
5 RESULTADOS 26
6. DISCUSSÃO 35
7. CONCLUSÃO 39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

RESUMO

REBELO, M. A. **Efeito do treinamento aeróbio contínuo ou intervalado sobre a função cognitiva em ratos adultos alimentados com frutose**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Na última década estudos tem mostrado que os maus hábitos alimentares podem influenciar negativamente a memória. Por outro lado, os efeitos benéficos do exercício físico sobre a memória também têm sido demonstrados, mas grande parte dos estudos utilizou programas de exercício aeróbio realizado com método contínuo de treinamento físico, sendo escassos até o momento estudos que investigaram o efeito do exercício com método intervalado de treinamento sobre a função cognitiva. Esta comparação é relevante uma vez que a busca por métodos de treinamento mais eficientes é questão em voga na área de Ciências do Esporte. Assim, o objetivo do estudo foi investigar a influência dos diferentes métodos de treinamento físico, contínuo ou intervalado, sobre a memória espacial e aprendizado de animais alimentados com solução de frutose. Além disso, foi investigado se a mudança dietética teria efeito aditivo ao treinamento físico. Para isso, ratos Sprague Dawley machos (70 dias de vida) receberam solução de frutose a 15% por seis semanas. Após a sexta semana, metade dos animais passou a receber água (SDF-A) e a realizar treinamento físico contínuo (TRF-AC) ou intervalado (TRF-AI) e os demais permaneceram com solução de frutose (SDF-F) e a realizar treinamento físico contínuo (TRF-FC) ou intervalado (TRF-FI). Ambos os protocolos de treinamento consistiram de três sessões semanais, com duração de 40 minutos para treino contínuo (60% Vmax) e 18 minutos para treino intervalado (3 x 2 minutos a 70% Vmax por 4 minutos a 35% Vmax). A memória espacial e a aprendizagem foram avaliadas utilizando o labirinto de Barnes, a expressão de BNDF, GFAP e de NeuN no hipocampo foi determinada por western blot e a técnica de imunohistoquimica foi utilizada para marcação de NFkB e de aSMA na região CA3 do hipocampo. Os resultados mostraram que, aparentemente, o treinamento físico intervalado empregado neste estudo foi mais eficiente do que o contínuo, uma vez que os animais do grupo TRF-FI apresentaram tempo de latência primária 59% menor do que os do grupo SDF-F e para o grupo TRF-FC o tempo de latência foi, apenas, 15% menor do que o observado para o grupo SDF-F. Não foi confirmado um efeito aditivo da mudança dietética associada ao exercício físico. Os animais do grupo TRF-FI apresentaram maior expressão de BDNF e tendência à aumento da expressão de NeuN no hipocampo. Em conclusão, o protocolo de treinamento físico que utilizou o método intervalado mostrou-se mais eficiente do que o contínuo para o aprimoramento da memória, levando-se em consideração o tempo de latência no labirinto de Barnes, e que o desempenho em teste de memória está associado à sensibilidade periférica à insulina e aos níveis de NFkB no hipocampo. Foi observado também que a mudança dietética não proporciona efeito aditivo ao treinamento físico nas respostas observadas.

Palavras-chave: Exercício Aeróbio, Treino Intervalado de Intensidade Moderada, Memoria Espacial, Frutose

ABSTRACT

REBELO, M. A. **Effect of continuous or interval aerobic training on cognitive function in fructose-fed rats**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

In the last decade studies have shown that unhealthy eating habits can negatively influence memory. On the other hand, the beneficial effects of physical exercise on memory have also been demonstrated. However, most of the studies employed aerobic exercise programs performed with a continuous method of physical training, with few studies investigating the effect of interval training on cognitive function. This comparison is relevant considering that the need for more efficient training method is a current issue in the area of Sports Science. Thus, the aim of the study was to investigate the influence of different exercise training methods, continuous or interval, on spatial memory and learning in animals fed fructose solution. Furthermore, it was investigated whether the dietary change would have an additive effect to the physical training. Male Sprague Dawley rats (70 days old) were fed 15% fructose solution for six weeks. After the sixth week, half of the animals were given water (SDF-A) and either continuous (TRF-AC) or interval (TRF-AI) exercise training, and the rest remained on fructose solution (SDF-F) and either continuous (TRF-FC) or interval (TRF-FI) exercise training. Both training protocols consisted of three weekly sessions, lasting 40 minutes for continuous training (60% Vmax) and 18 minutes for interval training (3 x 2 minutes at 70% Vmax for 4 minutes at 35% Vmax). Spatial memory and learning were assessed using the Barnes maze, the expression of BNDF, GFAP and NeuN in the hippocampus was determined by western blot and immunohistochemistry technique was used for staining of NFkB and aSMA in the CA3 region of the hippocampus. It seemed that the interval training used in this study was more efficient than the continuous training, as the animals in the TRF-FI group had a primary latency time 59% shorter than the SDF-F group, and in the TRF-FC group the latency time was only 15% shorter than that observed in the SDF-F group. No additive effect of dietary change associated with exercise was confirmed. The animals in the TRF-FI group showed higher BDNF expression and a trend towards increased NeuN expression in the hippocampus. In conclusion, the interval training protocol was more efficient than continuous training to improve memory, regarding the latency time in the Barnes maze and that memory performance is associated with peripheral insulin sensitivity and NFkB levels in the hippocampus. It was also observed that dietary change does not provide an additive effect to physical training on the observed responses.

Keywords: Endurance Training, Moderate-Intensity Interval Training, Spatial Memory, Fructose

1 INTRODUÇÃO

O aumento exponencial do consumo de alimentos com alto teor de açúcares e gordura parece estar associado ao aumento da prevalência de agravos à saúde, com consequências físicas, econômicas e sociais. Entre estas complicações estão: depressão, ansiedade, hipertensão arterial e diabetes mellitus, sendo algumas destas fortemente relacionadas à deposição de gordura visceral e a resistência à insulina (BARNES; JOYNER, 2012; JACQUES et al., 2019; KIM et al., 2018).

Os mecanismos que explicariam a influência negativa da resistência à insulina, hipertensão e outros distúrbios causados pelo consumo exagerado de alimentos com alto teor de açucares e gordura sobre a função cognitiva têm sido investigados utilizando modelos em que o animal é exposto ao consumo de dietas ricas em açucares e/ ou gorduras em sua fase adulta. Ratos Sprague-Dawley adultos alimentados durante oito meses com solução de frutose a 10% tiveram maior ganho de peso e aumento da glicemia, resultados acompanhados de pior desempenho no teste de memória espacial quando comparados aos seus controles que ingeriram água. O s autores atribuíram este achado à redução da sinalização da insulina no hipocampo dos animais alimentados com solução de frutose (WU et al., 2015). Maior ganho de peso, dislipidemia, tolerância a glicose reduzida e baixa sensibilidade a insulina levaram a prejuízos em teste de memória espacial também foi observado por Cisternas et al. (2015) em camundongos C57BL/6 adultos alimentados com solução de frutose a 15% durante oito semanas. Estudos têm investigado o impacto da redução da perfusão cerebral sobre a função cognitiva. Resultados de estudos realizados com humanos mostram que há uma relação inversa entre fluxo sanguíneo cerebral e desempenho cognitivo em idosos com Alzheimer (LEEUWIS et al., 2017) e em indivíduos adultos de meia-idade hipertensos (GOTTESMAN et al., 2014).

Por outro lado, há algum tempo, tem sido mostrado o benefício de programas de exercício físico para a prevenção ou controle de doenças crônicas não transmissíveis como as do aparelho circulatório e doenças metabólicas (WARBURTON; BREDIN, 2017) que poderiam, em longo prazo, interferir negativamente na função cognitiva. O exercício aeróbio de intensidade moderada preveniu a disfunção endotelial em ratos alimentados com dieta altamente palatável rica em açúcar e gordura (OHAROMARI et al., 2015), além de prevenir o ganho de peso e o acúmulo de gordura visceral (GARCIA et al., 2016). Com relação aos efeitos do exercício físico sobre a função cognitiva, mais especificamente sobre a memória, alguns estudos, tem demonstrado resultados

importantes. Em ratas Wistar saudáveis, com oito semanas de vida, submetidas ao treinamento físico aeróbio (corrida continua em esteira, 5 vezes por semana) durante 4 semanas apresentaram melhora na memória de trabalho e memória espacial, quando comparadas aos seus pares sedentários, sendo este resultado atribuído ao aumento da densidade neuronal no hipocampo (WANG; WANG, 2016). Efeitos semelhantes também foram encontrados em animais alimentados com dieta padrão que receberam água ou solução 10% frutose para beber. Os resultados mostram que seis semanas de treinamento físico aeróbio moderado (corrida continua em esteira, 3 vezes por semana) induziram melhora da memória de trabalho em ambos os grupos treinados, assim como aumento da sensibilidade a glicose e menor acumulo de gordura epididimal (REBELO et al, 2020).

Apesar de haver evidências científicas acerca dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a função cognitiva, grande parte dos estudos utilizou o método de treinamento aeróbio contínuo, principalmente os que investigaram os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce seus efeitos. Até o momento ainda são escassos estudos que investigaram o efeito do exercício aeróbio realizado com o método intervalado sobre a função cognitiva. Essa questão é particularmente importante quando se considera o potencial de translação dos resultados da pesquisa básica para a aplicação prática, uma vez que métodos de treinamento intervalado vêm sendo utilizados por se apresentarem altamente eficientes em termos do aprimoramento na aptidão cardiorrespiratória, por exemplo. Diante do panorama apresentado, o objetivo do presente estudo é avaliar a eficácia de dois diferentes métodos de treinamento físico, contínuo e intervalado, em sessões de exercício realizadas três vezes por semana, sobre a memória espacial e aprendizagem em animais adultos alimentados com solução de frutose a 15%.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Influência dos hábitos alimentares sobre as condições de saúde

O estilo de vida dos indivíduos tem mudado com o decorrer dos anos, com o aumento do consumo de alimentos elaborados com grande quantidade de açucares e de gorduras e redução da atividade física habitual. Este comportamento parece estar associado ao aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, com consequências físicas, econômicas e sociais (DINICOLANTONIO; O'KEEFE; LUCAN, 2015).

Os problemas de ordem fisiológica induzidas pelo consumo de dietas inadequadas são bastante investigados e as evidências são baseadas em estudos populacionais. Zobel et al. (2016) apresentam um panorama global mostrando os danos a saúde relacionados ao consumo de dietas baseadas em alimentos industrializados ultra processados ricos em açúcar, gordura e sal, sendo este padrão alimentar o responsável pela maior incidência de obesidade, hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus.

Um interessante estudo comparou o hábito de compra da população norueguesa entre 2005 e 2013, utilizando os códigos de barras dos produtos, e os resultados mostraram o aumento no consumo de alimentos ultra processados, representando cerca de 60% dos alimentos consumidos pela população. Estes achados ocorreram em paralelo ao aumento de sobrepeso e obesidade na população daquele país. Achados semelhantes foram reportados em estudos na América Latina, mais especificamente no Chile, onde uma amostra com uma representatividade nacional de 10.096 famílias foram acompanhadas durante os anos de 2006-2007 para que se pudesse catalogar suas dietas para verificação do consumo de alimentos minimamente processados, alimentos para uso culinário processados e alimentos prontos para o consumo (ultra processados). Os resultados apontaram que a amostra estudada apresentava má qualidade alimentar, apontando-a como um comportamento de risco para o desenvolvimento de doenças (CROVETTO M et al., 2014). No Brasil, um levantamento realizado entre os anos de 1987 e 2003 mostrou que houve aumento progressivo do consumo de alimentos ultra processados ao longo dos anos. Os autores do estudo sugerem que as mudanças nos hábitos alimentares poderiam levar não apenas à danos a saúde, como aumento da prevalência de diabetes, hipertensão e sobrepeso, mas também à consequências sociais, econômicas e ambientais (MONTEIRO et al., 2011). Esse comportamento se manteve

constante ao longo dos anos, como apontado em estudos subsequentes. O aumento da ingestão energética como um dos principais problemas já que a troca de alimentos preparados em casa por alimentos ultraprocessados ricos em gorduras, sódio e açúcares estão altamente associados ao acometimento por doenças crônicas (CLARO et al., 2015). O consumo excessivo de refrigerantes e sucos artificiais pela população brasileira, excedendo em mais de 50% o limite máximo recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) foi observado em estudo realizado durante o ano de 2013(CLARO et al., 2015; LOUZADA et al., 2015). Nesse contexto podemos considerar a má alimentação como um dos principais fatores para o aumento do número de pessoas que desenvolvem doenças crônicas não transmissíveis.

Alterações psicológicas também estão sendo relacionadas ao consumo de alimentos inadequados, com alto teor de gordura ou rica em frutose, que parecem favorecer o desenvolvimento de sintomas de depressão e ansiedade, sentimentos como tristeza, irritabilidade, prejudicando assim os relacionamentos sociais e familiares (GANCHEVA; GALUNSKA; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, 2017). Além disso, há estudos que buscaram compreender a relação dos maus hábitos alimentares, assim como das doenças crônicas decorrentes dos mesmos, e o desenvolvimento de problemas cognitivos. Pacientes de meia idade realizaram testes para avaliação da memória, aprendizagem e comunicação previamente à cirurgia bariátrica e os resultados mostraram forte correlação negativa entre o grau de obesidade e o desempenho nos testes (ROCHETTE et al., 2013). Um estudo realizado na Espanha com 1949 idosos com média de idade de 74 anos, investigou a relação entre comorbidades e o desempenho em testes de memória, atenção e fluência verbal e ficou demonstrado que os menores escores em todos os testes realizados eram dos indivíduos com obesidade, diabetes, hipertensão ou dislipidemia (BENITO-LEÓN et al., 2013).

O consumo de dieta com alto teor de açúcar, mais especificamente a frutose, causa estresse oxidativo, diminuição da tolerância à glicose, resistência à insulina, hipertensão, além disso, tem demonstrado ser prejudicial na sinalização dos hormônios do apetite (LINDQVIST; BAELEMANS; ERLANSON-ALBERTSSON, 2008). As alterações vasculares induzidas pelo consumo excessivo de frutose tem mostrado alta correlação com a incidência de danos cognitivos (EGGERMONT et al., 2012). Estudo propõe que parâmetros vasculares periféricos poderiam ser utilizados como possíveis biomarcadores para detecção de riscos cognitivos oriundos de desordens vasculares (OLVER et al., 2016).

Essas alterações estão ligadas ao tipo de metabolismo da frutose que, diferente do metabolismo da glicose, é independente da insulina para sua captação nos tecidos, assim é rapidamente absorvida pelo fígado, causando aumento exacerbado produção de triglicerídeos, podendo levar a aumento do acumulo de gordura visceral, dislipidemia e resistência à insulina (SCHAEFER; GLEASON; DANSINGER, 2009).

2.2 Efeitos deletérios do consumo de frutose sobre a memória

Estudos em animais são realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos no dano cognitivo induzido pela ingestão inadequada de açúcar. Assim, os estudos têm utilizado a estratégia de adicionar açúcares na água de beber, ao invés de adicioná-los na constituição da ração oferecida aos animais. Os açúcares ingeridos em soluções líquidas induzem danos de maior amplitude quando comparado ao dano observado após a ingesta de açúcares na dieta sólida. Foi observado também que estes danos ocorrem independentemente do ganho de peso, e que estariam associados ao aumento da inflamação no hipocampo, que ocorre em até duas semanas, com marcado aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Fator de necrose tumoral-alfa) e IL-1β (Interleucina 1 Beta) (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2016).

Neste contexto, foi observado pior desempenho no teste de memória espacial em ratos Sprague-Dawley adultos alimentados durante oito meses com solução de frutose a 10% quando comparados aos seus controles que ingeriram água. Além do maior ganho de peso e do aumento na glicemia, os animais apresentavam problemas na sinalização da insulina no hipocampo (WU et al., 2015).

Buscando investigar se o dano cognitivo estaria relacionado essencialmente ao ganho de peso, grupos de camundongos C57BL/6J foram alimentados com dois tipos de dietas diferentes: uma dieta hiperlipídica (42% de gordura) e outra com alto teor de carboidrato (70% de carboidrato, sendo 66% de sacarose). Após cinco semanas foi observado ganho exponencial de peso no grupo alimentado com dieta hiperlipídica, o que não ocorreu com o grupo sacarose. Entretanto, ambos os grupos apresentaram prejuízo na memória espacial avaliada pelo teste de reconhecimento de objeto, menor flexibilidade cognitiva e memória de longo prazo, avaliadas pelo teste do labirinto aquático de Morris (MAGNUSSON et al., 2015). Outro estudo com ratos mostrou que a ingestão de dieta com 39% da energia proveniente de lipídios desde o desmame até o 5º mês de vida induziu

à alterações metabólicas, com o aumento da concentração plasmática de leptina e do colesterol total, e déficit na memória espacial e na aprendizagem (LÉPINAY et al., 2015).

Marwitz; Woodie; Blythe (2015) observaram, em ratos Sprague Dawley jovens (com aproximadamente 120g) alimentados com ração modificada (41,7% das calorias eram provenientes de banha e dextrose) forte relação entre ansiedade, o ganho de peso e os níveis de insulina, sugerindo que as alterações comportamentais observadas poderiam estar relacionadas ao comprometimento da barreira hematoencefálica induzida por dieta e inflamação do hipocampo. O aumento da ingestão de gorduras e de açucares poderia desencadear inflamação e problemas na sinalização da insulina no hipocampo, assim como hipertensão e acidente vascular cerebral (LAKHAN e KIRCHGESSNER, 2013).

Lowette et al. (2015), em revisão da literatura, mostraram que a ingestão de frutose está relacionada a redução da fosforilação dos receptores de insulina, comprometendo a sinalização desse hormônio em áreas cerebrais. Esta condição levaria à perda na memória espacial e aprendizado de ratos e, ainda, poderia resultar em perda neuronal.

Tais alterações parecem estar associadas ao aumento da ativação de NFkB (Receptor quinase B de Tropomiosina) e receptores tipo Toll-like e aumento de citocinas pro inflamatórias na região do hipocampo (SHAO et al., 2016). Diante deste quadro há indícios de que a inflamação estaria modificando o perfil oxidativo, diminuindo os níveis de antioxidantes e de marcadores de crescimento de neurônios como o BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) na região do hipocampo resultando em déficit cognitivo (HUSSAIN; JAIN; SAMAIYA, 2019).

2.3 Exercício físico como intervenção para o aprimoramento da memória

Em contraposição aos efeitos deletérios dos maus hábitos alimentares sobre a memória, alguns estudos em humanos e em modelo animal têm mostrado que a realização de exercício físico induz à efeitos benéficos sobre a memória e outras funções cognitivas.

Interessante salientar que há estudos que investigaram o efeito de apenas uma sessão de exercício sobre as funções cognitivas e observaram melhora no desempenho dos participantes nos testes realizados após o esforço. Tsai et al. (2014) avaliaram o desempenho em tarefa de atenção visuoespacial e memória espacial antes e após uma sessão de exercício aeróbio de intensidade moderada (30 minutos a 60% do VO_2 máximo) e observaram que após a sessão de exercício os participantes apresentaram menor tempo de resposta em teste de atenção visuoespacial e melhor desempenho em teste de memoria

espacial. Ainda, foi observado maior concentração sérica de BDNF após o exercício, mas, os autores não atribuíram a melhora no desempenho cognitivo à essa resposta. Uma única sessão de exercício físico intervalado de alta intensidade em cicloergômetro, que consistiu de 3 blocos de 2 minutos em alta intensidade (com faixa entre 200 a 315 watts, variando entre os indivíduos) com intervalos de 2 minutos em intensidade baixa (50W), também induziu aprimoramento da memória espacial e do tempo de reação, avaliadas por tarefa de rastreamento visuomotor, em adultos jovens com idade entre 18 e 30 anos (SKRIVER et al., 2014).

A comparação dos efeitos de diferentes intensidades de exercício foi realizada por Marin Bosch et al. (2020). Neste estudo, adultos (entre 18 a 35 anos) foram submetidos à duas condições experimentais: uma sessão de exercício físico de intensidade moderada (30 minutos a 60% do VO_2 máximo) e uma sessão de exercício físico de intensidade alta (30 minutos a 75% do VO_2 máximo) e os resultados mostraram aprimoramento da velocidade de reação e aumento da atividade neural na região do hipocampo, o que estaria refletindo o aumento da velocidade de comunicação entre os neurônios.

Mais uma vez os estudos em modelo animal foram conduzidos na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no aprimoramento da função cognitiva observada em humanos. Cassilhas et al. (2012) verificaram, em ratos Wistar adultos, que o exercício físico aeróbio (corrida em esteira a 20 m/min, velocidade do limiar anaeróbio, por 30 minutos, cinco vezes por semana) e o exercício de força (subida em escada com 100% do peso corporal por oito vezes por sessão, cinco vezes por semana) contribuíram para o aprimoramento dos processos relacionados à aprendizagem e a memória espacial. Os mecanismos propostos seriam diferentes para cada tipo de exercício, sendo que o exercício aeróbio induziria o aumento da expressão de BDNF, de TrkB (Receptor quinase B de Tropomiosina) e do complexo CaMKII (Cálcio-calmodulina dependente de proteína quinase II) e o treinamento de força atuaria aumentando por via do IGF-1 (Fator de Crescimento semelhante à Insulina-1), os IGF-1R (Receptor do Fator de crescimento semelhante à Insulina-1) e a AKT (Proteína Quinase B).

Vilela et al. (2016) mostraram que ratos Wistar idosos submetidos à programa de oito semanas de exercício aeróbio (realizado de três a quatro vezes por semana na esteira, com 50 minutos por sessão) ou exercício de força (três a quatro sessões de treino por semana, onde tinham que realizar subida de uma escada de 1 metro de altura com aumento progressivo do peso atado a cauda que variou entre 50% a 100% do peso corporal do animal) apresentaram aumento da expressão do fator neurotrófico BDNF e melhor

desempenho em testes cognitivos de memória espacial e aprendizado. Assim como a realização de estímulos diferentes, a prática de exercício físico realizada de forma voluntária (roda de corrida) ou forçada (corrida em esteira ou natação) também levou ao aprimoramento da memória em camundongos fêmeas C57BL/6. Este resultado foi observado em conjunto com a proliferação de células neurais no giro dentado do hipocampo após a prática de exercício de natação ou corrida e ao estimulo de enriquecimento ambiental Van Praag; Kempermann; Gage, (1999). Resultados interessantes também foram observados em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em gordura, desde o desmame, que após a realização de treinamento físico (corrida em esteira a 14 m/ min por 40 minutos, 4 vezes por semana) apresentaram melhor desempenho no teste de memória espacial e aprendizado (utilizando o laribirinto aquatico de Morris) e maior expressão de fatores neurotróficos como o BDNF e o NGF (Nerve Growth Factor) (WOO et al., 2013).

Doenças crônicas não transmissíveis, sejam cardiovasculares ou metabólicas, estão altamente relacionadas à danos cognitivos (DONG et al., 2018), utilizando animais Wistar submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas para mimetizar a demência induzida por dano vascular, verificaram que os animais melhoraram seu desempenho em teste de memória de reconhecimento após duas semanas de exercício, sendo ele voluntário (roda de corrida com média de 360 ciclos diários) ou involuntário (corrida em roda com a velocidade de 12 ciclos por minuto em sessões de 30 minutos). O aprimoramento da memória foi relacionado ao aumento da plasticidade sináptica hipocampal, sinalizada pelo com aumento da expressão de marcadores de plasticidade sináptica como o SYN (plasticidade estrutural sináptica), PSD-95, MAP-2 e Tau, proteínas responsáveis pela comunicação neuronal.

De Senna et al. (2015) verificaram, em ratos Wistar com diabetes tipo 1 induzida por injeção de estreptozotocina, melhora da memória de reconhecimento (avaliada em teste de reconhecimento de novo objeto) após a realização de cinco semanas de corrida em esteira (60 minutos em intensidade entre 50-60 % da velocidade máxima, 5 vezes na semana). Os autores atribuíram este achado à prevenção da integridade da barreira hematoencefálica em animais diabéticos que realizaram exercício físico.

Recente estudo mostrou que o pré condicionamento físico poderia proteger o indivíduo de danos cognitivos, como perda de memória, deficits na velocidade de processamento e desatenção, induzidos por estresse pós-traumático (transtorno psicológico gerado por eventos como guerra, abusos ou acidentes de trânsito, por

exemplo). Utilizando ratos Wistar fêmeas, que foram submetidas à treinamento físico utilizando corrida em esteira com intensidade moderada (velocidade de 13 m/min equivalente à 50-60% do VO_2 máximo) ou alta intensidade (treino intervalado com esforços de 4 minutos à 22 m/min equivalente à 80-90% VO_2 máximo seguidos de 3 minutos a 13 m/min equivalente à 50-60% VO_2 máximo), foi observado que os animais treinados tinham melhor desempenho em teste de memória de reconhecimento antes e após as duas exposições ao nado forçado e a uma sessão de perda de consciência por anestesia (modelo utilizado para mimetizar o estresse pós traumático), com resultados ainda melhores no grupo que realizou o treinamento intervalado. Os autores atribuíram o efeito protetor do exercício às adaptações no balanço redox com aumento da atividade da SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase) e redução de espécies reativas de oxigênio. Ainda, observaram menor infiltração de neutrófilos no tecido cerebral (KOYUNCUOĞLU et al., 2021).

3 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Há evidências acerca dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a função cognitiva, em especial a memória. Entretanto, grande parte dos estudos realizados utilizou protocolos de exercício físico cujo método de treinamento foi o contínuo, ou seja, o indivíduo realiza o esforço na mesma intensidade durante todo o tempo. Há algum tempo tem sido investigado na área de Ciências do Esporte a adoção de protocolos de exercício físico utilizando o método intervalado de treinamento como estratégia para melhora dos parâmetros cardiovasculares e metabólicos. Os resultados são positivos e demonstram que o treino intervalado, em que há mudanças na intensidade do esforço durante a sessão, proporciona adaptações semelhantes ao treino realizado com método contínuo, porém com sessões de exercício de menor duração, sendo assim, tempo-eficiente. Até o momento são escassos os trabalhos que investigaram os efeitos deste método de treinamento sobre parâmetros cognitivos, e não encontramos trabalhos que tenham comparado as adaptações induzidas por treinamento físico realizado com o método contínuo ou com o método intervalado sobre a memória.

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência dos diferentes métodos de treinamento físico, contínuo ou intervalado, sobre a memória espacial e aprendizado de animais alimentados com solução de frutose. Além disso, foi investigado se a mudança dietética teria efeito aditivo ao treinamento físico.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o desempenho dos animais em teste de memória espacial e de aprendizagem;
b) Avaliar a sensibilidade periférica à insulina e a tolerância à glicose;
c) Determinar a expressão no hipocampo de fatores neurotróficos como BDNF, GFAP e NeuN;
d) Quantificar a marcação para fatores relacionados à neuroinflamação (NFkB) e angiogênese (aSMA) no hipocampo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e condições de manutenção

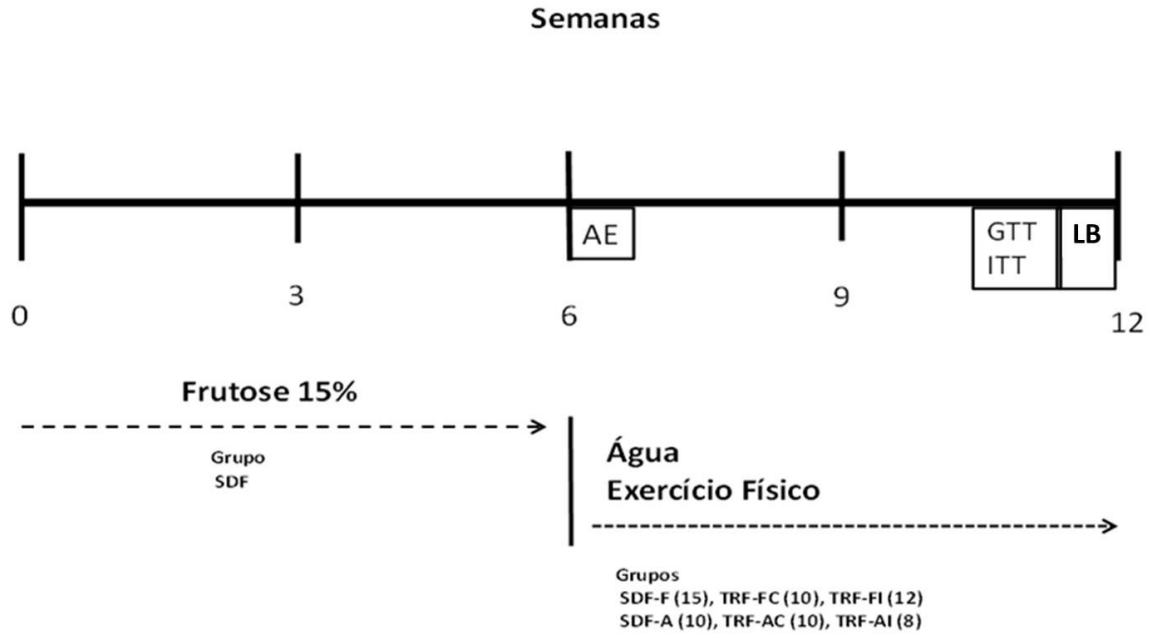
Ratos Sprague-Dawley, machos, com 70 dias de vida foram mantidos em caixas coletivas de 1.394 cm^2 (41 x 34 x16 cm), com quatro animais, em estante ventilada alocada em biotério convencional, ciclo claro/escuro de 12h controlado com timer, temperatura entre 22ºC e 24ºC controlado com ar condicionado, sem controle de umidade e cama de maravalha trocada três vezes por semana.

4.2 Protocolo experimental

Este projeto de pesquisa teve seus protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-EEFERP Nº2016.1.462.90.7).

O protocolo experimental teve duração de doze semanas e foram utilizados 65 ratos com 70 dias de vida, inicialmente todos os animais eram do grupo Sedentário Frutose (SDF), pois, tiveram acesso livre a solução de frutose à 15% e a ração padrão para roedores (marca NUVILAB) durante seis semanas. Após este período, parte dos animais tiveram a solução de frutose substituída por água e alguns deles foram submetidos ao treinamento físico, passando a constituir os grupos: Sedentário Frutose-Água (SDF-A), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI). O restante dos animais continuou com a ingesta de frutose e parte deles iniciou o protocolo de treinamento passando a constituir os grupos: Sedentário Frutose (SDF-F), Treinado Frutose-Continuo (TRF-FC) e Treinado Frutose-Intervalado (TRF-FI). O protocolo experimental é mostrado na figura 1.

Figura 1 - Protocolo experimental



Os animais foram alimentados com solução de frutose por seis semanas. Na 6ª semana foram realizadas duas intervenções: o oferecimento de água a parte dos animais e o início do treinamento físico. A adaptação ao exercício (AE) foi realizada entre a 6ª e a 7ª semana e, posteriormente, os animais iniciaram o treinamento físico com três sessões semanais em método continuo ou intervalado. O teste do Labirinto de Barnes (LB) para avaliação da memória espacial e aprendizagem foi realizado na 6ª e 12ª semana. Avaliações metabólicas como teste de tolerância à glicose (GTT) e o teste de tolerância à insulina (ITT) foram realizadas entre a 10ª e a 12ª semana.

4.3 Adaptação ao exercício físico e teste incremental máximo

Na primeira semana do protocolo experimental todos os animais foram submetidos a um período de adaptação em esteira. Detalhes na tabela 1.

Tabela 1 - Esquema de adaptação dos animais ao exercício em esteira durante a 6ª semana do experimento

	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Vel (m/ min)	5	5	10	10	teste
Tempo (min)	30	60	30	60	máximo

Vel: velocidade; m/min: metros por minutos; min: minutos

Após este período, somente os animais com padrão de corrida (animais que movimentavam as quatro patas e mantinham-se distantes do fundo da baia da esteira) realizaram um teste físico e os demais foram alocados nos grupos sedentários durante ou

ao final do período de adaptação. O teste incremental consistiu de corrida em esteira, com velocidade inicial de 11,6 m/min com incremento de 1,6 m/min a cada 2 minutos, até a velocidade de 20 m/min. A partir desta velocidade, o incremento foi de 3,2 m/min a cada dois minutos. A exaustão foi determinada quando o animal tocou o fundo da baia, por cinco vezes, no período de um minuto. Neste momento o animal foi retirado da esteira e a velocidade na qual ocorreu a exaustão foi considerada como a velocidade pico. A velocidade pico foi utilizada como parâmetro para a alocação dos animais nos grupos TRC e TRI utilizando o espelhamento, ou seja, os animais foram separados de modo a se garantir que o nível de aptidão dos animais para a corrida fosse semelhante entre os grupos.

A velocidade máxima foi determinada a partir da equação: $Vmax = W1 + (W2 \times tempo/120)$, sendo W1= velocidade do último estágio completado; W2 incremento do estágio em que ocorreu a exaustão; t=tempo no estágio em que ocorreu a exaustão em segundos e a constante 120 refere-se ao tempo de duração (em segundos) dos estágios do teste (KUIPERS et al., 1985).

A distância percorrida no teste incremental foi utilizada para o cálculo do índice de desempenho, segundo HOHL et al. (2009), que é dado pelo produto da distância (em metros) pelo peso do animal (kg).

4.4 Protocolo de exercício físico e determinação do domínio de intensidade do esforço

Os animais dos grupos treinados realizaram sessões de exercício físico três vezes por semana em dias intercalados (seg, qua, sex), no mesmo período do dia (entre 11h e 14h) durante cinco semanas. A parte principal da sessão de exercício teve duração de 40 minutos para os grupos treinados por método contínuo (TRF-AC e TRF-FC) e de 18 minutos para os grupos que treinaram pelo método intervalado (TRF-AI e TRF-FI), sendo 2 minutos na maior intensidade seguido de 4 minutos na menor intensidade, por 3 vezes. A parte principal da sessão de ambos os grupos foi precedida de 5 minutos de aquecimento (20%V_{max}) e ao final realizaram mais 5 minutos de desaquecimento a 20% V_{max}. Durante as cinco semanas de treinamento houve progressão das cargas conforme mostra a tabela 2. Os ajustes das cargas de treino (velocidade) foram feitos após a realização de novo teste incremental ao final da segunda semana de treinamento.

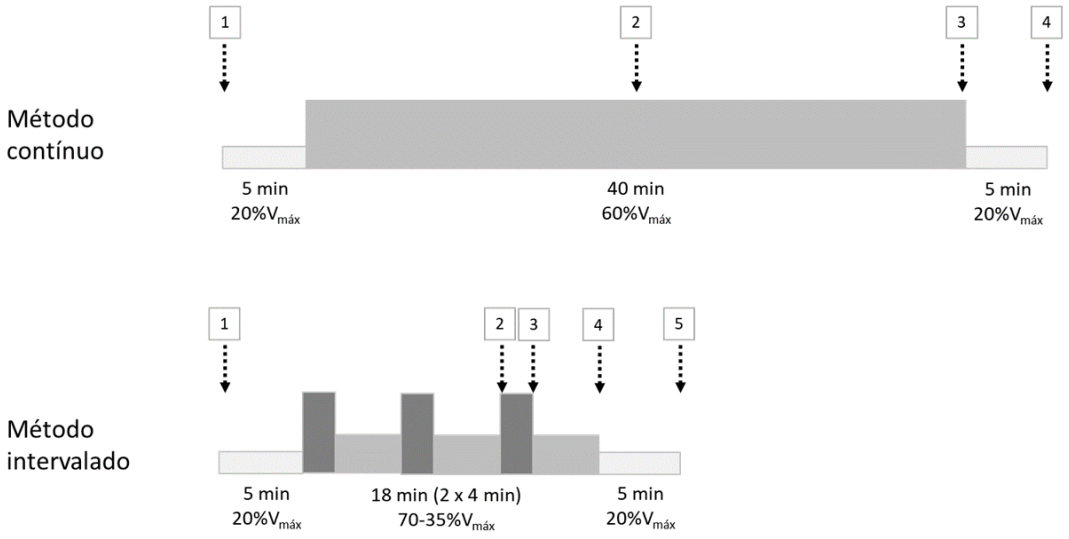
Tabela 2 - Carga de treinamento dos protocolos de exercício contínuo (TRC) e intervalado (TRI), considerando frequência semanal de três vezes e duração de cinco semanas

	TRC		**TRI**	
semanas	Intensidade (% da V_{max})	carga de treino semana (u.a)	Intensidade (% da V_{max})	carga de treino semana (u.a)
1	40	4800	50 – 25	1650
2	50	6000	60 – 30	1980
3	50	6000	60 – 30	1980
4	60	7200	70 – 35	2310
5	60	7200	70 – 35	2310
Carga total		**31.200**		**10.230**

Carga de treino= intensidade x tempo x frequência semanal, dada em unidades arbitrárias (u.a)

A quantificação da lactacidemia foi utilizada para a determinação do domínio da intensidade. Para isso, amostras de sangue (25 μL*)* foram coletadas da extremidade caudal dos animais com o auxílio de capilares de vidro previamente calibrados com heparina e transferidos para microtubulos contendo 50 μL de fluoreto de sódio (NaF 1%) onde foram homogeneizadas e mantidas a 4ºC. As amostras foram analisadas em um lactímetro eletroquímico Yellow Spring Instruments (YSI), modelo 2300 Stat para determinação da concentração de lactato sanguíneo [La] em cada uma delas. As coletas foram realizadas na última sessão de exercício físico da 5ª semana do protocolo de treinamento físico. Os momentos das coletas estão mostrados na figura 2.

Figura 2 – Caracterização dos tempos de coleta de lactato durante o treino



Momentos para coleta de sangue caudal dos animais submetidos aos protocolos de treinamento físico por método contínuo ou por método intervalado. As setas indicam o momento da sessão em que foi coletada a amostra de sangue.

4.5 Avaliação da memória espacial e aprendizagem

A memória espacial e aprendizagem foram avaliadas utilizando-se o Labirinto de Barnes, com protocolo adaptado de (GAWEL et al., 2019). A tarefa é baseada na tendência espontânea dos roedores buscarem um ambiente mais escuro e protegido. Em uma plataforma circular com 120 cm de diâmetro, com 20 buracos de 10 cm de diâmetro com tampas removíveis e uma caixa de escape (13 cm × 29 cm x 14 cm) construída de plástico preto. Todas sessões foram gravadas em vídeo para posterior análise utilizando o software Kinovea versão 0.8.15. Importante salientar que os animais não foram submetidos ao exercício físico nos dias em foram realizados as exposições e o teste no Labirinto de Barnes para se evitar o efeito agudo da sessão de exercício.

O protocolo do teste consistiu das seguintes sessões, conforme segue:

Habituação (dia 0)

A fase de habituação foi realizada 24 horas antes da fase de aquisição, os animais foram habituados ao aparato e a caixa de escape, com luz branca acesa e sem a colocação

de pistas visuais nas paredes da sala onde estava o aparato. Os animais foram colocados no centro do labirinto, e permaneceram livres para exploração por 1 minuto. Após o tempo de exploração os animais foram levados gentilmente para a caixa de escape. Os animais permaneceram na caixa de escape por 2 minutos. Após este procedimento os animais foram retirados da caixa de escape e levados de volta as suas caixas de convivência (Casa).

Fase de Aquisição (dia 1 a 4)

A fase de aquisição consistiu de duas exposições diárias (separadas por 15 minutos) dos animais ao labirinto ao longo de quatro dias consecutivos, sendo que a primeira exposição desta fase ocorreu 24 horas após a habituação. Com o labirinto sempre na mesma posição e lugar, com a iluminação da sala feita com luz vermelha e dicas visuais colocadas nas paredes da sala. Os animais foram colocados no centro do labirinto, cobertos com uma caixa plástica branca opaca por 30 segundos. Logo após a caixa era retirada e os animais ficavam livres para a exploração do labirinto por 2 minutos. Caso o animal escapasse do labirinto, ou seja, encontrasse e entrasse na caixa de escape, a exposição era finalizada, o tempo era marcado e o animal era devolvido a sua caixa de convivência. Quando o animal não escapava do labirinto, ao final dos dois minutos de exploração o animal era gentilmente levado à caixa de escape onde permanecia por 1 minuto e em seguida era devolvido à caixa de convivência.

Fase de evocação: teste de memória (dia 5)

Após 24 horas da realização da última sessão da fase de aquisição, os animais retornavam para a realização do teste. Assim, o animal era colocado no centro do aparato, sob a caixa plástica branca opaca, permanecendo nesta condição por 15 segundos. Logo após este breve período a caixa era retirada e o animal permanecia por 1 minuto e 30 segundos explorando o labirinto. Quando o animal encontrava e entrava na caixa de escape, o tempo era anotado e o animal era devolvido a sua caixa de convivência. Caso o animal apenas identificasse o escape, onde foi considerado o movimento de abaixar a cabeça com o nariz em direção a caixa de escape, mas não entrasse na caixa, permanecia no aparato até o final do tempo do teste e ao final era devolvido a sua caixa de convivência.

4.6 Teste de tolerância à insulina e teste de tolerância à glicose

Foram realizados testes de Tolerância à Insulina (ITT) e de Tolerância à Glicose (GTT), três dias antes do sacrifício dos animais, em dias não consecutivos, estando em jejum de 8 horas. Para o ITT a insulina (2U/kg de peso corporal) foi injetada via intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda do animal nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para verificação da glicose sanguínea (PAULI; ROPELLE, 2009). A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi determinada segundo Bonora et al. (2000).

No GTT, os animais receberam injeção intraperitoneal de solução de glicose a 10% na dose de 2 g/kg e amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos para determinação da glicose sanguínea. Foi calculada a área sob a curva de glicemia para cada grupo experimental.

4.7 Eutanásia e obtenção de sangue e tecidos

Ao final do protocolo experimental parte dos animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com Uretana (25%, 1,25 g/kg, por via intraperitoneal) após jejum noturno. Destes animais foram extraídos tecido adiposo e o encéfalo para a dissecção do hipocampo e congelamento para a realização da técnica de western blot. As amostras de hipocampo para a realização do ensaio de imunohistoquímica foram obtidas de animais após a realização da técnica de perfusão descrito abaixo.

O protocolo para a realização do procedimento foi adaptado de Gage; Kipke e Shain (2012). Assim que o animal atingiu o plano cirúrgico de anestesia, foi verificado os reflexos, onde na ausência dos mesmos foi iniciado o procedimento. Assim dando processo a realização de uma incisão da tesoura cirúrgica através do tegumento e da parede abdominal logo abaixo da caixa torácica. Após o animal estar aberto, uma pequena incisão no diafragma foi realizada, usando a tesoura curva e romba para sua remoção total. Foi separado cuidadosamente o fígado do diafragma. Levantando o esterno, foi retirado cuidadosamente qualquer tecido que o conecte ao coração ao tórax. O esterno foi imobilizado com uma pinça para uma visão mais clara e segura do coração. Após esse preparo foi realizada a perfusão com a incisão de uma agulha no ventrículo esquerdo, ligada a um sistema de perfusão com soluções salina e paraformaldeído 4% onde o animal

foi perfundido por 5 minutos com solução salina e 10 a 12 minutos com solução de paraformaldeído 4%.

O hipocampo foi isolado e fixado em solução de formalina (10%) por 48 horas e posteriormente armazenado a 4ºC em solução sacarose-salina (30%) por 2 dias. Após este período foi congelado em OCT para a posterior obtenção de cortes frontais com espessura de 40 μm.

4.8 Avaliação das vias de sinalização do hipocampo

4.8.1 Quantificação dos fatores neurotróficos no hipocampo por western blot

Cada hipocampo foi homogeneizado a 4°C em um tampão de extração (1% Triton X - 100, 100 mM de Tris, pH 7,4, contendo 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 0,1 mg / mL de aprotinina) com um gerador Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35), que foi operado a uma velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados (11000g) por 40 minutos a 4° C para remoção do material insolúvel, e os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As proteínas foram desnaturadas por fervura em um tampão de amostra Laemmli contendo 100mM de DTT, colocadas em um gel de eletroforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (RPN303D, Hybond ECL; GE Healthcare Pittsburgh, PA). A eficiência de transferência para as membranas de nitrocelulose foi testada por uma breve coloração dos blots com uma coloração vermelho Ponceau. Essas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris contendo 5% de albumina de soro bovino e 0,1% de Tween-20 por 1 hora a 4°C. A transferência de proteínas para as membranas foi monitorada qualitativa ou quantitativamente por meio da coloração com vermelho de Ponceau.

As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários para detecção do fator neurotrófico BDNF (diluição 1: 1.000, ab226843; Abcam), do marcador de astrócitos GFAP (diluição 1: 1.000, ab207165; Abcam) e o marcador de neurônios NeuN (diluição 1: 1.000, ab12886; Abcam). Após a lavagem com solução

salina tamponada com Tris contendo 0,1% de Tween-20, todas as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário Anti-Rabbit (diluição 1:5.000, .ab6721, Abcam).

As bandas imunorreativas específicas foram detectadas por quimioluminescência (ECL Plus; GE Healthcare). As imagens foram obtidas utilizando o equipamento C-DiGit Blot Scanner (LI - COR, Lincoln, NE) e quantificadas usando o software Image Studio para C-DiGit Blot Scanner. Após a quantificação da densidade das bandas os valores foram normalizados pelo resultado do grupo SDF-F, considerado como controle.

4.8.2 Quantificação dos fatores de angiogênese e inflamação no hipocampo por imunohistoquimica

Cortes frontais do encéfalo, com espessura de 40 µM, foram incubados com anticorpos para a marcação de alfa actina de células de músculo liso (aSMA, 1:300, Abcam, Cambridge, MA) e NFkB (NF- kB p65, 1:100, Abcam, Cambridge, MA).

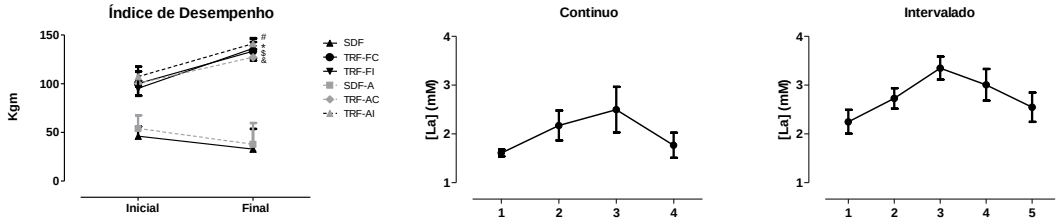
4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis seguido de pós hoc de Dunn para verificação de diferença entre os grupos experimentais. Devido ao pequeno número experimental a análise de regressão múltipla foi substituída por análise de correlação de Spearman para investigação do grau de associação entre o tempo de latência (indicador de desempenho em teste de memória) e as variáveis sistêmicas (sensibilidade à insulina) e locais (expressão de fatores neurotróficos e marcação de angiogênese e neuroinflamação). Todos os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS versão 20.0 e o nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

5 RESULTADOS

O protocolo de treinamento físico utilizado neste estudo foi eficaz para causar adaptação e aprimoramento do desempenho físico dos animais, medido pelo índice de desempenho, que foi aumentado por ambos os métodos de treinamento, de maneira similar [X^2 (5) 20,030; $p<0,05$]. A cinética da concentração de lactato sanguíneo foi determinada em sessão de treinamento por método contínuo ou intervalado para demonstrar que em ambos os protocolos a intensidade do exercício foi abaixo do limiar anaeróbio com concentrações de lactato mantendo-se abaixo dos 4 mM de lactato.

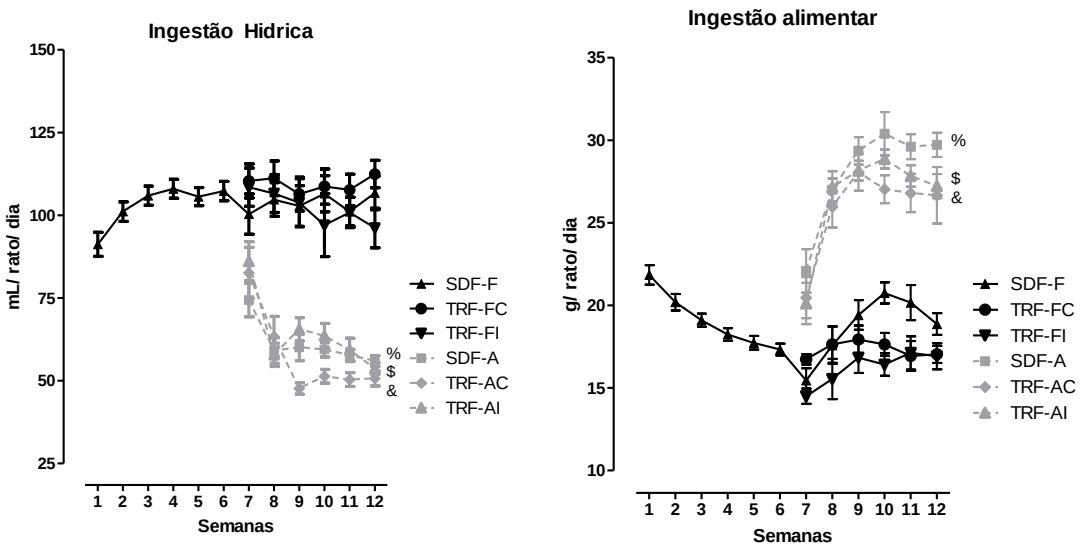
Figura 3 - Índice de desempenho e cinética da concentração de lactato em sessão de exercício contínuo ou exercício intervalado.



Sedentário Frutose (SDF-F, n=5), Treinado Frutose-Continuo (TRF-FC, n=5), Treinado Frutose-Intervalado (TRF-FI, n=5), Sedentário Frutose-Água (SDF-A, n=5), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=5) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=5). Dados expressos em média ± erro padrão da média. # efeito do treinamento continuo, * efeito do treinamento intervalado, % efeito da troca dietética, * efeito do treinamento intervalado, $ efeito da troca dietética associado ao treinamento continuo e & efeito da troca dietética associado ao treinamento intervalado. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de $p<0,05$).

Todos os animais tiveram acesso à solução de frutose a 15% durante as seis primeiras semanas do protocolo experimental. Após a 6ª semana houve a substituição da solução de frutose por água pura para os grupos SDF-A, TRF-AC e TRF-AI. Observa-se que a ingestão hídrica, a partir deste momento, foi em média 97% maior nos grupos que tinham acesso a frutose quando comparado ao consumo médio dos grupos que passaram a ter acesso à água para beber [X^2 (5) 71,562; $p<0,05$]. Comportamento inverso foi verificado na ingestão alimentar, em que os animais que passaram a ter acesso à água apresentaram aumento de 58% no consumo de ração [X^2 (5) 56,884; $p<0,05$]. Os resultados são mostrados na figura 4.

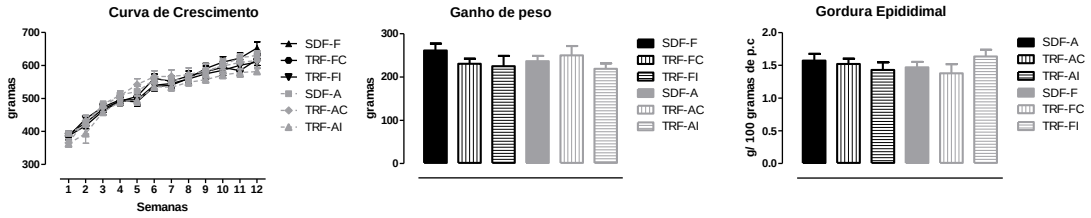
Figura 4. Ingestão hídrica e ingestão alimentar ao logo das 12 semanas do protocolo experimental



Sedentário Frutose (SDF-F, n=10), Treinado Frutose-Continuo (TRF-FC, n=10), Treinado Frutose-Intervalado (TRF-FI, n=8), Sedentário Frutose-Água (SDF-A, n=15), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=10) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=12). Dados expressos em média ± erro padrão da média. # efeito do treinamento continuo, * efeito do treinamento intervalado, % efeito da troca dietética, * efeito do treinamento intervalado, $ efeito da troca dietética associado ao treinamento continuo e & efeito da troca dietética associado ao treinamento intervalado. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de $p<0,05$).

O peso dos animais foi obtido semanalmente para que se pudesse acompanhar a curva de crescimento. Não foram observadas diferenças entre os grupos ao longo do protocolo experimental para a curva de crescimento, assim como para o ganho de peso e tamanho do depósito de gordura epididimal. Os resultados são mostrados na figura 5.

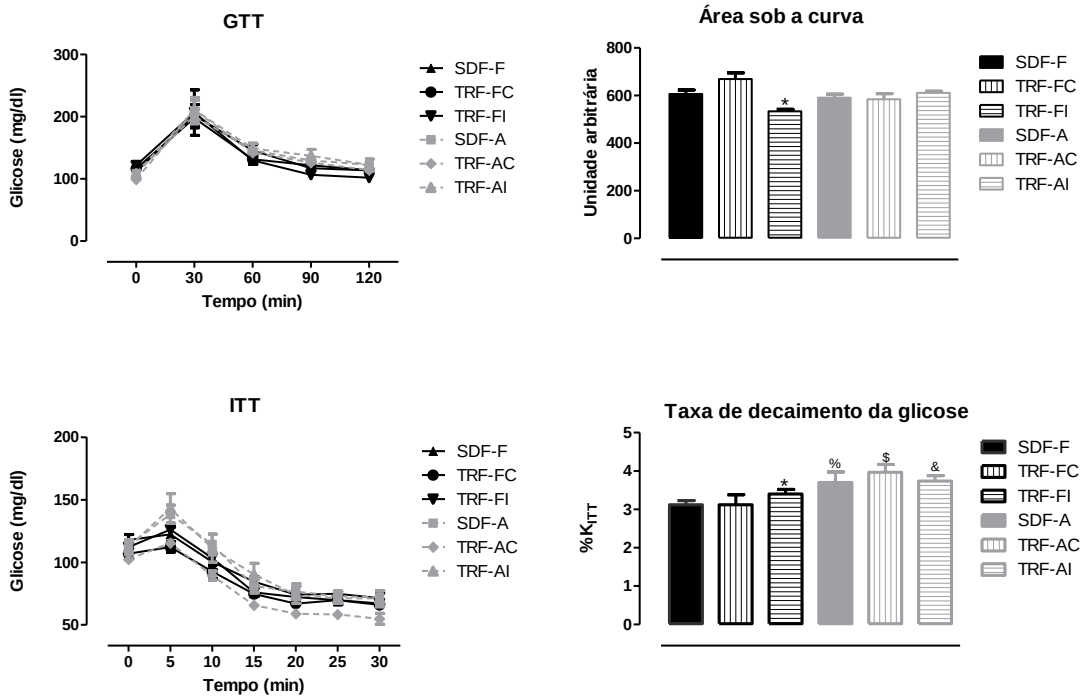
Figura 5. Curva de crescimento, ganho de peso e depósito de gordura epidimal ao final do protocolo experimental



Sedentário Frutose (SDF-F, n=10), Treinado Frutose - Continuo (TRF-FC, n=10), Treinado Frutose - Intervalado (TRF-FI, n=8), Sedentário Frutose - Água (SDF-A, n=15), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=10) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=12). Dados expressos em média ± erro padrão da média. # efeito do treinamento continuo. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de $p<0,05$). A gordura epididimal foi relativizada pelo peso corporal (p.c) do animal.

A avaliação dos efeitos do consumo de frutose sobre a tolerância à glicose foi realizada pelo teste de tolerância à glicose e os resultados são mostrados na figura 6. Apenas o grupo TRF-FI, que foi submetido ao treinamento intervalado associado ao consumo de frutose, apresentou redução de 12% da área sob a curva quando comparado ao grupo SDF-F [X^2 (3) 11,125; $p<0,05$]. Este mesmo grupo apresentou aumento da sensibilidade a insulina visto o aumento de 9% na taxa de decaimento da glicose comparado ao grupo SDF-F [X^2 (3) 8,076; $p<0,05$]. Resultado positivo também foi observado para os grupos submetidos à mudança dietética que apresentaram aumento na taxa de decaimento da glicose em comparação ao grupo SDF-F [X^2 (5) 12,011; $p<0,05$], sendo este aumento de 19% no grupo SDF-A, 27% no grupo TRF-AC e de 20% no grupo TRF-AI. Os resultados do teste de tolerância à insulina são mostrados na figura 6.

Figura 6. Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose (GTT) e área sob a curva no mesmo teste, curva glicêmica do teste de tolerância a insulina (ITT) e taxa de decaimento da glicose no mesmo teste



Sedentário Frutose (SDF-F, n=6), Treinado Frutose - Continuo (TRF-FC, n=6), Treinado Frutose - Intervalado (TRF-FI, n=4), Sedentário Frutose - Água (SDF-A, n=6), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=6) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=6). Dados expressos em média ± erro padrão da média. * efeito do treinamento intervalado, %. efeito da troca dietética, $ efeito da troca dietética associado ao treinamento continuo e & efeito da troca dietética associado ao treinamento intervalado. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de $p<0,05$).

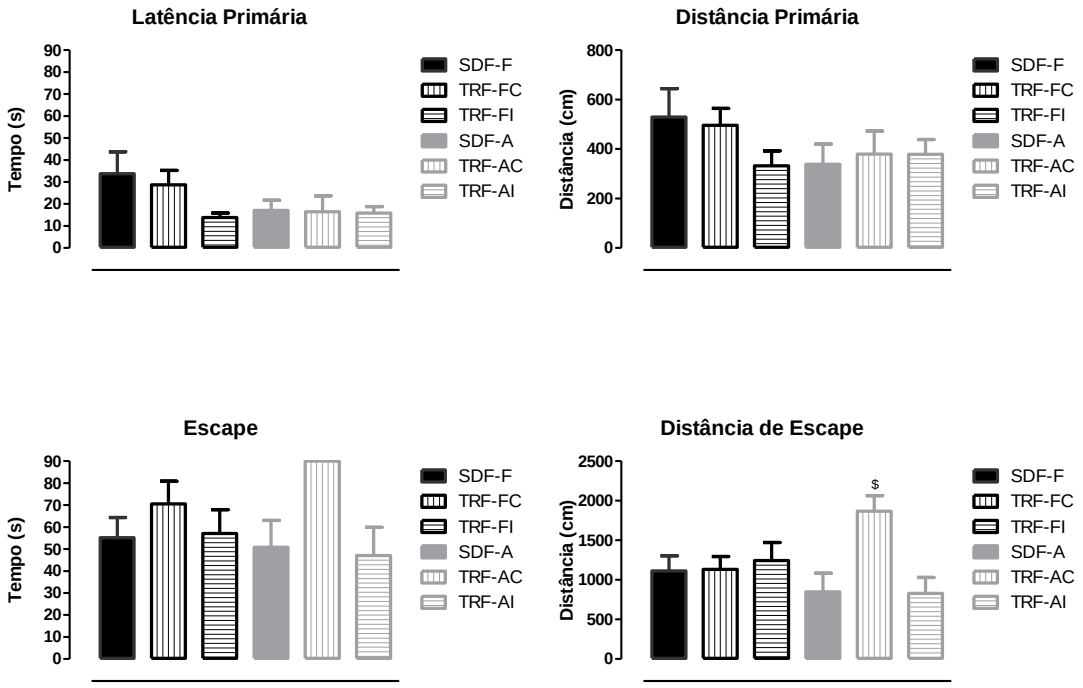
O labirinto de Barnes foi o aparato utilizado para a avaliação da memória e aprendizagem espacial com os resultados do tempo e distância de latência (sendo considerada como latência a identificação da saída do labirinto) e o tempo e distância de escape (considerado como escape a identificação da saída e entrada do animal na caixa de escape do labirinto). Ainda, os resultados mostrados na figura 7 dizem respeito à sessão teste realizada 24 horas após a última sessão de tentativa.

Para a latência primaria foi possível notar uma tendência a redução no tempo gasto pelos grupos que realizaram o protocolo de treinamento, sem diferença estatística entre os grupos [X^2 (5) 4,588; $p>0,05$]. Entretanto, ao observar os resultados percebe-se que o grupo TRF-FC identificou a saída em tempo 15% menor e o TRF-FI em 59% menos

tempo comparados ao grupo SDF-F. A mudança dietética também parece influenciar o tempo de latência, pois, o grupo SDF-A identificou a saída em tempo 50% menor do que SDF-F. Interessante salientar que a associação mudança dietética e exercício físico não promoveu efeito aditivo. Quanto a distância percorrida até a identificação da saída, também não foi observada diferença estatística entre os grupos [X^2 (5) 4,545; $p>0,05$]. Há uma discreta redução da atividade locomotora no grupo TRF-FC (aproximadamente 6%) mas para os demais grupos a tendência de menor atividade locomotora é mais marcante sendo que o TRF-FI se deslocou 37% menos do que SDF-F até identificar a saída, resultado similar foi observado para SDF-A. Já os grupos TRF-AC e TRF-AI se deslocaram 28% menos do que SDF-F.

Os resultados acerca do tempo e da distância percorrida até a entrada do animal na caixa de escape do labirinto também são mostrados na figura 7. Não foram observadas diferenças no tempo de escape [X^2 (5) 9,968; $p>0,05$], porém os grupos que realizaram treinamento continuo apresentaram tendência a maior tempo para escape (TRF-FC: +29% e TRF-AC: +63%) comparados aos SDF-F. Os demais grupos tiveram comportamento semelhante entre eles. A distância percorrida até a entrada na caixa de escape foi 68% maior no grupo TRF-AC comparado ao SDF-F [X^2 (5) 7,029; $p<0,05$], e uma tendência à menor deslocamento até o escape foi observada para os grupos SDF-A e TRF-AI que, em média, se deslocaram 24% menos do que o grupo SDF-F.

Figura 7. Resultados do teste de memória e aprendizagem espacial. Tempo e distância percorrida para identificação da saída (latência) e tempo e distância percorrida para saída do labirinto (escape)

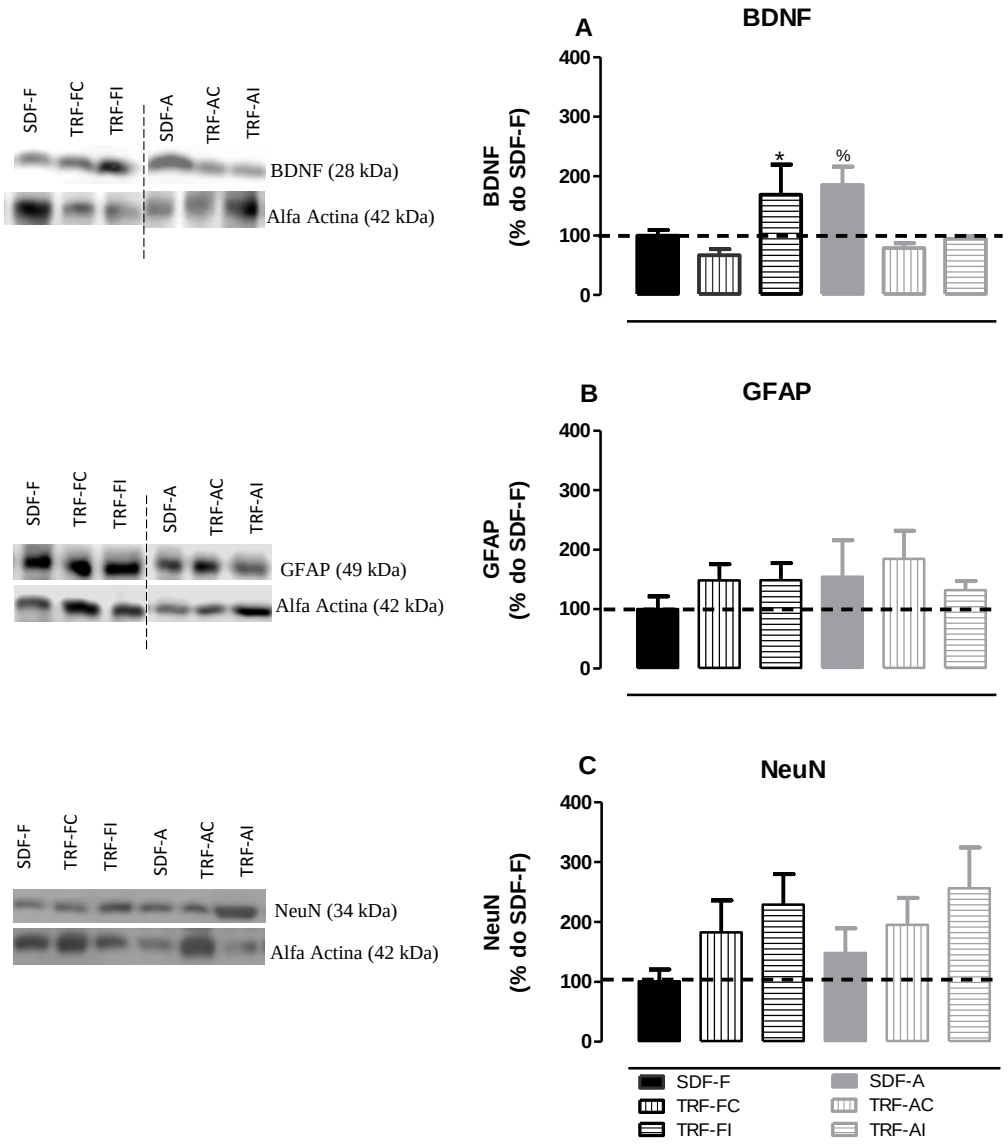


Sedentário Frutose (SDF-F, n=10), Treinado Frutose - Continuo (TRF-FC, n=10), Treinado Frutose - Intervalado (TRF-FI, n=8), Sedentário Frutose - Água (SDF-A, n=8), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=4) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=8). Dados expressos em média ± erro padrão da média. $ efeito da troca dietética associado ao treinamento continuo. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de $p<0,05$).

Com relação à análise de parâmetros locais, os ensaios de westen blot e imunohistoquimica foram realizados em amostras de hipocampo. Após a quantificação da densidade das bandas os valores foram normalizados pelo resultado do grupo SDF-F, considerado como controle. O fator neurotrófico, BDNF, foi aumentado em dois grupos TRF-FI (69%) e SDF-A (85%) [X^2 (5) 13,677; $p<0,05$], os resultados estão mostrados na figura 8A. A proteína glial fibrilar ácida, GFAP, marcador de astrócitos não teve a sua expressão significativamente modificada pelas intervenções [X^2 (5) 3,054; $p>0,05$]. Porém, é possível observar tendência de aumento em todos os grupos quando comparados ao SDF-F, partindo de 32% no grupo TRF-AI até 84% no grupo TRF-AC (figura 8B). A expressão do marcador de neurônios maduros, NeuN, também não foi modificada pelas intervenções realizadas [X^2 (5) 5,939; $p>0,05$]. Mais uma vez tendências foram

observadas no sentido do aumento da expressão deste marcador principalmente nos grupos submetidos ao treinamento físico e, no grupo que sofreu manipulação da dieta, também se observa tendência ao aumento da expressão do NeuN mas em menor amplitude do que a observada nos grupos treinados fisicamente (figura 8C).

Figura 8. Expressão de BDNF (A), GFAP (B) e NeuN (C) no hipocampo

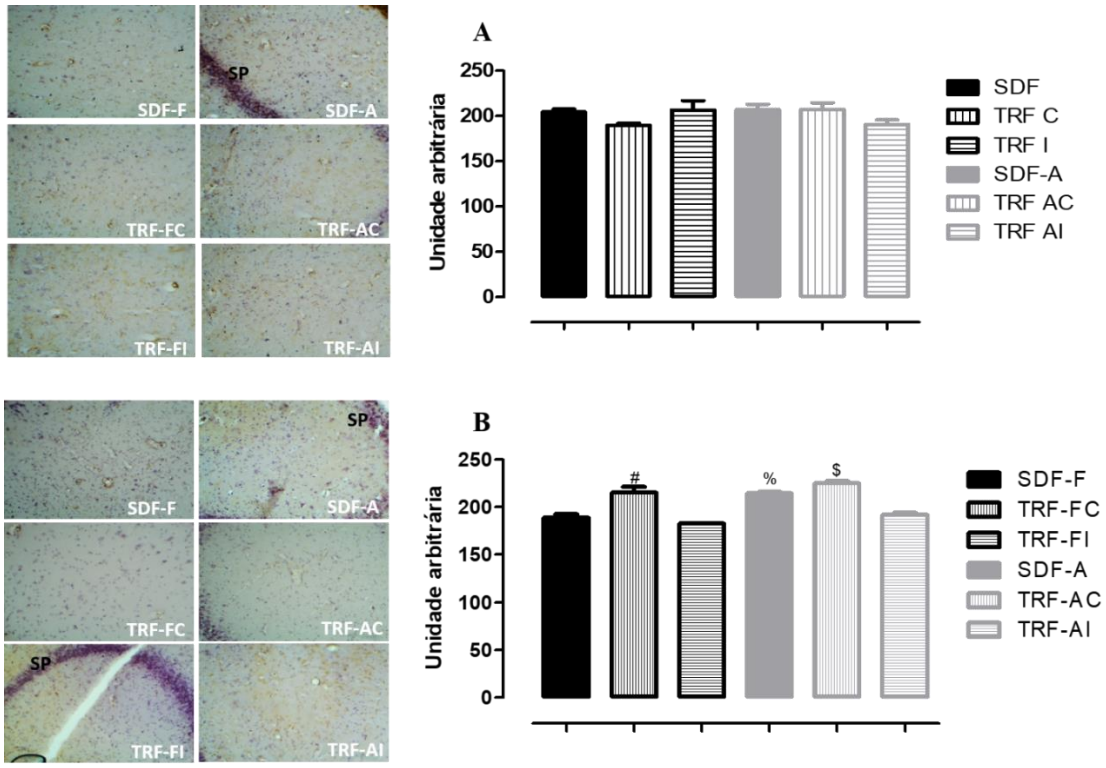


Os valores da razão proteína de interesse/ alfa actina foram normalizados pelos valores obtidos para o grupo SDF-F. Figuras à esquerda são representativas da quantificação da densidade e fotos à direita são as bandas representativas de cada grupo para cada uma das proteínas investigadas. Sedentário Frutose (SDF-F, n=7), Treinado Frutose - Continuo (TRF-FC, n=7), Treinado Frutose - Intervalado (TRF-FI, n=7), Sedentário Frutose - Água (SDF-A, n=7), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=7) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=7). Dados expressos

em média ± erro padrão da média. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de p<0,05).

Para investigar o efeito das intervenções sobre a neuroinflamação foi utilizada a marcação do fator de transcrição NFkB que envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória. Não foi observada diferença entre os grupos experimentais ([X^2 (5) 8,051; p>0,05]) como mostrado na figura 9A. A possível angiogênese induzida pelas intervenções foi investigada marcando-se a alfa-actina de músculo liso (aSMA) no hipocampo. Foi observado aumento nesta marcação nos grupos TRF-FC (+14%), SDF-A (+13,2%) e TRF-AC (+19%) quando comparados ao grupo SDF-F [X^2 (5) 15,125; p<0,05].

Figura 9. Criocortes histológicos do hipocampo com marcação para NFkB e aSMA.



Marcação imunopositiva para NFkB (A) e aSMA (B) evidenciada em castanho nos núcleos dos neurônios do Cornu Ammonis 3 (CA3). Marcação em roxo (hematoxilina) dos núcleos dos neurônios, principalmente os do Stratum pyramidale (SP). Sedentário Frutose (SDF-F, n=8), Treinado Frutose - Continuo (TRF-FC, n=6), Treinado Frutose - Intermitente (TRF-FI, n=4), Sedentário Frutose - Água (SDF-A, n=4), Treinado Frutose-Água Continuo (TRF-AC, n=4) e Treinado Frutose-Água Intervalado (TRF-AI, n=5). Dados expressos em média ± erro padrão da média. % efeito da troca dietética, $ efeito da troca dietética associado ao treinamento continuo. Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (nível de significância de p<0,05).

Na tentativa de se estabelecer a contribuição dos fatores sistêmicos (tolerância à glicose e sensibilidade à insulina) e locais (expressão de fator neurotrófico, proteína glial e neurônios maduros, neuroinflamação e angiogênese no hipocampo) sobre o desempenho em teste de memória foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman. Entre todos os fatores investigados apenas o K_{ITT} e a marcação para NFkB mostraram ter associação moderada e fraca, respectivamente, com o tempo de latência (tabela 3).

Tabela 3. Coeficiente de correlação entre o tempo de latência primária e fatores sistêmicos e locais.

	Tempo de latência primária		
	Coeficiente de correlação (r_s)	Significância (unicaudal)	N
Área sob a curva no GTT	0,077	0,377	19
Taxa de decaimento da Glicose (K_{ITT})	-0,417	*0,038**	19
Expressão de BDNF	0,295	0,118	18
Expressão de GFAP	0,059	0,357	41
Expressão de NeuN	-0,235	0,124	26
Marcação NFkB	-0,324	*0,012**	48
Marcação aSMA	0,022	0,472	13

Coeficiente de correlação de Spearman, unicaudal, nível de significância de $p<0,05$.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a influência de dois métodos de treinamento físico, contínuo ou intervalado, sobre a memória espacial e aprendizagem de animais alimentados com solução de frutose. Os resultados mostraram que, aparentemente, o treinamento físico intervalado empregado neste estudo foi mais eficiente do que o contínuo, uma vez que os animais do grupo TRF-FI apresentaram tempo de latência primária 59% menor e para os animais do grupo TRF-FC o tempo de latência foi, apenas, 15% menor do que o observado para o grupo SDF-F. Além disso, não foi confirmado o efeito aditivo da mudança dietética e do exercício físico, uma vez que a substituição da solução de frutose por água a partir da 6ª semana *per se* provocou redução de 50% no tempo de latência para o grupo SDF-A comparado ao SDF-F, resultado semelhante ao observado para os grupos TRF-AC e TRF-FI. A análise de correlação mostrou que a sensibilidade à insulina e a neuroinflamação são, entre os fatores investigados neste estudo, os que apresentaram associação significativa com o tempo de latência sendo que o primeiro explicaria 17% e o segundo 10% do resultado observado no teste de memória.

Interessante observar que os animais que tinham solução de frutose para beber apresentaram consumo hídrico maior e ingestão alimentar menor do que os animais que tinham água pura. A hipótese é que a alta palatabilidade da solução de frutose fez com que os animais aumentassem o consumo hídrico e sendo a frutose um carboidrato, os animais diminuíam a ingestão alimentar para garantir o equilíbrio energético. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, mostrou que mesmo uma solução de frutose com concentração mais baixa (10%) do que a utilizada no presente estudo (15%) provoca alteração do padrão alimentar com aumento da ingestão hídrica e redução da ingestão alimentar em ratos (REBELO et al., 2020). Os protocolos de exercício físico não provocaram alteração no padrão alimentar dos animais.

O perfil glicêmico tem relação com as funções cerebrais, pois a glicose é um dos principais nutrientes utilizados pelos neurônios (DIENEL, 2019). Alterações como o aumento exacerbado da glicemia ou a redução da sensibilidade à insulina podem levar à prejuízos cognitivos como déficit de aprendizagem e de memória, e podem estar associados também à doença de Alzheimer e Parkinson (KOEPSELL, 2020; SZABLEWSKI, 2017). Ratos Sprague-Dawley adultos alimentados durante oito meses com solução de frutose a 10% tiveram aumento da glicemia e pior desempenho no teste de memória espacial quando comparados aos seus controles que ingeriram água. Os

autores atribuíram este achado à redução da sinalização da insulina no hipocampo dos animais alimentados com solução de frutose (WU et al., 2015). A despeito dos achados da literatura, no presente estudo não foi observada a ação deletéria do consumo de frutose sobre a memória espacial e aprendizagem.

Apesar das intervenções realizadas não induzirem à modificação da glicemia de jejum parte delas influenciou de modo positivo a sensibilidade à insulina. Em animais alimentados com frutose apenas o treino intervalado aumentou a sensibilidade à insulina. A alteração dietética, associada ou não ao exercício físico, aumentou a sensibilidade à insulina. O exercício físico tem se mostrado eficaz no controle do equilíbrio glicêmico. Estudos realizados em animais diabéticos ou não diabéticos que consumiram dietas com alto teor de açucares e/ou gordura apresentaram aumento da sensibilidade à insulina após período de treinamento físico (DE MORAES et al., 2008; RATTANAVICHIT et al., 2018; REBELO et al., 2020 CHO et al., 2020). O teste de correlação apontou que há associação inversa, de grau médio, entre o desempenho em teste de memória e a sensibilidade periférica à insulina, ou seja, quanto maior é sensibilidade à insulina, menor é o tempo de latência no teste de memória.

Apesar de o teste estatístico não ter apontado diferença entre os grupos para o desempenho em teste de memória podemos observar uma forte tendência à redução do tempo de latência em animais do grupo TRAI, SDF-A, TRF-AC e TRF-AI. O mesmo não foi observado para o tempo de escape. A razão para este achado não é clara, uma hipótese seria a de que o ambiente do labirinto de Barnes não provocava estímulo suficiente para que o animal entrasse na caixa de escape para fugir do ambiente. Diante dessa hipótese foi considerado o tempo de latência como medida do desempenho em teste de memória.
A influência do exercício físico sobre a memória foi demonstrada em diferentes estudos que utilizaram modelo animal. Em ratos Wistar com diabetes tipo 1 induzida com injeções de estreptozotocina, o treinamento físico por cinco semanas (corrida, 5 vezes por semana, com sessões de 60 minutos em intensidade de 50-60% da velocidade máxima alcançada em teste) provocou aprimoramento da memória avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos (DE SENNA et al., 2015). Achado semelhante foi observado em animais Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty (modelo semelhante a diabetes tipo 2), que após quatro semanas de treinamento físico (corrida, 5 dias por semana, 30 minutos com intensidade moderada) apresentaram aprimoramento da memória espacial avaliada utilizando o labirinto aquático de Morris (SHIMA et al., 2017). Animais alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos à corrida em esteira durante oito semanas também

apresentaram aprimoramento da memória espacial (WOO et al., 2013). Resultado semelhante foi observado em camundongos alimentados com dietas ricas em gordura ou frutose e submetidos à corrida em esteira cinco dias por semana, durante 23 semanas (HAN; LEEM; KIM, 2019).

Com relação aos fatores neurotróficos investigados, apenas o BDNF teve a sua expressão significativamente aumentada em animais dos grupos TRF-FI e SDF-A. Este resultado foi diferente do encontrado na literatura em que ratos Wistar submetidos à corrida em esteira, em intensidade moderada, tiveram aumento da expressão de BDNF no hipocampo (CASSILHAS et al., 2012; VILELA et al., 2017). Grupos de ratos Wistar com déficit de memória induzido por escopolamina, que realizaram corrida em esteira com intensidades de ~40% ou de ~70% da velocidade máxima tiveram aumentado da expressão de BDNF no hipocampo após 10 semanas de treinamento físico (CEFIS et al., 2019). Este mesmo estudo mostrou que há diferença entre os grupos quanto ao aumento da expressão de BDNF e de sinaptofisina, além de aprimoramento da memória de reconhecimento, sendo que animais que realizaram a corrida a ~70% da velocidade máxima tiveram maior expressão de BDNF e somente este grupo apresentou aprimoramento da memória. A hipótese possível para não termos observado o aumento da expressão de BDNF em todos os grupos exercitados pode estar relacionado à frequência semanal das sessões de exercício que nos estudos citados foi de 5 (CASSILHAS et al., 2012) a 7 vezes na semana (CEFIS et al., 2019) ou, ainda, pela diferença de idade dos animais já que o estudo de Vilela et al. (2017) foi realizado com ratos idosos. Os outros fatores neurotróficos investigados no presente estudo não foram significativamente modificados pelas intervenções realizadas.

Não há evidência de alteração da ativação do NFkB na região CA3 do hipocampo dos animais dos diferentes grupos experimentais. Segundo Shao et al. (2016), o aumento da ativação de NFkB pode indicar a ocorrência de inflamação, sendo assim nossos resultados mostram que o consumo de frutose por 12 semanas (SDF-F) ou por seis semanas (SDF-A) não induziu neuroinflamação. Talvez a ausência de neuroinflamação seja a explicação para a não observância marcado déficit na memória espacial e aprendizagem dos animais SDF-F. Parece que a inflamação modifica o perfil oxidativo, diminuindo os níveis de antioxidantes e de marcadores de crescimento de neurônios como o BDNF na região do hipocampo resultando em déficit cognitivo (HUSSAIN; JAIN; SAMAIYA, 2019). A influência da neuroinflamação sobre a funcionalidade do hipocampo pode ser demonstrada no presente estudo através da análise de correlação

realizada em que os níveis de NFkB mostraram fraca associação inversa (porém significativa) com o desempenho em teste de memória.

Interessante observar que os animais submetidos ao treinamento por método contínuo, grupos TRF-FC e TRF-AC, apresentaram aumento da marcação para aSMA indicando o aumento de músculo liso vascular na região CA3 do hipocampo. O exercício físico é um potente estímulo para angiogênese. Foi observado que a indução de angiogênese no cérebro pode ser mediada pela ativação do receptor de lactato HCART1 presente no tecido cerebral (MORLAND et al., 2017), além da ação do óxido nítrico, que tem a sua produção aumentada pela tensão de cisalhamento no vaso induzida pelo exercício físico (SCHMIDT et al., 2013). Ambas as vias induzem aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que culmina em síntese proteica e proliferação celular. A hipótese para este achado ser observado apenas em grupos que treinaram por método contínuo é o maior volume de treinamento realizado por estes grupos, o que proporcionaria maior duração da tensão de cisalhamento e produção aumentada de óxido nítrico. A alteração dietética induziu resposta semelhante ao exercício e a razão para este achado não é clara. Sabe-se que o consumo de frutose pode levar à disfunção endotelial, com marcada redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, e este estado ocorre devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio via ativação da NADPH-OX (KLEIN; KIAT, 2015). A retirada do estímulo que gera dano vascular, com a substituição da frutose por água, pode ter proporcionado a normalização da função endotelial e estimulado a angiogênese.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos considerar que o protocolo de treinamento físico que utilizou o método intervalado mostrou-se mais eficiente do que o contínuo para o aprimoramento da memória, levando-se em consideração o tempo de latência no labirinto de Barnes, e que o desempenho em teste de memória está associado à sensibilidade periférica à insulina e aos níveis de NFkB no hipocampo. Foi observado também que a mudança dietética não proporciona efeito aditivo ao treinamento físico nas respostas observadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, J. N.; JOYNER, M. J. Sugar highs and lows: The impact of diet on cognitive function. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 12, p. 2831–2831, 2012.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. **Behavioural Brain Research**, v. 306, p. 1–7, 2016.

BENITO-LEÓN, J. et al. Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: A population-based cross-sectional study (NEDICES). **European Journal of Neurology**, v. 20, n. 6, p. 899-e77, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CASSILHAS, R. C. et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 202, p. 309–317, 2012.

CEFIS, M. et al. The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity. **Brain Structure and Function**, v. 224, p. 1975–1985, 2019.
CHO, J. A. et al. Exercise and Curcumin in Combination Improves Cognitive Function and Attenuates ER Stress in Diabetic Rats. [s.d.].

CLARO, R. M. et al. Consumo de alimentos não saudáveis relacionados a doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 257–265, 2015.

CROVETTO M, M. et al. Household availability of ready-to-consume food and drink products in Chile: impact on nutritional quality of the diet. **Revista médica de Chile**, v. 142, n. 7, p. 850–8, 2014.

DE MORAES, C. et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiology**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2008.

DE SENNA, P. N. et al. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats. **Brain Research**, v. 1618, p. 75–82, 2015.

DIENEL, G. A. Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 949–1045, 2019.

DINICOLANTONIO, J. J.; O'KEEFE, J. H.; LUCAN, S. C. Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences. **Mayo Clinic proceedings**, v. 90, n. 3, p. 372–381, 2015.

DONG, J. et al. Exercise improves recognition memory and synaptic plasticity in the prefrontal cortex for rats modelling vascular dementia. **Neurological Research**, v. 40, n. 1, p. 68–77, 2018.

EGGERMONT, L. H. P. et al. Cardiac disease and cognitive impairment: A systematic review. **Heart**, v. 98, n. 18, p. 1334–1340, 2012.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 65, p. 1–9, 2012.

GANCHEVA, S.; GALUNSKA, B.; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 5, p. 296–306, 2017.

GARCIA, N. F. et al. 7-week aerobic exercise training reduces adipocyte area and improves insulin sensitivity in Wistar rats fed a highly palatable diet. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 22, n. 1, p. 12–17, 2016.

GAWEL, K. et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 1, p. 1–18, 2019.

HAN, T. K.; LEEM, Y. H.; KIM, H. S. Treadmill exercise restores high fat diet-induced disturbance of hippocampal neurogenesis through β2-adrenergic receptor-dependent induction of thioredoxin-1 and brain-derived neurotrophic factor. **Brain Research**, v. 1707, n. July 2018, p. 154–163, 2019.

HUSSAIN, Y.; JAIN, S. K.; SAMAIYA, P. K. Short-term westernized (HFFD) diet fed in adolescent rats: Effect on glucose homeostasis, hippocampal insulin signaling, apoptosis and related cognitive and recognition memory function. **Behavioural Brain Research**, v. 361, n. August 2018, p. 113–121, 2019.

JACQUES, A. et al. The impact of sugar consumption on stress driven, emotional and addictive behaviors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 103, n. March, p. 178–199, 2019.

KIM, S. et al. Sucrose withdrawal induces depression and anxiety-like behavior by Kir2.1 upregulation in the nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 130, p. 10–17, 2018.

KLEIN, A. V.; KIAT, H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: A review. **Journal of Hypertension**, v. 33, n. 5, p. 912–920, 2015.

KOEPSELL, H. Glucose transporters in brain in health and disease. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 472, n. 9, p. 1299–1343, 2020.

KOYUNCUOĞLU, T. et al. High intensity interval training protects from Post Traumatic Stress Disorder induced cognitive impairment. **Behavioural Brain Research**, v. 397, n. April 2020, 2021.

KUIPERS, H. et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, n. 4, p. 197–201, 1985.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2013.
LEEUWIS, A. E. et al. Lower cerebral blood flow is associated with impairment in multiple cognitive domains in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 13, n. 5, p. 531–540, 2017.

LÉPINAY, A. L. et al. Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 82–93, 2015.

LOUZADA, M. L. DA C. et al. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 49, p. 1–11, 2015.

MARIN BOSCH, B. et al. Effect of acute physical exercise on motor sequence memory. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

MARWITZ, S. E.; WOODIE, L. N.; BLYTHE, S. N. Western-style diet induces insulin insensitivity and hyperactivity in adolescent male rats. **Physiology and Behavior**, v. 151, p. 147–154, 2015.

MONTEIRO, C. A. et al. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: Evidence from Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 5–13, 2011.

MORLAND, C. et al. ARTICLE Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

OHAROMARI, L. K. et al. Exercise training and taurine supplementation reduce oxidative stress and prevent endothelium dysfunction in rats fed a highly palatable diet. **Life Sciences**, v. 139, p. 91–96, 15 out. 2015.

OLVER, T. D. et al. Carotid Artery Vascular Mechanics Serve as Biomarkers of Cognitive Dysfunction in Aortic-Banded Miniature Swine That Can Be Treated With an Exercise Intervention. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 5, p. 1–11, 2016.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R. Effects of Physical Exercise in the Ampkα Expression and Activity in High-fat Diet Induced Obese Rats. v. 15, n. 3, p. 98–103, 2009.

REBELO, M. A. et al. Moderate-intensity exercise training improves long-term memory in fructose-fed rats. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 26, n. 4, p. 1–8, 2020.

ROCHETTE, A. D. et al. Mild Cognitive Impairment is Prevalent in Persons with Severe Obesity Amber. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

SCHAEFER, E. J.; GLEASON, J. A.; DANSINGER, M. L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 6, p. 1257–1262, 2009.

SCHMIDT, W. et al. Train the vessel, gain the brain: Physical activity and vessel function and the impact on stroke prevention and outcome in cerebrovascular disease. **Cerebrovascular Diseases**, v. 35, n. 4, p. 303–312, 2013.

SHAO, X. et al. Uric acid induces cognitive dysfunction through hippocampal inflammation in rodents and humans. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 43, p. 10990–11005, 2016.

SHIMA, T. et al. Moderate exercise ameliorates dysregulated hippocampal glycometabolism and memory function in a rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 3, p. 597–606, 2017.

SKRIVER, K. et al. Acute exercise improves motor memory: Exploring potential biomarkers. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 116, p. 46–58, 2014.

SZABLEWSKI, L. Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 55, n. 4, p. 1307–1320, 2017.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 266–270, 1999.

VILELA, T. C. et al. Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7928–7937, 2017.

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

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: A systematic review of current systematic reviews. **Current Opinion in Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 541–556, 2017.

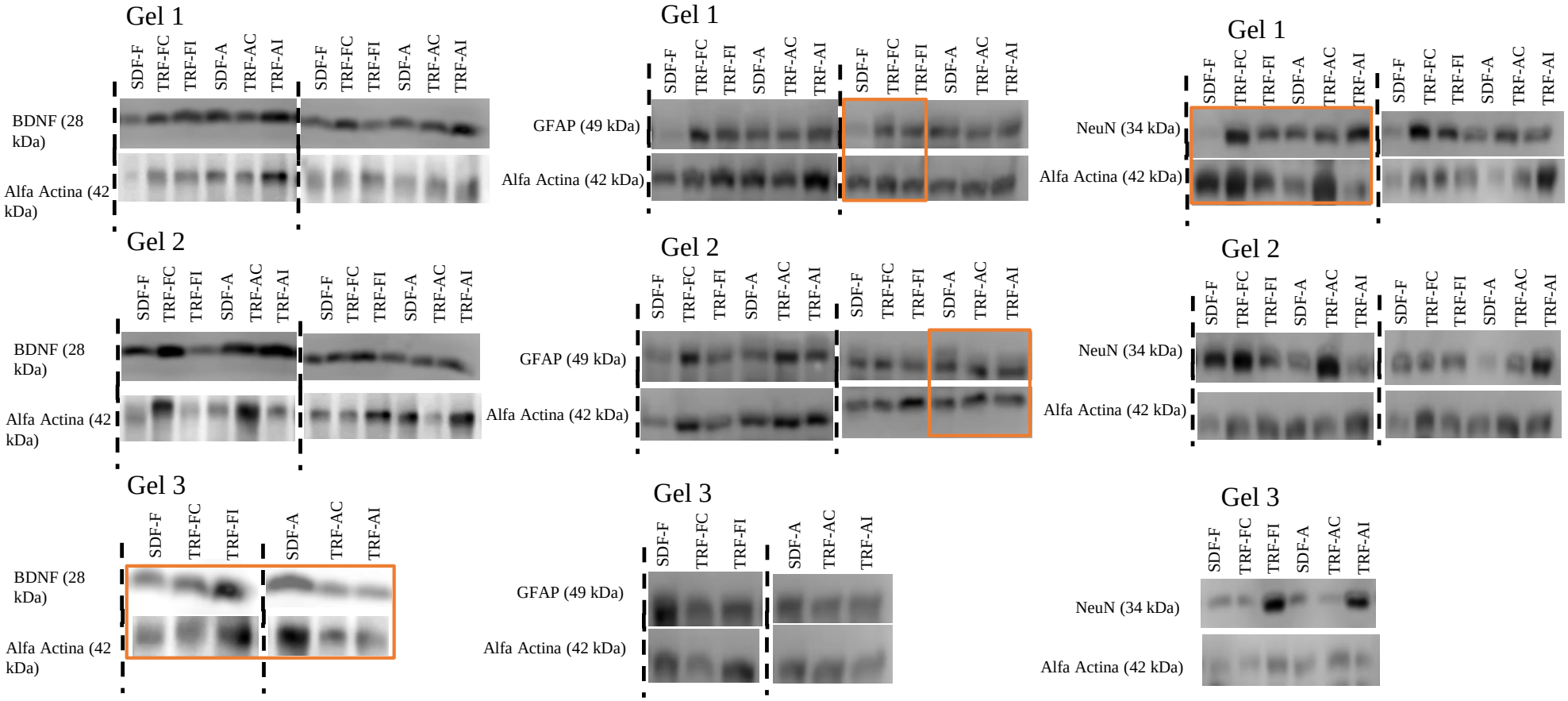
WOO, J. et al. Effects of exercise and diet change on cognition function and synaptic plasticity in high fat diet induced obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

WU, H.-W. et al. A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male Sprague-Dawley rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 323–328, 2015.

ZOBEL, E. H. et al. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. **Current obesity reports**, v. 5, n. 4, p. 449–455, 2016.

ANEXOS

Arquivo suplementar da análise de western blot.



Fotos representativas circulados de vermelho, tracejados representam cortes de bandas não pertencentes ao presente trabalho que foram retiradas.