

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

EFEITOS BIOMOLECULARES DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DISFUNÇÃO NA  
VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM HIPOCAMPO DE RATOS  
ENVELHECIDOS

Gabriel Keine Kuga

RIO CLARO

2018

GABRIEL KEINE KUGA

EFEITOS BIOMOLECULARES DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DISFUNÇÃO NA  
VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM HIPOCAMPO DE RATOS  
ENVELHECIDOS

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências da Motricidade.

Orientador: Leandro Pereira de Moura

RIO CLARO

2018

301.435 Kuga, Gabriel Keine  
K95e Efeitos biomoleculares do exercício físico sobre a  
disfunção na via de sinalização da insulina em hipocampo de  
ratos envelhecidos / Gabriel Keine Kuga. - Rio Claro, 2018  
51 f. : il., figs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Leandro Pereira de Moura

1. Envelhecimento. 2. PTP1B. 3. Hipocampo. 4. Insulina.  
5. BDNF. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

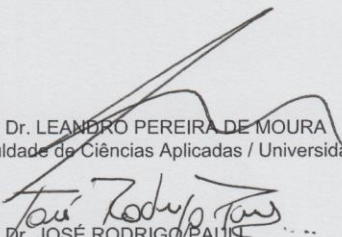
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS BIOMOLECULARES DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A DISFUNÇÃO NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM HIPOCAMPO DE RATOS ENVELHECIDOS

**AUTOR: GABRIEL KEINE KUGA**

**ORIENTADOR: LEANDRO PEREIRA DE MOURA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE , área: BIODINAMICA DA MOTRICIDADE HUMANA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEANDRO PEREIRA DE MOURA  
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas - Limeira / SP

  
Prof. Dr. JOSÉ RODRIGO PAUL  
Curso de Ciências do Esporte - Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas - Limeira - SP

Prof. Dr. JULIO WILSON DOS SANTOS  
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - SP

Rio Claro, 24 de julho de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício por todo suporte durante a realização do período experimental, sem os quais seria impossível a finalização deste experimento. Agradeço especialmente aos colaboradores Rafael Gaspar e Vitor Muñoz pela amizade e pela parceria.

Agradeço ao PPG em Ciências da Motricidade e a CAPES pelo apoio.

Agradeço muito aos Professores Dennys Cintra e Eduardo Ropelle por abrirem as portas de seus laboratórios e fornecerem condições de pesquisa de primeira linha. Agradeço da mesma maneira a meu orientador Prof. Leandro Pereira de Moura pela orientação e por toda ajuda para o desenvolvimento desta dissertação. Faço um agradecimento muito especial ao Prof. José Rodrigo Pauli por todo ensinamento durante os últimos anos e por dar todas as melhores condições para seus alunos exercerem atividades de pesquisa. Todos os alunos do LaBMEx/LabGeN são muito gratos pelas oportunidades e orientação que tem.

Agradeço com muito carinho ao Prof José Alexandre Curiacos de Almeida Leme por ter me guiado na transição entre a graduação e o mestrado e sempre dar um suporte quando necessário. É muito feliz saber que vamos construindo sobretudo amizades ao longo desta jornada.

Agradeço à Bruna por sempre estar a meu lado ser o porto seguro nos momentos de dificuldade.

Finalmente, agradeço a meus pais pelo ensinamento de que com trabalho e persistência qualquer sonho se torna realidade. Agraço muito a eles pelo exemplo e por todo incentivo que sempre tive.

Obrigado.

## RESUMO

A insulina e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo promovem a plasticidade sináptica e a formação da memória no hipocampo. Por outro lado, o envelhecimento está relacionado ao declínio cognitivo e é o principal fator de risco para a doença de Alzheimer (DA). No entanto, a comunidade científica tem feito grande esforço para elucidar os mecanismos moleculares responsáveis pela patogênese da DA que são disparados pelo envelhecimento. A Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B) está relacionada a vários processos deletérios nos neurônios e pode ser alvo promissor para novas terapias, e também regulada pelo exercício físico. Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo investigar as alterações relacionadas com o envelhecimento sobre o conteúdo de PTP1B, sinalização da insulina e conteúdo de  $\beta$ -amilóide no hipocampo de ratos de meia-idade, bem como o possível efeito terapêutico do exercício físico. Ratos Wistar jovens (3 meses de idade) e de meia-idade (sedentários e exercitados) (17 meses de idade) foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM), ao teste de tolerância à glicose e à análise molecular do tecido hipocampal através da técnica de *Western Blot*. Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) *one-way* com nível de significância estabelecido abaixo de 0,05. Os ratos realizaram protocolo de exercício físico de natação durante 5 dias consecutivos, com 2 horas de duração por dia. Através dos resultados, verificou-se que o envelhecimento resultou em aumento do peso corporal e intolerância à glicose, bem como diminuiu o processo de aprendizagem no MWM. Observou-se também que os ratos de meia-idade têm níveis mais altos de PTP1B, e isso está relacionado a menor fosforilação de Substrato do Receptor de Insulina-1 (IRS-1), Proteína Kinase B (Akt), Glicogênio Sintase Kinase  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), e Receptor Tirosina Kinase Beta (TrkB). Além disso, o processo de envelhecimento aumentou o conteúdo  $\beta$ -amilóide no hipocampo. Por outro lado, o exercício físico foi eficiente em melhorar a tolerância à glicose e o desempenho no MWM, bem como em restaurar a fosforilação da Akt e reduzir o conteúdo de  $\beta$ -amilóide. Em conclusão, este estudo fornece novas evidências de que o conteúdo de PTP1B no hipocampo está aumentada com o envelhecimento e isto está relacionado com alterações cognitivas, e, por outro lado, o exercício físico atenua esse processo em ratos envelhecidos.

**Palavras-chave:** PTP1B; Hipocampo; Insulina; Envelhecimento; BDNF.

## ABSTRACT

The insulin and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) signaling in the hippocampus promote synaptic plasticity and memory formation. On the other hand, aging is related to the cognitive decline and is the main risk factor for Alzheimer's Disease (DA). Nevertheless, a great effort has been made by the scientific community to elucidate the molecular mechanism of aging-related DA pathogenesis. The Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) is related to several deleterious processes in neurons and emerges as a promising target for new therapies, like as physical exercise. In this context, our study aims to investigate the age-related changes in hippocampal PTP1B content, insulin signaling,  $\beta$ -amyloid content in the hippocampus of middle-aged rats, and the possible therapeutic effect of exercise. Young (3 months-old) and Middle-aged (17 months-old) Wistar rats were submitted to Morris-water maze (MWM) test, glucose tolerance test, and to molecular analysis in the hippocampus. The rats performed a 2-hour swim physical exercise protocol for 5 consecutive days. Aging resulted in increased body weight, and glucose intolerance and decreases learning process in MWM. Interestingly, the Middle-Aged rats have higher levels of PTPB, and this is related to lower phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1), Protein Kinase B (Akt), Glycogen Syntase Kinase  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), and Tyrosine Kinase Receptor Beta (TrkB). Also, the aging process increased  $\beta$ -amyloid content in the hippocampus. On the other hand, the physical exercise was efficient to improve glucose tolerance and MWM performance, as well as to restore Akt phosphorylation and reduce  $\beta$ -amyloid content. In conclusion, this study provides new evidence that PTP1B content in the hippocampus is increased with aging and this is related to cognitive alterations, and physical exercise can attenuate this process in middle-aged rats.

**Key-words:** PTP1B; Hippocampus; Insulin; Aging; BDNF.

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
Figura 1 .....	17
Figura 2 .....	26
Figura 3 .....	27
Figura 4 .....	29
Figura 5 .....	32
Figura 6 .....	33
Figura 7 .....	34
Figura 8 .....	35
Figura 9 .....	35
Figura 10 .....	41



## LISTA DE ABREVIÇÕES

Akt: Proteína Kinase B

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

AMPK: Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

APP: Proteína precursora de amilóide

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CREB: Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc

DA: Doença de Alzheimer

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

eIF2 $\alpha$ : fator de iniciação da tradução subunidade alfa

GSK3 $\beta$ : Glicogênio Sintase Kinase Beta

GTT: Teste de Tolerância à Glicose

IDE: Enzima Degradadora de Insulina

IKK: i Kappa B Kinase

I $\kappa$ B: Inibidor Kappa B

IL1 $\beta$ : Interleucina 1-beta

IR: Receptor de Insulina

IRS-1: Substrato do Receptor de Insulina tipo 1

IRS-2: Substrato do Receptor de Insulina tipo 2

JNK: c-Jun n-Terminal Kinase

MWM: Labirinto Aquático de Morris

NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa B

Pi3k: fosfatidilinositol 3-Kinase

PKR: Proteína Kinase Dependente de RNA

PTP1B: Proteína tirosina fosfatase 1B

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TrkB: Receptor tirosina Kinase beta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

®: Registrado

**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
INTRODUÇÃO .....	11
REVISÃO DE LITERATURA .....	13
JUSTIFICATIVA .....	22
HIPÓTESE .....	23
OBJETIVO .....	24
MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
RESULTADOS .....	31
DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS .....	43
ANEXO A .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA) e o hipocampo é uma estrutura severamente afetada nesta condição (FJELL et al., 2014; KAWAS et al., 2000). Mais especificamente, estudos recentes demonstraram que o processo patogênico envolvido na DA induzida pelo envelhecimento envolve a resistência à insulina no hipocampo (DE LA MONTE; WANDS, 2008; LOURENCO et al., 2013; VIEIRA et al., 2017). O declínio cognitivo e a neurodegeneração, processos associados ao envelhecimento, estão ligados ao mecanismo de inflamação, que consiste em níveis aumentados de proteínas inflamatórias como a interleucina-1beta (IL1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (FRANCESCHI et al., 2000; GIUNTA et al., 2008). Desta forma, a inflamação conecta a interrupção da sinalização de insulina no hipocampo ao mecanismo molecular patogênico da DA (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

O conhecimento dos principais fatores responsáveis pela resistência à insulina no hipocampo é de grande interesse para a comunidade científica. Vários estudos demonstraram que o processo inflamatório induz aumento do conteúdo de Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B) em sítios importantes de sinalização de insulina, como o músculo esquelético (ROPELLE et al., 2006), fígado (DE MOURA et al., 2013a) e hipotálamo (MORRISON et al., 2007). Este estímulo inflamatório aumenta o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , que ativam seus receptores e estimulam a sinalização da via da I Kappa B Kinase (IKK) (SONG et al., 2016; ZABOLOTNY et al., 2008). Uma vez ativada, a IKK fosforila o inibidor Kappa B (I $\kappa$ B), liberando o Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) para se translocar ao núcleo celular e se ligar ao DNA, exercendo sua atividade transcricional de genes inflamatórios, dentre eles o gene da PTP1B (LOVATEL et al., 2013; SONG et al., 2016; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015; ZABOLOTNY et al., 2008). Por sua vez, a PTP1B é uma das principais fosfatases de resíduos de tirosina do Receptor de Insulina (IR), do Substrato de IR-1 (IRS-1) e do Receptor Tirosina Kinase B (TrkB) (OZEK et al., 2014; ROPELLE et al., 2006; VIEIRA et al., 2017).

Por outro lado, o exercício físico tem se mostrado capaz de atenuar o processo inflamatório no hipocampo (LOVATEL et al., 2013). Os mecanismos através dos quais o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina em órgãos da periferia do organismo são bem descritos na literatura (BRANDT; PEDERSEN, 2010; DE MOURA et al., 2013b; JESSEN; GOODYEAR, 2005; PAULI et al., 2009a; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008; PEREIRA et al.,

2017; STANFORD; GOODYEAR, 2014). Entretanto, é mais recente o progresso para desvendar os mecanismos terapêuticos e profiláticos do exercício físico nas funções hipocâmpais e seu consequente papel neuroprotetor na DA (INTLEKOFER; COTMAN, 2013). Vários estudos demonstraram que o exercício físico é capaz de aumentar a expressão e conteúdo de Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo (AGUIAR et al., 2008, 2010, 2011; SOYA et al., 2007), promovendo importantes efeitos sobre a memória e cognição. Especificamente sobre a PTP1B, já é conhecido que o exercício físico é capaz de reduzir o conteúdo de PTP1B em outros tecidos, como como o músculo esquelético (ROPELLE et al., 2006) e o fígado (DE MOURA et al., 2013a). Entretanto, ainda não se sabe se o exercício físico é capaz de modular o conteúdo de PTP1B no hipocampo, apesar de ser bem estabelecido seu papel protetor sobre os mecanismos moleculares decorrentes da resistência à insulina no hipocampo (DIEGUES et al., 2014; LIU et al., 2013; UM et al., 2011).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.2 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal forma de manifestação de demência (GOMES et al., 2009) e sua prevalência é maior na população idosa (DE FELICE; FERREIRA, 2014). A estimativa do ano de 2015 é de que as demências acometam cerca de 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo e a projeção é que este número dobre a cada 20 anos, atingindo o patamar de 74 milhões em 2030 e 131 milhões em 2050 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2015). Neste mesmo ano, espera-se que pelo menos 100 milhões de pacientes sejam exclusivamente portadores da DA (BROOKMEYER et al., 2007; INTLEKOFER; COTMAN, 2013). O custo anual do tratamento para as demências é projetado em aproximadamente 818 bilhões de dólares. Este custo inclui despesas hospitalares, serviços de atendimento e gastos pessoais, e espera-se que este valor atinja 2 trilhões em 2030 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2015). Este custo exorbitante é causado pela não existência de cura ou tratamento eficiente para retardar o progresso da DA. Apesar de interessantes resultados encontrados em roedores, os avanços ainda são lentos por conta das dificuldades encontradas pela comunidade científica na translação entre espécies (DE FELICE; MUNOZ, 2016).

A neuropatologia da DA é caracterizada pela formação de oligômeros de proteína  $\beta$ -amilóide, perda e disfunção sináptica, inflamação neuronal, fosforilação da proteína tau e formação de emaranhados neurofibrilares (DE FELICE; MUNOZ, 2016; GOMES et al., 2009). Por outro lado em neurônios do hipocampo, a insulina e fatores de crescimento, como BDNF (brain derived neurotrophic factor), IGF-1 e 2 (insulin-like growth factors 1 and 2) e VEGF (vascular endothelial growth factor), transmitem o sinal intracelular para a sobrevivência neuronal e modulam o metabolismo de proteínas envolvidas na gênese da DA. Em condições normais, a insulina e os fatores de crescimento atuam adequadamente e atenuam este processo patológico da DA. Quando a insulina e os fatores de crescimento são impedidos de exercer adequadamente seu papel, é estabelecida condição favorável para o desenvolvimento da DA.

Por outro lado, o exercício físico tem se mostrado capaz de atenuar o processo inflamatório no hipocampo (LOVATEL et al., 2013). Os mecanismos através dos quais o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina em órgãos da periferia do organismo são bem descritos na literatura (PAULI et al., 2009a). Entretanto, é mais recente o progresso para desvendar os mecanismos terapêuticos e profiláticos do exercício físico nas funções

hipocampais e seu consequente papel neuroprotetor na DA (INTLEKOFER; COTMAN, 2013).

## **2.2 Sinalização da Insulina e Inflamação no Hipocampo**

A insulina e o BDNF desempenham um papel neurogênico, sinaptogênico e promotor da formação da memória no hipocampo (AGUIAR et al., 2011; HU; RUSSEK, 2008; TAKEDA et al., 2011; VIEIRA et al., 2017). A insulina exerce sua sinalização intracelular através da ligação com o receptor de insulina (IR). O IR é constituído por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , com ligações dissulfeto. A ligação da insulina com a subunidade  $\alpha$  induz mudança conformacional do receptor e também estimula a atividade tirosina kinase da subunidade  $\beta$ . A subunidade  $\beta$  possui atividade tirosina kinase intrínseca, ou seja, possui a capacidade de fosforilar a si próprio e outros substratos em tirosina. Os principais substratos fosforilados pelo IR são os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) que, neste caso, criam sítios de ligação para a enzima fosfatidilinositol 3-kinase (Pi3k) ativando-a; uma vez ativada, esta fosforila seus substratos, sendo um dos principais a Proteína Kinase B (Akt), mediadora do sinal protetor da insulina sobre o processo patogênico da DA (DE FELICE; LOURENCO; FERREIRA, 2014; DE LA MONTE; WANDS, 2008; DIEGUES et al., 2014; TAKEDA et al., 2011; VIEIRA et al., 2017).

A nível molecular, a sinalização adequada da insulina no hipocampo desliga várias proteínas envolvidas no mecanismo molecular da DA (TAKEDA et al., 2011; VIEIRA et al., 2017). Uma proteína essencial para a sinalização de insulina no hipocampo é a Glicogênio Sintase Kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ), que é fosforilada e inativada através da via da Pi3k/Akt (TAKEDA et al., 2011). Quando ativada, a GSK3 $\beta$  é responsável pela fosforilação de Tau. Uma característica do DA é a hiperfosforilação de Tau e a consequente formação dos emaranhados neurofibrilares (TAKEDA et al., 2011). Em condições normais, a Tau contribui para estabilização do citoesqueleto neuronal, entretanto sua ativação prolongada leva a um quadro de hiperfosforilação e formação de emaranhados neurofibrilares, resultando em processo de apoptose neuronal (HAMPEL et al., 2010; TALBOT et al., 2012). Além disso, o aumento da insulina circulante compete com  $\beta$ -amilóide por degradação pela Enzima Degradora de Insulina (IDE) (QIU et al., 1998; QIU; FOLSTEIN, 2006; TAKEDA et al., 2011). Outra característica da DA é o acúmulo de oligômeros de proteína  $\beta$ -amilóide, que, por sua vez, inibem a sinalização da insulina no hipocampo e exercem um efeito sinaptotóxico (LOURENCO et al., 2013).

Uma das principais causas desta deficiência na ação da insulina é a inflamação de baixo grau, que consiste em um processo através do qual ocorrem eventos moleculares que reduzem a capacidade da insulina de propagar seu sinal intracelular, culminando em um estado de resistência à insulina. A resposta compensatória do organismo à reduzida ação da insulina consiste nos quadros crônicos de hiperinsulinemia (MEHRAN et al., 2012), fornecendo a base para a instauração do quadro de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Verificou-se que a DA apresenta características em comum com DM2, o que levou alguns pesquisadores a anunciar o DA como Diabetes tipo 3: a deficiência da ação da insulina e a diminuição de fatores de crescimento estão intimamente associados à neurodegeneração típica da DA (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Durante o processo inflamatório no hipocampo são encontrados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (LOVATEL et al., 2013). Um fator que está altamente relacionado com o aumento destas citocinas é o envelhecimento (CHUNG et al., 2009; LOVATEL et al., 2013), caracterizando a condição denominada *inflamm-aging* (FRANCESCHI et al., 2000; GIUNTA et al., 2008), o que é compreensível pelo fato da DA apresentar prevalência elevada na população idosa (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2015). Quando estas citocinas se ligam a seus receptores desencadeiam cascatas de sinalizações ativadoras das proteínas JNK (c-Jun N-terminal quinase) e IKK, que possuem a propriedade de inibir a sinalização da insulina e agravar o processo inflamatório por aumentar a transcrição de genes inflamatórios (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015).

A JNK é uma serina quinase ativada pela ligação do TNF $\alpha$  com seu receptor ou através da ativação do Receptor Toll-Like 4 por lipopolissacarídeos e alguns tipos de ácidos graxos livres (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Quando ativada por estas vias, a JNK promove a fosforilação em serina<sup>307</sup> do IRS-1, desligando etapas chaves de sua cascata de sinalização e constituindo um dos principais mecanismos de resistência à insulina (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Outra ação da JNK é a ativação do fator de transcrição de genes inflamatórios AP1 (VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). A análise *post-mortem* de cérebros de pacientes diagnosticados com DA revelou aumento da fosforilação em serina do IRS-1 e da expressão da JNK da mesma maneira que em pacientes com DM2 (BOMFIM et al., 2012). Foi demonstrado que tanto oligômeros da proteína  $\beta$ -amilóide (BOMFIM et al., 2012) como a dieta rica em gorduras saturadas e ômega-6 podem ativar a JNK em neurônios hipocampais (MA et al., 2009), com conseqüente aumento da fosforilação em serina<sup>307</sup> de IRS-1 e proteína tau, sendo este um mecanismo através do qual o acúmulo de oligômeros de  $\beta$ -amiloide e a obesidade podem



promover a neurodegeneração característica da DA em decorrência da redução da ação da insulina sobre a sobrevivência neuronal. Embora o processo de envelhecimento esteja associado com aumento da inflamação, esta situação é ainda pior em idosos que desenvolvem obesidade.

Outra proteína mediadora da resistência à insulina é a IKK. Quando ativada pelas cascatas de sinalização dos receptores de TNF $\alpha$  e Receptor Toll-Like 4, o IKK cliva o complexo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$  $\beta$  (CHUNG et al., 2009). A clivagem deste complexo libera o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que migra para o núcleo celular e inicia a transcrição de proteínas como TNF $\alpha$  e IL1- $\beta$  (CHUNG et al., 2009; LOVATEL et al., 2013; VELLOSO; FOLLI; SAAD, 2015). Além disso, a IKK também é capaz de promover a fosforilação em serina do IRS-1 em neurônios hipocampais mediante ativação por oligômeros de proteína  $\beta$ -amilóide (BOMFIM et al., 2012). O envelhecimento contribui para maior ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no hipocampo, podendo ser um dos fatores através dos quais a DA se manifesta principalmente na população idosa (LOVATEL et al., 2013).

Um dos principais genes inflamatórios transcritos a partir da atividade do NF- $\kappa$ B é o da PTP1B. Por sua vez, a PTP1B é uma das principais fosfatases de resíduos de tirosina do IR, IRS-1 e TrkB, inibindo a sinalização intracelular da insulina e do BDNF (OZEK et al., 2014; ROPELLE et al., 2006; VIEIRA et al., 2017). Apesar disso, ainda existem poucas evidências sobre o papel da PTP1B no hipocampo. Camundongos com deleção da PTP1B seletivamente no hipocampo apresentam um processo de aprendizado aumentado, avaliado pelo teste *Barnes Maze* (FUENTES et al., 2012), indicando o papel desta proteína como um regulador negativo da memória (VIEIRA et al., 2017). Esses achados sugerem que o PTP1B pode ser responsável pela resistência à insulina do hipocampo, por déficits na consolidação da memória e pelo processo patogênico do DA (VIEIRA et al., 2017). Esta via de sinalização está esquematizada na Figura 1.



capacidade da insulina de exercer seu efeito neuroprotetor e as consequências são acúmulo de oligômeros de proteína  $\beta$ -amiloide, hiperfosforilação da proteína tau e apoptose neuronal, criando as condições favoráveis para a gênese da DA.

### **2.3 Efeitos do Exercício Físico sobre a sinalização da insulina e inflamação no hipocampo**

Os efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina tem sido mais amplamente investigados na literatura nas últimas décadas. Na periferia, o exercício físico estimula a captação de glicose por via independente da insulina, através da ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (PAULI et al., 2009b). Além disso, o exercício também reduz a atividade das serinas quinase JNK e IKK (PAULI et al., 2010), atenuando a inflamação subclínica e os efeitos deletérios destas proteínas sobre a via de sinalização da insulina. Entretanto, no sistema nervoso central são diferentes os mecanismos através dos quais ocorre a resposta ao exercício físico. Diversos resultados demonstraram como resultado benéfico do exercício físico a melhoria da plasticidade sináptica e cognição (DIEGUES et al., 2014; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004), regulação da produção e degradação de neurotransmissores (GLIGOROSKA; MANCHEVSKA, 2012), angiogênese (VAN DER BORGHT et al., 2009) e neurogênese (NOKIA et al., 2016). Apesar dos mecanismos moleculares responsáveis por estes eventos não estarem totalmente elucidados, acredita-se que o aumento da produção e sensibilidade a fatores de crescimento, como BDNF, sejam fatores mediadores deste processo (GOMES et al., 2009; LOU et al., 2008; NOKIA et al., 2016; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Diegues e colaboradores (DIEGUES et al., 2014) realizaram estudo investigando os mecanismos moleculares do treinamento físico em ratos Wistar diabéticos submetidos ao treinamento físico. Após a indução do diabetes por administração de Aloxana, estes pesquisadores encontraram prejuízo no desempenho do labirinto aquático de Morris (teste de memória espacial) nos ratos diabéticos sedentários em relação aos diabéticos submetidos ao treinamento físico (6 semanas de natação, 1 hora por dia durante 5 dias na semana e com o animal suportando carga correspondente a 90% do limiar anaeróbio). Em análises de amostras de hipocampo, eles ainda verificaram aumento da fosforilação da isoforma Akt-2 nos grupos treinados, e também aumento da fosforilação da Akt-1 apenas no grupo diabético treinado.

Também encontraram aumento da fosforilação da proteína  $\beta$ -amilóide nos ratos diabéticos. Além disso, verificaram que o exercício físico reduziu tanto a expressão de proteína precursora de amilóide (APP) quanto a fosforilação da proteína tau, sendo esta uma consistente evidência acerca dos efeitos neuroprotetores do exercício físico em neurônios hipocampais e preventivo sobre a DA.

Em relação à DA, sabe-se que o envelhecimento é o principal fator de risco para sua patogênese (GIUNTA et al., 2008) e é de interesse da comunidade científica avaliar o possível protetor do exercício físico neste contexto. Em ratos *Wistar* idosos (24 meses) foi demonstrado que 5 semanas de exercício físico de esteira (4-6 minutos de corrida, 2 esforços por dia com velocidade de 10 m/min e intervalo de 1 min entre elas, 4 dias por semana) foi uma intervenção eficiente para aumentar a fosforilação da Akt e da proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB, importante fator de transcrição realizado com a formação da memória), além de aumentar o conteúdo e a expressão gênica de BDNF (AGUIAR et al., 2011). Este achado reforça o efeito neuroprotetor do exercício físico na condição de envelhecimento e as consequentes disfunções na sinalização da insulina no hipocampo. O BDNF, por sua vez, age ativando seu receptor TrkB, que possui atividade tirosina kinase intrínseca e ativa a via de sinalização Pi3k/Akt, contribuindo para a sobrevivência neuronal (OZEK et al., 2014).

A neuroproteção hipocampal mediada pelo exercício físico na DA foi alvo de investigação de um interessante estudo anterior (UM et al., 2011). Neste estudo, camundongos Tg-NSE/hPS2m (modelo transgênico de Alzheimer) realizaram treinamento físico durante 3 meses em esteira (5 dias por semana com duração diária de 60 minutos e velocidade de 12 m/min). Foi verificada redução do conteúdo proteico de  $\beta$ -amilóide e da fosforilação da Tau no hipocampo dos camundongos treinados. Também houve aumento da fosforilação de importantes proteínas da via da sobrevivência neuronal estimulada pela insulina, como Akt e GSK3- $\beta$ , além de elevação da expressão de BDNF. Através de ensaio *TUNEL*, verificaram que os animais treinados apresentaram menor fragmentação de DNA, indicando o efeito neuroprotetor do exercício físico. Estes resultados reforçam o relevante efeito do treinamento físico para atenuar ou até reverter a inflamação e apoptose de neurônios hipocampais presente na DA.

A ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B parece ter estreita relação com o envelhecimento, assim como o desenvolvimento da DA. Foi encontrada maior ativação do NF- $\kappa$ B em amostras de hipocampo de ratos *Wistar* com 20 meses de idade do que com 3 meses

(LOVATEL et al., 2013). Neste mesmo estudo, foi investigado o efeito de 2 semanas de exercício físico em esteira (20 minutos diários a 60% da intensidade estimada de consumo máximo de oxigênio do animal) sobre a ativação do NF- $\kappa$ B no hipocampo, e não houve diferença significativa entre animais com 3 meses de idade que praticaram ou não o exercício físico (LOVATEL et al., 2013). Entretanto, em ratos com 20 meses de idade e submetidos ao treinamento foi verificada menor ativação do NF- $\kappa$ B no hipocampo 1 hora após a última sessão de exercício em relação aos animais de mesma idade e que não treinaram (LOVATEL et al., 2013). Um dado a ser levado em consideração ao interpretar estes resultados é que foram utilizados ratos Wistar saudáveis, ou seja, não foram induzidos a obesidade, diabetes ou DA, sendo possível afirmar que o exercício físico parece atenuar a ativação do NF- $\kappa$ B no hipocampo induzida pelo envelhecimento. Futuros estudos são necessários para investigar os efeitos do exercício físico sobre a ativação do NF- $\kappa$ B no hipocampo de animais com DA em diferentes idades.

No hipocampo, são relevantes os efeitos do exercício físico sobre a sinalização da insulina e a neuroinflamação. O treinamento físico reduz a expressão de  $\beta$ -amilóide (UM et al., 2011) e fosforilação da tau (DIEGUES et al., 2014), proteínas classicamente fundamentais no desenvolvimento da DA. O aumento da fosforilação de proteínas chave da via da insulina no hipocampo, como a Akt, é um indício de que há efeito direto e positivo sobre a sobrevivência neuronal. Ainda, o exercício atua sobre a inflamação, reduzindo tanto a fosforilação de JNK como também a ativação de NF- $\kappa$ B e também a transcrição tanto de proteínas pró-inflamatórias como pró-apoptóticas. Por todas estas ações, é possível que o exercício físico ainda seja um método subestimado, embora promissor, de prevenção (atenuando os fatores de risco) e tratamento da DA. O mecanismo através do qual o exercício físico exerce efeito protetor está ilustrado na Figura 1.

Em estudo de meta-análise (HAMER; CHIDA, 2009), foi estimado que o exercício físico possa reduzir o risco de desenvolvimento da DA em até 45%, apesar das limitações de realizar esta quantificação devido à diversos protocolos de exercício físico utilizados entre os estudos revisados, uma vez que diferentes relações entre as variáveis relativas à prática do exercício físico como tipo, frequência, intensidade, duração e progressão podem produzir respostas fisiológicas e metabólicas diferentes.

O grande desafio da comunidade científica para os próximos anos é superar as dificuldades de translação entre espécies nos estudos envolvendo DA, elucidando os

mecanismos envolvidos na neuroproteção mediada pelo exercício físico em primatas e humanos e permitindo a obtenção de dados mais vez mais específicos para a consolidação desta ferramenta como forma de tratamento no intuito de reduzir ou até reverter a projeção de grande aumento do número de casos de DA nas próximas décadas.

### 3. JUSTIFICATIVA

A DA é a principal causa de demência e a projeção atual é de crescimento do número de pessoas acometidas pela doença nas próximas décadas, gerando um alto custo para os sistemas de saúde (BROOKMEYER et al., 2007; DE FELICE; FERREIRA, 2014; INTLEKOFER; COTMAN, 2013). O principal motivo para este fato é a falta de método preventivo ou terapêutico eficiente, pois ainda não se conhece totalmente quais são as causas da DA (BROOKMEYER et al., 2007; DE FELICE; FERREIRA, 2014; INTLEKOFER; COTMAN, 2013). Entretanto, sabe-se que o envelhecimento é o principal fator de risco para a gênese da DA (GIUNTA et al., 2008) e que o exercício físico parece ser uma interessante intervenção não-farmacológica para atenuar os prejuízos da doença (INTLEKOFER; COTMAN, 2013; STRANAHAN; MARTIN; MAUDSLEY, 2012). Sendo assim, é de grande interesse da comunidade científica investigar quais são os mecanismos que conectam o envelhecimento à patogênese da DA e se o exercício físico é eficiente em exercer efeito sobre estas vias de sinalização celular. Neste contexto, a PTP1B aparenta ser um interessante alvo terapêutico contra a DA (VIEIRA et al., 2017), mas não existem evidências na literatura sobre os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo desta proteína no hipocampo.

#### **4. HIPÓTESE**

O presente estudo tem por hipótese que o envelhecimento esteja associado com prejuízos na aprendizagem espacial, tolerância à glicose e sinalização hipocampal da insulina, bem como com aumento do conteúdo de PTP1B no hipocampo. Por outro lado, é esperado que o exercício físico seja eficiente em atenuar estas alterações deletérias provocadas pelo envelhecimento.



## **5. OBJETIVO**

### **5.1 Objetivo Geral**

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre a via molecular da insulina em hipocampo de ratos envelhecidos.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Analisar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o aprendizado através do Labirinto Aquático de Morris (MWM) em ratos jovens e de meia-idade;
- Avaliar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo de PTP1B no hipocampo de ratos jovens e de meia-idade;
- Determinar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina e do BDNF no hipocampo de ratos jovens e de meia-idade.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* jovens (3 meses) e de meia-idade (17 meses) para os procedimentos experimentais. Foi escolhido este período de 17 meses como meia-idade de acordo com estudos prévios que detalharam o ciclo vital de ratos (estima-se que seja em torno do equivalente de 50 anos de um humano), considerando que ratos podem viver até entre 36 e 48 meses (QUINN, 2005; SENGUPTA, 2013). Os ratos foram provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica sobre Ciência Animal de Laboratório (CEMIB) - Universidade de Campinas (UNICAMP), mantidos em gaiolas coletivas ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ciclo claro/escuro alterado a cada 12 horas, sendo alimentados com dieta padrão (Nuvilab®) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas, UNICAMP - Campinas-SP (n° 4257-1). O número de animais utilizados em cada experimento foi especificado nas legendas de cada figura. Os animais foram distribuídos entre os seguintes grupos experimentais: Ratos sedentários e com idade de 3 meses (JSed), Ratos sedentários e com idade de 17 meses (MISed) e Ratos exercitados com idade de 17 meses (MIExe). O cronograma experimental está ilustrado na Figura 2.

### 6.2 Desenho Experimental

Inicialmente, todos os animais foram adaptados ao meio líquido durante 4 dias. Nos dois primeiros dias de adaptação eles foram colocados em tanque de natação com água cobrindo aproximadamente metade do corpo. Nos próximos dois dias de adaptação, o volume de água do tanque foi aumentado gradativamente sem adição de sobrecarga ao corpo do animal, com duração entre 5 a 10 minutos para cada dia de adaptação. Então, os animais realizaram exercício físico de natação durante 4 sessões de 30 minutos com intervalo de 10 minutos entre cada sessão em cada dia de exercício, totalizando 2 horas de exercício por dia. Após um dia de descanso para todos os grupos (dia 5 do período experimental), foi iniciado o protocolo de exercício físico para o grupo MIExe (dia 6 do período experimental). No dia seguinte, foram iniciados os dias de aprendizado do Labirinto Aquático de Morris (MWM) (dias 7 a 10 do período experimental). No dia 11 do período experimental foi realizado o Teste de Retenção de Memória do MWM 16 horas após o final da sessão de exercício físico do dia anterior. No dia seguinte, foi realizada nova sessão de exercício físico para o grupo MIExe e descanso para os

demais grupos. Após 16 horas do final desta sessão de exercício físico, foi realizado o Teste de Tolerância à Glicose. No dia seguinte, novamente foi realizada sessão de exercício físico para o grupo MIExe e descanso para os demais grupos. Após 16 horas do final desta sessão de exercício físico foi realizada a extração tecidual para o início das análises moleculares.

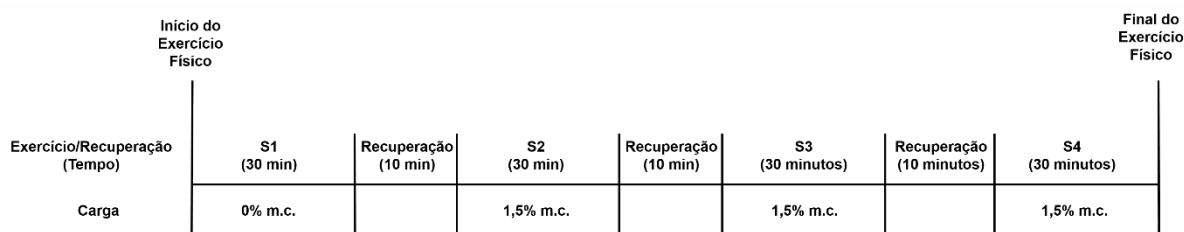
Grupo	Dias								
	1-4	5	6	7-10	11	12	13	14	15
JSed	Adaptação ao meio líquido	Descanso	Descanso	MWM	Teste de Retenção de Memória (MWM)	Descanso	Teste de Tolerância à Glicose	Descanso	Extração Tecidual
MISed	Adaptação ao meio líquido	Descanso	Descanso	MWM	Teste de Retenção de Memória (MWM)	Descanso	Teste de Tolerância à Glicose	Descanso	Extração Tecidual
MIExe	Adaptação ao meio líquido	Descanso	Exercício	MWM Exercício	Teste de Retenção de Memória (MWM)	Exercício	Teste de Tolerância à Glicose	Exercício	Extração Tecidual

**Figura 2.** Ilustração do cronograma do período experimental. Nos primeiros quatro dias experimentais, todos os animais realizaram adaptação ao meio líquido para posterior realização do Labirinto Aquático de Morris. Após descanso no quinto dia, os animais do grupo MIExe iniciaram o protocolo de exercício físico no sexto dia e continuaram até o décimo dia. Do sétimo até o décimo dia, todos os animais realizaram os dias 1 a 4 do Labirinto Aquático de Morris. No dia 11, foi realizado o Teste de Retenção de Memória do Labirinto Aquático de Morris com todos os animais. Nos dias 12 e 14, os animais dos grupos JSed e MISed descansaram, enquanto o grupo MIExe realizou exercício físico. No dia 13, todos os animais realizaram o Teste de Tolerância à Glicose. No dia 15 ocorreu a extração tecidual para realização das análises moleculares. Os testes de Retenção de Memória e de Tolerância à Glicose e a extração tecidual foram realizados 16 horas após o final do exercício físico no dia anterior. MWM, Labirinto Aquático de Morris.

### 6.3 Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício físico foi realizado durante o ciclo escuro (horário: 20h-22h30) e foi adaptado de um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (MUÑOZ et al., 2017b). A primeira sessão foi realizada sem sobrecarga e as próximas 3 sessões com adição de sobrecarga de 1,5% da massa corporal atada ao tórax do animal.

O tanque de natação continha área de 22 cm<sup>2</sup> para cada animal e 50 cm de profundidade, com a temperatura da água mantida constante em 32 °C. Foram realizados 5 dias consecutivos de exercício físico. Os 4 últimos dias de exercício foram paralelos com a realização do Labirinto Aquático de Morris (MWM), com o MWM sendo realizado no ciclo claro e o exercício físico no ciclo escuro. Todos os testes foram realizados 16h após o final do exercício físico por ter sido previamente demonstrado como um período adequado para analisar o efeito do exercício físico sobre a PTP1B (ROPELLE et al., 2006). Após 16h da última sessão de exercício, os animais foram submetidos ao Teste de Retenção de Memória. No dia seguinte, os animais realizaram nova sessão de exercício e 16h após o final desta sessão foi realizado o Teste de Tolerância à Glicose. No dia seguinte, foi realizada a sessão final de exercício físico e após 16h foi realizada a eutanásia para extração tecidual. O protocolo da realização do exercício físico está ilustrado na Figura 3.



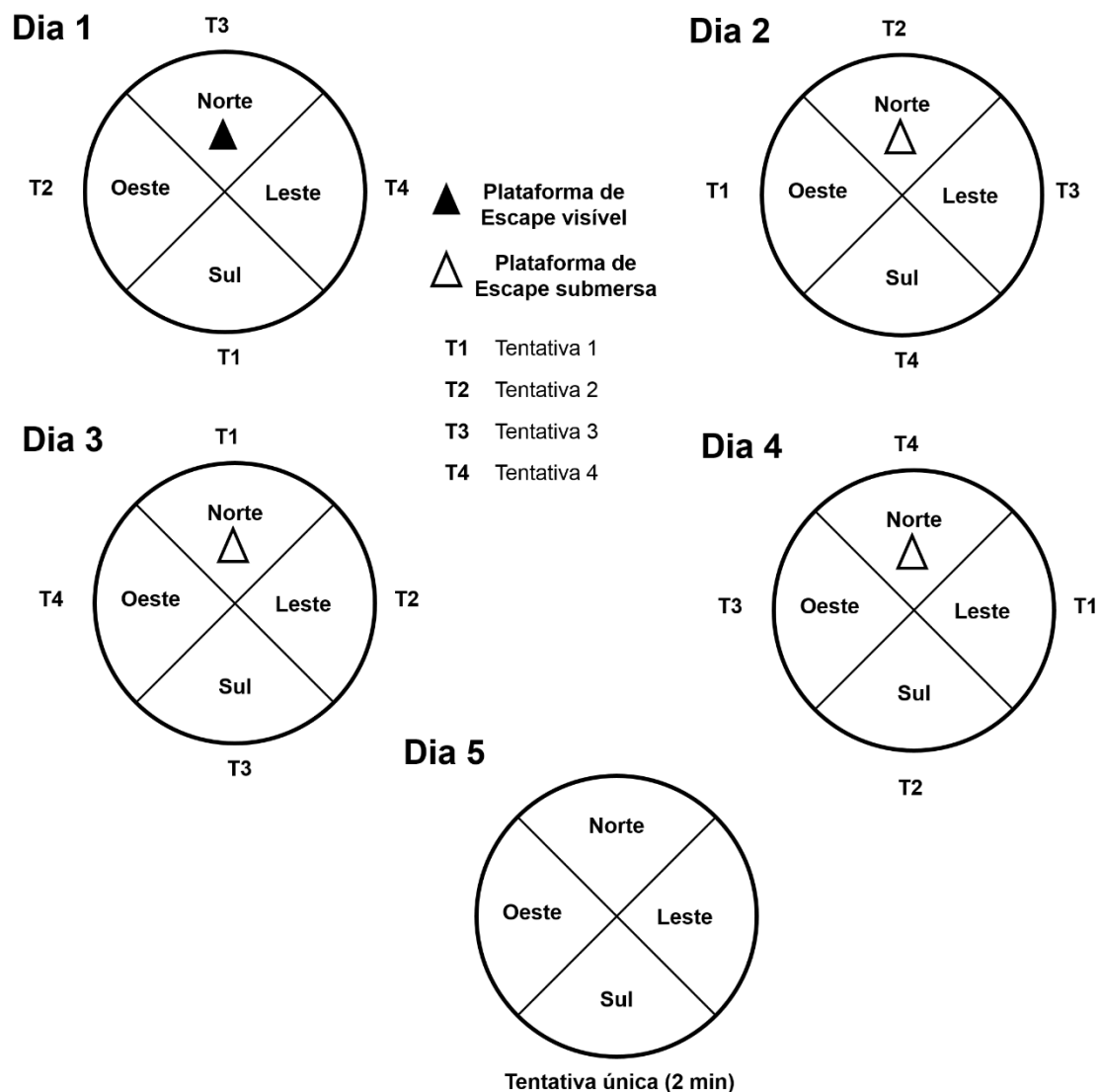
**Figura 3.** Ilustração referente ao protocolo realizado a cada dia de exercício físico. S1, Primeira sessão de exercício físico; S2, Segunda sessão de exercício físico; S3, Terceira sessão de exercício físico; S4, Quarta sessão de exercício físico; m.c., Massa corporal.

#### 6.4 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

O GTT foi realizado 16h após a realização da última sessão de exercício, com os animais permanecendo em jejum por 8h antes da realização do teste. Para tal, foi realizada coleta de sangue correspondente ao tempo 0 e logo após os animais receberam injeção intraperitoneal de solução de glicose 50% (2g/Kg de massa corporal) seguido de coleta de sangue aos 0, 30, 60 e 120 minutos. Os valores de glicemia obtidos durante o teste de GTT foram determinados com o equipamento *Accu-Check Active* (Roche®, Switzerland). A área sob a curva foi calculada pelo método trapezoidal de Mathews no software Microsoft® Excel 2007 (MATTHEWS et al., 1990).

### **6.5 Teste do Labirinto Aquático Morris (MWM)**

O protocolo do MWM foi adaptado de estudos anteriores (DIEGUES et al., 2014; LI et al., 2014) e foi realizado durante o ciclo claro. Utilizamos uma piscina circular (diâmetro: 2m, profundidade da água: 70 cm, temperatura da água  $25 \pm 1$  ° C) e uma plataforma de escape circular (diâmetro: 15 cm). Em primeiro lugar, os animais foram adaptados ao meio líquido durante cinco dias, da mesma maneira que os animais que praticaram o exercício físico já haviam sido adaptados conforme anteriormente descrito. Durante os quatro dias do teste, os animais realizaram quatro tentativas por dia (máximo de 60s cada) começando em todos os quadrantes (ou seja, sul, oeste, norte e leste) com a cabeça virada para a parede da piscina. A água foi mantida incolor no primeiro dia do teste e foi escurecida por adição de corante (cor preta) nos próximos dias. A plataforma de escape foi colocada no centro do quadrante norte e mantida 5 cm acima do nível de água no primeiro dia e 5 cm abaixo nos próximos dias. O tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma foi registrado (tempo de escape de latência). Se os animais não encontrassem a plataforma, eles foram gentilmente colocados sobre ela, permanecendo por 15 s. Para o teste de retenção de memória, a plataforma de escape foi retirada e os animais realizaram tentativa única com duração de 2 minutos, iniciando no quadrante Sul e sendo mensurado o tempo em que cada um permaneceu no quadrante Norte. O protocolo de realização do MWM está ilustrado na Figura 4.



**Figura 4.** Ilustração referente ao protocolo do Labirinto Aquático de Morris realizado.

## 6.6 Extração tecidual e análises de Western Blot

Após o período de jejum 8h e 16h após a realização da última sessão de exercício, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina (100 mg / kg) e xilazina (5 mg / kg). Após a perda de reflexos de retirada da pata, foi realizada abertura da cavidade abdominal do animal para exposição da veia porta, e foi injetada 0,2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo insulina ( $10^{-6}$  mol/L) através da veia porta hepática. Cinco minutos depois, a eutanásia foi realizada por decapitação, e o hipocampo foi extraído. A homogeneização do tecido com tampão de extração (DE MOURA et al., 2013a) foi realizada através do equipamento Tissue Lyser II (QIAGEN®) e após 40 minutos de agitação (4 °C) foi

realizada centrifugação (15 minutos, 4 °C, 12000 rpm) e coletado o sobrenadante (homogenato). Após a determinação da concentração de proteína do homogenato pelo método do *Bicinchoninic Acid* (BCA) (Sigma-Aldrich®), foi realizado preparo da amostra com adição de Laemmli e 100mM de DTT. O protocolo da corrida de gel (eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE), transferência e visualização de bandas [quimioluminescência e densitometria (UN-SCAN-IT® gel 6.1)] foram realizadas como descrito recentemente por nosso grupo de pesquisa (BOTEZELLI et al., 2016; MUÑOZ et al., 2017a). As membranas de nitrocelulose foram incubadas *overnight* a 4 °C com os seguintes anticorpos primários específicos: Santa Cruz Biotechnology = PTP1B (*rabbit*, sc-14021), pAKT<sup>s473</sup> (*rabbit*, sc-33437), Akt (*rabbit*, sc-8312), GSK3β (*rabbit*, sc-9166), BDNF (*rabbit*, sc-546), pTrkB<sup>y706</sup> (*rabbit*, sc-135645), TrkB (*rabbit*, sc-8316), β-amilóide (*mouse*, sc-374527); Cell Signaling Technology = GAPDH (*rabbit*, #2118), pGSK3β<sup>s9</sup> (*rabbit*, #5558s), Life Technologies = pIRS-1<sup>Y612</sup> (*rabbit*, #44816G). Após, foi realizada incubação com anticorpo secundário de acordo com a origem do anticorpo primário (diluição 1:2000 uL em solução BSA 5%; Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody [Cell Signaling Technology #7074]; donkey anti-mouse IgG-R sc-2300 [Santa Cruz Biotechnology]) por 1 hora, e logo depois realizado tratamento quimioluminescente para visualização das bandas.

## 6.7 Análise estatística

Foi realizada anova *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey entre os grupos para análise dos dados de Massa Corporal, GTT (uma análise a cada ponto de tempo), AUC GTT, Teste do Labirinto Aquático de Morris (uma análise a cada dia, considerando para cada animal a média das tentativas de cada dia), Teste de Retenção de Memória e também para as quantificações das bandas de Western Blot de cada proteína. Foi realizado Teste de Correlação de Pearson entre a quantificação das bandas de PTP1B e o tempo que o respectivo animal permaneceu no quadrante Norte durante o Teste de Retenção de Memória do MWM. O nível de significância foi estabelecido em abaixo de 0,05. O software *GraphPad Prism 6.0*® foi utilizado para as análises e construção dos gráficos.

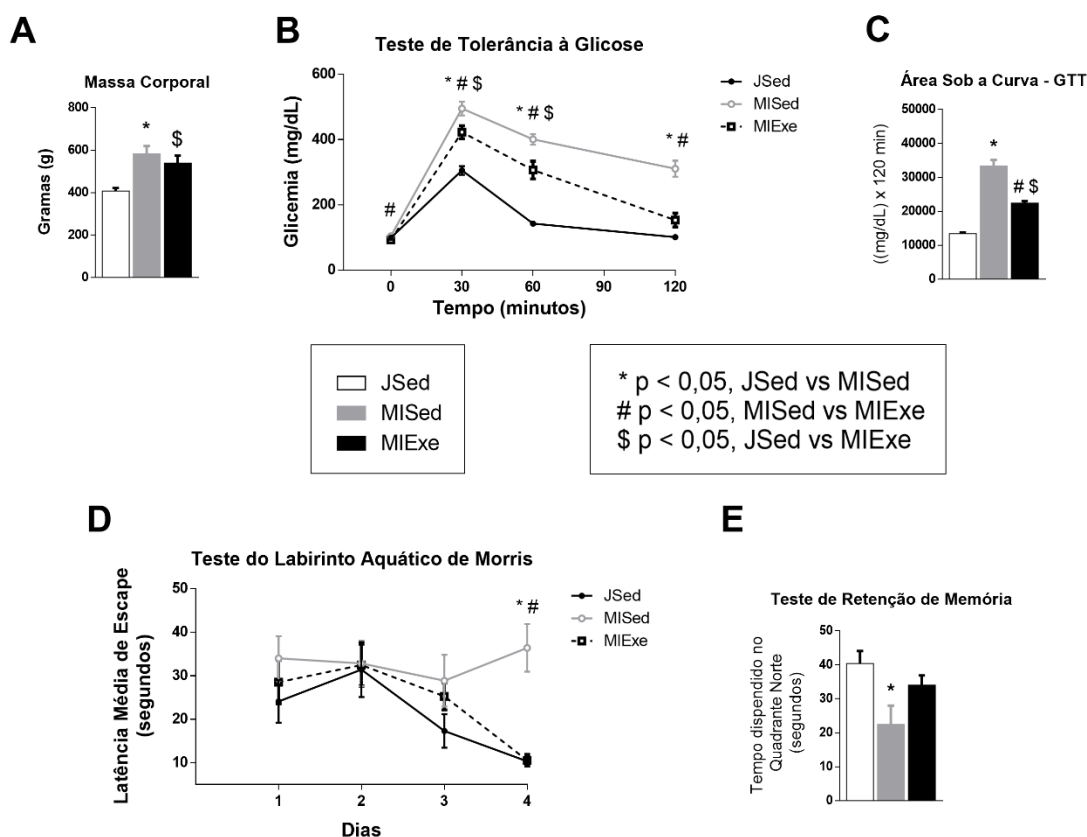
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Variáveis da composição corporal, dos testes fisiológicos e de aprendizagem espacial dos animais

Os ratos *Wistar* de meia-idade apresentaram maior massa corporal do que os jovens ( $p = 0,0024$ ), tanto os sedentários ( $p = 0,0024$ ) como os exercitados ( $p = 0,0191$ ) (Fig. 5A). Conforme demonstrado pelo teste de tolerância à glicose (GTT), o envelhecimento foi associado a reduzida tolerância à glicose (Área sob a Curva do GTT,  $p < 0,0001$ ) quando comparada a ratos jovens (JSed vs. MISed,  $p < 0,0001$ ; JSed vs. MIExe,  $p = 0,0002$ ) e o exercício físico promoveu melhoria significativa neste parâmetro fisiológico ( $p < 0,0001$ ) (Figs. 5B e 5C). Com relação às análises de cada ponto do GTT, no tempo 0 os animais de meia-idade exercitados apresentaram menor glicemia do que os de meia-idade sedentários ( $p = 0,0066$ ). Aos 30 minutos, houve diferença ( $p < 0,0001$ ) entre todos os grupos; os animais meia-idade sedentários apresentaram maior glicemia dos que os jovens ( $p < 0,0001$ ) e os exercitados ( $p = < 0,0152$ ), entretanto os meia-idade exercitados também apresentaram maior glicemia do que os jovens neste ponto ( $p = 0,0004$ ). Após 60 minutos do estímulo de glicose, houve o mesmo comportamento ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos (JSed vs MISed,  $p < 0,0001$ ; JSed vs. MIExe,  $p < 0,0001$ ; MISed vs. MIExe,  $p = 0,0004$ ). Aos 120 minutos, novamente o grupo de meia-idade sedentário apresentou maior glicemia ( $p < 0,0001$ ) que os grupos jovem ( $p < 0,0001$ ) e meia-idade exercitado ( $p < 0,0001$ ), entretanto neste ponto não houve diferença significativa entre os grupos JSed e MIExe.

Além disso, investigamos a cognição (tarefa de aprendizagem espacial) desses ratos no teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM). Como esperado, verificamos que os animais de meia-idade sedentários apresentaram déficit de aprendizado através do teste de retenção de memória em comparação com o grupo jovem ( $p = 0,0262$ ) (Fig. 5E). Com relação ao teste do MWM, houve diferença significativa no 4º dia de teste (Fig. 5D), quando os animais de meia-idade sedentários levaram mais tempo para encontrar a plataforma ( $p = 0,0001$ ) do que os animais jovens ( $p = 0,0003$ ) e os meia-idade exercitados ( $p = 0,0004$ ).



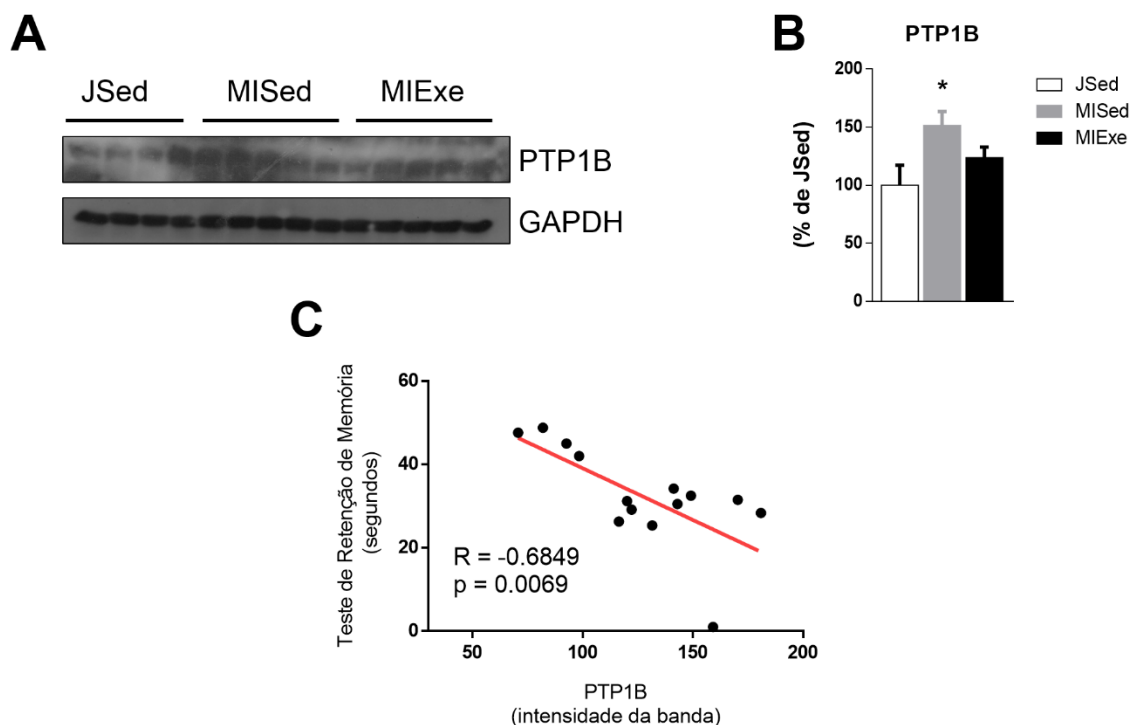


**Figura 5.** Dados fisiológicos e cognitivos. (A) Massa corporal dos grupos experimentais ( $n = 6$  por grupo). (B-C), Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Área sob a Curva ( $n = 5$  por grupo). (D) Latência Média de Escape dos grupos experimentais durante os 4 dias de teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM) ( $n = 5$  por grupo). (E) Tempo que os animais de cada grupo experimental permaneceu no quadrante Norte durante o Teste de Retenção de Memória ( $n = 5$  por grupo). \*  $p < 0,05$ , JSed vs MISed; #  $p < 0,05$ , MISed vs MIExe; \$  $p < 0,05$  JSed vs MIExe.

## 7.2 Aumento do conteúdo de PTP1B, redução da sinalização de insulina/BDNF e alterações relacionadas à DA no hipocampo de ratos de meia-idade

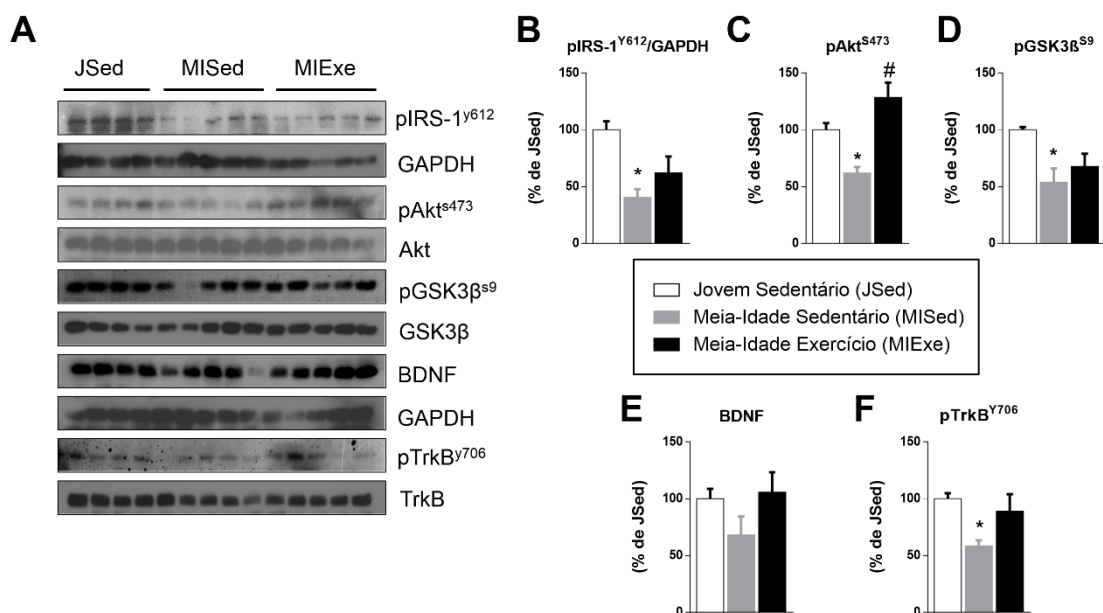
Verifica-se através da análise molecular que ocorreu aumento do conteúdo de PTP1B ( $p = 0,0483$ ) no hipocampo de ratos meia-idade sedentários em relação aos jovens ( $p = 0,0405$ ) (Fig. 6), um marcador bem conhecido responsável pela interrupção da via de sinalização de insulina/BDNF através da desfosforilação de IR, IRS-1 e TrkB. Entretanto, não houve diferença significativa em relação ao grupo de meia-idade exercitado (redução de aproximadamente 27,8%). O conteúdo de PTP1B no hipocampo esteve fortemente correlacionado ( $p = 0.0069$ , R

= -0.6849) negativamente com o desempenho no Teste de Retenção de Memória do MWM (Fig. 6C).



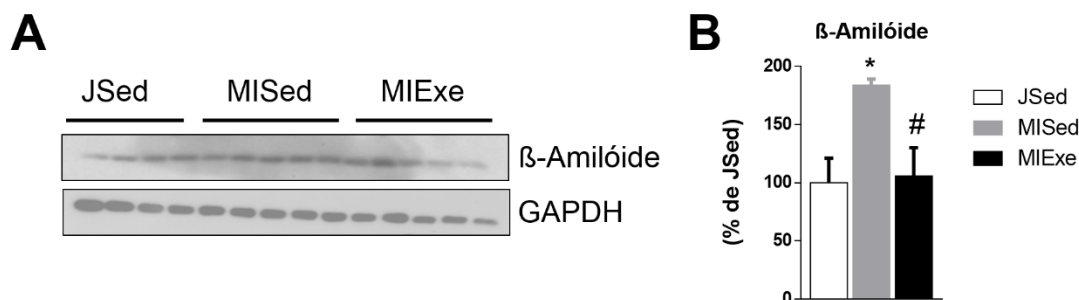
**Figura 6.** Conteúdo de PTP1B no hipocampo dos animais experimentais. Bandas de Western Blot (A) e dados de quantificação das bandas (B) representando o conteúdo de PTP1B no hipocampo de ratos estimulados por insulina. Correlação entre o conteúdo de PTP1B no hipocampo e tempo que o respectivo animal permaneceu no quadrante correto durante o Teste de Retenção de Memória do MWM (C). \*  $p < 0,05$  vs JSed. (JSed,  $n = 4$ , MISed e MIExe,  $n = 5$ ).

Com relação à análise da sinalização da insulina no hipocampo, os animais de meia-idade sedentários apresentaram em relação aos jovens redução significativa de pIRS-1/GAPDH ( $p = 0,0340$ ), pAkt ( $p = 0,0383$ ) e pGSK3 $\beta$  ( $p = 0,0270$ ) (Figs. 7A-D). O protocolo de exercício físico se mostrou eficiente em aumentar significativamente a fosforilação da Akt em relação aos meia-idade sedentários ( $p = 0,0007$ ). Embora não tenha havido diferença significativa no conteúdo do BDNF do hipocampo, os ratos de meia-idade apresentaram pTrkB reduzido ( $p = 0,0374$ ) (Fig. 7A, Figs. 7E e F).



**Figura 7.** Via de sinalização de insulina/BDNF no hipocampo de ratos estimulados com insulina. Bandas de Western Blot das proteínas de interesse analisadas no estudo (A) e dados de quantificação que representam a pIRS-1<sup>Y612</sup> (B), pAkt<sup>S473</sup> (C), pGSK3β<sup>S9</sup> (D), BDNF (E) e pTrkB<sup>Y706</sup> (F) no hipocampo de ratos jovens e de meia-idade sedentários e exercitados. \*  $p < 0,05$  vs JSed; #  $p < 0,05$  vs MISed (JSed,  $n = 4$ , MISed e MIExe,  $n = 5$ ).

Foi verificado o aumento do conteúdo de  $\beta$ -Amilóide ( $p = 0,0134$ ) no grupo MISed em relação ao JSed ( $p = 0,0241$ ) (Fig. 8A-B), sugerindo que as mudanças moleculares relacionadas à DA ocorrem paralelamente ao envelhecimento. Por outro lado, o exercício físico foi capaz de reverter este processo em animais de meia-idade ( $p = 0,0260$ ).



**Figura 8.** Conteúdo de  $\beta$ -Amilóide no hipocampo dos animais experimentais. Bandas de Western Blot (A) e dados de quantificação que representam o conteúdo de  $\beta$ -Amilóide (B) no hipocampo de ratos jovens e de meia-idade (sedentários e exercitados) estimulados com insulina. \*  $p < 0,05$  vs JSed; #  $p < 0,05$  vs MISed. (JSed,  $n = 4$ , MISed e MIExe,  $n = 5$ ).

As variações percentuais entre os grupos experimentais de nosso estudo com relação às proteínas avaliadas estão sumarizadas na Figura 9.

Proteína	Efeito Envelhecimento (Variação % JSed vs. MISed)	$p$ (JSed vs. MISed)	Efeito Exercício (Variação % MISed vs. MIExe)	$p$ (MISed vs. MIExe)
PTP1B	+ 51,6%	0.0405	- 18,36%	0.28
pIRS-1	- 59,47%	0.007	+ 53,45%	0.3335
pAkt	- 38,01%	0.0383	+ 107,46%	0.0007
pGSK3 $\beta$	- 46,11%	0.027	+ 25,87%	0.603
BDNF	- 31,77%	0.3661	+ 55,13%	0.2213
pTrkB	- 41,38%	0.0374	+ 52,06%	0.1069
$\beta$ Amilóide	+ 84,14%	0.0241	- 42,45%	0.026

**Figura 9.** Sumário das variações percentuais entre os grupos com relação às proteínas avaliadas. Nesta figura está ilustrado o aumento percentual de PTP1B e  $\beta$ Amilóide e redução percentual de pIRS-1, pAkt, pGSK3 $\beta$ , BDNF e pTrkB que o grupo MISed apresenta em relação ao grupo JSed. Também está ilustrado a redução percentual de PTP1B e  $\beta$ Amilóide além do aumento de pIRS-1, pAkt, pGSK3 $\beta$ , BDNF e pTrkB que o grupo MIExe apresenta em relação ao grupo MISed. ANOVA one-wau

## 8. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a aprendizagem espacial, tolerância à glicose, conteúdo de PTP1B e sinalização da insulina no hipocampo de ratos *Wistar*, bem como o possível efeito do exercício físico sobre estes parâmetros. Os ratos *Wistar* de meia-idade apresentaram maior peso corporal e diminuição da tolerância à glicose. Acompanhando estas alterações fisiológicas observa-se que os animais envelhecidos apresentaram menor desempenho no teste de memória se comparado a seus pares jovens. Já se sabe que a *downregulation* do IR especificamente no hipocampo resulta em déficits na transmissão sináptica associada à aprendizagem espacial (GRILLO et al., 2015). Além disso, vários estudos que investigaram a resistência hipocampal à insulina descreveram déficits de aprendizagem espacial semelhantes em animais diabéticos (DIEGUES et al., 2014), obesos (LIANG et al., 2015) e idosos (GALLAGHER; BURWELL; BURCHINAL, 2015). Anteriormente, verificou-se a redução da sinalização da insulina e o aumento dos mediadores da inflamação em cérebros *post-mortem* de humanos diagnosticados com DA (BOMFIM et al., 2012; VIEIRA et al., 2017), conectando a reduzida ação da insulina ao desenvolvimento de DA. Considerando que o envelhecimento está fortemente associado ao desenvolvimento da DA, observou-se em nosso estudo que o envelhecimento é acompanhado pelo aumento do conteúdo de PTP1B no hipocampo, indicando o papel dessa fosfatase na interrupção da via de sinalização hipocampal da insulina nos estágios mais avançados da vida.

Estudos anteriores demonstraram que o envelhecimento aumenta o conteúdo de PTP1B em vários tecidos alvo da ação da insulina, como fígado (DE MOURA et al., 2013a), músculo esquelético (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012) e hipotálamo (MORRISON et al., 2007). No entanto, este é o primeiro estudo que mostra o aumento do conteúdo de PTP1B no hipocampo de ratos de meia-idade. A PTP1B é uma das principais fosfatases de resíduos de tirosina do IR, IRS-1 e TrkB (DE MOURA et al., 2013a; OZEK et al., 2014; ROPELLE et al., 2006; VIEIRA et al., 2017), e o presente estudo fornece novas evidências sobre o papel desta proteína interrompendo a via de sinalização de insulina/BDNF e contribuindo para o declínio das funções cognitivas em ratos de meia-idade.

Na avaliação das proteínas-chave da cascata de sinalização de insulina no hipocampo, os animais de meia-idade mostraram reduções notáveis na fosforilação Akt e GSK3 $\beta$ . Este processo pode ser explicado parcialmente devido ao aumento do conteúdo de  $\beta$ -amilóide. A  $\beta$ -amilóide é uma proteína sinaptotóxica que ativa a via de sinalização TNF $\alpha$ / Proteína Kinase

Dependente de RNA (PKR)/Fator De Iniciação Da Tradução Subunidade Alfa (eIF2 $\alpha$ ), induzindo o estresse do retículo endoplasmático e resultando na inibição, internalização e degradação do IR (LOURENCO et al., 2013). Outro efeito resultante da sinalização reduzida da insulina do hipocampo é a ativação da GSK3 $\beta$  e a fosforilação da proteína Tau, uma característica do mecanismo molecular da DA e um gatilho para a apoptose neuronal (SCHUBERT et al., 2004). A sinalização de insulina parece exercer um efeito protetor importante contra DA no hipocampo. A injeção intracerebral de estreptozotocina, um fármaco de ação pró-diabetes, resultou em déficits na via de sinalização da insulina do hipocampo, aumentou a fosforilação de Tau e a expressão gênica da APP (LESTER-COLL et al., 2006). Esse processo também é acompanhado por um déficit na aprendizagem espacial (DE LA MONTE et al., 2006). Também é proposto atualmente que esses mecanismos moleculares estão ligados ao envelhecimento (HERRUP, 2010; PALMERI et al., 2013), sugerindo que a patogênese da doença de Alzheimer no envelhecimento está associada a resistência à insulina do hipocampo.

Os ratos de meia-idade não apresentaram redução significativa na concentração de BDNF no hipocampo. Entretanto, verificamos redução significativa na fosforilação do TrkB nos ratos de meia-idade. O BDNF é um fator de crescimento que exerce efeito importante (como a insulina) estimulando a plasticidade sináptica, a formação da memória e a neurogênese (VIEIRA et al., 2017). Este processo começa com a ligação do BDNF ao seu receptor (TrkB), desencadeando a via Pi3k/Akt (OZEK et al., 2014). Um possível gatilho para o processo de redução do aprendizado espacial é o aumento do conteúdo de PTP1B e a resultante desfosforilação do TrkB.

Por outro lado, verificamos que o exercício físico foi eficiente em melhorar a tolerância à glicose. Este resultado vai ao encontro a outros estudos na literatura que mostraram que o exercício tem efeito favorável sobre a homeostase glicêmica, resultando em melhoria da tolerância a glicose (BRANDT; PEDERSEN, 2010; DE MOURA et al., 2013b; JESSEN; GOODYEAR, 2005; PAULI et al., 2009; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008; PEREIRA et al., 2017; STANFORD; GOODYEAR, 2014), especialmente em animais envelhecidos (PAULI et al., 2010). Estes animais que realizaram o protocolo de treinamento de curto período também necessitaram de menor tempo para encontrar a plataforma de escape no 4º dia de MWM, corroborando achados prévios sobre os efeitos positivos do exercício físico em animais com deficiência na sinalização da insulina no hipocampo (DIEGUES et al., 2014). Entretanto, verificamos uma tendência de redução de PTP1B (18,36%) no hipocampo de animais de meia-

idade exercitados, e essa pequena redução também se refletiu em aumento do desempenho no teste de retenção de memória (50,98%). Esta relação entre o conteúdo de PTP1B no hipocampo e a aprendizagem espacial fica mais notória considerando a forte correlação negativa ( $R = -0.6964$ ) entre o conteúdo de PTP1B no hipocampo e o tempo que o respectivo animal permaneceu no quadrante correto durante o Teste de Retenção de Memória, evidenciando o efeito negativo que esta fosfatase parece exercer no hipocampo sobre os processos cognitivos.

A pequena redução do conteúdo de PTP1B no hipocampo foi acompanhando de restauração da fosforilação da Akt. É possível que outros mecanismos sejam mais estimulados pelo exercício físico para promover benefícios na sinalização da insulina, como a redução de IKK e c-Jun N-terminal Kinase (JNK) (LOVATEL et al., 2013; UM et al., 2011). Estudos avaliando os efeitos de períodos prolongados de treinamento físico encontraram efeitos positivos desta intervenção sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela gênese da DA (LIU et al., 2013; UM et al., 2011). Recentemente, um estudo concluiu que o exercício físico agudo não modifica a atividade cerebral e o desempenho cognitivo em animais transgênicos (APP/PS1) para desenvolvimento de DA (MIKI STEIN et al., 2017). É bastante provável que a redução da PTP1B no hipocampo decorrente da prática de exercício também necessite de protocolos mais longos de treinamento, uma vez que todas estas vias estão conectadas pelo processo inflamatório. Adicionalmente, futuros estudos são necessários para avaliar se um período maior de prática ou maior intensidade (com maior número de animais) podem exercer maior efeito sobre o conteúdo de PTP1B no hipocampo.

Apesar de conhecidos os efeitos protetores do exercício físico durante a prevenção (atenuando os fatores de risco) e tratamento da DA, os mecanismos moleculares envolvidos ainda necessitam ser elucidados por completo. Uma das principais respostas com efeito anti-inflamatório do exercício físico é o aumento da secreção de interleucina 10 (IL-10) (GOMES DA SILVA et al., 2013; ROPELLE et al., 2010). Este aumento de IL-10 promove a redução da atividade da IKK e consequentemente da atividade transcricional do NF-KB (ROPELLE et al., 2010). Este mecanismo foi demonstrado no hipocampo de ratos *Wistar* de 18 meses exercitados em esteira (30 minutos de exercício a 15 m/min durante 10 dias; extração 1 hora após a última sessão de exercício) (GOMES DA SILVA et al., 2013). Curiosamente, um estudo mais recente encontrou aumento do RNAm de IL-10 no hipocampo de camundongos C57BL/6 de 19-21 meses de idade e a manutenção destes animais em ambiente com roda de atividade (a extração tecidual foi realizada após a realização de teste cognitivo durante aproximadamente 15 minutos) durante 8 semanas reduziu a expressão gênica de IL-10 (DALLAGNOL et al., 2017). É possível

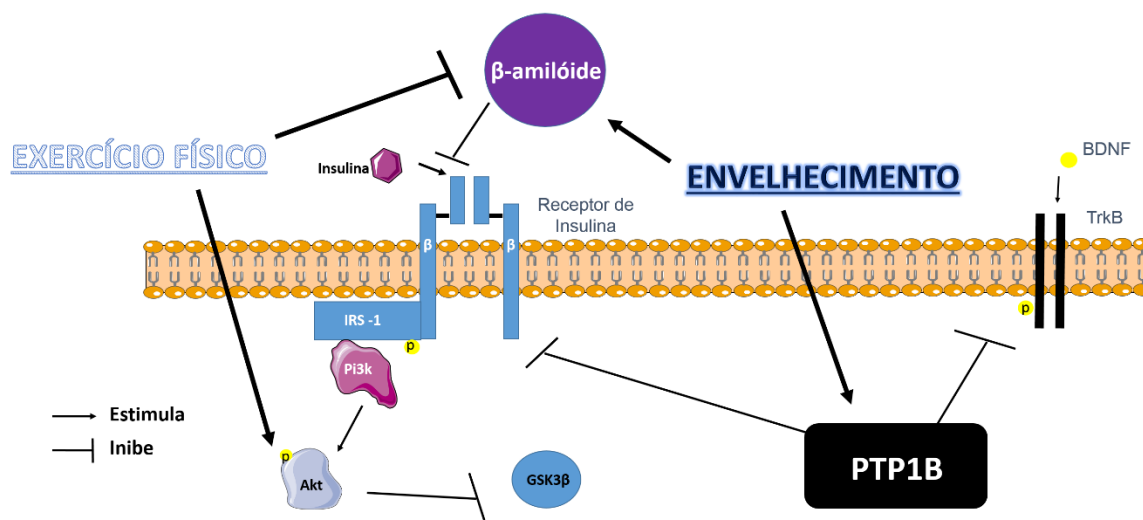
que os resultados sejam contraditórios porque as técnicas de análise foram diferentes, já que o estudo de Gomes da Silva et al. (2013) utilizou radioimunoensaio e o de Dallagnol et al. (2017) analisou a expressão gênica através da técnica de *Real-Time quantitative-polymerase chain reaction*. Outra possibilidade é que possam ocorrer alterações no processo de tradução da IL-10 pós-exercício no hipocampo. Em modelo de indução de DA pela administração intracerebroventricular de oligômeros de  $\beta$ -amilóide, foi verificado que a concentração de IL-10 aumentou após a indução de DA e o exercício físico (natação por 8 semanas, sobrecarga de 3%, 5 dias na semana por 60 minutos/dia; extração tecidual 24h após a última sessão de exercício) resultou em redução da IL-10 no hipocampo tanto dos animais saudáveis como dos que foram induzidos a DA (SOUZA et al., 2013). Também deve ser considerada a diferença entre as espécies experimentais utilizadas nos diferentes estudos e o tempo após a última sessão de exercício em que a extração do hipocampo foi realizada. Vale ressaltar que nenhum destes estudos investigou o conteúdo de PTP1B.

Uma vez que a IL-10 é uma das principais inibidoras da via IKK/NF-KB (que resulta na transcrição de PTP1B) e havendo ainda certa controvérsia na literatura, este mecanismo precisa ser elucidado para a completa compreensão do efeito que o exercício físico sobre o conteúdo de PTP1B no hipocampo. Um prévio estudo investigou a PTP1B no músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* obesos e verificaram que 16h após o exercício físico agudo (1 dia de natação com 2 sessões de 3 horas com 15 de descanso entre elas, sem sobrecarga) o conteúdo de PTP1B, a atividade da PTP1B e a associação da PTP1B com o IR estava diminuída em relação aos obesos sedentários, restaurando a sinalização da insulina nestes animais (ROPELLE et al., 2006). Outro achado do estudo de Ropelle et al. (2006) foi que o exercício físico agudo promoveu menor associação da PTP1B com o IR e maior fosforilação do IR, o que foi mais proeminente 16h após a última sessão do exercício do que 8h. Outro estudo encontrou aumento da PTP1B no fígado de ratos *Wistar* envelhecidos (21 meses) e verificou que 16h após o exercício físico agudo (1 dia de natação com 2 sessões de 90 minutos com descanso de 45 minutos entre elas) houve redução do conteúdo de PTP1B e da associação da PTP1B com o IR e IRS-1 neste tecido (DE MOURA et al., 2013a). As evidências prévias sugerem que 16h após a última sessão de exercício parece ser o tempo necessário para verificar redução do conteúdo de PTP1B em tecidos da periferia. Entretanto, são necessários estudos investigando o tempo/resposta do efeito do exercício físico para verificar se este período de 16h também é o ideal para identificar alterações no conteúdo de PTP1B no Sistema Nervoso Central.



Pesquisas futuras também são necessárias para avaliar se a inibição da PTP1B no hipocampo de animais de meia-idade altera a aprendizagem espacial e a retenção de memória. Além disso, é importante ressaltar que a deleção de PTP1B no hipocampo resultou em melhor desempenho de animais jovens no teste *Barnes Maze* (FUENTES et al., 2012). No entanto, ainda não foi descrito se a inibição ou deleção desta proteína no hipocampo de animais envelhecidos é capaz de prevenir ou atenuar os déficits e a patogênese da DA.

A PTP1B está associada com déficits de aprendizado espacial e reduzida sinalização de insulina/BDNF no hipocampo dos animais de meia-idade sedentários através da desfosforilação de IRS-1 e TrkB. A Figura 10 ilustra de maneira resumida os achados do nosso estudo, referente as alterações moleculares observadas no hipocampo e o efeito do exercício físico sobre esse processo durante o envelhecimento de ratos *Wistar*. Aqui, mostramos novas evidências sobre o efeito relacionado à idade, aumentando o conteúdo de PTP1B e reduzindo a sinalização de insulina/BDNF no hipocampo. Em síntese, nossos achados mostram que a disfunção da via da insulina hipocampal está associado a um aumento no conteúdo de PTP1B em ratos de meia-idade. Portanto, talvez intervenções para modular a atividade de PTP1B no hipocampo podem ser uma estratégia atrativa para desacelerar ou prevenir o desenvolvimento da DA em indivíduos idosos.



**Figura 10.** Ilustração dos principais achados dos efeitos do envelhecimento e do exercício físico nesta condição sobre a sinalização da insulina/BDNF no hipocampo. Os animais de meia-idade apresentaram aumento do conteúdo de PTP1B e de  $\beta$ -amilóide e redução da fosforilação do TrkB, IRS-1 e GSK3 $\beta$  no hipocampo. Por outro lado, os animais que realizaram o protocolo de exercício apresentaram redução do conteúdo de  $\beta$ -amilóide e fosforilação da Akt, sugerindo que esta intervenção pode atenuar algumas alterações moleculares associadas ao processo inflamatório característico do envelhecimento. IRS-1, Substrato do Receptor de Insulina 1; Pi3k, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase; Akt, Proteína Kinase B; GSK3 $\beta$ , Glicogênio Sintase Kinase 3 beta; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; TrkB, Receptor Tirosina Kinase beta; PTP1B, Proteína Tirosina Fosfatase 1B.

## 9. CONCLUSÃO

O envelhecimento está associado com o aumento do conteúdo de PTP1B, prejuízos na sinalização da insulina (pIRS-1, pAkt, pGSK3 $\beta$ ) e do BDNF (pTrkB) no tecido hipocampal. Estas alterações foram acompanhadas de déficit de aprendizagem espacial em animais de meia-idade. No entanto, o exercício físico indica efeitos favoráveis sobre a sinalização da insulina (pAkt) e redução do conteúdo de  $\beta$ -amilóide durante o envelhecimento e reforça o potencial terapêutico sobre as alterações moleculares e déficit cognitivo associados à DA.

## 10. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S. et al. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 9, p. 1251–1255, 16 set. 2008.

AGUIAR, A. S. et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1216–1227, 29 dez. 2010.

AGUIAR, A. S. et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11–12, p. 560–567, nov. 2011.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia**. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2016.

BOMFIM, T. R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1339–53, abr. 2012.

BOTEZELLI, J. D. et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31106, 4 nov. 2016.

BRANDT, C.; PEDERSEN, B. K. The Role of Exercise-Induced Myokines in Muscle Homeostasis and the Defense against Chronic Diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

BROOKMEYER, R. et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 3, n. 3, p. 186–91, jul. 2007.

CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 18–30, 2009.

DALLAGNOL, K. M. C. et al. Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 61, p. 31–35, mar. 2017.

DE FELICE, F. G.; FERREIRA, S. T. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2262–72, jul. 2014.

DE FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V.; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. S26–S32, fev. 2014.

DE FELICE, F. G.; MUNOZ, D. P. Opportunities and challenges in developing relevant animal models for Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 112–114, 2016.

DE LA MONTE, S. M. et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 10, n. 1, p. 89–109, set. 2006.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **Journal of diabetes science and technology**, v. 2, n. 6, p. 1101–13, nov. 2008.

DE MOURA, L. P. et al. Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. **Immunity & ageing : I & A**, v. 10, n. 1, p. 8, jan. 2013a.

DE MOURA, L. P. et al. Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 29, mar. 2013b.

DIEGUES, J. C. et al. Spatial memory in sedentary and trained diabetic rats: molecular mechanisms. **Hippocampus**, v. 24, n. 6, p. 703–11, jun. 2014.

FJELL, A. M. et al. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. **Progress in Neurobiology**, v. 117, p. 20–40, jun. 2014.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 244–54, jun. 2000.

FUENTES, F. et al. Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B Is Involved in Hippocampal Synapse Formation and Learning. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41536, 23 jul. 2012.

GALLAGHER, M.; BURWELL, R.; BURCHINAL, M. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water

maze. **Behavioral Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 540–548, ago. 2015.

GIUNTA, B. et al. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 5, p. 51, 2008.

GLIGOROSKA, J. P.; MANCHEVSKA, S. The effect of physical activity on cognition - physiological mechanisms. **Materia socio-medica**, v. 24, n. 3, p. 198–202, 2012.

GOMES DA SILVA, S. et al. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 827, 10 dez. 2013.

GOMES, R. J. et al. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 981–7, out. 2009.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Á. et al. Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. **Aging Cell**, v. 11, n. 2, p. 284–296, abr. 2012.

GRILLO, C. A. et al. Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3927–36, nov. 2015.

HAMER, M.; CHIDA, Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. **Psychological medicine**, v. 39, n. 1, p. 3–11, jan. 2009.

HAMPEL, H. et al. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 1, p. 30–40, jan. 2010.

HERRUP, K. Reimagining Alzheimer's Disease--An Age-Based Hypothesis. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 16755–16762, 15 dez. 2010.

HU, Y.; RUSSEK, S. J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–17, abr. 2008.

INTLEKOFER, K. A.; COTMAN, C. W. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 57, p. 47–55, 2013.

JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 1, p. 330–337, 7 abr. 2005.

KAWAS, C. et al. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **Neurology**, v. 54, n. 11, p. 2072–7, 13 jun. 2000.

LESTER-COLL, N. et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 9, n. 1, p. 13–33, mar. 2006.

LI, R. et al. Chrysin ameliorates diabetes-associated cognitive deficits in Wistar rats. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 1527–1532, 16 out. 2014.

LIANG, L. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Impairs Insulin Receptor Signaling in the Brains of Obese Rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126384, 15 maio 2015.

LIU, H. et al. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 261–272, 1 nov. 2013.

LOU, S. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research**, v. 1210, p. 48–55, 2008.

LOURENCO, M. V. et al. TNF- $\alpha$  Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 6, p. 831–843, 3 dez. 2013.

LOVATEL, G. A. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 101, p. 94–102, 2013.

MA, Q.-L. et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 28, p. 9078–89, 15 jul. 2009.

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v. 300, n. 6719, p. 230–5, 27 jan. 1990.

MEHRAN, A. E. et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. **Cell metabolism**, v. 16, n. 6, p. 723–37, 5 dez. 2012.

MIKI STEIN, A. et al. Acute exercise does not modify brain activity and memory performance in APP/PS1 mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178247, 22 maio 2017.

MORRISON, C. D. et al. Increased Hypothalamic Protein Tyrosine Phosphatase 1B Contributes to Leptin Resistance with Age. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 433–440, jan. 2007.

MUÑOZ, V. R. et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. **Journal of Physiological Sciences**, 2017a.

MUÑOZ, V. R. et al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, 8 dez. 2017b.

NOKIA, M. S. et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 7, p. 1855–1873, 1 abr. 2016.

OZEK, C. et al. Protein-tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Is a Novel Regulator of Central Brain-derived Neurotrophic Factor and Tropomyosin Receptor Kinase B (TrkB) Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 31682–31692, 14 nov. 2014.

PALMERI, A. et al. Inhibition of phosphodiesterase-5 rescues age-related impairment of synaptic plasticity and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 240, p. 11–20, 1 mar. 2013.

PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 4, p. 399–408, 2009a.

PAULI, J. R. et al. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 2, p. 98–103, 2009b.

PAULI, J. R. et al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mechanisms of ageing and development**, v. 131, n. 5, p. 323–9, maio 2010.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 1 out. 2008.

PEREIRA, R. et al. Fructose Consumption in the Development of Obesity and the Effects of



Different Protocols of Physical Exercise on the Hepatic Metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 405, abr. 2017.

QIU, W. Q. et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 49, p. 32730–8, 4 dez. 1998.

QIU, W. Q.; FOLSTEIN, M. F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- $\beta$  peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 2, p. 190–198, 2006.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775–777, jun. 2005.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of physiology**, v. 577, n. Pt 3, p. 997–1007, dez. 2006.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK $\beta$  and ER stress inhibition. **PLoS biology**, v. 8, n. 8, 2010.

SCHUBERT, M. et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3100–3105, 2 mar. 2004.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–30, jun. 2013.

SONG, G. J. et al. A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 86, 2016.

SOUZA, L. C. et al. Neuroprotective Effect of Physical Exercise in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Induced by  $\beta$ -Amyloid1–40 Peptide. **Neurotoxicity Research**, v. 24, n. 2, p. 148–163, 11 ago. 2013.

SOYA, H. et al. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 4, p. 961–967, 13 jul. 2007.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms

regulating glucose uptake in skeletal muscle. **Advances in physiology education**, v. 38, n. 4, p. 308–14, dez. 2014.

STRANAHAN, A. M.; MARTIN, B.; MAUDSLEY, S. Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 9, n. 1, p. 86–92, jan. 2012.

TAKEDA, S. et al. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. **Molecular bioSystems**, v. 7, n. 6, p. 1822–7, jun. 2011.

TALBOT, K. et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1316–38, abr. 2012.

UM, H.-S. et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience Research**, v. 69, n. 2, p. 161–173, 2011.

VAN DER BORGHT, K. et al. Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 928–36, out. 2009.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **The European journal of neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 2580–90, nov. 2004.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. **Endocrine reviews**, v. 36, n. 3, p. 245–71, jun. 2015.

VIEIRA, M. N. N. et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Potential Target for Alzheimer's Therapy? **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 7, 31 jan. 2017.

ZABOLOTNY, J. M. et al. Protein-tyrosine Phosphatase 1B Expression Is Induced by Inflammation *in Vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14230–14241, 23 maio 2008.

## Anexo A

### Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada O papel da proteína Rock sobre a homeostase glicêmica de roedores exercitados durante o processo de envelhecimento, registrada com o nº 4257-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Rodrigo Pauli e Vitor Rosetto Muñoz, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de 06 de junho de 2016.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2016-01/06/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	07/06/2016-01/06/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	50
Peso / Idade:	04 semanas / 400g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / F344/NTacUnib (Fischer 344)
No. de animais:	50
Peso / Idade:	04 semanas / 400g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 22 de junho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.