

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ASSOCIADO EM
EDUCAÇÃO FÍSICA – UEM/UEL

LAIZE PERON TÓFOLO

**EFEITO PROTETOR DO
TREINAMENTO FÍSICO MODERADO
EM ESTEIRA, SOBRE ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E
CARDIOMETABÓLICAS INDUZIDAS
POR DIETA HIPERCALÓRICA APÓS A
CESSAÇÃO DO TREINAMENTO EM
RATOS**

Maringá
2018

LAIZE PERON TÓFOLO

**EFEITO PROTETOR DO TREINAMENTO
FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA, SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
CARDIOMETABÓLICAS INDUZIDAS POR
DIETA HIPERCALÓRICA APÓS A
CESSAÇÃO DO TREINAMENTO EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Associado em Educação Física –
UEM/UEL, para obtenção do título de
Doutor em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Rinaldi

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

T644e Tófolo, Laize Peron
Efeito protetor do treinamento físico moderado em esteira, sobre alterações comportamentais e cardiometabólicas induzidas por dieta hipercalórica após a cessação do treinamento em ratos / Laize Peron Tófolo. -- Maringá, PR, 2018.
62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Rinaldi.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Educação Física, Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física - UEM/UEL, 2018.

1. Obesidade. 2. Comportamento alimentar. 3. Treinamento físico. 4. Desordem cardiometabólica. 5. Dieta hipercalórica. I. Rinaldi, Wilson, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física - UEM/UEL. III. Título.

CDD 23.ed. 616.398


LAIZE PERON TÓFOLO

EFEITO PROTETOR DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO EM ESTEIRA, SOBRE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E CARDIOMETABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA HIPERCALÓRICA APÓS A CESSAÇÃO DO TREINAMENTO EM RATOS

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física – UEM/UEL, na área de concentração Desempenho Humano e Atividade Física, para obtenção do título de Doutor(a).

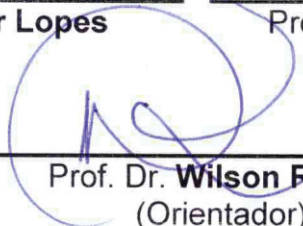
APROVADA em 19 de janeiro de 2018.


Prof. Dr. **Gustavo Rodrigues Pedrino**


Prof. Dr. **Paulo Cezar de Freitas Mathias**


Prof. Dr. **Wendell Arthur Lopes**


Prof. Dr. **Solange de Paula Ramos**


Prof. Dr. **Wilson Rinaldi**
(Orientador)

Dedicatória

Aos meus amados pais, Valentim e Márcia que são exemplos de humildade, perseverança e vitória. À minha querida irmã, minha parceira de todas as horas. Dedico esta tese a vocês que são tudo pra mim e estão sempre presentes, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim. Eu sinto muito orgulho da nossa família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar e abençoar o meu caminho e por me dar forças para vencer os obstáculos encontrados no decorrer do processo de doutoramento.

Agradeço ao apoio e incentivo da minha família, que são minha base, a qual eu tenho muito apego e aprendo todos os dias como ser uma pessoa melhor. Dentre eles, agradeço a meus pais, meus exemplos, que sempre fizeram o melhor para contribuir para meu futuro profissional; à minha irmã, amiga, parceira, que não vivo sem, sempre esteve do meu lado nos bons e maus momentos me dando apoio ou realçando minha alegria; à meus avós paternos, vó Maria e vô Gino eu nunca vou me esquecer de vocês e dos conselhos da vó “mas tá loco menina, chega de estudar, tem que procurar um emprego bom agora”, talvez a vó estivesse certa e seria a melhor opção, mas Deus quis que eu fizesse o doutorado; à meus avós maternos, que vou admirar eternamente a bondade e o jeito de viver de vocês, obrigada por sempre me mimarem e por serem essas pessoas maravilhosas a qual eu sinto muito orgulho; ao meu tio Padre, que sempre teve palavras confortadores nos meus momentos de medo; à tia Paula que sempre me apoiou e foi minha inspiração para a carreira acadêmica; ao tio Mizinho e a tia Martinha que são uns doces de pessoas e fazem toda a diferença nos momentos em família, meus tios parceiros que sempre estão prontos para o que der e vier. Tenho muito orgulho em ter essa família, que não é perfeita, mas que pra mim, é exemplar.

Ao meu parceiro, amigo e namorado, João Otávio, que enfrentou firmemente comigo a última metade do doutorado, a metade cheia de incertezas, dúvidas, questionamentos e também cheia de alegrias, conquistas e superações, e esteve comigo em todos os momentos; às minhas melhores amigas, irmãs, confidentes e psicólogas Dai e Ju, que nunca me deixaram sozinha, mesmo quando eu tentava me afastar devido à sobrecarga do doutorado.

Ao meu querido orientador prof. Paulo Mathias, por esses 7 anos de ensinamentos diários, pelos puxões de orelha e também os incentivos. Obrigada por abrir as portas de seu laboratório, conseguir recursos financeiros para a realização do meu projeto e por sempre nos incentivar a sermos excelentes no que fazemos. Muito do que sou hoje, devo aos ensinamentos do senhor. Sou admiradora da sua garra, força e, sobretudo de sua inteligência; ao meu querido orientador, Wilson Rinaldi, que me mostrou o caminho da pesquisa, confiou em mim, depositou suas expectativas e sempre me mostrou o melhor caminho dentro da pós-graduação. Sou admiradora do seu empenho, inteligência e da sua visão

sobre a pesquisa; à minha querida co-orientadora, Késia por me estimular, desafiar e me conduzir a caminhos que me deram enorme bagagem acadêmica. Sem sua ajuda desafiadora, muitas coisas não teriam acontecido. Sou eternamente grata por ter tido excelentes orientadores.

A prof. Patrícia Pelufo por propor uma parceria e disponibilizar a oportunidade de desenvolver um projeto em seu laboratório, financiado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Por sua orientação e ensinamentos e por me receber tão bem em seu grupo de pesquisa. Aos colegas e co-orientadores Amanda, Tania, Dani e Márcio, que me ajudaram e me ensinaram as técnicas pertinentes ao meu projeto e as demais técnicas realizadas pelo grupo de pesquisa.

Aos amigos que a pós-graduação me deu, Ananda, Tati e Audrei, muito obrigada por toda ajuda nos experimentos e pela companhia do dia a dia. Como fez diferença ter vocês comigo em todos os momentos do laboratório e também em vários deles fora do laboratório. Sinto-me uma pessoa de muita sorte por ter tido joias raras como vocês nesses momentos, que muitas vezes não são fáceis, mas sabemos que temos pessoas que podemos contar para qualquer situação. Isa, Camila e Ana, chega ser engraçado como a gente se engana quando tiramos conclusões precipitadas né? obrigada por serem sempre parceiras, pessoas agradáveis nas quais nos divertimos muito dentro e fora do laboratório. Espero levar vocês todos pra sempre em minha vida; agradeço aos demais colegas do laboratório, nos quais não irei citar nomes, pois são muitos e não quero ser injusta. Com cada um eu aprendi muito e sinto um carinho especial por todos; Maroly, nossa querida que sempre fez de tudo para cuidar muito bem dos nossos ratinhos, sempre prestativa, atenciosa e colaboradora, inclusive dona do melhor café que já bebi.

Ao programa de Pós-Graduação associado em Educação Física UEM-UEL e aos coordenadores que estiveram presentes no decorrer do período de doutorado, prof. Dr. Nelson e prof. Dr. Giulliano, sempre prestativos e disponíveis para qualquer esclarecimento; à Guisela, secretária do programa, sempre eficiente em orientar para os processos burocrática; e rápida em resolver qualquer problema/necessidade que eu tive; á coordenação de aperfeiçoamento de nível superior (CAPES) e Conselho Nacional de Pesquisas e Aperfeiçoamento (CNPQ) por ceder bolsas de auxílio para que eu pudesse me dedicar integralmente à pesquisa.

Aos admiráveis professores que aceitaram participar da minha banca avaliadora e contribuíram com a finalização da minha tese, prof. Dr. Gustavo, prof. Dr. Paulo, prof. Dra. Solange e prof. Dr. Wendell.

Sou muito grata a todos vocês!

TÓFOLLO, Laize Peron. **Protector effect of treadmill moderate physical training on behavioral and cardiometabolic changes induced by hypercaloric diet after cessation of the training in rats** 2018. Doctoral thesis in physical education – Health Sciences Center. State University of Maringá, Maringá, 2018.

ABSTRACT

The present study had the objective to test if a moderate intensity physical training, performed three times to week for four weeks, may induces a long-term protection against food behavior deregulation and cardiometabolic deregulation, induces by hypercaloric intake after physical training cessation. For this, we used male Wistar rats with 60 and 90 days, who performed treadmill exercise training with moderate intensity, 3 times a week, for 30 days. After this, animals with 90 and 120 days-old were fed with hypercaloric diet (HD) or commercial diet until 120 and 150 days-old. The evaluation consisted in verifying: body weight gain, food intake pattern, satiety, lipid and glycemic profile, serial levels of triiodothyronine (T3), free thyroxine (T4), blood pressure and pulse interval. Additionally was performed a spectral evaluation of blood pressure and pulse interval variability and cardiac baroreflex sensitivity. To complement the results, were evaluated *in vitro* the dopamine receptor expression (D1) and tyrosine hydroxylase (TH) on striatum nucleus and the SOCS 3 receptor expression on hypothalamus. Results showed that physical training developed a stimulus that lasted after the training cessation in which we observed a decreased in food intake during the light period and animals that consumed HD showed total food intake decreased. The animals (DH) had a decrease in SOCS 3, which corroborates with decrease in total food intake. Physical training developed stimulus to increase satiety and TH expression and decreased D1 receptor expression. When evaluating the other cardiometabolic parameters we observed that DH consumption was responsible for develop increase of blood pressure, pulse pressure, vascular sympathetic activity, body weight gain, adipose tissue gain and deregulate the lipid metabolism. Interestingly, the physical training developed long-lasting stimuli to improve some of these parameters, such as blood pressure, LDL cholesterol and body fat. Thus, we conclude that moderate intensity physical training, performed three times to week, protected against cardiometabolic alterations induced by hypercaloric diet in adult rats. It was noted a food rhythm modulation, that may are associated with the dopaminergic system control on striatum nucleus; it was also observed that previous trained animals shows a protector effect of the training in which we observed a resistance to alterations development induced by hypercaloric diet.

Keywords: Food behaviour. Physical detraining. Metabolism. Blood pressure. Hypercaloric feed. Physical training.

TÓFOLO, Laize Peron. **Efeito protetor do treinamento físico moderado em esteira, sobre alterações comportamentais e cardiometabólicas induzidas por dieta hipercalórica após a cessação do treinamento em ratos** 2018. Tese de Doutorado em Educação Física – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo testar se um treinamento físico com intensidade moderada, realizado três vezes por semana, durante quatro semanas, pode induzir uma proteção à longo prazo, contra desregulações do comportamento alimentar e desregulações cardiometabólicas, induzidas por ingestão de dieta hipercalórica após a cessação do treinamento físico. Para isso, utilizamos ratos Wistar machos de 60 e 90 dias, que realizaram um programa de treinamento físico em esteira com intensidade moderada, três vezes na semana, durante 30 dias. Após isso, animais com 90 e 120 dias foram alimentados com dieta hipercalórica (DH) ou dieta comercial até os 120 e 150 dias de vida. Foram avaliados: o ganho de peso corporal, padrão alimentar, saciedade, perfil lipídico e glicêmico, níveis séricos de triiodotironina (T3), tiroxina livre (T4), pressão arterial e intervalo de pulso. Adicionalmente foi realizada uma avaliação espectral da variabilidade da pressão arterial e intervalo de pulso; e sensibilidade barorreflexa cardíaca. A fim de complementar os resultados, foram avaliados *in vitro* a expressão de receptor de dopamina (D1) e tirosina hidroxilase (TH) no núcleo estriado e a expressão de receptores de SOCS 3 no hipotálamo. Os resultados demonstraram que o treinamento físico desenvolveu um estímulo que perdurou após a cessação do treinamento no qual observamos uma diminuição da ingestão alimentar durante o período claro; animais que consumiram DH apresentaram uma diminuição da ingestão alimentar total. Os animais (DH) apresentaram redução de SOCS 3, o que corrobora com a diminuição da ingestão alimentar total. O treinamento físico estimulou o aumento da saciedade e da expressão de TH e a diminuição da expressão do receptor D1. Ao avaliar os demais parâmetros cardiometabólicos foi observado que o consumo de DH foi responsável por desenvolver aumento da pressão arterial, pressão de pulso e atividade simpática vascular. Além disso, o consumo de DH estimulou um maior ganho de peso corporal, ganho de tecido adiposo e desregulação do metabolismo lipídico. Interessantemente, o treinamento físico prévio desenvolveu estímulos duradouros para melhorar alguns desses parâmetros, como a pressão arterial, colesterol LDL e gordura corporal. Desta forma, concluímos que o treinamento físico de intensidade moderada, realizado três vezes na semana, protegeu contra alterações cardiometabólicas induzidas por dieta hipercalórica em ratos adultos. Notou-se uma modulação no ritmo alimentar, que pode estar associado com o controle do sistema dopaminérgico no núcleo estriado; também observou-se que animais previamente treinados apresentaram um efeito protetor do treinamento no qual ressalta-se uma resistência para o desenvolvimento de alterações induzidos por dieta hipercalórica.

Palavras-Chave: Comportamento alimentar. Destreinamento físico. Metabolismo. Pressão arterial. Ração hipercalórica. Treinamento físico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo experimental (introdução geral).....	08
Figura 1 -	Análise de Western Blotting para receptores de SOCS-3 no hipotálamo (artigo 1).....	28
Figura 2 -	Análise de Western Blotting para receptores de tirosina hidroxilase (TH) e dopamina (D1) no núcleo estriado (artigo 1).....	29
Figura 1 -	Parâmetros biométricos em animais com 150 dias de vida (artigo 2)..	42
Figura 2 -	Pressão arterial em animais com 150 dias de vida (artigo 2).....	43
Figura 3 -	Análise espectral da pressão arterial e intervalo de pulso em animais com 150 dias de vida (artigo 2).....	44
Figura 4 -	Perfil lipídico em animais com 150 dias de vida (artigo 2).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo de treinamento físico de intensidade moderada de animais com 60 e 90 dias de vida (metodologia geral).....	09
Tabela 1 -	Protocolo de treinamento físico (artigo1).....	20
Tabela 2 -	Parâmetros biométricos e bioquímicos aos 120 dias de vida (artigo1).....	25
Tabela 3 -	Comportamento alimentar e saciedade aos 120 dias de vida (artigo1).....	27
Tabela 1 -	Protocolo de treinamento físico (artigo 2).....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANS	<i>Autonomic Nervous System/</i> Sistema Nervoso Autônomo
BCA	Ácido Bicinconinico
BW	<i>Body Weight/</i> Peso Corporal
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CM	Centímetro
DBP	<i>Diastolic Blood Pressure/</i> Pressão Arterial Distólica
DC	Dieta Comercial
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DEF	Departamento de Educação Física
DH	Dieta Hipercalórica
DTT	Ditiotreitól
D1	Receptor de Dopamina
EXE	Exercitado
G	Gramas
HDL	<i>High Density Lipoprotein/</i> Lipoproteína de Alta Densidade
HFD	<i>High-Fat Diet/</i> Dieta com Alto teor de Gordura
HF-IP	Alta Frequência do Intervalo de Pulso
HFS	<i>High-Fat-Sugar/</i> Alto Teor de Gordura e Açúcar
IP	Intervalo de Pulso
KCAL	Quilocaloria
LBCS	Laboratório de Biologia Celular da Secreção
LDL	<i>Low Density Lipoprotein/</i> Lipoproteína de Baixa Densidade
LDS	Dodecilsulfeto de Lítio
LF/HF-IP	<i>Ratio Low Frequency/ High Frequency of Pulse Interval/</i> Razão Baixa Frequência/Alta Frequência do Intervalo de Pulso
LF-SBP	<i>Low Frequency of Systolic Blood Pressure/</i> Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica

MPB	<i>Mean Blood Pressure/</i> Pressão Arterial Média
N	Quantidade Numérica
NFS	<i>Normal Fat Sugar/</i> Açúcar e Gordura Normais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PI	<i>Pulse Interval/</i> Intervalo de Pulso
SBP	<i>Systolic Blood Pressure/</i> Pressão Arterial Sistólica
SD	Desvio Padrão
SED	Sedentário
SEC	<i>Seconds/</i> Segundos
SEG	Segundos
SEM	Erro Padrão
SN	<i>Substancia Nigra/</i> Substância Negra
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SOCS-3	<i>Supressor of Cytokine Signalling-3/</i> Supressor de sinalização de citocinas – 3.
T3	Diiidotironina
T4	Tiroxina Livre
TH	Tirosina Hidroxilase
TF	Treinamento físico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein/</i> Lipoproteína de densidade muito baixa
VO2MAX	Velocidade Máxima Captação de Oxigênio
WHO	<i>Word Health Organization/</i> Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	06
3 MÉTODOS	07
4 RESULTADOS	16
4.1 Artigo 1	16
4.2 Artigo 2	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, nas últimas décadas, passou por uma transição epidemiológica caracterizada pela mudança progressiva de um perfil de mortalidade por doenças infectocontagiosas para outro perfil em que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) passaram a ser responsáveis pelo aumento do índice de mortalidade (1). Juntamente com as DCNT, a falta de exercícios físicos regulares contribui para este aumento da mortalidade (2). O período de transição epidemiológica também foi acompanhado por uma mudança nos hábitos de vida da população em geral. As facilidades do dia-dia e a falta de tempo levaram as pessoas a desenvolverem comportamentos sedentários e consumirem alimentos rápidos, industrializados, ricos em gordura e açúcar, fator este que contribuiu para o desenvolvimento das DCNT (3, 4).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças crônicas do pulmão foram as principais causadoras de quase 2/3 das mortes no mundo (5). A literatura aponta que dietas pobres em nutrientes (baixo teor proteico), ou as dietas hipercalóricas podem desregular as vias centrais que controlam o comportamento alimentar, e, deixar o metabolismo mais propenso ao surgimento ou desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (6-8). Nota-se que na sociedade contemporânea, o acesso a alimentos altamente saborosos, ricos em gordura e açúcar, é ilimitado e nutricionalmente empobrecidos (3). Desta forma, a ingestão crônica desses alimentos, está relacionada com o aumento do tecido adiposo e desenvolvimento de obesidade e doenças relacionadas (3).

O comportamento alimentar possui um padrão que pode ser caracterizado por refeições de diferentes quantidades e em diferentes frequências e durações ao longo de um dia (9). Essas informações evidenciam uma imagem dinâmica da ingestão alimentar de forma integral, nas quais, podem ser apresentadas de formas distintas em

ratos obesos e controles (9). Diferente do comportamento alimentar humano, os roedores possuem hábitos noturnos e 70% da sua alimentação ocorre no período escuro (10, 11). Estudos em animais mostram que o consumo de dieta rica em gordura (HFD) altera os padrões alimentares e a ritmicidade alimentar, além de alterar o ritmo circadiano do fígado (12, 13). Essas alterações acontecem devido aos animais reduzirem a amplitude do ritmo diário alimentar, ou seja, sua alimentação é igualmente distribuída durante o dia e a noite (12). Os padrões alimentares em ratos Zucker obesos são caracterizados por refeições maiores e aumento da ingestão alimentar no período claro (9, 14). Além disso, quando um animal é brevemente exposto à uma HFD nota-se uma maior acumulação de tecido adiposo, resistência à insulina e aumento da pressão arterial (15-17).

A hipertensão tem sua etiologia dependente de fatores genéticos, ambientais e comportamentais e também se desenvolve devido a outros distúrbios metabólicos, como a hiperglicemia, aumento da concentração de lipídios sanguíneos, sobrepeso e obesidade (18). Além disso, o aumento da ingestão alimentar com alta concentração de gordura contribui para o surgimento ou agravamento destes distúrbios. Estudos têm demonstrado que o consumo HFD tem alta correlação com doenças metabólicas e cardiovasculares, mesmo quando estes alimentos são consumidos durante um curto período de tempo (8, 17, 19). Outros estudos também apontam que o consumo de HFD pode desregular o sistema nervoso simpático (SNS), por meio do aumento da norepinefrina plasmática e concomitante aumento da atividade simpática renal, na qual pode contribuir, dentre outras disfunções, para a desregulação da pressão arterial (16, 20). A partir deste contexto de doenças e/ou distúrbios metabólicos, os exercícios físicos são considerados eficientes estratégias não farmacológicas, para a prevenção e tratamento de doenças cardiometabólicas induzidas por ingestão de HFD (21).

Muito se sabe sobre os vários benefícios do exercício físico na saúde, sendo eles o aumento da capacidade aeróbia, redução da obesidade, proteção/prevenção ou tratamento/melhora de doenças cardiometabólicas (17, 22-24) e também a contribuição para um maior controle do ritmo e comportamento alimentar (25, 26). Estudos em ratos mostraram que o exercício físico voluntário regula o comportamento alimentar e diminui a preferência por alimentos palatáveis (26, 27). O exercício pode modular o sistema

dopaminérgico mesocorticolímbico, o qual também é modulado por outros fatores como a motivação, o relógio biológico, a locomoção e a oscilação circadiana da ingestão alimentar (28). No núcleo estriado, o neurotransmissor dopamina atua na modulação da coordenação motora, recompensa, comportamentos motivacionais e emotivos (29). Além disso, a dopamina regula os processos cerebrais desenvolvidos com a prática de exercícios físicos (28, 30). É interessante ressaltar que, em animais, o início da vida (infância e adolescência) são períodos de intensa plasticidade neuronal, e os estímulos aplicados nessas fases podem desenvolver maior susceptibilidade para a saúde ou doença na vida adulta (31-33). Desta forma, realizar exercícios físicos durante essas fases, pode desenvolver um mecanismo de proteção ao metabolismo, mesmo quando o exercício é cessado (15, 34).

Por outro lado, sabe-se que deixar de realizar 20 a 30 minutos de caminhada rápida, por dia, pode aumentar em 20-30% as chances de desenvolvimento de doenças cardíacas (35). Porém, já é conhecido que um fator importante a se considerar é a continuidade do exercício físico para a manutenção dos ganhos adquiridos com a prática (36). Estudos mostram que a interrupção do treinamento ou destreino, pode levar a perdas parciais ou completas dos benefícios previamente adquiridos (34, 36, 37). Estes diferentes efeitos, estão relacionados com o tipo de exercício físico que é previamente realizado, a intensidade, frequência, o período da vida na qual é aplicado e a duração do treinamento e do destreino (38-40). Contudo, o efeito do destreino pode ser diferente nos sistemas orgânicos. Alguns estudos mostram que adaptações cardiometabólicas induzidas pelo treinamento persistem após um período de destreino (15, 38, 41, 42). Outros estudos mostram que as adaptações cardiometabólicas desenvolvidas com a prática de exercícios físicos, são abolidas completamente após um período de destreino (43-46). Já, quando verificamos a questão comportamental da ingestão alimentar, notamos um efeito diferente do treinamento físico após um período de destreino. De acordo com estudos experimentais, ritmos alimentares desregulares e a diminuição da atividade locomotora induzida por alimentação rica em gordura, são melhorados quando animais são expostos a um treinamento voluntário, o que se sugere que o exercício físico melhora a organização do ritmo circadiano geral e alimentar (47, 48). Porém, adaptações no

controle da ingestão alimentar, são revertidas com somente duas semanas de destreinamento (49, 50). Nota-se, desta forma, que o sistema de regulação alimentar é sensível no período de destreinamento, pois a perda dos benefícios induzidos pela prática sobre a regulação alimentar, parece acontecer mais rapidamente do que a perda dos benefícios sobre o metabolismo (49, 50). Nota-se que muitos trabalhos científicos utilizam o exercício voluntário nos estudos do comportamento alimentar. Há uma escassez em pesquisas a respeito do efeito do treinamento físico em esteira motorizada após um período de destreinamento, sobre o controle do comportamento alimentar de ratos.

Visto a importância da prática dos exercícios físicos sobre o controle metabólico, ressalta-se a necessidade de estudos com intensidades de treinamento controladas para melhor esclarecimento dos resultados relacionados com o comportamento alimentar. Ainda, é interessante desvendar os mecanismos que o treinamento físico moderado (realizado somente três vezes na semana) desenvolve e que é mantido após um período de destreinamento. Sabe-se que a esteira motorizada é um equipamento no qual é possível prescrever exercícios físicos, com intensidades controladas, e com isso, possui características diferentes dos exercícios físicos voluntários, para ratos. Porém, poucos estudos foram publicados envolvendo exercício físico em esteira e a relação com o controle circadiano do comportamento alimentar (51, 52). Esses poucos estudos concluíram que o exercício físico realizado em esteira motorizada não é tão efetivo quanto o exercício físico realizado de forma voluntária, para modificar o padrão alimentar em roedores (51, 52). Por outro lado, o exercício voluntário altera o estado motivacional, e conseqüentemente, afeta o ritmo circadiano alimentar em ratos (48). Desta forma este tipo de exercício possui uma estreita relação entre a questão comportamental e a ativação de áreas hedônicas centrais. Assim, os animais realizam o exercício quando sentem vontade e o fazem porque sentem prazer (48). Ressalta-se ainda que os dados sobre o destreinamento e sua relação tanto com o comportamento alimentar ou com o sistema cardiovascular e metabólico requerem mais pesquisas a fim de contribuir com a elucidação do possível efeito benéfico do exercício moderado, realizado três vezes na semana em ratos adultos/jovens e seu efeito durador contra os distúrbios induzidos pela obesidade; já que a maioria dos trabalhos utilizam o

exercício físico de intensidade moderada-alta e com uma frequência de 5 vezes na semana e poucas vezes estudam o que acontece durante a cessação do treinamento físico concomitante com uma alimentação rica em gordura.

Em um estudo anterior, mostramos que o treinamento físico de intensidade moderada em esteira desenvolve efeitos benéficos que perduram após um período de destreino e alimentação hipercalórica em ratos jovens/adultos. Estes efeitos foram: atenuação do ganho de peso e gordura corporal, da pressão arterial, da resposta glicêmica e insulinêmica frente um teste de tolerância a glicose e da atividade parassimpática vagal. A partir disso, seguimos nossa linha de pesquisa com a hipótese de que o treinamento físico de intensidade moderada, realizado três vezes por semana em esteira, desenvolve proteção sobre as alterações do comportamento alimentar em ratos jovens/adultos e alterações cardiometabólicas em ratos adultos, induzidas por dieta hipercalórica após a cessação do treinamento, em ratos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo testar se um curto período de treinamento físico com intensidade moderada, realizado três vezes por semana, induz proteção à longo prazo, contra desregulações do comportamento alimentar e desregulações cardiometabólicas, induzidas por ingestão de dieta hipercalórica após a cessação do treinamento físico.

3 MÉTODOS

Modelo experimental e dieta

Ratos Wistar machos com 60 dias de vida (Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil) foram mantidos na unidade de experimentação animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil (artigo 1). Outro grupo de animais com 90 dias de vida foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção (LBCS) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (artigo 2). Todos os animais foram mantidos no biotério com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12h/12h) e a humidade relativa (40-60%) controlada. O acesso à água e a ração foi *ad libitum*. Aos 60 (artigo 1) e 90 (artigo 2) dias de vida parte dos animais iniciaram um protocolo de treinamento físico em esteira, que perdurou por 30 dias. Outra parte dos animais foram mantidos sedentários. Durante o período de treinamento físico, todos os animais foram alimentados com uma dieta padrão comercial. Após este período (90-120 ou 120-150 dias de vida para os respectivos grupos), os animais foram alimentados com dieta comercial ou uma dieta hipercalórica e neste período todos os animais permaneceram sedentários. Desta forma, obtivemos quatro grupos experimentais, avaliados dos 60 aos 120 dias de vida (artigo 1) e quatro grupos experimentais avaliados dos 120 aos 150 dias de vida (artigo 2), que foram caracterizados como: ratos sedentários e exercitados alimentados com dieta comercial e ratos sedentários e exercitados alimentados com dieta hipercalórica (figura 1). Para isso, foi utilizado um total de 128 animais.

A dieta comercial conteve em torno de 3,4 Kcal/g e a dieta hipercalórica em torno de 5,3 kcal/g. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, projeto número 15-0344) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (protocolo número 9213241014). Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com as recomendações

nacionais e internacionais para pesquisas envolvendo animais, incluindo a Lei Brasileira No. 11,794 de 2008.

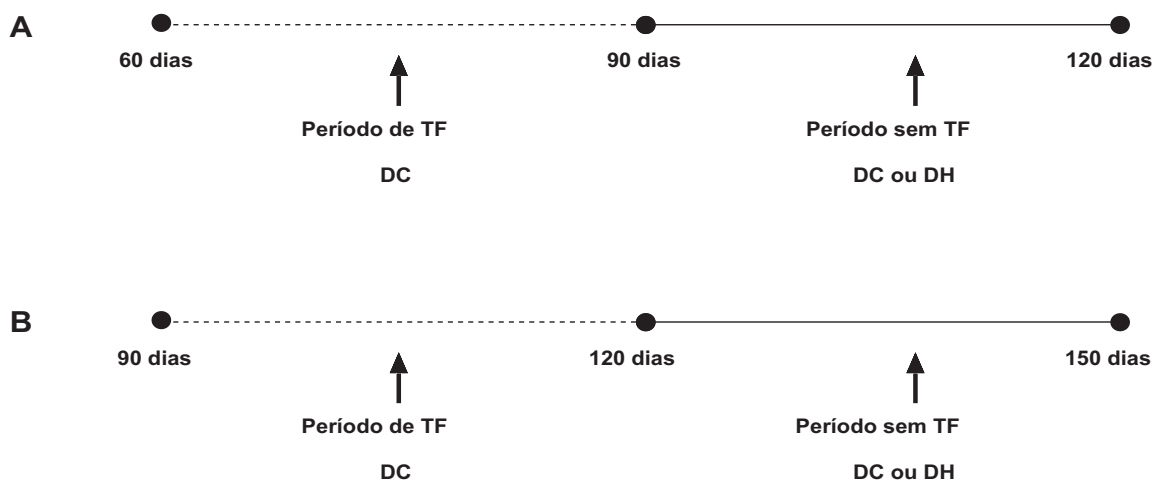


Figura 1 – Protocolo experimental. A linha A, representa os animais do estudo 1 (60-120 dias de vida) e a linha B, representa os animais do estudo 2 (90-150 dias de vida). A linha tracejada representa o período no qual os animais realizaram o protocolo de treinamento físico (TF). Neste período uma parte dos animais permaneceu sedentária e ambos os grupos foram alimentados com dieta comercial (DC). A linha contínua representa o período no qual os animais não realizaram mais o treinamento físico. Parte dos animais sedentários e treinados previamente continuaram recebendo dieta comercial (DH) e a outra parte dos animais recebeu dieta hipercalórica (DH).

Protocolo de treinamento físico em esteira

O programa de treinamento físico foi realizado em uma esteira motorizada, com controle eletrônico de velocidade, três vezes por semana, durante 4 semanas (12 sessões). O treinamento físico baseou-se em um protocolo de intensidade moderada, proposto por Negrão et.al. (1992) (53). Este protocolo foi adaptado e sua intensidade foi confirmada por meio de testes de esforço físico, conforme descrito anteriormente (15). Os testes foram realizados no início (2 dias antes da primeira sessão de treinamento), no meio (após 6 sessões de treinamento), e no fim do protocolo de treinamento (2 dias após a última sessão de treinamento). A velocidade proposta pelo protocolo de treinamento físico foi considerada como uma porcentagem da velocidade pico, obtida no teste de esforço máximo. As intensidades encontradas foram de 50, 66 e 68% do

pico de velocidade máxima obtida no teste, o que confirmou a intensidade moderada do treinamento. O programa de treinamento físico iniciou com sessões de 16 cm/seg por 10 min (1º semana) e finalizou com sessões de 26 cm/seg por 60 minutos (4º semana) conforme especificado na tabela 1. Os animais que se recusaram a realizar o treinamento físico, por três treinos consecutivos foram excluídos da pesquisa.

Tabela 1 – Protocolo de treinamento físico de intensidade moderada de animais com 60 e 90 dias de vida.

PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO				
<i>Semanas</i>	<i>Sessões</i>	<i>Velocidade (cm/seg)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Intensidade correspondente ao VO₂máx</i>
1º	1º	16	10	50%
	2º	16	20	50%
	3º	16	20	50%
2º	4º	16	30	50%
	5º	19	40	66%
	6º	19	40	66%
3º	7º	19	40	66%
	8º	22	50	66%
	9º	22	50	68%
4º	10º	22	55	68%
	11º	26	60	68%
	12º	26	60	68%

Avaliação do peso e gordura corporal

O peso corporal foi mensurado uma vez por semana durante todo o período experimental. Após a eutanásia, estoques de gordura corporal branca foram removidos e pesados. A porcentagem de gordura relativa ao peso corporal foi usada para estimar o acúmulo de gordura corporal.

Dosagens bioquímicas e coleta de tecidos

No final do protocolo experimental e após jejum, os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue do tronco cerebral foi coletado e o soro foi congelado em um freezer com temperatura de -80°C , para posteriores análises da glicemia, lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol total, triglicerídeos, Diiodotironina (T3) e tiroxina livre (T4), dosados por meio do método enzimático calorimétrico (glicose e lipídios) e método de imunoenensaio por quimiluminescência direta (T3 e T4; limite de ensaio: T3, 0,15-12,3 nmol/l; T4, 3,9-387 nmol/l). O colesterol LDL e VLDL foram calculados de acordo com a equação de Friedewald: $\text{LDL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$ e $\text{VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$ (54).

Após a eutanásia, o cérebro de animais com 120 dias foi dissecado, rapidamente congelado em isopentano e estocado em freezer com temperatura de -80°C . Para posterior dissecação do núcleo estriado e hipotálamo, os cérebros congelados foram transferidos para uma caixa térmica com temperatura de -20°C e cortados manualmente em fatias coronais de 0,25 mm de diâmetro. As estruturas foram identificadas por meio de um atlas anatômico (55) e processadas por meio da técnica de Western Blotting.

Análise do padrão alimentar e saciedade

A ingestão alimentar de animais dos grupos experimentais de 90-150 dias de vida foi mensurada 3 vezes por semana, durante todo o protocolo experimental. A ingestão alimentar foi calculada como a diferença entre a quantidade de alimento restante e o total fornecido, que foi dividido pelo número de dias que a ração ficou disponível e o número de ratos que se alimentaram na caixa.

Para os grupos experimentais avaliados dos 60-120 dias de vida, a avaliação do comportamento alimentar foi realizada em dois períodos: durante a última semana do programa de treinamento físico (idade aproximada dos animais: 90 dias) e durante a última semana de destreino (idade aproximada: 120 dias). Para isso, foi usado um sistema de monitoramento alimentar (BioDAQ[®] monitoring system - Research Diets[®])

previamente descrito (56). Este sistema consiste em dois funis alimentares que são montados em uma caixa específica e individual para ratos, acoplados a um medidor de tensão eletrônico (balança) para mensuração da ingestão alimentar. Os funis alimentares eram pesados 50 vezes por segundo (precisão de 0,01g), e a média e o desvio padrão (SD) da ingestão alimentar/seg, foi calculado usando um computador periférico. A alimentação era sinalizada por flutuações no peso do funil (definido como $SD > 2000$ mg) causado pela ingestão do animal. Cada evento alimentar (data e hora de início da alimentação, duração da alimentação, peso final do funil e quantidade consumida) foi registrado e exportado para um computador e os dados transferidos para uma planilha do Excel (Microsoft, Redmond, WA) para o posterior análise e cálculo dos parâmetros de interesse. O sistema registra dois tipos de eventos alimentares: ataques (*bout*) e refeições. O final de um *bout* alimentar é sinalizado quando o funil não é tocado por pelo menos 5 segundos (definido como $SD < 2000$ mg). A partir disto, a duração do evento alimentar e a quantidade consumida (peso do funil inicial – peso do funil final) foi calculada. A refeição foi definida como uma diferença no peso do funil de 0,1g, separada de outro *bout* alimentar dentro de um intervalo de 15 minutos (32, 33, 57). A análise foi realizada dentro dos ciclos de luz claro e escuro.

Para análise da ingestão alimentar, após três semanas de treinamento na esteira, os animais foram transferidos para caixas individuais equipadas com o sistema de monitoramento de ingestão alimentar (BioDAQ[®]) e tiveram acesso a ração comercial (AIN 93 M, Nuvital[®]) e água *ad libitum*. O programa de treinamento ocorreu normalmente neste período que os animais encontravam-se em avaliação. Após 2 dias de adaptação ao equipamento, foi registrado e avaliado a ingestão de ração (ingestão total em gramas (g) e em quilocalorias (Kcal), número total de refeições (n) e tamanho das refeições em gramas (g), número total de *bouts* (n) e tamanho dos *bouts* (g)) em animais sedentários e exercitados, por 2 dias consecutivos. O segundo momento da análise da ingestão alimentar ocorreu após três semanas de destreinamento, no qual os animais sedentários e exercitados alimentados com ração comercial ou hipercalórica retornaram para as caixas individuais equipadas com o sistema BioDAQ[®]. Os parâmetros avaliados foram os mesmos que ocorreram na primeira análise.

Para analisar a saciedade relativa, foi realizado um cálculo sobre a ingestão alimentar de animais com aproximadamente 120 dias de vida (na última semana de destreinamento), na qual utilizamos duas variáveis: a quantidade de ração consumida em gramas e o intervalo entre as refeições em segundos $((\text{intervalo}/\text{consumo}) \times 100/\text{peso corporal})$.

Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

A pressão arterial sistólica, diastólica, média, frequência cardíaca e intervalo de pulso dos animais pertencentes ao grupo experimental dos 60 aos 120 dias de vida, foram realizadas e os dados foram publicados em um estudo anterior (15). Como continuidade, ratos com 150 dias de vida, foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina intramuscular (3 e 0,6 mg/100g de peso corporal, respectivamente) e um cateter P10 (cânula P10-Micro-Renathane conectada a uma cânula P50-ClearTygon) preenchido com solução salina heparinizada (500 unidades / mL) foi implantado na artéria femoral e avançado (4 cm) até a ponta da cânula situar-se na aorta abdominal. Durante a cirurgia, foi administrado uma dose de antibiótico (Cloridrato de Doxiciclina - 2 mg/Kg de peso corporal, intra-arterial) e após a cirurgia, foi colocado uma dose de analgésico na água dos animais (Metamizol sódico - 12,5 mg/dia, durante 2 dias). Os animais foram mantidos em caixas individuais e 2 dias após a implantação do cateter arterial foi injetado 0,1 ml de solução salina heparinizada (500 unidades / mL) na cânula, para eliminar qualquer possível coágulo (58). As gravações da pressão arterial foram realizadas 4 dias após o procedimento cirúrgico, a fim de evitar qualquer interferência da cirurgia (59). No período de recuperação pós-cirurgia, os animais foram examinados diariamente, e aqueles que apresentavam indícios de sofrimento ou estresse, foram excluídos da amostragem da pesquisa.

Os experimentos foram realizados após 1 hora de adaptação à sala experimental. A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) basal, frequência cardíaca (FC) e intervalo de pulso (IP) basais, foram registrados com os animais livres na caixa por um período de 30 minutos. Para isso, a cânula arterial completa com soro fisiológico foi conectada a um transdutor de pressão arterial

(MLT0699, AD Instruments, Dunedin, Nova Zelândia), e este transdutor foi conectado a um amplificador de sinais (Insight, Ribeirão Preto/SP Brasil). As gravações foram registradas a 1000Hz na qual foi usado uma placa conversora analógico-digital (CODAS, frequência de amostragem de 1 kHz, Dataq Instruments. Inc, Akron, OH). As análises foram realizadas batimentos por batimentos para quantificar as mudanças na pressão arterial (PA) e no IP (60).

Para a análise espectral da variabilidade cardiovascular e sensibilidade barorreflexa cardíaca, os dados da PAS e IP batimento por batimento foram utilizados por meio do *software CardioSeries v 2.4* (<http://www.danielpenteado.com/>). A força espectral foi calculada por meio de segmentos de sobreposição múltipla (50%) 512 pontos de dados da PAS e IP estacionário (51.2 s) usando uma transformação rápida de Fourier (61). O espectro foi integrado nas bandas de baixa frequência (LF; 0,2 a 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75 a 3,0 Hz) (61). A sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea foi estimada pelo método da sequência (62). Quatro consecutivos batimentos nos quais aumentaram a PAS, seguidos pelo alongamento do IP foram considerados uma sequência barorreflexa ascendente e as diminuições na PAS seguidas pelo encurtamento do IP foram considerados uma sequência barorreflexa descendente, com correlação linear maior que 0,85 (32).

Análise de Western blotting

Como complemento das análises previamente realizadas, e a fim de desvendar possíveis mecanismos dos resultados obtidos, as amostras do núcleo estriado dorsal e do hipotálamo de ratos eutanasiados com 120 dias de vida, foram estudadas. Ressalta-se que, por questões laboratoriais e estruturais, as análises foram realizadas somente em animais com 120 dias. Para isso, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão de extração citosólica com inibidores de protease (Coquetel inibidor de Protease) e fosfatase (Coquetel inibidor de fosfatase – PhosSTOP). As amostras foram centrifugadas à uma rotação de 3000 rpm, por 10 minutos, à 4°C, para posterior extração da fração citosólica. Subsequentemente, foi realizada uma centrifugação adicional a 13000 rpm, por 30 minutos, à temperatura de 4°C. Parte do sobrenadante (2

μL) foi usado para quantificar o conteúdo total de proteínas, determinada com um kit de ácido bicinconínico (BCA), usando albumina de soro bovino como padrão. Uma parte do sobrenadante contendo 40 μg de proteína foi incubada com Dodecilsulfato de lítio (LDS) e ditioneitol (DTT) a 99°C, durante 3 minutos. Essas amostras e um padrão de peso molecular (MagicMark) foram pipetadas em géis de gradiente de poliacrilamida de 4-12%, submetidos a eletroforese e depois transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Para uma melhor comparação entre os grupos, utilizamos géis com 13 poços, nos quais seis poços foram pipetados com amostras de um grupo experimental, seis poços com amostras de outro grupo experimental e um poço com um marcador de peso molecular. Assim, em cada gel obtivemos uma comparação entre dois grupos experimentais, para evitar comparações cruzadas entre os géis. Foram realizadas quatro análises entre grupos, originadas a partir de quatro géis de cada estrutura. As transferências foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris contendo 5% de leite sem gordura e 1% de Tween-20. As membranas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário (anticorpo do receptor anti-dopamina D1, 1:1000 ou anti-tirosina hidroxilase, TH 1:5000). No dia seguinte, as membranas foram incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário (*anti-rabbit* 1: 2000, *Cell Signaling*, 7074s ou *anti-mouse* 1: 2000, *Cell Signaling*, 7076s). As membranas foram então molhadas com ECL (*ECL western blot analysis system*, *GE healthcare*, RNP2106) e avaliadas em *ImageQuant LAS 4000 imager* (*GE Healthcare Life Sciences*). A intensidade das bandas do *Western Blot* foi quantificada por densitometria usando o *software Image-J* (*Research Services Branch*, Instituto Nacional de Saúde Mental, *Maryland, EUA*). Os resultados foram expressos como a proporção de proteína de interesse contra um padrão para a β-actina (1:1000, *Sigma-Aldrich*, A4700).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão (SEM). Foi utilizado para a análise estatística, o software *GraphPadPrism* versão 6.01 para Windows (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, EUA). As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância de duas vias (ANOVA-TwoWay) seguida do teste de comparações

múltiplas de Tukey. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos ao analisar o efeito principal da dieta (pd), exercício físico (pe), sua interação (dieta vs exercício) e as diferenças entre os grupos. Quando a comparação era realizada somente entre dois grupos, foi utilizado o teste t student.

4 RESULTADOS

4.1 – Artigo 1

Long-lasting effect of moderate treadmill exercise against feeding behaviour deregulation induced by hypercaloric diet in rats

Resumo

Objetivo: Testar a hipótese de que o treinamento físico de intensidade moderada em esteira, realizado três vezes por semana oferece proteção a longo prazo contra desregulações no comportamento alimentar induzidos por ingestão de uma dieta hipercalórica que pode estar relacionado com potenciais mecanismos de regulação central. **Métodos:** ratos com 60 dias de idade foram submetidos ao treinamento moderado, três vezes por semana, durante 30 dias. Após isso, os ratos receberam uma dieta hipercalórica (com alto teor de gordura e açúcar - HFS) ou dieta padrão comercial, durante 30 dias. Os animais sedentários também receberam as mesmas dietas. Aos 120 dias, o comportamento alimentar foi analisado com o auxílio de um sistema computadorizado (BioDAQ, Research Diets[®]) e após, foram realizadas as análises biométricas, bioquímicas e moleculares. Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA two-way seguido de post hoc de Tukey. **Resultados:** O treinamento físico foi associado com diminuição da ingestão alimentar no período claro e aumento da saciedade, enquanto a dieta HFS foi associada com diminuição da ingestão alimentar total e aumento da saciedade (mais evidente em animais EXE-HFS). O treinamento físico estimulou um aumento da expressão de tirosina hidroxilase e diminuição da expressão do receptor de dopamina D1, no núcleo estriado. A dieta HFS foi associada com diminuição da expressão de SOCS3 no hipotálamo. **Conclusão:** O treinamento físico parece modular o ritmo alimentar mesmo após a cessação do treinamento; essas mudanças comportamentais são associadas com diferenças na expressão de TH e D₁ no sistema dopaminérgico no núcleo estriado. Em ratos previamente exercitados, a ingestão crônica da dieta HFS atenuou os benefícios do treinamento físico.

Palavras chaves: Sistema dopaminérgico, comportamento alimentar, dieta hipercalórica, metabolismo, treinamento físico em esteira.

Abstract

Objective: Test the hypothesis that treadmill physical training with moderate intensity performed three times to week, provides long-term protection against the deregulation in feeding behaviour induced by hypercaloric diet intake that may be related to potential central regulation mechanisms. **Methods:** Sixty-day-old rats were subjected to moderate

physical training, three times weekly for 30 days. Once trained, rats received a hypercaloric diet (high-fat, high-sugar diet - HFS) or commercially available standard rat chow for 30 days. Sedentary animals also received the same diets. At age 120 days, feeding behaviour was analysed using a computerized system (BioDAQ, Research Diets[®]), followed by biometrical, biochemical and molecular measurements. Data were analysed by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. **Results:** Physical training was associated with decreased food intake in the light period and increase satiety while HFS diet was associated with decreased food intake and satiety (more evident in exercised animals). Exercise increased striatal tyrosine hydroxylase (TH) expression, and decreased striatal dopamine receptor (D₁) expression. The HFS diet was associated with decreased SOCS3 expression in the hypothalamus. **Conclusion:** Physical training appears to modulate food intake rhythm same after cessation of the training; these behavioural changes are associated with differences in the expression of TH and D₁ on the striatal dopaminergic system. In previous trained rats, chronic intake of a HFS diet attenuated the benefits of the physical training.

Key-Words: Dopaminergic system, food behaviour, hypercaloric diet, metabolism, treadmill physical training.

Introduction

Obesity has been considered a serious public health problem with substantial impact on mortality, mainly due to the development of related conditions such as dyslipidaemia, hypertension and diabetes, which may be related with alterations on feeding behaviour and its central brain modulation (18). In turn, poor nutrition quality due to a deregulated feeding behaviour can contribute to the development of obesity and its harmful consequences (6-8). Feeding patterns, which can be characterized by meals of different sizes, frequencies, and durations across the circadian cycle, provide a dynamic picture of integrated eating behaviour. Eating patterns are different in normal and obese states (9). In contemporary society, there is unlimited access to highly palatable foods, rich in fat and sugar but nutritionally impoverished; chronic intake of these diets is linked to increased adipose tissue deposition and ultimately, to the development of obesity and related diseases. Animal studies show that brief exposure to a high-fat diet (HFD) is enough to induce accumulation of adipose tissue, higher

blood pressure and insulin resistance (15-17). Furthermore, HFD disrupts eating patterns and the liver circadian clock (12).

In this context, guided physical exercise has been proposed as a non-pharmacological treatment that is effective and indicated for all ages and yields better health-protective effects when performed continuously (63). In fact, detraining (training followed by a sedentary period) can be harmful to health, depending on the type, intensity, duration and the period of life during which exercise is performed (38-40). In animals, early life, infancy and adolescence are periods of intense neuronal plasticity, when insults or stimuli may make the organism more susceptible to health or disease later in life (31-33). Exercise during these vulnerable phases can be protective, even after a detraining period (15, 34).

Animal studies have shown that physical exercise regulates feeding behaviour. Recent studies using voluntary exercise showed that exercised animals exhibit decreased preference for palatable diets (26, 27). The mechanisms implicated in exercise-mediated appetite suppression and food intake control are not fully understood. Additionally, abnormal feeding rhythms and locomotor activity induced by HFD in rats are ameliorated by exposure to voluntary exercise, which occurs concomitantly with weight reduction, suggesting that exercise can modulate the circadian organization and daily rhythms of eating behaviour (47, 48). However, when exercise ceases, the adaptations induced by training, such as food intake control and lower adiposity, are reversed with only 2 weeks of detraining (49, 50).

Surprisingly, research involving physical training on a motorized treadmill (which has different characteristics than voluntary physical activity), with the training performed only three times a week during 30 days and with the moderately intensity rigorously controlled during the sessions on young adult animals and the relation to feeding behaviour protection after cessation of the training and hypercaloric diet consumption is scarce. Within this context, we aimed to test the hypothesis that physical training with moderate intensity performed three times to week, provides long-term protection against the deregulation in feeding behaviour induced by hypercaloric diet intake that may be related to potential central regulation mechanisms.

Methods

Experimental design

Male Wistar rats (Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil) were housed in the animal experimentation unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (n=48). Three animals per cage were randomly housed in a room maintained at 22 ± 2 °C with a 12/12 h light/dark cycle and relative humidity between 40 and 60%. Access to water and food were provided *ad libitum*. After 2 weeks of environmental adaptation, at 60 days of life, half of the animals (n=24) were subjected to an physical training protocol for 30 days, while the other half remained sedentary. Throughout this period, all animals were fed a normal-fat, normal-sugar diet (NFS). From 90 to 120 days of life, the two groups were further divided into two subgroups, one receiving a NFS and one a high-fat, high-sugar diet (HFS), and training was interrupted. Four groups were therefore obtained: sedentary rats fed NFS (SED-NFS), sedentary rats fed HFS (SED-HFS), exercised rats fed NFS (EXE-NFS) and exercised rats fed HFS (EXE-HFS). All animal procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, project number 15–0344) and followed national and international guidelines for research involving animals, including Brazilian Law No. 11,794 of 2008.

The NFS diet consisted of a commercial chow providing 3.06 kcal/g (9% mineral, 22% protein, 4% fat, 7% fibre, 45.5% carbohydrate; AIN 93 M, Nuvital®, Curitiba, Brazil), while the HFS was a hypercaloric diet providing 4.82 kcal/g (8% mineral, 14% protein, 34% fat, 6% fibre, and 30% carbohydrate, with 20% sucrose – Prag-Solutions Biosciences®, Jaú, Brazil).

Treadmill physical training protocol

Rats were trained on an adapted human treadmill, divided into eight acrylic bays. The treadmill was programmed with different speeds (10-26 cm/sec), and speed controls were adjusted manually. A plastic tube (diameter 10 cm) was placed on the back end of

the treadmill as a contact stimulus to keep the animals moving. Training was performed three times a week for 4 weeks (12 sessions, from ages 60 to 90 days), always in the morning period (around 9:00 a.m). The training sessions started at 16 cm/sec for 10 min (1^o week) and ended at 26 cm/sec for 60 min (4^o week) (table 1). This protocol was modified from a moderate physical training protocol for rats proposed by Negrão et al. (53). The training intensity had been previously confirmed using a maximal effort test performed at 58, 75 and 94 days of life. The proposed protocol speed was 50, 66 and 68%, respectively, of the peak velocity obtained in the maximum effort test, confirming the moderate intensity of training (15).

Table 1 Moderate intensity physical training protocol

PHYSICAL TRAINING PROTOCOL				
<i>Weeks</i>	<i>Sessions</i>	<i>Speed (cm/sec)</i>	<i>Time (min)</i>	<i>Intensity Corresponding to VO₂max</i>
1 ^o	1 ^o	16	10	50%
	2 ^o	16	20	50%
	3 ^o	16	20	50%
2 ^o	4 ^o	16	30	50%
	5 ^o	19	40	66%
	6 ^o	19	40	66%
3 ^o	7 ^o	19	40	66%
	8 ^o	22	50	66%
	9 ^o	22	50	68%
4 ^o	10 ^o	22	55	68%
	11 ^o	26	60	68%
	12 ^o	26	60	68%

Analysis of meal patterns

Feeding behaviour evaluations were performed in two periods: during the last week of the physical training program (at an approximate age of 90 days) and during the last week of detraining (at approximately 120 days). For these, the BioDAQ® food intake

monitoring system (Research Diets®, New Brunswick, USA) was used as previously described (56). This system consists of two food hoppers mounted on electronic strain gauge-based load cells to measure food intake. Food hoppers were weighed 50 times/second (accurate to 0.01 g), and the mean and standard deviation (SD) of food intake over the course of each second was calculated by a peripheral computer. Feeding was signalled by fluctuations in the hopper weight (defined as a SD > 2000 mg) caused by the animal eating. Each feeding event (cage/animal number, start date and time, feeding duration, final hopper weight and amount eaten) was recorded and exported to a central computer, where it was entered into a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA) for calculation of the parameters of interest (see below) and data summarization. The system recorded two types of feeding event: bouts and meals. The end of a feeding bout was signalled when the hopper was left undisturbed for 5 s (defined as SD < 2000 mg), at which point the duration of the feeding event and the amount eaten (initial hopper weight minus final hopper weight) was calculated. A meal was defined as a difference in hopper weight of 0.1 g, separated from other feeding bouts within a range of 15 min (32, 33, 57). Analyses was performed throughout the light and dark cycles.

Standard rat chow intake analysis

After three weeks of physical training, animals were placed into an individual cage equipped with the BioDAQ® food intake monitoring system and allowed access to standard rat chow (AIN 93 M, Nuvital®) and water ad libitum. After 2 days of adaptation, the standard chow intake [total intake in grams (g) and kilocalories (kcal), total number of meals (n) and size in grams (g), total number of bouts (n) and size in grams (g)] of sedentary and exercised animals were evaluated for 2 consecutive days.

After three weeks of detraining, sedentary and exercised animals, fed NFS or HFS, returned to individual cages equipped with the BioDAQ® system. The total intake (g and kcal), total meals (n and g/n) and total bouts (n and g/n) during 48 hr were recorded. Data from the first day on the apparatus were not considered in the analysis, to allow the animals to re-adapt to the cage. Rat chow intake was recorded on the 2

subsequent days, with the SED-NFS and EXE-NFS groups exposed to the NFS diet and the SED-HFS and SED-HFS animals exposed to the HFS diet.

Satiety analysis during the last week of detraining

The satiety was calculate as the amount of food consumed in grams and the post-meal interval in seconds (post-meal interval/food consumed) × 100/BW in the last week of detraining.

Biochemical analysis and adipose tissue collection

After 2 days of feeding behaviour monitoring, 120-day-old animals were fasted for 4 hours and decapitated. Trunk blood was collected and serum samples were frozen at -80°C for later analyses of glucose, high-density lipoprotein (HDL), total cholesterol, triglycerides, diiodothyronine (T3), and free thyroxine (T4), which were measured in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre clinical laboratory, using standard enzymatic colorimetric methods (for glucose and lipids) direct chemiluminescent immunoassay (for T3 and T4; assay limits: T3, 0.15–12.3 nmol/l; T4, 3.9–387 nmol/l).

Fat pads (retroperitoneal and mesenteric) were removed and weighed. The percentage of fat relative to total BW was used as an estimate of total fat accumulation.

The brains were also dissected, flash-frozen in isopentane, and stored at -80°C. For dissection of the dorsal striatum and hypothalamus, frozen brains were warmed to 20°C and coronal sections 0.25 thick cm were cut. The structures were identified with the aid of an atlas (55). The extracts obtained were processed for Western blot analysis, as described below.

Western blot analysis

Dorsal striatum samples were homogenized in cytosolic extraction buffer with protease (Protease Inhibitor Cocktail) and phosphatase (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets) inhibitors. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10

minutes at 4°C for extraction of the cytosolic fraction. Subsequently, an additional centrifugation at 13000 rpm for 30 minutes at 4°C was performed. Part of the supernatant (2 µL) was used to quantify total protein content, which was determined with a bicinchoninic acid (BCA) kit using bovine serum albumin as a standard. Supernatant containing 40 µg of protein was incubated with lithium dodecyl sulfate (LDS) and dithiothreitol (DTT) at 99°C for 3 minutes. These samples and a molecular weight standard (MagicMark) were loaded on 4–12% polyacrylamide gradient gels, subjected to electrophoresis, and then transferred to a nitrocellulose membrane. For a better comparison between the groups, we used 13 wells gels, in which six wells were pipetted with samples from one experimental group, six wells with samples from another experimental group and one well with a molecular weight marker. Thus, in each gel we obtained a comparison between two experimental groups, to avoid cross-gel comparisons. Four between-groups analyses were made, originated from four gels from each structure. The blots were blocked in Tris-buffered saline containing 5% non-fat milk and 1% Tween-20. The membranes were incubated overnight with the primary antibody (anti-dopamine D1 receptor antibody, 1:1000, or anti-tyrosine hydroxylase, TH 1:5000). The next day, the membranes were incubated for 1 hour with the secondary antibody (anti-rabbit 1:2000, Cell Signaling, 7074s, or anti-mouse 1:2000, Cell Signaling, 7076s). Membranes were then flashed with ECL (ECL western blotting analysis system, GE healthcare, RNP2106) and developed in an ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare Life Sciences). The intensity of Western blot bands was quantified by densitometry using the Image-J software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Maryland, USA). Results were expressed as the ratio of protein of interest to β -actin (1:1000, Sigma-Aldrich, A4700).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error (SEM). GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis and plots. Statistical analyses were performed using ANOVA two way test followed by the Tukey multiple comparisons test. P-values <0.05 were considered

significant when analysing the main effect of diet (p_D), exercise (p_E), their interaction (p_I ; diet vs exercise) and the differences between groups. When two groups were comparing was used t-test.

Results

Body weight, fat deposition and biochemical analysis

Body weight gain was attenuated by exercise in the fourth week of training and continued to be reduced until last week of detraining ($p_E < 0.001$). After training, it was observed an effect of HFS diet on increased body weight ($p_D < 0.01$) and exercise on decreased body weight ($p_E < 0.001$) (table 2).

Animals exposed to HFS diet showed approximately 37% greater retroperitoneal fat weight and 24% greater mesenteric fat weight compared to animals exposed to NFS ($p_D < 0.001$). Interestingly, training attenuated the fat gain by 24% and 18% in mesenteric fat pads and 34% and 28% in retroperitoneal fat pads in EXE-NFS and EXE-HFS as compared with the respective sedentary groups ($p_E < 0.01$ and $p_E < 0.001$ respectively) (table 2).

Animals exposed to the HFS diet exhibited an approximately 9% increase in total cholesterol compared with NFS animals ($p_D < 0.05$). HDL cholesterol was not influenced by previous exercise or HFS diet intake. Interestingly, HFS animals showed a 109% increase in triglyceride levels as compared with NFS animals ($p_D < 0.001$). A slight (9.3%) increase in glucose levels was observed in HFS vs. NFS animals ($p_D < 0.05$). Training increased T3 production by 7.3% ($p_E < 0.05$) compared to sedentary animals, and HFS intake decreased T4 levels by 15% compared to NFS animals ($p_D < 0.001$) (table 2).

Table 2 Biometric and biochemical parameters at age 120 days

Parameters	Groups				factors		
	SED-NFS	SED-HFS	EXE-NFS	EXE-HFS	I	E	D
Body weight (g) (90-day-old)	392,25 ± 9.21 ^{aa}	396,78 ± 9.18 ^{bbb}	348,02 ± 5.30 ^{aa}	350,96 ± 6.23 ^{bbb}	ns	+++	ns
Body weight (g) (120-day-old)	447,68 ± 6.96 ^a	472,85 ± 10.27 ^b	414,10 ± 5.21 ^a	438,56 ± 8.66 ^b	ns	+++	++
Retroperitoneal fat (g/100g _{BW})	2,09 ± 0.22 ^{accc}	3,19 ± 0.23 ^{bbccc}	1,39 ± 0.12 ^{add}	2,30 ± 0.13 ^{bbdd}	ns	+++	+++
Mesenteric fat (g/100g _{BW})	0,87 ± 0.07	1,10 ± 0.07	0,66 ± 0.03 ^d	0,90 ± 0.06 ^d	ns	++	+++
Total cholesterol (mg/dL)	52.91 ± 1.66	55.75 ± 2.21	52.55 ± 2.30	58.75 ± 1.71	ns	ns	+
HDL cholesterol (mg/dL)	43.27 ± 1.66	40.42 ± 1.59	40.64 ± 1.10	41.50 ± 1.35	ns	ns	ns
Triglycerides (mg/dL)	75.10 ± 6.85 ^{ccc}	151.27 ± 16.56 ^{ccc}	79.17 ± 7.15 ^{ddd}	171.40 ± 10.69 ^{ddd}	ns	ns	+++
Glucose (mg/dL)	121.91 ± 4.83	130.50 ± 2.65	114.73 ± 1.40 ^d	128.08 ± 2.23 ^d	ns	ns	+++
Diiodothyronine - T3 (ng/dL)	112.13 ± 2.14	110.14 ± 3.23	121.70 ± 3.78	116.87 ± 3.95	ns	+	ns
Free thyroxine - T4 (ng/dL)	2.60 ± 0.05 ^{ccc}	2.14 ± 0.09 ^{ccc}	2.55 ± 0.08 ^d	2.23 ± 0.08 ^d	ns	ns	+++

SED-NFS, sedentary rats subjected to a normal-fat/normal-sugar diet; SED-HFS, sedentary rats subjected to a high-fat/high-sugar diet; EXE-NFS, exercised animals subjected to a normal-fat/normal-sugar diet; EXE-HFS, exercised animals subjected to a high-fat/high-sugar diet; $n = 9-12$ animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. +++ $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$; + $p < 0.05$ and ns (not significant) for probability based on an analysis of variance. Same letters represent statistically different values. Same letters represent a significant difference. Three letters represent $p < 0.001$, two letters represent $p < 0.01$ and one letter represent $p < 0.05$ (Tukey's post-hoc test).

Food intake

Total food intake in grams decreased 26% in animals exposed to the HFS diet compared with NFS diet ($p_D < 0.05$). During the light period, exercise led to a 64% decrease in food intake in EXE-NFS animals compared to SED-NFS animals ($p_E < 0.05$), resulting in a significant exercise × diet interaction ($p_I < 0.05$). During the dark period, food intake showed a 26% reduction in groups receiving HFS ($p_D < 0.05$) (table 3).

The frequency of bouts over a 48h period decreased 49% in HFS vs. NFS animals in the sedentary and exercised groups ($p_D < 0.001$). During the light period, SED-

HFS, EXE-NFS and EXE-HFS animals showed reduced bout frequency compared with SED-NFS animals, resulting in a significant exercise \times diet interaction ($p_i < 0.05$). During the dark period, HFS decreased bout frequency compared with NFS ($p_D < 0.01$), in a pattern similar to that observed for the total 48h recording. Bout size increased 49% in HFS compared to NFS animals ($p_D < 0.001$). Similarly, bout size was increased during the light and dark periods (122% and 60%, respectively) in animals exposed to HFS compared to NFS ($p_D < 0.01$ and $p_D < 0.1$, respectively) (table 3).

Meal frequency during 48h decreased 37% in EXE-NFS compared to SED-NFS animals ($p < 0.05$), with no effect of exercise in animals exposed to HFS, resulting in a significant exercise \times diet interaction ($p_i < 0.05$). This pattern was also observed when analysing the light and dark periods separately. Data from the dark period clearly confirms the effect of exercise, with a 31% reduction in meal frequency in EXE-NFS animals ($p_E < 0.05$), resulting in a significant exercise \times diet interaction ($p_i < 0.05$). Meal size was reduced in EXE-HFS animals, comparing with EXE-NFS animals ($p < 0.05$) (table 3).

Table 3 Food intake behaviour and satiety at age 120 days

	Food Intake	Groups				factors		
		SED-NFS	SED-HFS	EXE-NFS	EXE-HFS	I	E	D
48h	Food Intake (g/100g _{BW})	2.85 ± 0.40	2.10 ± 0.14	2.32 ± 0.35	1.73 ± 0.30	ns	ns	+
	Bout size (g/100g _{BW})	0.14 ± 0.01 ^c	0.21 ± 0.02 ^c	0.13 ± 0.01 ^{ddd}	0.22 ± 0.02 ^{ddd}	ns	ns	+++
	Bout frequency (n)	31.10 ± 4.90 ^{cc}	15.12 ± 1.38 ^{cc}	24.33 ± 3.29 ^d	13.16 ± 1.26 ^d	ns	ns	+++
	Meal size (g/100g _{BW})	0.48 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.48 ± 0.08	0.40 ± 0.05	ns	ns	ns
	Meal frequency (n)	7.17 ± 0.64 ^a	6.58 ± 0.36	5.25 ± 0.58 ^a	6.82 ± 0.35	+	ns	ns
	Satiety	1130 ± 184.71	1631 ± 195.54 ^{bb}	1716 ± 261.03 ^d	3228 ± 593.73 ^{bbd}	ns	++	++
Light	Food intake (g/100g _{BW})	0.36 ± 0.05 ^a	0.23 ± 0.05	0.13 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.03	+	+	ns
	Bout size (g/100g _{BW})	0.05 ± 0.01 ^c	0.12 ± 0.03 ^c	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.01	ns	ns	+++
	Bout frequency (n)	4.00 ± 0.62 ^{ca}	1.92 ± 0.42 ^c	1.90 ± 0.64 ^a	2.17 ± 0.34	+	ns	ns
	Meal size (g/100g _{BW})	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.17 ± 0.02	ns	ns	ns
	Meal frequency (n)	1.36 ± 0.15 ^a	1.25 ± 0.22	0.60 ± 0.22 ^{da}	1.33 ± 0.14 ^d	+	ns	ns
Dark	Food intake (g/100g _{BW})	2.32 ± 0.35	1.86 ± 0.12	1.94 ± 0.29	1.30 ± 0.23	ns	ns	+
	Bout size (g/100g _{BW})	0.08 ± 0.01 ^{ccc}	0.14 ± 0.01 ^{ccc}	0.09 ± 0.01 ^d	0.13 ± 0.01 ^d	ns	ns	+++
	Bout frequency (n)	25.88 ± 3.95 ^{cc}	13.21 ± 1.37 ^{cc}	19.50 ± 2.83 ^d	10.18 ± 0.98 ^d	ns	+	+++
	Meal size (g/100g _{BW})	0.41 ± 0.06	0.40 ± 0.04	0.45 ± 0.05 ^d	0.27 ± 0.04 ^d	ns	ns	ns
	Meal frequency (n)	6.00 ± 0.42 ^{aa}	5.50 ± 0.27	4.11 ± 0.31 ^{daa}	5.55 ± 0.37 ^d	+	+	ns

SED-NFS, sedentary rats subjected to a normal-fat/normal-sugar diet; SED-HFS, sedentary rats subjected to a high-fat/high-sugar diet; EXE-NFS, exercised animals subjected to a normal-fat/normal-sugar diet; EXE-HFS, exercised animals subjected to a high-fat/high-sugar diet; $n = 7-12$ animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. +++ $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$; + $p < 0.05$ and ns (not significant) for probability based on an analysis of variance. Same letters represent statistically different values. Same letters represent a significant difference. Three letters represent $p < 0.001$, two letters represent $p < 0.01$ and one letter represent $p < 0.05$ (Tukey's post-hoc test).

Satiety analysis

Satiety, analysed during 48h (table 3), increased 66% in animals exposed to HFS compared to animals exposed to NFS ($p_D < 0.01$). Exercise also increased satiety by 75% compared to sedentary status ($p_E < 0.01$).

Western blot analysis

Analysis of SOCS3, TH and D1 proteins showed that SOCS3 expression was 16% lower in SED-HFS compared to SED-NFS animals ($p < 0.01$; figure 1A) and 20% lower in EXE-HFS compared to EXE-NFS animals ($p < 0.05$; figure 1B). TH expression was 27% higher in EXE-NFS compared to SED-NFS animals ($p < 0.05$; figure 2C). D₁ dopamine receptor levels were 59% lower in EXE-NFS compared with SED-NFS animals ($p < 0.05$; figure 2G) and 63% lower in EXE-HFS compared with SED-HFS animals ($p < 0.01$; figure 5H).

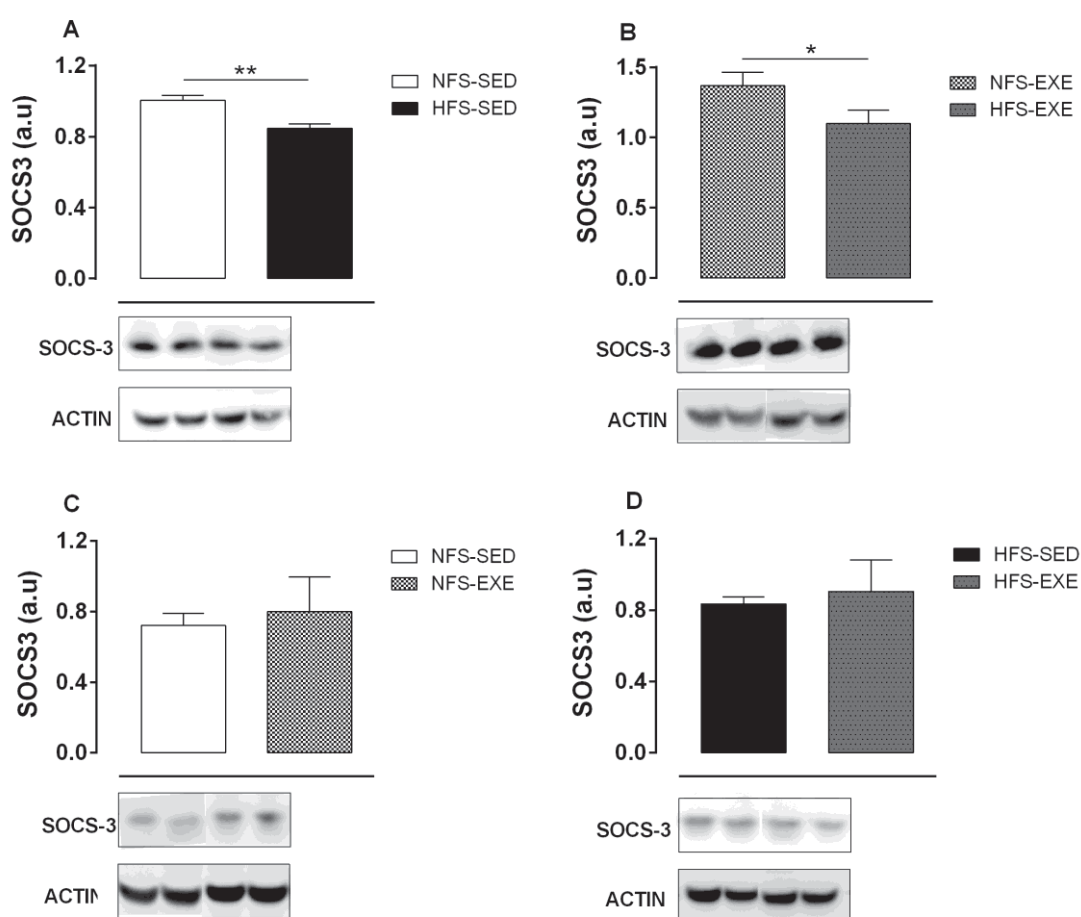


Figure 1 Western blot analysis for SOCS-3 receptor in hypothalamus. (a) NFS-SED × HFS-SED animals; (b) NFS-EXE × HFS-EXE animals; (c) NFS-SED × NFS-EXE animals; (d) HFS-SED × HFS-EXE animals. $n = 3-6$ per group. SED-NFS, sedentary rats fed a normal-fat/normal-sugar diet; SED-HFS, sedentary rats fed a high-fat/high-sugar diet; EXE-NFS, exercised rats fed a normal-fat/normal-sugar diet; EXE-HFS, exercised rats fed a high-fat/high-sugar diet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for probability (t-test).

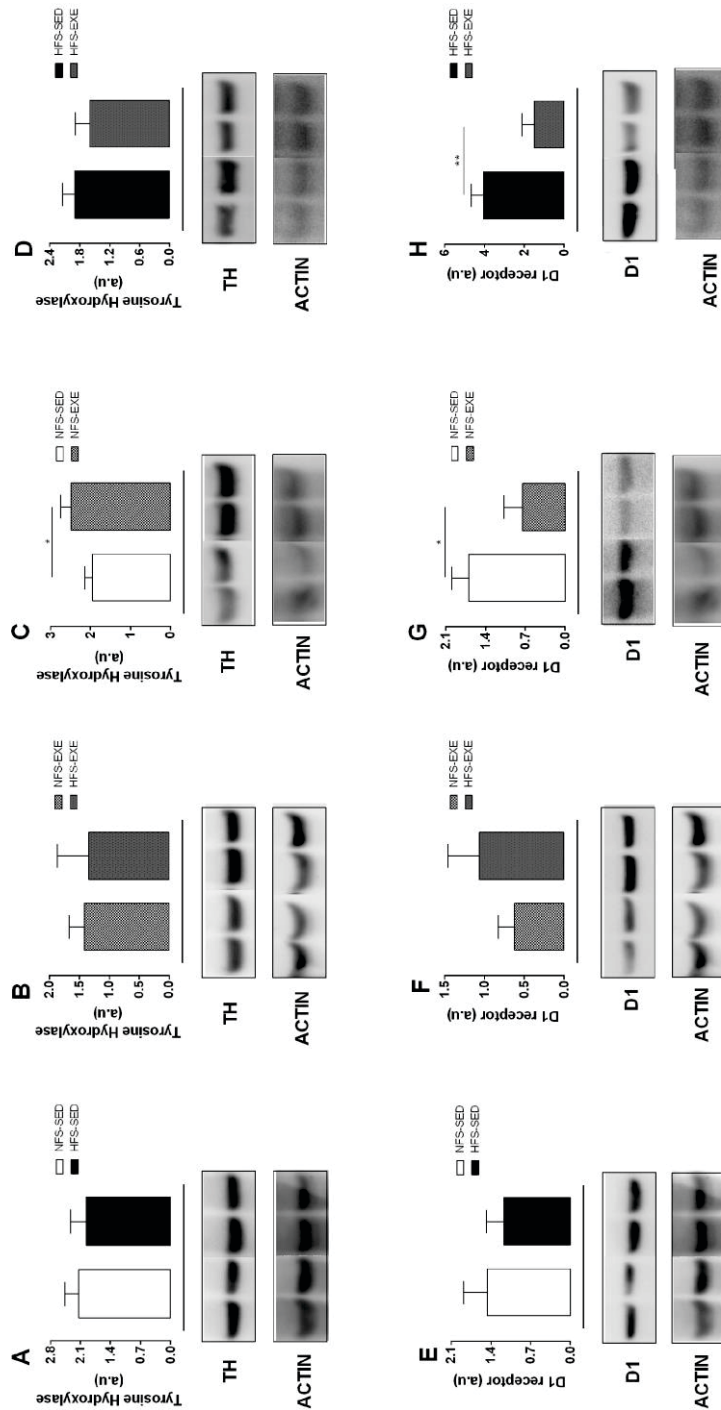


Figure 2 Western blot analysis for Tyrosine Hydroxylase (TH) and Dopamine receptor (D1) in the striatum nucleus. (a-e) NFS-SED × HFS-SED animals; (b-f) NFS-EXE × HFS-EXE animals; (c-g) NFS-SED × NFS-EXE animals; (d-h) HFS-SED × HFS-EXE animals. $n = 3-6$ per group. SED-NFS, sedentary rats fed a normal-fat/normal-sugar diet; SED-HFS, sedentary rats fed a high-fat/high-sugar diet; EXE-NFS, exercised rats fed a normal-fat/normal-sugar diet; EXE-HFS, exercised rats fed a high-fat/high-sugar diet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for probability (t-test).

Discussion

In the present study, we showed for the first time that physical training, even followed by detraining, protects against the deregulation in feeding behaviour rhythm induced by chronic exposure to a hypercaloric diet. It is important to consider that the physical training protocol used in this study was performed on a treadmill, with moderate intensity only three times to week, during three weeks and may thus be characterised as a subtle physical training protocol. Furthermore, this protocol followed by detraining affected food intake behaviour, reducing meal size/frequency during the light period. Interestingly, dopamine signalling through D₁ receptors in the striatum is crucial for the expression of circadian meal patterns (64), and the altered behaviour described in this study is also associated with differences in components of the dopaminergic pathway in this structure.

Nonetheless, this beneficial effect of physical training was attenuated in HFS animals. Recent studies have shown that a different type of exercise (free voluntary activity) modulates the rhythm of food intake during the light period, decreasing intake and preference for HFD (26, 27, 47, 48). Voluntary exercise is performed to self-satisfy an internal urge at times of high energy, more frequently in the animal's active period, and has a close relationship to the rewarding system, which explains the above-mentioned results from the literature (48). Moreover, in the present study we found that forced physical training also induces long-lasting beneficial effects on metabolism and feeding behaviour, which were associated with changes in the mesocorticolimbic dopaminergic system.

In this study, the physical training protocol was employed in young adult life, and was associated with attenuated body weight and fat gain, regardless of diet. Evidence suggests that physical exercise causes a negative energy balance, thus decreasing body weight gain (25). Corroborating our results, moderate treadmill exercise on adolescent rats is an effective dysfunction strategy for the cardiovascular and metabolic derangements induced by diabetes. This pattern remains even after 3 weeks of detraining (34). Recent research at our laboratory showed that the same physical training protocol used in the present work protects against HFD-induced obesity in rats

(15). On the other hand, it has been shown that detraining is related to non-adaptive changes in metabolism (40). Female adolescent rats exercised on a treadmill and detrained showed more fat accumulation in response to HFD exposure when compared to sedentary animals (65). However, the effect of detraining on metabolism, which has been intensely discussed in the literature, depends on many factors, such as the period of the life cycle and the frequency, intensity and type of physical exercise performed previously; therefore, it may be characterized by lasting positive effects of physical exercise on metabolism, or by metabolic disturbances in response to detraining (49, 65, 66).

Interestingly, our work shows that HFS animals exhibit decreased food intake, which may depend on reduced bout frequency; however, bout size is increased, in an apparent attempt to compensate for the lower rhythmicity of food intake. The literature shows that HFDs are linked to a chronic disruption of feeding rhythmicity (13). Feeding patterns in obese Zucker rats are characterized by a larger meal size and increased food intake during the light period (9, 14). Meal size and number are regulated by complex peripheral and central processes (9, 67). Surprisingly, we also found that physical exercise before detraining modulates food intake behaviour, decreasing food consumption, bout frequency, and meal frequency during the light period, thus indicating a modulatory effect on the circadian regulation of food intake. Very few studies involving the forced treadmill method and circadian control of food intake have been published. Contrary to our findings, two studies showed that treadmill exercise is not as effective as wheel-running activity to modify feeding patterns in rodents (51, 52), suggesting that voluntary exercise alters the motivational state and consequently affects food intake circadian rhythm (48).

In rodents, 70% of food intake occurs in the dark period (10, 11). It is known that circadian food regulation is sensitive to changes in diet composition (12). The specific food intake patterns we observed may result from HFS and NFS animals having a preference for their respective diets. We tested this hypothesis using a feeding preference test, and observed that the maintenance of eating patterns was not related to food preference. Thus, we then studied satiety as a possible explanation for our behavioural findings. Satiety is regulated by peripheral hormones that act directly in the

hypothalamus, the central mediator of whole-body energy homeostasis (68); in addition, hypothalamic centres modulate the function of motivation areas such as the mesocorticolimbic dopaminergic system (69). Interestingly, our results show that, even after detraining, exercised animals exhibited increased satiety. However, we have no explanation as to why HFS sedentary animals ate less.

Studies show that HFD ingestion increases levels of the suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). SOCS-3 is a possible mediator of hypothalamic leptin/insulin resistance (70), and a marker of central resistance to the action of these important regulators of food intake. SOCS-3 is present in catabolic pathways that block leptin signalling to inhibit transduction of JAK/STAT signalling in the hypothalamus (71). When SOCS-3 is increased, there is often increased appetite, as both insulin and leptin signalling are blunted (72). On the other hand, physical exercise reduces SOCS-3 levels in the hypothalamus because of its strict relationship with the activation of catabolic pathways (73). In the present study, we found that both sedentary and exercised HFS animals had reductions in SOCS-3, which may explain their decrease in food intake. However, we cannot rule out the possibility that catabolic pathways were less active despite lower levels of SOCS-3, as hypothalamic signalling of insulin and leptin is a complex process that involves many other proteins.

As the mesocorticolimbic dopaminergic system lies between motivation and peripheral metabolism, striatal dopamine signalling was investigated in this study. This system is also modulated by the biological circadian cycle and plays key roles in motor locomotion and motivation/reinforcement, as well as on circadian oscillation of food intake (28). Dopamine acts on the striatum to modulate motor coordination, reward, motivated behaviour, and emotion (29). In addition, dopamine is a prominent neurotransmitter regulating brain processes related to exercise (28, 30). Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme for catecholamine synthesis, including dopamine. Treadmill exercise enhances TH expression in the substantia nigra (SN) and striatum (30). Accordingly, the present work found increased striatal TH expression in NFS-exercised animals, with a concomitant decrease in expression of D₁ dopamine receptors. We may speculate that increased TH expression was associated with increased DA availability in the synaptic cleft, with consequent down-regulation of D₁.

Interestingly, it appears that HFS exposure in exercised animals is associated with similar TH levels but diminished expression of striatal D₁ receptors when compared to the sedentary group. This is consistent with a study showing that voluntary exercise is associated with decreased expression of D₁ receptors in the striatum (74). Lower expression of TH and D₁ is associated with a reduction in food anticipatory behaviour, which is important to maintain the daily rhythms of food intake (64).

We conclude that an HFS diet disrupts food intake behaviour, while treadmill physical training, even when followed by detraining, offers some protection, modulating the food intake rhythm. Interestingly, striatum dopaminergic pathways may be implicated in the long lasting benefits derived from training on food intake behaviour, which highlights the importance of physical exercise on the control of obesity risk by central nervous system modulation.

5.2 – Artigo 2

Long last effects of moderate physical training in the cardiovascular alterations developed by high-fat-diet in adult rats

Resumo:

Objetivo: Testar se um curto período de exercício moderado, realizado três vezes por semana na vida adulta, desenvolve proteção a longo prazo sobre alterações cardiometabólicas induzidas por ingestão de dieta rica em gordura (HFD). **Métodos:** Ratos com 90 dias de vida foram submetidos a um treinamento físico de intensidade moderada, três vezes por semana, durante 30 dias. Após concluir o programa de treinamento físico, os ratos receberam uma dieta hipercalórica (dieta rica em gordura - HFD) ou uma dieta normocalórica (NFD) por 30 dias consecutivos. Os animais sedentários também receberam as mesmas dietas. O peso corporal e a ingestão alimentar foram avaliados semanalmente. Aos 150 dias de vida, foi realizada uma cirurgia na artéria femoral, para implantação de um cateter. Após 4 dias foi realizado o registro da pressão arterial para a posterior análise da pressão arterial sistólica, diastólica e média e pressão de pulso. Batimentos a batimentos foram verificados para realizar a análise espectral da pressão arterial e do intervalo de pulso por meio do *software* CardioSeries v2.4. Após a eutanásia, os estoques de gordura corporal foram removidos e pesados e o sangue total foi armazenado para posterior dosagem do perfil lipídico. **Resultados:** HFD foi responsável pelo aumento da pressão arterial, da pressão de pulso, da atividade vascular simpática, do peso corporal, da gordura corporal e desenvolvimento de dislipidemia. Interessantemente, o exercício desenvolveu um efeito protetor a longo prazo, no qual diminuiu a pressão arterial, colesterol LDL e gordura corporal de ratos EXE-HFD. **Conclusão:** O efeito do treinamento físico não perdurou completamente após a cessação do treinamento sobre a proteção contra alterações induzidas por ingestão de HFD. Contudo, nos mostramos que mesmo após um período de destreinamento e ingestão de HFD, ratos previamente treinados tiveram resistência a desenvolver alterações cardiometabólicas, na qual apontamos pela primeira vez que o benefício de um curto período de treinamento físico realizado em uma fase mais tardia da vida adulta pode ser parcialmente mantido após um curto período de destreinamento.

Palavras chaves: Pressão arterial, alterações cardiometabólicas, ingestão hipercalórica, destreinamento físico, treinamento físico.

Abstract:

Objective: Test whether moderate physical training, performed three times to week during four weeks on adult life develop long lasting protection on cardiometabolic alterations induced by high fat diet intake after cessation of training. **Methods:** Ninety-day-old rats were subjected to moderate physical training three times weekly for 30 days. Once trained, rats received a hypercaloric diet (high fat diet -HFD) or a commercial diet (NFD) for 30 consecutive days. Sedentary animals also received the same diets. Body weight and food intake was evaluated weekly. At age 150 days-old, was performed a surgery on femoral artery, for catheter implantation. After four days, the registration of blood pressure was performed for posterior analysis of systolic, diastolic, media blood pressure and pulse interval. Beat-to-beat data were analyzed to calculate power spectra of systolic blood pressure and pulse interval using the CardioSeries v 2.4 software. After euthanasia, fat pad stores were removed and weight and total blood was stoked for posterior analysis of lipid profile. **Results:** HFD was able to increase blood pressure, pulse pressure, vascular sympathetic activity, body weight gain, fat pad stores and deregulated lipid profile. Interestingly, physical training developed long last protection which decreased blood pressure, LDL cholesterol and body fat accumulation of EXE-HFD animals. **Conclusion:** Physical training effect did not last totally after a training cessation on protection against alterations induced by HFD intake. However we show that same after a period of detraining and HFD intake, previous trained animals had resistance to develop cardiometabolic alterations, which point for the first time that the benefice of physical training on late adult life may be partially maintained after a four weeks of detraining period.

Key-Words: Blood pressure, cardiometabolic alterations, hypercaloric intake, physical detraining, physical training.

Introduction

According to World Health Organizations (WHO 2017) non-communicable diseases such as cardiovascular disease, cancer, diabetes and chronic lung disease was the main world health problem causing nearly two thirds of all deaths (5). Three quarts of the deaths caused by cardiovascular disease take place in low and middle income countries (75). Cardiovascular diseases are dependent on genetic and environmental factors, sedentary lifestyle and others metabolic disease such as high blood glucose, high blood lipids, overweight and obesity. Furthermore, the increase in palatable food intake with high concentration of fat and sugar, and physical inactivity contribute for this impaired health. Studies have shown that high fat diet (HFD)

consumption has a high correlation with metabolic and cardiovascular diseases, even when consumed for a short-term period (8, 17, 19). Some changes that HFD may cause in cardiovascular system depend on sympathetic nervous system, highlighted increased plasma norepinephrine and its turnover in the heart, and increase renal sympathetic nerve activity, contributing to the deregulation of blood pressure (16, 20).

Wen and Wu (2012) pointed that failing to perform fifteen to thirty minutes/days of brisk walking may increase 20-30% the risk of develop heart diseases (35). In this context, the increase of physical activity and concomitant energy expenditure is, an efficient strategy to prevent or treat cardiometabolic diseases, such as hypertension (21). Studies have shown that physical exercise promotes a reduction of obesity and amelioration of cardiometabolic dysfunctions by activation of lipid metabolism and modulation of inflammation (22, 23). When exercise is performed using the aerobic metabolism, it promotes fat mobilization, control of blood pressure and others benefits on cardiovascular system. In this context, physical exercise may decrease or treat disturbs induced by HFD ingestion. One of mechanism involved is the activation or down regulation of brain areas that regulates the autonomic nervous system (ANS) function (68).

It is important to consider that the more relevant benefits of physical exercise are related directly with its continuity (36). Exercise cessation or detraining is associated with a partial or complete lost physical benefits obtained in the period of physical exercise (37). The effect of detraining on cardiometabolic system is controversial. Some studies show that the cardiometabolic adaptations induced by exercise persists after one, two or four weeks of detraining period (15, 38, 41, 42). Conversely, other studies point that the adaptations are abolished after two, four, five or ten weeks of detraining period (43-46). This discrepancy in literature is due to different type of physical exercise (intensity and frequency of exercise), period of life that the exercise was performed and duration of exercise or detraining (39).

Considering the evident deleterious impact of HFD and the controversial benefic of detraining in the cardiovascular system, it is interesting to observe that no studies have addressed the effect of a poor food diet after a cessation of moderate intensity and low frequency exercise in adult life. Thus, we hypothesized that moderate physical

training performed three times to week during four weeks on adult life protects cardiometabolic alteration induced after cessation of training and HFD intake.

Methods

Experimental model and diet

Eighty-five day-old male Wistar rats (five per cage) were provided with water and food *ad libitum* at 22 ± 2 °C with a 12/12 h light/dark cycle. After 5 days of environmental adaptation, a group of 90-day-old rats underwent on treadmill physical training for 30 days. The control rats remained sedentary. During this period (90-120 days of life), all animals were fed a normal-fat diet (NFD). After this period (120-150 days of life), the animals were fed with a NFD or HFD and remained at rest. Four groups were obtained: sedentary and exercised rats subjected posteriorly to a NFD (SED-NFD and EXE-NFD, respectively) or to a HFD (SED-HFD and EXE-HFD, respectively). The NFD was a commercial diet with 3.801 kcal/g (AIN 93 M, Nuvital-Curitiba, PR), and the HFD was a hypercaloric home-made diet with 5.817 kcal/g and 35 % lard. The composition of the NFD and HFD was described previously (76). All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the State University of Maringá (protocol number 9213241014) and followed national and international guidelines for research involving animals, including Brazilian Law No. 11,794 of 2008.

Treadmill physical training protocol

The rats trained in an animal treadmill (Panlab, Harvard Apparatus®, Cornellà-Barcelona – Spain) with electronic control of velocity. This equipment has a shock system that is used for stimulus to keep the animal moving (0.4 milliamps). Physical training was performed in the afternoon period (around 14:00 p.m.), three times a week for 4 weeks (12 sessions from 90 to 120 days of life). The programming of physical training was modified from a moderate physical training protocol for rats previously

describable (15) and proposed by Negrão et al., (1992) (53). The training intensity had been previously confirmed using a maximal effort test, related previously (15). The training started with sessions of 16 cm/sec for 10 min (1^o week) and finished with sessions of 26 cm/sec for 60 min (4^o week) (table 1).

Table 1 Physical training protocol

PHYSICAL TRAINING PROTOCOL			
<i>Weeks</i>	<i>Sessions</i>	<i>Speed (cm/sec)</i>	<i>Time (min)</i>
1 ^o	1 ^o	16	10
	2 ^o	16	20
	3 ^o	16	20
2 ^o	4 ^o	16	30
	5 ^o	19	40
	6 ^o	19	40
3 ^o	7 ^o	19	40
	8 ^o	22	50
	9 ^o	22	50
4 ^o	10 ^o	22	55
	11 ^o	26	60
	12 ^o	26	60

Analysis of food intake, body weight and fat pads

The food intake was measured 3 times a week from 90 to 150 days of life. The food intake was calculated as the difference between the amount of food remaining and the total provided, which was divided by the number of days and the number of rats in the box. Because the energetic values between the diets were different, the values in grams were converted into caloric values. Body weight (BW) was measured once a week during the experimental period. After the euthanasia, fat pad stores were removed and weighted, for measure body fat accumulation.

Surgery for arterial catheter implantation

Rats were anesthetized with intramuscular ketamine-xylazine mixture (3 and 0.6 mg/100 g of body weight, respectively) and a P10 catheter (P10 cannula-Micro-Renathane connected to a P50 cannula-ClearTygon) filled with heparinized saline (500 units/mL) implanted into the femoral artery and advanced (4 cm) until the tip entered the abdominal aorta. Antibiotic Doxycycline (2 mg/Kg of body weight, intra-arterial) was administered during the surgery and analgesic Metamizole (12.5 mg/day on drinking water) treatment was performed during two days following the surgery. Two days following arterial catheter implantation and just before blood pressure recordings 0.1 ml of heparinized saline (500 units/mL) was injected through the cannula to eliminate any clot (58). The animals were housed individually and cardiovascular recordings were performed 4 days later (59). On post-surgery recovery period, animals were daily examined and those who showed signs of suffering or stress were excluded of the study.

Measurement of blood pressure, heart rate and pulse pressure

The experiments were performed after 1 hour adaptation to the experimental room, always on afternoon period (14:00 p.m.). Systolic, diastolic, mean blood pressure and pulse pressure baseline recordings were made in freely moving rats in their home cage during 30 minutes. The arterial cannula was connected to a fluid-filled blood pressure transducer (MLT0699, AD Instruments, Dunedin, New Zealand), which was connected to a signal amplifier (Insight, Ribeirão Preto/SP Brazil). The recordings were sampled at 1000Hz using an analog-to-digital converter board (CODAS, 1-kHz sampling frequency, Dataq Instruments, Inc, Akron, OH). Analyses were performed on a beat-to-beat basis to quantify the changes in the blood pressure (BP) and pulse interval PI (60).

Cardiovascular variability and cardiac baroreflex sensitivity

Beat-to-beat data were analyzed to calculate power spectra of systolic blood pressure and pulse interval (a surrogate for the heart rate) using the CardioSeries v 2.4

software (<http://www.danielpenteadoc.com/>). The power spectra were calculated for multiple overlapping (by 50%) segments 512 data points (51.2 s) of stationary SBP and PI using a fast Fourier transform (77). The spectra were integrated in the low frequency (LF; 0.2 to 0.75 Hz) and high frequency (HF, 0.75 to 3.0 Hz) bands (77). The spontaneous cardiac baroreflex sensitivity was estimated by the sequence method (62). Four consecutive beats in which increases in SBP were followed by PI lengthening (up sequence) and decreases in SBP were followed by PI shortening (down sequence), with a linear correlation higher than 0.85 (78).

Lipid profile analysis

A separated group of 150-days-old rats was decapitated and blood samples were collected. Plasma was used for measurement of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides by enzymatic method using specific colorimetric commercial kit (Gold Analisa®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). LDL and VLDL cholesterol were calculated according to the Friedewald equation: $LDL = Total\ cholesterol - (HDL + VLDL)$ and $VLDL = Triglycerides/5$ (54).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error (SEM). GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis and plots. Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance (ANOVA-Two way) followed by the Tukey multiple comparisons test. P-values <0.05 were considered significant when analysing the main effect of diet (p_d), exercise (p_e), their interaction (p_i ; diet vs exercise) and the differences between groups.

Results

Food intake and body weight gain

During physical training period, from 90 to 120 days of life, training did not impact on grams and calories of the food intake (fig.1A). After this period, the HFD sedentary and exercised animals showed a 30% decrease ($p_d < 0.01$) of food intake amount (g) ($p < 0.001$) compared with NFD animals (Fig. 1B), but the caloric consumption was similar between HFD and NFD treated animals (fig. 1D). The physical training performed prior to the HFD exposure stimulated an 8% increase of food intake amount and calories (g and kcal) in NFD and HFD animals ($p_e < 0.05$) compared with sedentary controls. The HFD and NFD consumption of calories from 120 until 150-days was not significantly difference (Fig.1D).

During training period body weight was not different between groups (Fig.1E). After this period, HFD induced an increase body weight gain (sedentary: +51%, exercised: +35%; $p_d < 0.001$), compared with NFD feed animals (Fig.1F). The EXE-HFD group showed a 19% decrease ($p_e < 0.05$) of body weight gain compared with SED-HFD animals. This pattern resulted in a diet x exercise interaction ($p_i < 0.05$). NFD animals do not show any modification in body weight gain when comparing sedentary to exercised animals, during all experimental protocol.

Fat deposition

At 150 days of life, HFD induced an increase in visceral fat pat deposition (sedentary: +56%, exercised: 45%; $p_d < 0.001$) compared with NFD feed animals (fig. 1G). Interestingly, previous training developed a resistance to fat gain in HFD animals, in which presented 18% of fat pad decreased ($p_e < 0.05$). This pattern resulted in a diet x exercise interaction ($p_i < 0.05$). NFD animals do not show difference on fat deposition when comparing sedentary to exercised animals.

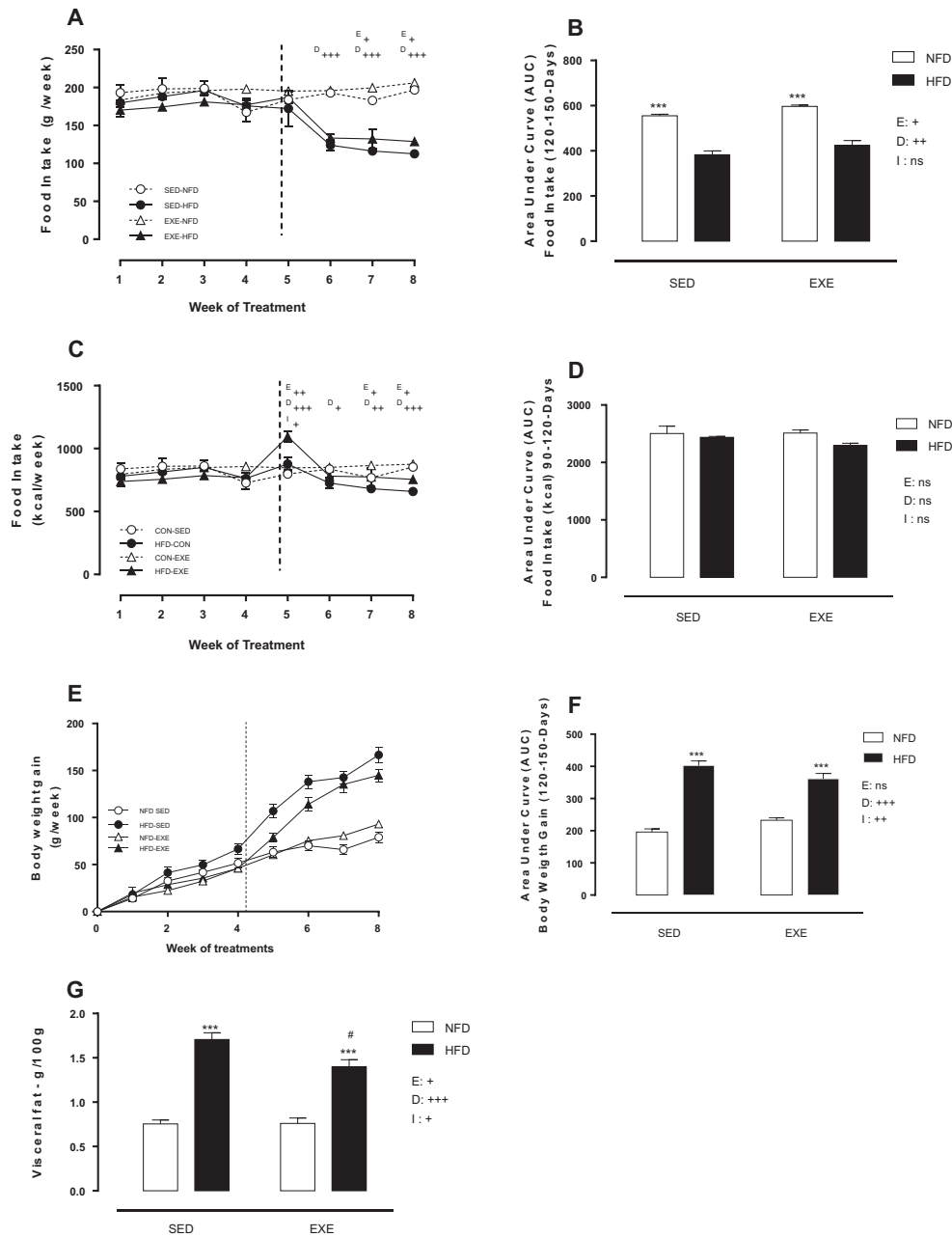


Figure 1 – Biometric parameters in 150-day-old animals. (A) Food intake curve (g/week), (B) Area Under Curve – Food intake in grams (120-150-Days), (C) Food intake (Kcal/week), (D) Area Under Curve – Food intake in Kcal (120-150-Days), (E) Body weight gain (g/week), (F) Area Under Curve – Body weight gain (120-150-Days), (G) Visceral fat (g/100gBW). $n = 15-20$ per group. NFD, normal-fat diet; HFD, high-fat diet; SED, sedentary animals; EXE, exercised animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. $+++p < 0.001$; $++p < 0.01$ and $+p < 0.05$ for probability based on a two-way analysis of variance. $***p < 0.001$ statistical significance between NFD and HFD and $\# p < 0.05$ statistical significance between HFD groups, for the probability based on a Tukey multiple comparisons test.

Blood pressure, heart rate and pulse interval

Figure 2A shows that systolic blood pressure was 19% increase in SED-HFD compared with SED-NFD animals ($p < 0.01$) with no effect of diet in exercised animals, resulting in a significant effect of diet and ($p_d < 0.01$) a significant interaction between factors ($p_i < 0.05$). A similar pattern was observed in mean blood pressure (Fig 2C), with 19% increase in SED-HFD compared with SED-NFD animals, leading to a significant effect of diet ($p_d < 0.05$) and an interaction ($p_i < 0.01$). Diastolic blood pressure was 18% increase in SED-HFD compared with SED-NFD animals ($p < 0.05$), resulting in a significant interaction between factors ($p_i < 0.01$, Fig 2B). Pulse interval was 19% increased by HFD ($p_d < 0.01$, Fig 2D).

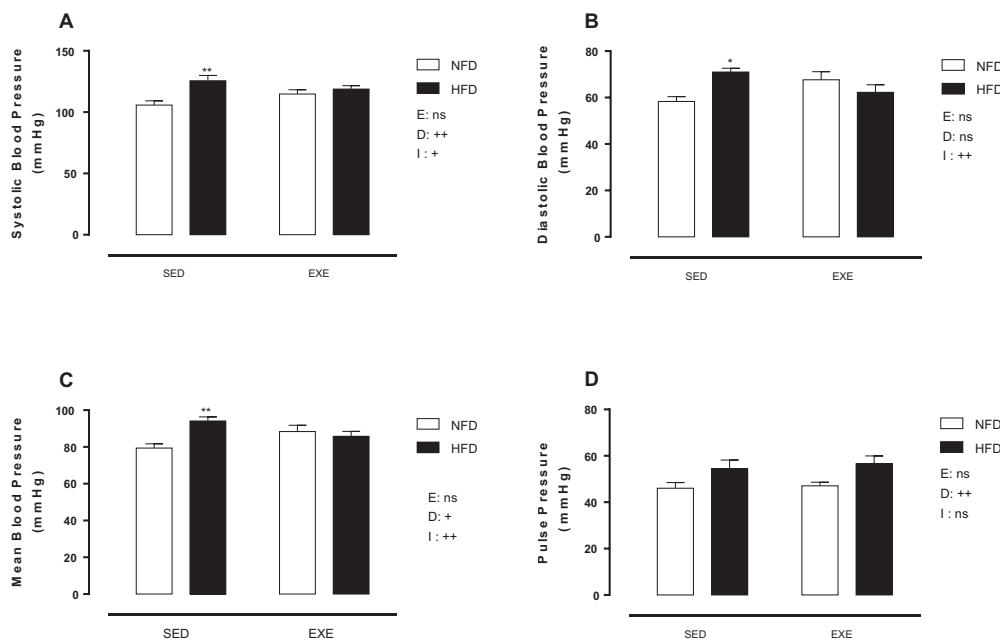


Figure 2 – Blood pressure parameters in 150-day-old animals. (A) Systolic blood pressure, (B) Diastolic blood pressure, (C) Mean blood pressure, (D) Pulse pressure. $n = 7-9$ per group. NFD, normal-fat diet; HFD, high-fat diet; SED, sedentary animals; EXE, exercised animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. $++p < 0.01$ and $+p < 0.05$ for probability based on a two-way analysis of variance. $**p < 0.01$ and $*p < 0.05$ statistical significance of the differences between NFD and HFD for the probability based on a Tukey multiple comparisons test.

Cardiovascular variability and cardiac baroreflex sensitivity

The LF-SBP power, an estimation of vascular sympathetic activity, was 30% increased by HFD ($p_d < 0.001$, Fig 3A). The LF/HF-ip ratio, an estimation of cardiac sympathetic activity, was not affected by any factor (Fig 3B). The HF-ip power, an estimation of parasympathetic activity, was 31% increase in EXE-NFD animals, compared with SED-NFD animals ($p < 0.05$), with no effect in HFD feed animals, which lead to a significant interaction ($p_i < 0.01$, Fig 3C). The cardiac baroreflex gain was not affected by any factor (Fig 3D).

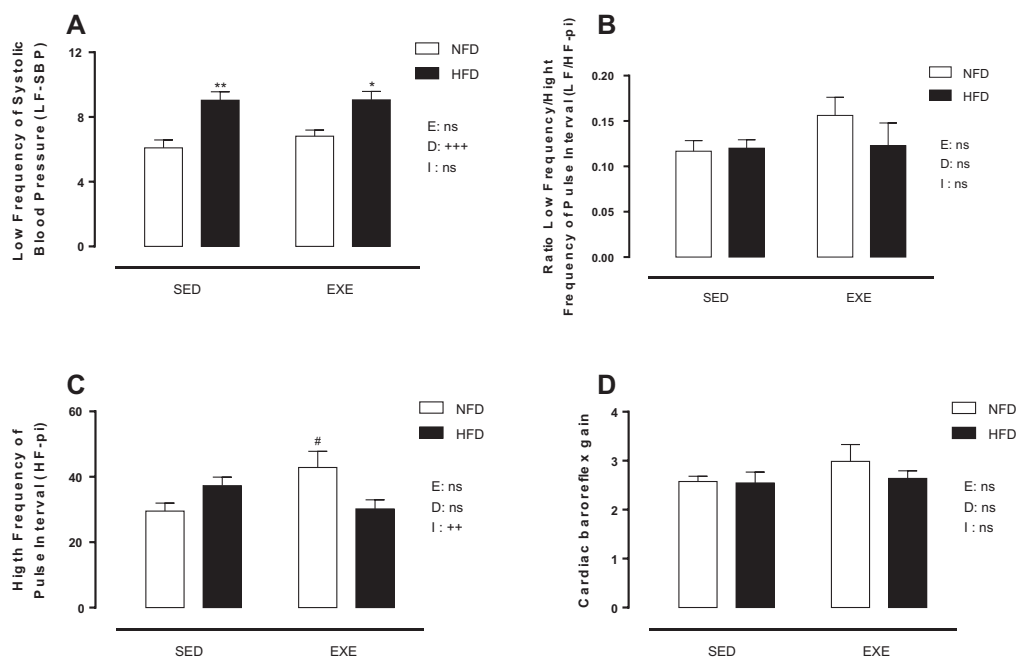


Figure 3 – Spectral analysis on blood pressure and pulse interval in 150-day-old animals. (A) Low frequency of systolic blood pressure, (B) High frequency of pulse interval, (C) Ratio low frequency/ high frequency of pulse interval (D) Cardiac baroreflex gain. $n = 5-9$ per group. NFD, normal-fat diet; HFD, high-fat diet; SED, sedentary animals; EXE, exercised animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. $+++p < 0.001$, $++p < 0.01$ for probability based on a two-way analysis of variance. $**p < 0.01$ and $*p < 0.05$ statistical significance of the differences between NFD and HFD. $\#p < 0.05$ statistical significance of sedentary versus exercised animals for the probability based on a Tukey multiple comparisons test.

Lipid profile

Figure 4 show that HFD induced dyslipidemia in both, sedentary and trained animals. Triglycerides levels was increase by HFD consumption ($p_d < 0.001$), compared with NFD feed animals (fig 4A). HFD increased total cholesterol levels in sedentary and exercised rats (+29% and 19%, respectively), compared with NFD animals ($p_d < 0.0001$, Fig 4B). HDL cholesterol was 46% increase by HFD consumption ($p_d < 0.001$), compared with NFD feed animals and 14% increased by exercise ($p_e < 0.05$), compared with sedentary rats (Fig 4C). LDL cholesterol was 19% decreased in EXE-HFD compared to SED-HFD animals ($p < 0.05$, Fig 4D), resulting in an interaction between the exercise and diet factors ($p_i < 0.05$).

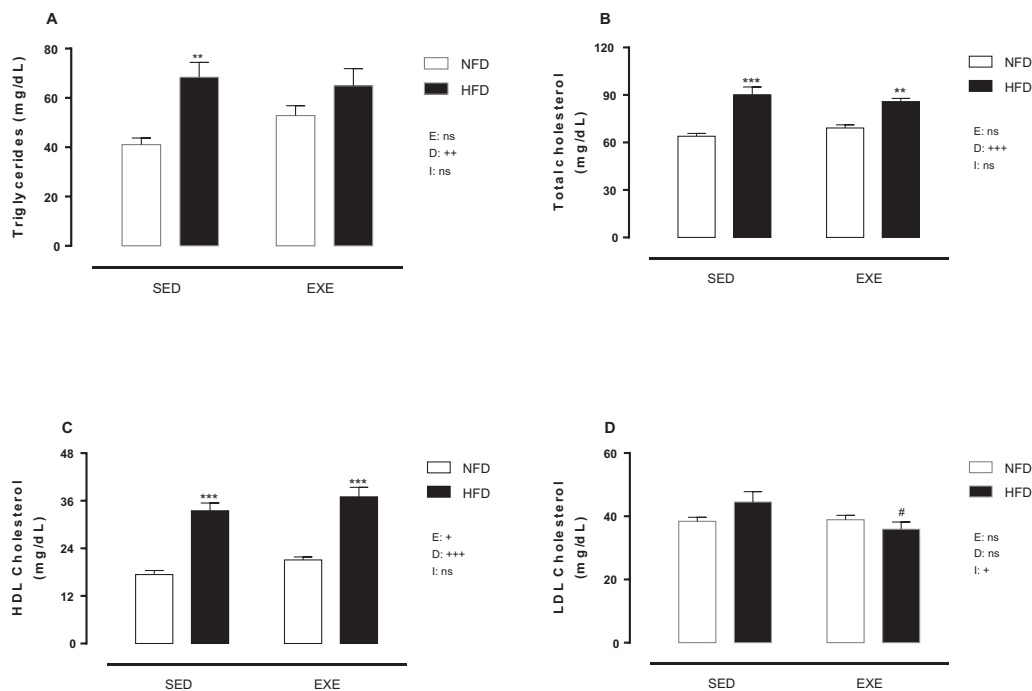


Figure 4 – Lipid profile in 150-day-old animals. (A) Triglycerides, (B) Total cholesterol, (C) HDL cholesterol, (D) LDL cholesterol. $n = 8-10$ per group. NFD, normal-fat diet; HFD, high-fat diet; SED, sedentary animals; EXE, exercised animals; I, interaction between exercise and diet factors; E, exercise factor; D, diet factor. $+++p < 0.001$, $++p < 0.01$ and $+p < 0.05$ for probability based on a two-way analysis of variance. $***p < 0.001$ and $**p < 0.01$ statistical significance of the differences between NFD and HFD. $\#p < 0.05$ statistical significance of sedentary versus exercised animals for the probability based on a Tukey multiple comparisons test.

Discussion

The current study shows for the first time that moderate physical training performed three times to week on adulthood, followed by a same period of detraining, protects against blood pressure increase induced by HFD consumption. It is well known that HFD is strongly associated with increased cardiovascular risks, such as increase in blood pressure, sympathetic activity, pulse interval and dyslipidemia among others parameters (15, 16, 19, 20, 79). However, from our knowledge, any study has addressed the impact of detraining in blood pressure after a HFD intake. It should be emphasized that our physical training protocol is a gentle and little stressful training with aerobic characteristics and develop by a sufficient time to stimulate positive alterations and may be for this that offers beneficial effect even after a period without physical training. Recently, Waring used exercise with 80-85% of VO_2 max and suggested that exercise with less intensity than this may reduce the loss of the exercise effect, after detraining period (39).

The cardiovascular homeostasis is maintained by different regulatory mechanisms that act on balance of sympathetic and parasympathetic activity to the vessels and heart (80). Other factor that may be regulate blood pressure is the ingestion of palatable foods or diets rich in fat, that contributes directly to an increase in adipose tissue and obesity development, affecting the regulation of blood pressure (81). In accordance with this, our animals increased body weight and fat pad stores when they are feed with HFD. Moreover, HFD rats showed increase blood pressure in sedentary animals as well described in the literature (16, 19, 20). It have been suggested that HFD intake and obesity induce an imbalance in the ANS, with increase of sympathetic and decrease of parasympathetic outflow (16, 20, 82, 83). Corroborating with these findings, we showed that HFD intake during 30 days, was able to increase sympathetic vascular activity estimated by spectral analysis of LF-SBP. Sympathetic activation and the norepinephrine spillover are responsible to increase sympathetic outflow to the kidneys and skeletal muscle vasculature in obese humans (82, 84).

Studies with different experimental protocols shows a better effect of continuous exercise, but when this is stopped or when animal is in detraining period, these

adaptations are completely or partially lost (46). Our work showed that moderate physical training protocol performed three times to week in adult rats is effective to protect even after a period of detraining, against the increase of blood pressure stimulated by HFD intake. Agarwal et al., showed that two weeks of detraining are not enough for abolish the benefic effect of moderate exercise on attenuation of blood pressure (42). However, these authors suggest that detraining for more than two weeks may revert completely this cardio-protection develop by exercise (42). Recently, Waring et al., shows that cardiac adaptations induced by four weeks of physical exercise, such as better cardiac function, increase on ventricular wall and increase on maximal capacity of exercise, returned to basal levels after four weeks of detraining in adult rats (39). We may points that our training protocol developed protection on blood pressure same after three weeks of cessation of detraining due to its aerobic characteristics and frequency of three times to week, which comparing to others protocols, is a gentle physical training.

Other beneficial effect of physical training observed in the present study was an increase in parasympathetic cardiac activity in control NFD feed animals estimated by spectral analysis in HF domain of PI. Previous studies have reported an increase in parasympathetic activity induced by different types of exercise such as resistance training, high intensity interval training (HIIT), aerobic training and swimming (24, 85, 86). Corroborating with our research, Mostarda *et al.*, shows that cardiac parasympathetic activity estimated by HF spectral analysis of PI is increased and maintained after three weeks of detraining period after a moderate exercise, in diabetic animals (34). The unbalance of cardiac autonomic activity, as the increase in sympathetic and decrease in parasympathetic activity, may initiate others cardiovascular complications, such as hypertension, and pulse pressure increase, when it is associated with body weight and fat body increase and deregulation of lipid profile, it represents a high risk for cardiovascular disease and death (87).

Pulse pressure is directly related with heart rate, ejection fraction, arterial stiffness and early decrease of pulse wave. Studies have considered that pulse pressure, mathematically obtained by difference between systolic and diastolic blood pressure is a strong determinant of the cardiovascular risks, mainly in human elderly with systolic hypertension and increase in arterial stiffness (88, 89). Siriku et al., showed that after 60

years old (in humans) the systolic blood pressure has a tendency to increase and the diastolic blood pressure reaches a plateau or has a gradually decrease, which led to increments in pulse pressure (89). Sedová, Z. et al., showed that HFD spontaneous hypertensive rats have a delay on cardiovascular recovery from stress, has nocturnal hypertension and cardiac hypertrophy. Thus, these authors suggest that HFD may potentiate the impact of stress on cardiovascular system (90). Knowing that adult life has a relation to increase of pulse pressure and HFD consumption may potentiate the disturbance on cardiovascular system, these may be factors which may help to understand our results in which the HFD animals show an increase in pulse pressure (89).

Moreover, HFD lead to dyslipidemia in both sedentary and exercised rats, with increased levels of total cholesterol and triglycerides, which are biomarkers of cardiovascular risk. This increase induced by HFD is well documented in the literature and appear to depend on lipid metabolism disorder (91-94). The LDL cholesterol, another biomarker for cardiovascular disease related with atherosclerosis plate development, is not affected by the 3 weeks of HFD consumption. Conversely, Chengyan Zhou, C. *et al.*, showed that 5, 11 and 18 weeks of HFD consumption developed increase on LDL and decrease on HDL cholesterol. (95). We observed an increase in HDL cholesterol in HFD animals. This may be related to the increased total cholesterol in HFD animals and unchanged LDL cholesterol, suggesting that the excess of cholesterol is not used by the tissues, leaving more cholesterol to be metabolized by the liver. Interestingly, the LDL-cholesterol levels are decreased in EXE-HFD rats suggesting that animals exposed to diet rich in lipids are more susceptible to the benefits of physical training, which is compatible with some studies that show a better response to exercise in obese animals (15, 17, 96).

Interestingly, although cardiometabolic complications are related to HFD consumption it is important to empathize that our animals showed decrease in HFD intake, that may have been related to composition and palatability of the HFD in which stimulate an increase of satiety (97). Consistent with our study, HFD rats have an increase of body weight, even if the energetic intake is not increased. This pattern may be related to the diet composition, which is composed by a high amount of lipids, which

induces the onset of obesity (7, 98). Furthermore, although the detraining is considered by some authors as a factor that stimulates the development of obesity (99, 100) our animals did not show increase in body weight or body fat mass.

In summary, HFD intake was responsible to induce an increase in blood pressure, pulse pressure, vascular sympathetic activity, body weight gain and fat pat stores, and a dyslipidemia, which are all risk factors for cardiovascular diseases and death. And, four weeks of moderate physical training performed three times to week followed by four weeks of detraining promoted a protective effect on blood pressure, LDL cholesterol and body fat against deregulation by HFD intake. In conclusion, the moderate physical training, performed three times to week, for three weeks, promoted protector effect against cardiometabolic alterations induced by HFD. We points for the first time that physical training benefice on adult life may be maintained after a detraining period.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de testar a hipótese de que um curto período de treinamento físico de intensidade moderada, realizado três vezes na semana em ratos adultos, protege mesmo após um período de cessação de treinamento, contra desregulações no comportamento alimentar e desregulações cardiometabólicas induzidas por consumo de dieta hipercalórica, realizou-se dois estudos, nos quais confirmaram a hipótese geral da presente tese.

Notou-se no estudo 1 que o treinamento desenvolveu estímulos persistentes mesmo após um período de cessação do treinamento físico e consumo de dieta hipercalórica, no qual pôde-se observar os efeitos benéficos sobre o controle do comportamento alimentar de ratos adultos. Este controle, sugerimos estar relacionado com a alteração de possíveis vias dopaminérgicas do núcleo estriado (TH-D1). Também observamos que animais previamente treinados, alimentados posteriormente ao treinamento com ração comercial ou hipercalórica tiveram menor ganho de peso corporal e gordura corporal e aumento dos níveis plasmáticos de T3. Sabemos também, por um estudo realizado anteriormente, que estes animais previamente treinados, desenvolveram um efeito benéfico sobre a pressão arterial, na qual apresentou-se reduzida comparada com seus controles (15).

No estudo 2, embora tenhamos realizado um protocolo experimental semelhante, este aconteceu em uma fase posterior da vida adulta e objetivou entender se o treinamento físico nesta fase também tem efeito benéfico após um período de cessação de treinamento sobre o perfil metabólico e cardiovascular. Notamos, desta forma, que estes animais previamente exercitados e posteriormente alimentados com ração comercial ou hipercalórica, tiveram o padrão alimentar semelhante ao de 48h de análise do estudo 1 e também apresentaram menor ganho de gordura corporal, assim como os animais do estudo 1. No estudo 2 já não conseguimos observar um efeito protetor do treinamento contra o aumento de peso corporal estimulado por ingestão hipercalórica. Ao realizar a avaliação da pressão arterial, notou-se um efeito benéfico do treinamento,

que perdurou após sua cessação, no qual impediu o aumento da pressão arterial em animais alimentados posteriormente com ração hipercalórica. Desta forma, ressalta-se que mesmo após um período de destreinamento e ingestão de HFD, ratos previamente treinados tiveram resistência a desenvolver algumas alterações cardiometabólicas, na qual apontamos pela primeira vez que o benefício de um curto período de treinamento físico realizado em uma fase mais tardia da vida adulta pode ser parcialmente mantidos após um curto período de destreinamento.

Embora tenhamos encontrado resultados interessantes que sustentaram nossa hipótese inicial, ainda faz-se necessário, estudos complementares para desvendarmos os mecanismos metabólicos e cardiovasculares que são ativados no período de destreinamento, assim como, experimentos *in vivo* e *in vitro* para verificar o funcionamento pancreático, experimentos para entender o funcionamento da pressão arterial frente a situações de stress, medidas *in vivo* e *in vitro* de controladores da pressão arterial, registro elétrico da atividade elétrica renal, registro elétrico da atividade autonômica simpática e parassimpática e estudos de mecanismos centrais envolvidos no controle metabólico em geral. Ressaltamos ainda, que alguns destes experimentos já foram realizados, mas devido ao grande número de dados destes diferentes sistemas estudados, não foi possível a inserção destes, nesta tese. Outros experimentos ainda não foram realizados, devido a condições estruturais.

REFERÊNCIAS

1. Malta DC, Franca E, Abreu DMX, Perillo RD, Salmen MC, Teixeira RA, et al. Mortality due to noncommunicable diseases in Brazil, 1990 to 2015, according to estimates from the Global Burden of Disease study. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2017 May-Jun;135(3):213-21. PubMed PMID: 28746656.
2. Hallal PC, Bauman AE, Heath GW, Kohl HW, 3rd, Lee IM, Pratt M. Physical activity: more of the same is not enough. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):190-91. PubMed PMID: 22818932.
3. Mendonca CP, dos Anjos LA. [Dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in Brazil]. *Cadernos de saude publica*. 2004 May-Jun;20(3):698-709. PubMed PMID: 15263980. Aspectos das praticas alimentares e da atividade fisica como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil.
4. Hamilton MT, Healy GN, Dunstan DW, Zderic TW, Owen N. Too Little Exercise and Too Much Sitting: Inactivity Physiology and the Need for New Recommendations on Sedentary Behavior. *Current cardiovascular risk reports*. 2008 Jul;2(4):292-8. PubMed PMID: 22905272. Pubmed Central PMCID: 3419586.
5. Donaldson L RP. Healthier, fairer, safer: the global health journey. World Health Organization. 2017;2007-2017(Geneva). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Ananda Malta EGdM, Tatiane Aparecida Ribeiro, Laize Peron Tófolo, Latifa Abdennebi-Najar, Didier Vieau, Luiz Felipe Barella, Paulo Cezar de Freitas Mathias, Patrícia Cristina Lisboa, Júlio Cezar de Oliveira. Protein-energy malnutrition at mid-adulthood does not imprint long-term metabolic consequences in male rats. *European journal of nutrition*. 2015.
7. Borst SE, Conover CF. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life sciences*. 2005 Sep 09;77(17):2156-65. PubMed PMID: 15935403.
8. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007 Apr;15(4):798-808. PubMed PMID: 17426312.
9. Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, et al. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition*. 2000 Oct;16(10):843-57. PubMed PMID: 11054589.
10. Meijer JH, Schwartz WJ. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of biological rhythms*. 2003 Jun;18(3):235-49. PubMed PMID: 12828281.
11. Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation proceedings*. 1983 Aug;42(11):2783-9. PubMed PMID: 6135628.
12. Branecky KL, Niswender KD, Pendergast JS. Disruption of Daily Rhythms by High-Fat Diet Is Reversible. *PloS one*. 2015;10(9):e0137970. PubMed PMID: 26366733. Pubmed Central PMCID: 4569368.
13. Hatori M, Panda S. Response of peripheral rhythms to the timing of food intake. *Methods in enzymology*. 2015;552:145-61. PubMed PMID: 25707276.

14. Meguid MM, Laviano A, Rossi-Fanelli F. Food intake equals meal size times mean number. *Appetite*. 1998 Dec;31(3):404. PubMed PMID: 9920692.
15. Tofolo LP, da Silva Ribeiro TA, Malta A, Miranda RA, Gomes RM, de Oliveira JC, et al. Short-term moderate exercise provides long-lasting protective effects against metabolic dysfunction in rats fed a high-fat diet. *European journal of nutrition*. 2014 Dec 21. PubMed PMID: 25528242.
16. Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, Davern PJ, Burke SL, Montani JP, et al. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension*. 2010 Apr;55(4):862-8. PubMed PMID: 20194306.
17. Gomes RM, Tofolo LP, Rinaldi W, Scomparin DX, Grassioli S, Barella LF, et al. Moderate Exercise Restores Pancreatic Beta-Cell Function and Autonomic Nervous System Activity in Obese Rats Induced by High-Fat Diet. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013 Aug 5;32(2):310-21. PubMed PMID: 23942282.
18. Lopez-Jaramillo P, Lahera V, Lopez-Lopez J. Epidemic of cardiometabolic diseases: a Latin American point of view. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2011 Apr;5(2):119-31. PubMed PMID: 21406494.
19. Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JA, Jen KL, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain research bulletin*. 2003 Sep 30;61(5):511-9. PubMed PMID: 13679250.
20. Armitage JA, Burke SL, Prior LJ, Barzel B, Eikelis N, Lim K, et al. Rapid onset of renal sympathetic nerve activation in rabbits fed a high-fat diet. *Hypertension*. 2012 Jul;60(1):163-71. PubMed PMID: 22647890.
21. Batacan RB, Jr., Duncan MJ, Dalbo VJ, Connolly KJ, Fenning AS. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2016 Sep;41(9):945-52. PubMed PMID: 27523646.
22. Ross R, Freeman JA, Janssen I. Exercise alone is an effective strategy for reducing obesity and related comorbidities. *Exercise and sport sciences reviews*. 2000 Oct;28(4):165-70. PubMed PMID: 11064850.
23. Lazzer S, Lafortuna C, Busti C, Galli R, Agosti F, Sartorio A. Effects of low- and high-intensity exercise training on body composition and substrate metabolism in obese adolescents. *Journal of endocrinological investigation*. 2011 Jan;34(1):45-52. PubMed PMID: 20808072.
24. Barbosa Neto O, Abate DT, Marocolo Junior M, Mota GR, Orsatti FL, Rossi e Silva RC, et al. Exercise training improves cardiovascular autonomic activity and attenuates renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of sports science & medicine*. 2013;12(1):52-9. PubMed PMID: 24149725. Pubmed Central PMCID: 3761757.
25. Stensel D. Exercise, appetite and appetite-regulating hormones: implications for food intake and weight control. *Annals of nutrition & metabolism*. 2010;57 Suppl 2:36-42. PubMed PMID: 21346335.
26. Moody L, Liang J, Choi PP, Moran TH, Liang NC. Wheel running decreases palatable diet preference in Sprague-Dawley rats. *Physiology & behavior*. 2015 Oct 15;150:53-63. PubMed PMID: 25791204. Pubmed Central PMCID: 4546889.
27. Liang NC, Bello NT, Moran TH. Wheel running reduces high-fat diet intake, preference and mu-opioid agonist stimulated intake. *Behavioural brain research*. 2015 May 1;284:1-10. PubMed PMID: 25668514. Pubmed Central PMCID: 4381440.

28. Mendoza J, Challet E. Circadian insights into dopamine mechanisms. *Neuroscience*. 2014 Dec 12;282:230-42. PubMed PMID: 25281877.
29. Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences*. 2007 May;30(5):194-202. PubMed PMID: 17408759.
30. Baek DJ, Lee CB, Baek SS. Effect of treadmill exercise on social interaction and tyrosine hydroxylase expression in the attention-deficit/ hyperactivity disorder rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2014 Oct;10(5):252-7. PubMed PMID: 25426460. Pubmed Central PMCID: 4237838.
31. de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *The Journal of endocrinology*. 2013 Feb;216(2):195-206. PubMed PMID: 23151360.
32. Cunha Fda S, Dalle Molle R, Portella AK, Benetti Cda S, Noschang C, Goldani MZ, et al. Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the "Similarities in the Inequalities" model. *PloS one*. 2015;10(3):e0118586. PubMed PMID: 25738800. Pubmed Central PMCID: 4349804.
33. Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Re is TM, Desai M, Ross MG, et al. Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain research*. 2015 Aug 27;1618:41-9. PubMed PMID: 26006109.
34. Mostarda C, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, et al. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2009 Jan 28;145(1-2):11-6. PubMed PMID: 19022707.
35. Wen CP, Wu X. Stressing harms of physical inactivity to promote exercise. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):192-3. PubMed PMID: 22818933.
36. Kilic-Erkek O, Kilic-Toprak E, Caliskan S, Ekbic Y, Akbudak IH, Kucukatay V, et al. Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016 Jan;412(1-2):209-19. PubMed PMID: 26708216.
37. Mujika I, Padilla S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. *Sports medicine*. 2000 Aug;30(2):79-87. PubMed PMID: 10966148.
38. Marini M, Falcieri E, Margonato V, Trere D, Lapalombella R, di Tullio S, et al. Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. *Histochemistry and cell biology*. 2008 Apr;129(4):479-87. PubMed PMID: 18172661.
39. Waring CD, Henning BJ, Smith AJ, Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison GM. Cardiac adaptations from 4 weeks of intensity-controlled vigorous exercise are lost after a similar period of detraining. *Physiological reports*. 2015 Feb 1;3(2). PubMed PMID: 25713328.
40. Sertie RA, Andreotti S, Proenca AR, Campana AB, Lima-Salgado TM, Batista ML, Jr., et al. Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2013 Aug 1;115(3):394-402. PubMed PMID: 23703117.
41. Lehnen AM, Leguisamo NM, Pinto GH, Markoski MM, De Angelis K, Machado UF, et al. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. *Cardiovascular diabetology*. 2010 Oct 28;9:67. PubMed PMID: 21029425. Pubmed Central PMCID: 2984487.

42. Agarwal D, Dange RB, Vila J, Otamendi AJ, Francis J. Detraining differentially preserved beneficial effects of exercise on hypertension: effects on blood pressure, cardiac function, brain inflammatory cytokines and oxidative stress. *PloS one*. 2012;7(12):e52569. PubMed PMID: 23285093. Pubmed Central PMCID: 3527563.
43. Kemi OJ, Haram PM, Wisloff U, Ellingsen O. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23):2897-904. PubMed PMID: 15173028.
44. Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013 Apr;57:119-28. PubMed PMID: 23376037.
45. Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *European journal of applied physiology*. 2010 Jul;109(5):909-14. PubMed PMID: 20300769.
46. Kilic-Erkek O, Kilic-Toprak E, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M. Exercise training and detraining modify hemorheological parameters of spontaneously hypertensive rats. *Biorheology*. 2014;51(6):355-67. PubMed PMID: 25467762.
47. Mifune H, Tajiri Y, Nishi Y, Hara K, Iwata S, Tokubuchi I, et al. Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides*. 2015 Sep;71:49-55. PubMed PMID: 26122892.
48. Pendergast JS, Branecky KL, Huang R, Niswender KD, Yamazaki S. Wheel-running activity modulates circadian organization and the daily rhythm of eating behavior. *Frontiers in psychology*. 2014;5:177. PubMed PMID: 24624109. Pubmed Central PMCID: 3941004.
49. Mazzucatto F, Higa TS, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(8):2000-8. PubMed PMID: 25232380. Pubmed Central PMCID: 4161540.
50. Applegate EA, Upton DE, Stern JS. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. *The Journal of nutrition*. 1984 Feb;114(2):447-59. PubMed PMID: 6694004.
51. Marchant EG, Mistlberger RE. Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiology & behavior*. 1996 Aug;60(2):657-63. PubMed PMID: 8840932.
52. Wolff G, Esser KA. Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. *Medicine and science in sports and exercise*. 2012 Sep;44(9):1663-70. PubMed PMID: 22460470. Pubmed Central PMCID: 3414645.
53. Negrao CE, Moreira ED, Brum PC, Denadai ML, Krieger EM. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1992;25(10):1045-52. PubMed PMID: 1342828.
54. Berlanga J, Cibrian D, Guillen I, Freyre F, Alba JS, Lopez-Saura P, et al. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. *Clinical science*. 2005 Jul;109(1):83-95. PubMed PMID: 15755259.
55. Paxinos G WC. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier. 2007;6th edition

56. Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obesity research*. 2003 Jul;11(7):845-51. PubMed PMID: 12855753.
57. Eckel LA, Langhans W, Kahler A, Campfield LA, Smith FJ, Geary N. Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats. *The American journal of physiology*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):R186-93. PubMed PMID: 9688978.
58. Martin V, Wiesel ML, Beretz A. Artifact of blood pressure recording using heparin-filled catheter: effects on blood pressure and coagulation parameters. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 1996 Oct;36(2):69-72. PubMed PMID: 8912223.
59. Poppendieck S, Kapapa M, Haas P, Kielstein H. Prolonged postsurgical recovery period and adverse effects of a leptin application in endotoxemic obese rodents. *Life sciences*. 2013 Aug 14;93(5-6):247-56. PubMed PMID: 23800646.
60. Palma-Rigo K, Baudrie V, Laude D, Elghozi JL. Cardiovascular rhythms and cardiac baroreflex sensitivity in AT1A receptor gain-of function mutant mice. *Hypertension*. 2010;55:1507-8.
61. Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LF, Magni DV, Ferreira AP, et al. Exercise preconditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotoxicity research*. 2012 Feb;21(2):175-84. PubMed PMID: 21735317.
62. Di Rienzo M, Castiglioni P, Parati G. The sequence technique revised: additional concepts on the assessment of spontaneous baroreflex function. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference*. 2010;2010:1703-5. PubMed PMID: 21096401.
63. da Mota GR, Zanesco A. [Leptin, ghrelin, and physical exercise]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007 Feb;51(1):25-33. PubMed PMID: 17435852. Leptina, ghrelina e exercicio fisico: Leptin, ghrelin, and physical exercise.
64. Gallardo CM, Darvas M, Oviatt M, Chang CH, Michalik M, Huddy TF, et al. Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *eLife*. 2014;3:e03781. PubMed PMID: 25217530. Pubmed Central PMCID: 4196120.
65. Yasari S, Dufresne E, Prud'homme D, Lavoie JM. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. *Physiology & behavior*. 2007 Jun 8;91(2-3):281-9. PubMed PMID: 17449070.
66. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Kato T, Umemura Y. Bones benefits gained by jump training are preserved after detraining in young and adult rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2008 Sep;105(3):849-53. PubMed PMID: 18599679.
67. Levin BE. Arcuate NPY neurons and energy homeostasis in diet-induced obese and resistant rats. *The American journal of physiology*. 1999 Feb;276(2 Pt 2):R382-7. PubMed PMID: 9950915.
68. Chari M, Lam CKL, Lam TKT. Hypothalamic Fatty Acid Sensing in the Normal and Disease States. In: Montmayeur JP, le Coutre J, editors. *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL)2010.
69. Somalwar AR, Shelkar GP, Subhedar NK, Kokare DM. The role of neuropeptide CART in the lateral hypothalamic-ventral tegmental area (LH-VTA) circuit in motivation. *Behavioural brain research*. 2017 Jan 15;317:340-9. PubMed PMID: 27686026.

70. Wang ZW, Pan WT, Lee Y, Kakuma T, Zhou YT, Unger RH. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001 Jan;15(1):108-14. PubMed PMID: 11149898.
71. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nature medicine*. 2004 Jul;10(7):739-43. PubMed PMID: 15208705.
72. Proulx K, Richard D, Walker CD. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4683-92. PubMed PMID: 12446596.
73. Patterson CM, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008 Feb;294(2):R290-301. PubMed PMID: 17989137.
74. Eddy MC, Stansfield KJ, Green JT. Voluntary exercise improves performance of a discrimination task through effects on the striatal dopamine system. *Learning & memory*. 2014 Jul;21(7):334-7. PubMed PMID: 24934332. Pubmed Central PMCID: 4061424.
75. Organization WH. Cardiovascular diseases (CVDs) - Fact sheet N°317. 2015:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
76. Barella LF, de Oliveira JC, Branco RC, Camargo RL, Gomes RM, Mendes FC, et al. Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2012 Jun;44(6):458-64. PubMed PMID: 22438211.
77. Santos SO, Loureiro SM, Alves IG, Jesus CS, Santos PR, Santos MR, et al. Experimental gestational hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2012 Sep 25;170(1-2):36-41. PubMed PMID: 22878215.
78. Silva AS, Ariza D, Dias DP, Crestani CC, Martins-Pinge MC. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. *Life sciences*. 2015 Apr 15;127:82-9. PubMed PMID: 25744393.
79. Xue B, Yu Y, Zhang Z, Guo F, Beltz TG, Thunhorst RL, et al. Leptin Mediates High-Fat Diet Sensitization of Angiotensin II-Elicited Hypertension by Upregulating the Brain Renin-Angiotensin System and Inflammation. *Hypertension*. 2016 May;67(5):970-6. PubMed PMID: 27021010. Pubmed Central PMCID: 4833570.
80. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991 Aug;84(2):482-92. PubMed PMID: 1860193.
81. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2000 Jun;33(6):605-18. PubMed PMID: 10829088.
82. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *Journal of hypertension*. 2004 Dec;22(12):2363-9. PubMed PMID: 15614031.
83. Van Vliet BN, Hall JE, Mizelle HL, Montani JP, Smith MJ, Jr. Reduced parasympathetic control of heart rate in obese dogs. *The American journal of physiology*. 1995 Aug;269(2 Pt 2):H629-37. PubMed PMID: 7653627.

84. Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL, Collier G, Kaye DM, Seals DR, et al. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *Journal of hypertension*. 1999 Aug;17(8):1125-33. PubMed PMID: 10466468.
85. Paolillo FR, Arena R, Dutra DB, de Cassia Marqueti Durigan R, de Araujo HS, de Souza HC, et al. Low-level laser therapy associated with high intensity resistance training on cardiac autonomic control of heart rate and skeletal muscle remodeling in wistar rats. *Lasers in surgery and medicine*. 2014 Dec;46(10):796-803. PubMed PMID: 25363390.
86. Silveira LC, Tezini GC, Schujmann DS, Porto JM, Rossi BR, Souza HC. Comparison of the effects of aerobic and resistance training on cardiac autonomic adaptations in ovariectomized rats. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2011 Jul 05;162(1-2):35-41. PubMed PMID: 21429820.
87. Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 Nov;1083:129-52. PubMed PMID: 17148737.
88. Sousa JM, Hermann JL, Guimaraes JB, Menezes PP, Carvalho AC. Evaluation of systolic, diastolic, and pulse pressure as risk factors for severe coronary arteriosclerotic disease in women with unstable angina non-ST-elevation acute myocardial infarction. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2004 May;82(5):430-3, 26-9. PubMed PMID: 15340673.
89. Sikiru L, Okoye GC. Effect of interval training programme on pulse pressure in the management of hypertension: a randomized controlled trial. *African health sciences*. 2013 Sep;13(3):571-8. PubMed PMID: 24250291. Pubmed Central PMCID: 3824464.
90. Sedova L, Berube J, Gaudet D, Dumont M, Tremblay J, Hamet P, et al. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obesity research*. 2004 Dec;12(12):1951-8. PubMed PMID: 15687396.
91. Kaprinay B, Liptak B, Slovak L, Svik K, Knezl V, Sotnikova R, et al. Hypertriglyceridemic rats fed high fat diet as a model of metabolic syndrome. *Physiological research*. 2016 Dec 21;65(Supplementum 4):S515-S8. PubMed PMID: 28006934.
92. Barella LF, Miranda RA, Franco CC, Alves VS, Malta A, Ribeiro TA, et al. Vagus nerve contributes to metabolic syndrome in high-fat diet-fed young and adult rats. *Exp Physiol*. 2015 Jan;100(1):57-68. PubMed PMID: 25398717.
93. Karupiah S, Ismail Z. Anti-Obesity Effects of *Melastoma malabathricum* var *Alba* Linn in Rats Fed with a High-Fat Diet. *AAPS PharmSciTech*. 2015 Jun;16(3):548-53. PubMed PMID: 25374344. Pubmed Central PMCID: PMC4444635.
94. Sour S, Belarbi M, Sari N, Benammar CH, Baghdad CH, Visioli F. Argan oil reduces, in rats, the high fat diet-induced metabolic effects of obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015 Apr;25(4):382-7. PubMed PMID: 25694362.
95. Zhou C, Zhou J, Han N, Liu Z, Xiao B, Yin J. Beneficial effects of neomangiferin on high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *International immunopharmacology*. 2015 Mar;25(1):218-28. PubMed PMID: 25661699.
96. Rinaldi W, Gomes RM, Scomparin DX, Grassioli S, Ribeiro TA, Fabricio GS, et al. Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2014;11:25. PubMed PMID: 24914402. Pubmed Central PMCID: 4049453.
97. Corbit JD, Stellar E. Palatability, Food Intake, and Obesity in Normal and Hyperhagic Rats. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1964 Aug;58:63-7. PubMed PMID: 14197042.

98. Sclafani A. Psychobiology of food preferences. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001 Dec;25 Suppl 5:S13-6. PubMed PMID: 11840208.
99. Petibois C, Cassaigne A, Gin H, Deleris G. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jul;89(7):3377-84. PubMed PMID: 15240618.
100. Shepard TY, Weil KM, Sharp TA, Grunwald GK, Bell ML, Hill JO, et al. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. *The American journal of clinical nutrition*. 2001 Apr;73(4):703-8. PubMed PMID: 11273843.

ANEXOS



Certificado de aprovação do projeto no comitê de ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 150344

Data da Versão do Projeto: 17/08/2015

Pesquisadores:

PATRICIA PELUFO SILVEIRA

LAIZE PERON TÓPOLO

AMANDA BRONDANI MUCCELLINI

Título: Análise do desempenho físico e alimentação rica em gordura em dois períodos diferentes da vida adulta, sob o comportamento alimentar e a relação com o hipotálamo e núcleo accumbens de ratos Wistar machos.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 13 de outubro de 2015.


Biol. Michael Evartton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Exercício físico moderado realizado no início da vida adulta pode programar o metabolismo a desenvolver proteção central e periférica contra comorbidades induzidas pela ingestão de dieta hiperlipídica em ratos.", protocolado sob o CEUA nº 9213241014, sob a responsabilidade de **Paulo Cezar De Freitas Mathias e equipe; Laize Peron Tófolo; Clarice Gravena; Késia Palma-rigo ; Maroly Valetin Alves Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/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 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) em reunião de 10/12/2014.

We certify that the proposal "Moderate physical exercise performed early in adult life can programming the metabolism to develop central and peripheral protection against diseases induced by high fat diet ingestion in rats.", utilizing 60 Heterogeneous rats (60 males), protocol number CEUA 9213241014, under the responsibility of **Paulo Cezar De Freitas Mathias and team; Laize Peron Tófolo; Clarice Gravena; Késia Palma-rigo ; Maroly Valetin Alves Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 12/10/2014.

Vigência da Proposta: de 12/2014 a 12/2016 Laboratório: Departamento De Biotecnologia, Genética E Biologia Celular (dbc)

Procedência: Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá – UEM

Espécie: Rato heterogêneo Gênero: Machos idade: 60 dias N: 60

Linhagem: Wistar Peso: ~250 gramas

Resumo: O estilo de vida sedentário e a alimentação com alto teor calórico influenciam diretamente no descontrole energético e metabólico, sendo estes, fortes preditores para o aumento da obesidade nos últimos anos. No entanto, a realização de exercício físico é considerado um eficiente tratamento não farmacológico contra as doenças decorrentes da obesidade. Assim, o objetivo do presente estudo é testar se o exercício físico aeróbico, com intensidade moderada, realizado por um curto período e frequência, oferece proteção contra as disfunções cardiometabólicas induzidas por ingestão de dieta rica em gordura em ratos adultos. Para isso, ratos machos com 60 dias, serão submetidos a um programa de exercício três vezes na semana por 30 dias. No final do protocolo de exercício físico, ratos treinados, receberão dieta hiperlipídica (HFD) por 30 dias (HFD-EXE). Animais sedentários receberão HFD (HFDSED). Outros dois grupos exercitados (NFD-EXE) ou sedentários (NFD-SED), serão tratados com dieta comercial. O consumo de ração e o peso corporal serão medidos semanalmente. Aos 120 dias de vida o controle glicêmico será analisado pela tolerância a glicose e sensibilidade periférica a insulina. As ilhotas pancreáticas serão isoladas e incubadas em presença de diferentes concentrações de glicose e acetilcolina, antagonistas e agonistas muscarínicos. Parte dos animais será usada para avaliar os registros eletrofisiológicos do ramo nervoso simpático (gânglio cervical superior) e parassimpático (nervo vago superior) como medida direta da ação do sistema nervoso autônomo.

Maringá, 02 de junho de 2015

Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá