

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA



Tese de doutorado

**Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre
parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em um modelo
experimental de neuroinflamação**

Nicole Gomes Gonzales

Pelotas, 2018

Nicole Gomes Gonzales

Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em um modelo experimental de neuroinflamação

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Educação Física (linha de pesquisa: Epidemiologia da Atividade Física).

Orientador: Prof. Dr. Airton José Rombaldi

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Rosélia Maria Spanevello

Pelotas, 2018

Ficha catalográfica

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G643e Gonzales, Nicole Gomes

Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em um modelo experimental de neuroinflamação / Nicole Gomes Gonzales ; Airton José Rombaldi, orientadora ; Rosélia Maria Spanevello, coorientador. — Pelotas, 2018.

146 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Escola Superior de Educação Física, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Exercício aeróbio. 2. Treinamento intervalado de alta intensidade. 3. Reconhecimento. 4. Memória. 5. Acetilcolinesterase. I. Rombaldi, Airton José, orient. II. Spanevello, Rosélia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 796

Elaborada por Patrícia de Borba Pereira CRB: 10/1487

Banca examinadora:

Prof. Dr. Airton José Rombaldi (orientador)
Escola Superior de Educação Física (UFPel)

Prof. Dr. Rafael Bueno Orcy
Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPel)

Prof. Dr. Gustavo Dias Ferreira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPel)

Prof. Dr. Marcelo Cozzensa da Silva
Escola Superior de Educação Física (UFPel)

Agradecimentos

Aos meus pais, Leilá e Nelci, agradeço imensamente por tudo que fizeram por mim até hoje, especialmente nesse período do doutorado. Os primeiros ensinamentos que recebi na vida vieram de vocês e além dos valores que me foram transferidos, sem dúvida a possibilidade que me foi dada de estudar e sempre ir em busca dos meus objetivos e conquistas foi fundamental para que eu obtivesse esse título. Mesmo com as dificuldades que enfrentamos nesse período, por diversas vezes vocês abdicaram de tudo para me auxiliar e garantir que eu realizasse minhas atividades. Sem o amor, carinho e dedicação que me forneceram, eu não teria chegado até aqui. Sei que compreenderam que todos os momentos que precisei estar ausente foi buscando ser uma profissional mais qualificada e uma pessoa melhor. Amo vocês!

Ao meu namorado Matheus, pela parceria firmada no doutorado e na vida, por ter sido bem mais que paciente, carinhoso e amoroso comigo nesse período, mas por ter me dado todo o suporte durante a pesquisa, para que junto comigo enfrentasse esse desafio de pesquisar sem recursos e numa área tão nova e tão complexa para a Educação Física. Sem dúvida eu não teria concluído essa etapa sem ti. Agradeço também por sempre me incentivar a ir em frente, a driblar as dificuldades que surgem pelo caminho e por acreditar no meu potencial. Te agradeço também pelo amor incondicional que me desses em todos os momentos e por tornar leve um período que, por si só é tão intenso e desgastante. Te amo!

Ao meu querido orientador, professor Airton Rombaldi, agradeço enormemente a confiança que depositastes em mim ao longo desses anos, pelas inúmeras oportunidades que me ofertastes de conhecimento e pelas experiências que me foram dadas na vida acadêmica. Sem dúvida, fostes o principal responsável por me fazer gostar de pesquisar e por me fazer querer ser uma profissional cada vez melhor. Obrigada pelos conselhos, que por vezes foram mais de pai que de orientador e que, com toda certeza, ultrapassam as barreiras da academia e passam hoje a ser ensinamentos de vida, que guardarei com muito carinho. Durante esse curso e na tua trajetória profissional, tens sido

incansável na tua busca por formar profissionais que realizem suas atividades acadêmicas pautadas pela ética, sem deixar o aspecto humano de lado e saibas que, sempre espelharei-me em ti na minha profissão. Preciso dizer que palavras não são suficientes para te agradecer por tudo o que fizestes por mim ao longo desse período, que se iniciou lá em 2008 no curso de graduação em Educação Física. Agradeço acima de tudo pela amizade que construímos ao longo do tempo. És para mim um grande exemplo profissional e pessoal a ser seguido!

-À minha coorientadora, professora Rosélia Spanevello (Rose), pelos ensinamentos que contigo aprendi e por acreditar que a pesquisa em questão tinha futuro e devia ser efetivamente realizada, além de sempre me receber de forma muito atenciosa, carinhosa e gentil. Fico extremamente feliz em te ter como colaboradora nesse estudo e por auxiliar na minha formação enquanto doutora em Educação Física.

-À professora Francieli Stefanello (Fran), que junto com a Rose embarcou nesse desafio de estudar exercício e neuroinflamação; por ter fornecido todo o suporte necessário para que a pesquisa ocorresse, seja através dos ensinamentos, da utilização do laboratório ou nas análises. Obrigado pela confiança que depositastes em mim e no Matheus e por sempre ser tão querida e atenciosa conosco.

-Às integrantes do Laboratório de Biomarcadores e do Neurocan, por todo o auxílio fornecido nas coletas dos dados.

-Aos auxiliares de bioterismo da UFPel, Cristiano, Cristina, Juliana e Patrícia, foi maravilhoso conhecer vocês. Agradeço imensamente todo o apoio que vocês nos deram nas coletas de dados, pois sem vocês a pesquisa de fato não teria como ocorrer. Obrigado também por tornarem esse período tão agradável, pois fomos recebidos com muito afeto e carinho e jamais esquecerei dos dias que estivemos no Biotério.

-À minha sogra Jane e ao meu sogro Paulo, por todo o apoio, carinho, atenção e incentivo que me deram nesse período, com certeza vocês foram fundamentais nesse processo!

-As queridas amigas Luiza, Roberta, Silvana e Tia Rosa, pelos mais de vinte amizade, incentivo e apoio. Vocês que sempre torceram por mim e por quem eu tenho muito amor e carinho, obrigada por tudo!

-À querida amiga Christine Spieker, por ter se tornado muito mais do que a funcionária do colegiado da pós-graduação da ESEF, mas minha grande amiga, conselheira e parceira de café nas manhãs e tardes que por muitos anos passei nessa universidade. Obrigada pela paciência, atenção, carinho e apoio durante essa jornada, com certeza ter com quem dividir as incertezas e as alegrias, é o que faz a vida valer a pena!

-Aos queridos colegas de doutorado e grandes amigos, Rodrigo e Aline, foi uma alegria muito grande e uma sorte incrível tê-los encontrado e poder contar com a amizade, incentivo e carinho de vocês, saibam que sempre estarei disponível e presente para ajudar vocês no que for!

-Ao colega de mestrado Natan, por ter compartilhado comigo as incertezas e os desafios de uma pesquisa com exercício em animais. Obrigado também pela troca de conhecimentos, pelo incentivo e pela ajuda de sempre!

-Aos auxiliares de pesquisa que foram essenciais para que a intervenção fosse aplicada. Obrigado pelo companheirismo e trabalho duro nas manhãs frias do inverno no Capão do Leão, Bruno, Marta, Denner e Zanetti.

-Às minhas amigas queridas, Juliana, Mariana e Fábria, agradeço imensamente todo o apoio, carinho, amizade e atenção que sempre me deram. Quando as coisas não estavam dando muito certo, sabia que podia contar com os conselhos e ombro amigo de vocês e sempre que uma nova conquista surgia, sabia que mesmo de longe estavam vibrando e torcendo por mim. Vocês são fundamentais na minha vida.

-Aos queridos amigos do intitulado “Grupinho Feliz”, Otávio, Marcelo (Fiss), Maurício (Pickols), Joubert, Mateus (Levy) e Nathália, obrigado por se fazerem presentes na minha vida nesse período, pelas reuniões alegres e felizes que me faziam por vezes deixar os estudos e as preocupações de lado. Obrigada também pela torcida e pelo apoio de sempre!

- À médica veterinária Anelize Campello, por todo o auxílio fornecido durante a pesquisa, pela atenção e gentileza com que nos recebeu no Biotério e pelos ensinamentos que contigo adquirimos durante o estudo.

-Ao querido amigo, José Antônio Bicca (Zé), por todo carinho, atenção e ajuda de sempre. Sei que sempre estarás disponível para me ajudar e saibas que a recíproca é verdadeira.

-À minha tia Noelci (*in memoriam*) por todo carinho, atenção e apoio que me dessem nesse período e ao longo da vida. Não estás mais de corpo presente para ver a minha conquista, mas sei que de onde tu estiver, estará torcendo pela minha felicidade e sucesso.

-À querida amiga Beatriz, pela amizade, carinho e apoio nesse período e ao longo da vida, és para mim como uma irmã e espero que estejas sempre por perto para poder vibrar comigo nas minhas conquistas.

-Aos queridos amigos, Silvia Helena e Elias, que mesmo de longe estão sempre torcendo pela minha felicidade e que sempre foram tão amorosos e carinhosos comigo. Obrigada por fazerem parte da minha vida e desculpem as escassas idas a POA, mas foi em busca desse título.

-Aos meus dindos Maria Adelina (Nina) e Reinaldo (Nino) e a minha prima Rose, pelo apoio, amor e carinho que sempre me deram, especialmente nesse período.

-Aos meus amigos, Chico e Renan, que sempre estiveram por perto vibrando com a minhas conquistas. Obrigada pela amizade, carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

-Ao meu amigo e colega de doutorado Léo Cabistany, que sempre foi um grande amigo, que torce muito por mim e que me acompanha desde a graduação. Saibas que sempre estarei aqui vibrando por ti!

-Aos integrantes do grupo de estudos do LABFex, que acompanharam essa jornada intensa e emocionante que é o curso de doutorado e que me ajudaram por diversas vezes com a troca de conhecimentos e com o auxílio na pesquisa.

-Ao aluno de pós-doutorado Jessié Gutierrez, que foi parte fundamental nessa pesquisa, pois foi o responsável por encontrar uma alternativa viável e com baixo custo para a realização deste doutorado. Obrigado pelos ensinamentos, pela convivência que tivemos nos dias de coleta e pelo teu jeito sempre muito carinhoso, atencioso e divertido conosco.

-Aos meus chefes da Faculdade Anhanguera Pelotas/RS, professores Beto Giusti e Grazielle Lima, agradeço imensamente o apoio e o incentivo de vocês nessa reta final do doutorado, pois me deram toda a segurança e a liberdade para trabalhar de modo que pudesse conciliar as atividades desse curso. Saibam que tenho em vocês um grande exemplo profissional e pessoal!

-Aos professores e colegas do doutorado da ESEF/UFPel, pela troca de conhecimentos adquiridos ao longo destes anos de intenso trabalho e estudo, bem como pela convivência e momentos de descontração que vivemos juntos.

-Aos funcionários da ESEF/UFPel, que com carisma, gentileza e paciência, sempre me auxiliaram em diversas atividades nesta instituição.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

GONZALES, Nicole Gomes. **Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em um modelo animal de neuroinflamação.** 2018. 153f. Tese (Doutorado em Educação Física) – Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Escola Superior de Educação Física, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Objetivos: Comparar os efeitos de seis semanas de exercício intermitente de alta intensidade e exercício contínuo de intensidade moderada sobre atividade locomotora, memória e atividade das enzimas AChE e Na⁺K⁺-ATPase de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 induzidas à neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS). **Métodos:** Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (GC) (n=10), grupo exercício contínuo de intensidade moderada (GCON) (n=10) e grupo exercício intermitente de alta intensidade (GHIIT) (n=10). Setenta e duas horas após a última sessão de exercício os animais receberam uma injeção com 250 µg/kg de LPS advindos da bactéria *Escherichia coli*. **Resultados:** Os protocolos de exercício físico não modificaram nenhum dos parâmetros avaliados pelo teste de campo aberto. O grupo HIIT apresentou maior percentual de exploração do objeto no teste de memória de reconhecimento de objetos em comparação com o grupo GCON [F(2,25)=5,01, p=0,01]. O grupo HIIT apresentou maior atividade da enzima AChE e reduzida atividade da enzima da Na⁺K⁺-ATPase em córtex cerebral e o GCON demonstrou maior atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase no hipocampo. **Conclusão:** Seis semanas de exercício intermitente de alta intensidade e

contínuo de intensidade moderada geraram melhoras na memória de curto prazo dos animais, observada através do teste de memória de reconhecimento de objetos, com resultados mais significativos no grupo HIIT em comparação com os demais grupos. Após o treinamento foram observadas elevações na atividade da AChE e reduções na Na⁺K⁺-ATPase no córtex cerebral de animais que realizaram HIIT. Estudos adicionais são necessários para verificar quais mecanismos neuroquímicos estão relacionados ao exercício físico e de que forma interferem no padrão comportamental e na memória dos animais.

Palavras-chave: Exercício aeróbio; Treinamento intervalado de alta intensidade; reconhecimento; memória; Acetilcolinesterase;

Abstract

GONZALES, Nicole Gomes. **Chronic effects of different models of physical exercise on behaviors parameters and collinergic system in animal modelo of neuroinflammation.** 2018. 153f. Tesis (Doctor degree in Physical Education) – Physical Education Post-Graduated Program, Physical Education Superior School, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Objective: To compare the effects of six weeks of high intensity intermittent exercise and continuous moderate exercise on locomotor activity, memory and activity of the AChE and Na⁺K⁺-ATPase enzymes of female C57BL/6 mice induced by lipopolysaccharide neuroinflammation (LPS). **Methods:** The animals were divided into three groups: control group (CG) (n = 10), continuous intensity group (GCON) (n = 10) and high intensity intermittent exercise group (n = 10) . Seventy-two hours after the last exercise session, animals received an injection with 250 µg/kg of LPS from Escherichia coli bacteria. **Results:** Physical exercise protocols did not modify any of the parameters evaluated by the open field test. The HIIT group presented higher percentage of object exploration in the object recognition memory test compared to the GCON group [F (2,25) = 5.01, p = 0.01]. The HIIT group showed higher activity of the AChE enzyme and reduced Na⁺K⁺-ATPase enzyme activity in the cerebral cortex, and GCON showed higher Na⁺K⁺-ATPase enzyme activity in the hippocampus. **Conclusion:** Six weeks of high-intensity intermittent and continuous moderate exercise led to improvements in the short-term memory of the animals, observed through the object recognition memory test, with more significant results in the HIIT group compared to the other groups. After training, elevations in AChE activity and reductions in Na⁺K⁺-ATPase were observed in the cerebral cortex of animals that underwent HIIT. Further studies are needed to verify which neurochemical mechanisms are related to physical exercise and how they interfere with the behavior pattern and the memory of the animals.

Key-words: Aerobic exercise; High intensity intermitente training; Recognition; Memory; Acetylcholinesterase;

Sumário

Introdução geral.....	15
1. Projeto de pesquisa.....	16
2. Relatório de trabalho de campo	95
3. Artigo original.....	102
4. Press-release	134
5. Anexos	137

Introdução Geral

A presente Tese de Doutorado atende ao regimento do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Escola Superior de Educação Física da Universidade Federal de Pelotas. O volume final contém as seguintes seções:

1- PROJETO DE PESQUISA: apresentado e defendido no dia 27 de abril de 2018, com a incorporação das sugestões dos revisores Professores Doutores Rafael Bueno Orcy e Gustavo Dias Ferreira;

2- RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO: descrição detalhada sobre alguns pontos que chamaram atenção durante o decorrer do trabalho de campo;

3- ARTIGO ORIGINAL: Efeito de diferentes modelos de exercício físico sobre atividade locomotora, memória e atividades das enzimas acetilcolinesterase e sódio potássio ATPase em animais submetidos à neuroinflamação por LPS. O artigo será traduzido para o inglês e submetido ao periódico Acta Physiologica;

4- PRESS-RELEASE: comunicado breve com os principais achados destinados à imprensa local;

5- ANEXOS: anexos utilizados no trabalho.

1 Projeto de Pesquisa

(Tese de Nicole Gomes Gonzales)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**



PROJETO DE TESE

**Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre
parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em um modelo
animal de neuroinflamação**

NICOLE GOMES GONZALES

PELOTAS, RS,

2018

Lista de Figuras

Figura 1.....	31
Figura 2.....	33
Figura 3.....	34
Figura 4.....	36
Figura 5.....	37
Figura 6.....	47
Figura 7.....	58
Figura 8.....	59
Figura 9.....	65
Figura 10.....	74

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1.....	71
Tabela 2.....	75
Quadro 1.....	53

Lista de Abreviaturas e siglas

Acetil CoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
Ache	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina Di Fosfato
AF	Atividade Física
AP-1	Ativador de Proteína 1
ATP	Adenosina Tri Fosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BBB	Barreira Hematoencefálica
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BrdU ⁺	Bromodeoxiuridina
CA1	Anidrases Carbônicas 1
CA3	Anidrase Carbônica 3
COX	Proteína Ciclooxygenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EF	Exercício Físico
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
E. coli	Escherichia coli
eWAT	Tecido Adiposo Epididimal
GC	Grupo Controle
GCON	Exercício Contínuo de Intensidade Moderada
GD	Giro Dentado

GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Células Gliais
GFAP+	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GHIIT	Grupo Exercício Intermitente de Alta Intensidade
HD	Doença de Huntington
HIIT	Exercício Intermitente de Alta Intensidade
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon Gama
I κ B-alfa	Inibidor de NF-KB Alfa
IKKs	Inibidor Kappa B Quinase
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IRF3	Fator Regulador de Interferon 3
iWAT	Tecido Adiposo Subcutâneo Inguinal
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Mal de Alzheimer
MAPK	Mitógenos
MD2	Proteína mielóide diferenciadora 2
MP	Mal de Parkinson
mRNA	Ácido Ribonucleico
MWM	Morris Water Maze
My88	Proteína de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88
M1	Receptor muscarínico 1
M2	Receptor muscarínico 2
M3	Receptor muscarínico 3

M4	Receptor muscarínico 4
M5	Receptor muscarínico 5
N	Número de animais
Na ⁺	Íons Sódio
Na ⁺ , K-ATPase	Sódio potássio ATPase
NF-kb	Fator Nuclear Kappa B
NK	Células Natural Killer
NR	não reportado
PCT	Proteínas de Choque Térmico
Pi	Fosfato Inorgânico
RFID	Implante Subcutâneo Passivo de Identificação por Radiofrequência
R-LPS	Lipopolissacarídeo Rugoso
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STAT-1	Ativador da Transcrição 1
Tau	Taurina
TC	Traumatismo Craniano
TDM	Transtornos Depressivos Menores
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TLR2	Receptor Toll Like 2
TRL4	Receptor Tool Like 4
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
vVO _{2max}	Velocidade do Consumo Máximo de Oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1. 2. OBJETIVO GERAL.....	28
1. 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
1. 4. JUSTIFICATIVA.....	28
1. 5. HIPÓTESE.....	29
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2. 1. LIPOPOLISSACARÍDEO.....	30-39
2.2. MODELOS ANIMAIS DE NEUROINFLAMAÇÃO.....	39-40
2.2.1. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA NEUROINFLAMAÇÃO.....	40-44
2.2.2. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O LPS.....	44-57
2.3. TESTES COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS E SUAS RELAÇÕES COM O EXERCÍCIO FÍSICO.....	57-62
2.4. Acetilcolinesterase (AChE) e sódio potássio ATPase (Na ⁺ K ⁺ - ATPase).....	62-68
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
3. 1. DELINEAMENTO.....	68
3. 2. ANIMAIS.....	68
3.3. CONTENSÃO E TRANSPORTE DOS ANIMAIS.....	69
3. 4. RANDOMIZAÇÃO E PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	69-70
3. 5. MODELO ANIMAL DE NEUROINFLAMAÇÃO.....	72
3. 6. PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	72

3.6.1. TESTE COMPORTAMENTAL DE CAMPO ABERTO.....	72
3.6.2. TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	73
3.7. TEMPERATURA CORPORAL.....	73
3.8. EUTANÁSIA E AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	73
3.9. ANÁLISE EM ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	74
3.9.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $Na^+ K^+$ ATPASE.....	74
3.9.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE).....	74
3.10. OPERACIONALIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	75
4. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	75-76
5. SELEÇÃO E TREINAMENTO DOS AUXILIARES DE PESQUISA.....	76
6. ASPECTOS ÉTICOS.....	76
7. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....	76
8. ORÇAMENTO.....	77
9. CRONOGRAMA.....	78
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79-92
11. ANEXOS.....	93
11.1. PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	94

1. Introdução

Segundo O'Callagan, Sriram e Miller (2008), a neuroinflamação é caracterizada por uma degeneração no sistema nervoso central (SNC) em que ocorrem significativas perdas nas estruturas e funções neuronais, as quais resultam em desequilíbrios funcionais e mentais.

Esses desequilíbrios afetam especialmente adultos de meia idade e idosos (HOFF & MOBBS, 2010) e podem levar a ocorrência de inúmeras doenças degenerativas como o mal de Parkinson (MP) (SOUZA et al., 2016) e de Alzheimer (MA) (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016), esclerose múltipla (EM) (OMS, 2008), esclerose lateral amiotrófica (ELA) (ZAREI et al. 2015) doenças neuropsiquiátricas como a depressão e a ansiedade (FURTADO; KAZTMAN, 2015; CHEN; ZHANG; HUANG, 2016) e também as infecções virais, onde um vírus pode invadir o SNC através da barreira hematoencefálica (BBB) (YANG et al., 1997), e também através da disseminação neuronal retrógrada (ARONSSON et al., 2003).

Em virtude da complexidade dessas doenças e pelo alto grau invasivo causado pelas enfermidades, os modelos animais têm sido amplamente utilizados para estudar neuroinflamação (MIX et al., 2010; HOOGLAND, et al., 2015). Neste cenário, a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS) é um dos modelos mais utilizados pelos pesquisadores em razão do baixo custo de aquisição dessa toxina e pela alta efetividade na indução da inflamação (HOOGLAND et al., 2015).

Os lipolissacarídeos ou lipoglicanos são moléculas de grandes dimensões constituídas por um lipídeo e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente, sendo um dos principais componentes da membrana externa de bactérias gram-negativas. Adicionalmente são endotoxinas que participam dos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana e determinam os efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias (WANG & QUIINN, 2010). A indução dessa substância ocorre através de uma

injeção intraperitoneal nos animais, de modo a simular um ataque inflamatório no organismo dos mesmos.

Adicionalmente aos efeitos causados pelo LPS no organismo dos animais, alguns estudos têm realizado intervenções para identificar os efeitos agudos e crônicos causados pelo exercício físico nos perfis inflamatório, comportamental e de saúde em ratos e camundongos que receberam doses dessa endotoxina. Os estudos têm verificado melhoras na coordenação motora, equilíbrio, nível reduzido de citocinas inflamatórias, entre outros aspectos (FUNK et al., 2011; SPIELMAN et al., 2016; GONÇALVES et al., 2012; LITTLEFIELD et al., 2015).

Nesse sentido, as medidas de parâmetros clínicos e fisiológicos tornam-se importantes para averiguar a eficácia de abordagens interventivas com uso do LPS e com isso, além dos aspectos comumente avaliados nos estudos, a realização dos testes clínicos que avaliam parâmetros comportamentais dos animais como mobilidade, equilíbrio, força e memória têm o intuito de encontrar novas abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas como a EM, ELA, MP, MA, entre outras, de modo a melhorar ou prevenir danos físicos e neurológicos causados por essas patologias (BUDDEBERG et al., 2004). Dentre os testes comportamentais mais utilizados pelos pesquisadores, destacam-se o de campo aberto e de memória de reconhecimento de objetos. O principal aspecto avaliado pelo teste de campo aberto é a locomoção dos animais, a qual se relaciona diretamente com o córtex cerebral, que é o local do cérebro onde ocorre o processamento neuronal mais sofisticado. Tendo em vista que as doenças de ordem neurológica levam frequentemente à quadros de extrema debilidade física, tais investigações se tornam de fundamental importância, no sentido de verificar a extensão dos danos causados e na busca de estratégias interventivas que previnam a ocorrência dessas patologias (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

Já o teste de memória de reconhecimento de objetos investiga a memória declarativa dos animais, ou seja, aquela de curto prazo, que se fundamenta na tendência inata do roedor em explorar mais o objeto novo à um objeto familiar e esse teste envolve mais o hipocampo dos roedores. Desse modo, se torna fundamental a utilização desse teste em modelos animais de

neuroinflamação em virtude das perdas significativas de memória e raciocínio causadas pelas desordens neurodegenerativas (ANTUNES & BIALA, 2012).

Outro aspecto importante a ser avaliado em trabalhos com animais submetidos a protocolos de exercício físico com indução do LPS é a temperatura corporal interna dos mesmos, visto que esse é um dos parâmetros mais importantes no que se refere à inflamação, já que a resposta inicial do organismo dos roedores à inflamação pode se dar através de febre ou hipotermia, aumentos na frequência respiratória e cardíaca e diminuição do número de leucócitos, indicando com isso, o grau de inflamação e debilidade dos animais (BONE, 1991; BONE et al., 1992).

Adicionalmente, as avaliações de parâmetros do sistema colinérgico se fazem necessários nos estudos que investigam a neuroinflamação induzida por LPS e sua relação com o exercício físico, pela estreita relação existente entre as sinapses nervosas e a atuação do neurotransmissor acetilcolina e sua enzima acetilcolinesterase, que atuam fundamentalmente sobre a função cognitiva (EVERITT & ROBBINS, 1997). Estudos tem mostrado que animais submetidos à protocolos de exercício, apresentaram um papel anti-inflamatório e evitaram que níveis elevados de enzimas do sistema colinérgico como a acetilcolinesterase se depositassem no organismo desses animais (BEN et al., 2010; CUNHA et al., 2009). Esse dado é de extrema relevância visto que a acetilcolinesterase apresenta-se alterada no cérebro de sujeitos com doenças neurodegenerativas como MA e a diminuição da neurotransmissão colinérgica atenua o déficit cognitivo e altera o comportamento de pacientes com essa doença (BALLARD et al., 2005).

Apesar das variadas técnicas e metodologias utilizadas nos estudos com neuroinflamação induzida por LPS, existem lacunas na literatura, especialmente quando da associação com o exercício físico, visto que o tipo de exercício mais adequado para prevenir neuroinflamação em animais ainda é incerto, de modo que a maioria dos estudos utiliza roda de corrida voluntária ou exercício contínuo de intensidade leve ou moderada, não havendo na literatura publicações que tenham utilizado o exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) como terapia para neuroinflamação.

1.2. Objetivo geral

Dessa forma, o presente estudo objetivará comparar os efeitos de seis semanas de treinamento intermitente de alta intensidade e treinamento contínuo de intensidade moderada sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos de camundongos da espécie C57BL/6 com neuroinflamação induzida por LPS.

1.3. Objetivos específicos

Comparar os efeitos do treinamento intermitente de alta intensidade e treinamento contínuo de intensidade moderada, iniciados seis semanas antes da indução do LPS sobre:

1. Teste comportamental de campo aberto;
2. Memória de reconhecimento de objetos;
3. Temperatura corporal;
4. Atividade das enzimas acetilcolinesterase e sódio e potássio ATPase;

1.4. Justificativa

O LPS é uma endotoxina produzida por bactérias gram-negativas e está envolvido na ocorrência de diversas doenças como o MP, MA, depressão, ansiedade, EM, ELA e outras (WANG & QUINN, 2010). Sujeitos acometidos por essas doenças apresentam uma série de incapacidades de ordem física como fraqueza, problemas no trato urinário, dificuldade de locomoção e outros, além de alterações cognitivas graves, como perda da memória e atenção (LIN & BEAL, 2006; CHAUDHURI et al., 2006; LEVENSON et al., 2014).

O tratamento para essas enfermidades se baseia fundamentalmente em terapias tradicionais com uso de medicamentos para atenuar os efeitos das mesmas, porém, em diversos casos, os tratamentos medicamentosos apresentam uma série de efeitos colaterais negativos, atuando por vezes, de forma paliativa no tratamento das doenças (VAN DER SCHYF, 2011).

Nesse sentido, novas terapias vêm sendo utilizadas, de forma conjunta ao tratamento medicamentoso ou como única forma de tratamento, que incluem a realização de exercício físico, no sentido de fornecer alternativas menos invasivas e com menor custo para os pacientes (RIAN & KELLY, 2016; STRANAHAN et al., 2012). No entanto, estudos em que há a utilização de

protocolos de exercício físico, focam suas intervenções em atividades de baixa e moderada intensidade, especialmente através de exercício contínuo (como caminhada, corrida e natação) e em virtude disso, justifica-se a realização do exercício intermitente de alta intensidade, de modo a compreender os efeitos crônicos do mesmo no tratamento de doenças neurodegenerativas (GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2009; LITTLEFIELD et al., 2015).

Além disso, a maioria dos estudos busca identificar alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais nos sujeitos investigados, de modo que análises em estruturas mais complexas como o cérebro, são necessárias para verificar os avanços da doença. Dessa forma, justifica-se o uso de modelos animais em doenças neurodegenerativas, em razão da complexidade das doenças e pela maior facilidade de coleta e análise de dados em órgãos de difícil acesso; adicionalmente, a injeção de uma endotoxina, como é o caso do LPS, é capaz de mimetizar um ataque inflamatório de bactérias gram-negativas e “simular” de forma efetiva uma doença acometida por neuroinflamação em humanos (MARTIN et al., 2013; RAMOS et al., 2010; CHEN; CHEN; JEN, 2010).

Ademais, o exercício físico tem atuado de forma efetiva sobre a memória, visto que pode melhorar a integridade estrutural e função do sistema nervoso central, além de prevenir e melhorar desequilíbrios cognitivos pela indução da plasticidade neuronal e de outros aspectos neuroquímicos (HILMANN et al., 2008; COTMAN et al., 2007; LIN et al., 2015). Em razão disso, justifica-se a investigação de parâmetros comportamentais que avaliem memória e locomoção de roedores e suas relações com o exercício físico. Por essa razão, justifica-se a realização deste estudo, que realizará injeções de LPS em camundongos da linhagem C57BL/6 para verificar os efeitos crônicos de diferentes modos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos.

1.5. Hipótese

Espera-se que os animais exercitados apresentem redução da temperatura corporal menos acentuada que seus controles sedentários, em razão do efeito anti-inflamatório do exercício (PETERSEN & PEDERSEN, 2005).

Espera-se que a concentração da enzima acetilcolinesterase diminua e que da sódio potássio ATPase aumente nos grupos exercitados (BEN et al., 2009).

Espera-se que animais exercitados apresentem maior exploração dos objetos em comparação aos seus controles sedentários, em razão do exercício atenuar a neuroinflamação e conseqüentemente auxiliar na melhor locomoção e comportamento dos animais (SVENSSON et al., 2014).

Espera-se que os grupos exercitados apresentem maior exploração do espaço (quadrantes geral e periféricos) de campo aberto que seus controles sedentários, especialmente animais do grupo de exercício intermitente de alta intensidade (SVENSSON et al., 2014).

2. Revisão de Literatura

2.1. Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina da classe das bactérias gram-negativas e foi descoberto no final do século XIX por Richard Pfeiffer (1858–1910). Esse pesquisador ao estudar sobre as bactérias da cólera mortas pelo calor verificou que elas próprias eram tóxicas em vez de causarem toxicidade pela secreção de um produto. A partir desse achado é que as toxinas das bactérias passaram a ser classificadas como: 1) exotoxinas, quando a toxina é secretada pela bactéria; e 2) endotoxinas, quando o material tóxico é encontrado dentro das bactérias sendo liberada após a destruição da sua membrana externa (BEUTLER & RIETSCHER, 2003). O LPS possui elevado grau de toxicidade o qual está relacionado com a membrana externa de bactérias da classe gram-negativa e essa endotoxina é liberada quando há a multiplicação das bactérias ou quando é destruída pelas células de defesa (TUIN et al., 2006). As bactérias gram-negativas possuem essa nomenclatura em razão de não reterem o corante cristal violeta da técnica de Gram, a qual é uma técnica que permite a diferenciação entre bactérias com diferentes estruturas de parede celular, a partir das colorações que estas adquirem no tratamento com agentes químicos específicos.

As bactérias gram-negativas são células bacterianas que apresentam em sua estrutura pequenas porções de peptidoglicanos, e uma membrana externa contendo LPS, lipoproteínas e demais macromoléculas complexas. No

sentido oposto, as bactérias gram-positivas, respondem à técnica de Gram colorindo-se de violeta e são células bacterianas que apresentam uma parede celular consistente e com grandes quantidades de peptidoglicanos em sua estrutura, além de não possuírem uma membrana externa como as bactérias gram-negativas (MADIGAN et al., 2016). Dentre as bactérias gram-negativas, o LPS está claramente caracterizado na *Escherichia Coli*, devido a via biosintética e o mecanismo de exportação (WANG & QUINN, 2010).

O LPS apresenta uma estrutura com uma bicamada de açúcar (hidrofílica) e outra de lipídeos (hidrofóbica), sendo que esta última é a responsável pela ação antigênica do mesmo (RAETZ E WHITFIELD, 2002). Ele está dividido em três partes: lipídio A, núcleo e antígeno O, como está apresentado na Figura 1.

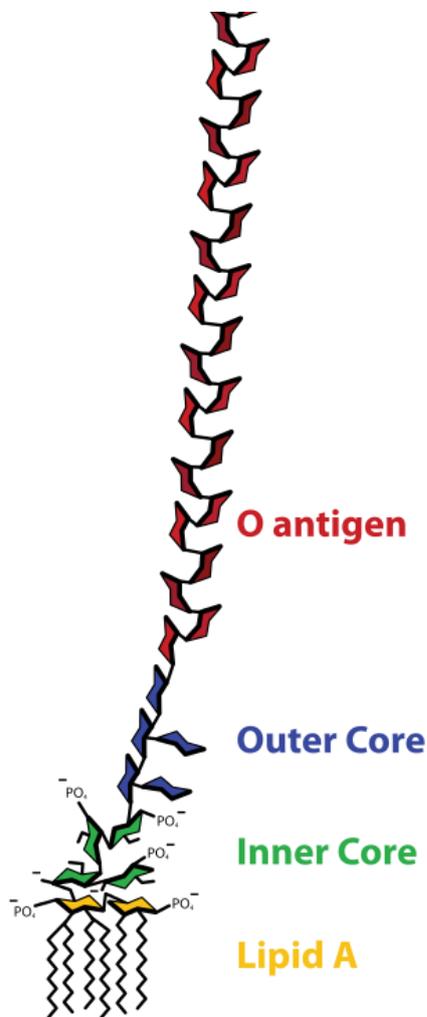


Figura 1. Estrutura de um lipopolissacarídeo (domínio público). Amarelo (lipídio A); Verde (núcleo interno); Azul (núcleo externo); Vermelho (antígeno O).

O lipídeo A é componente hidrofóbico do LPS, responsável pelos efeitos tóxicos das infecções com bactérias gram-negativas (GALANOS et al., 1985) e tem um importante papel na ativação de um dos receptores mais importantes de LPS que é o Toll Like 4 (TLR4) (PERSING et al., 2002; RIETSCHHEL et al., 1994). O núcleo central dessa endotoxina, está subdividido em núcleo interno e externo, os quais são uma cadeia curta de resíduos de açúcar localizadas no seu interior, onde o núcleo externo é a parte terminal da molécula de LPS, também conhecido como LPS rugoso (R-LPS) e o núcleo interno desempenha um papel crucial no estabelecimento da função de barreira da membrana externa, o que pode explicar o alto grau de conservação estrutural em *Escherichia coli* (*E. coli*) (HEINRICHS; YETHON; WHITFIELD, 1998).

O núcleo externo é feito de resíduos de hexose que estão ligados ao último resíduo de heptose no núcleo interno. As hexoses frequentemente encontradas no núcleo externo incluem: D-glicose, D-manose, D-galactose, etc. Geralmente há pelo menos três hexoses ligadas a $\beta 1 \rightarrow 3$, com o antígeno O sendo ligado à terceira hexose. Outras hexoses são frequentemente encontradas ligadas ao núcleo externo, ramificando-se a partir do oligômero principal. O antígeno "O" está ligado ao oligossacarídeo do núcleo e compreende o domínio mais externo da molécula de LPS, onde a presença ou ausência desse antígeno determina se o LPS será liso ou rugoso e em razão de sua localização, o antígeno "O" é um alvo para reconhecimento pelos anticorpos hospedeiros.

Na parede celular do LPS encontram-se os lipoglicanos, fosfolipídios, peptidoglicanos e as lipoproteínas, os quais estão apresentados na figura 2. As lipoproteínas são responsáveis por estabilizar a membrana externa e fixá-la à camada de peptidoglicano; os peptidoglicanos, por sua vez, são responsáveis por conceder a forma mais rígida às células e por fornecerem proteção ao citoplasma contra às diferenças na pressão osmótica; os lipoglicanos são heteropolissacarídeos longos ligados covalentemente a um lipídeo, dentre suas funções, destacam-se a estimulação na produção de anticorpos IgM in vivo e in vitro, a modulação da resposta imune a antígenos dependentes de células T e as atividades imunossupressoras e imunoestimuladoras que realizam (SMITH, 1984). Os fosfolipídios são essenciais à formação da membrana externa de bactérias gram-negativas,

onde em vez de possuírem uma bicamada lipídica como as células em geral, são formadas por uma dupla camada, contendo fosfolipídios e proteínas (MADIGAN, 2016).

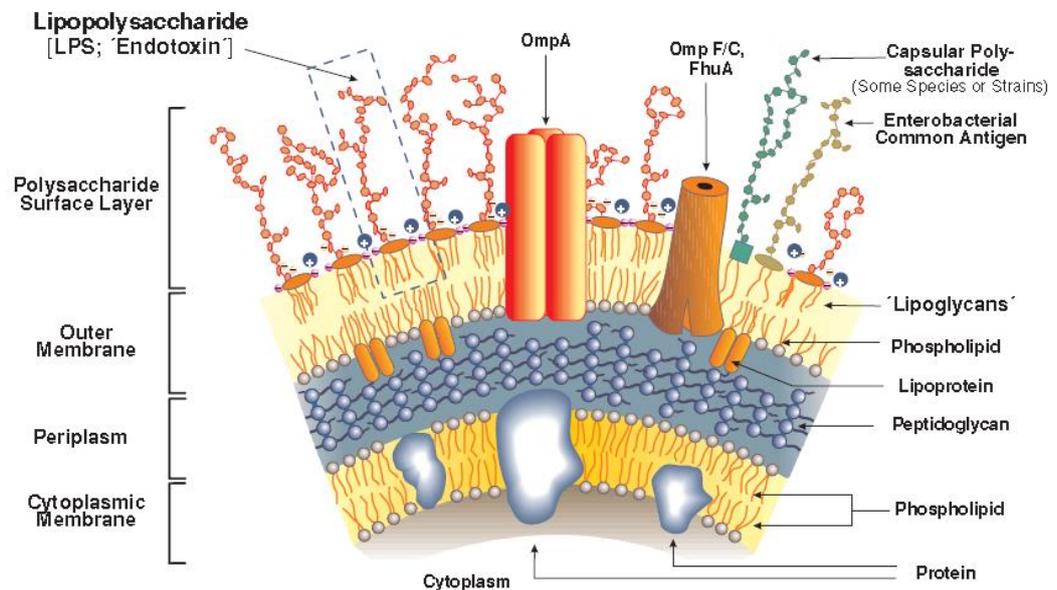


Figura 2. Arquitetura da parede celular de um lipopolissacarídeo (Fonte: ALEXANDER & RIETSCHEL, 2001).

A sinalização do LPS ocorre através de padrões moleculares associados a patógenos, os chamados PAMPs, que são padrões de moléculas reconhecidas pelo sistema imune inato como forma de detectar a invasão por patógenos. No caso das bactérias, fungos e vírus esses receptores são específicos e da classe Toll-Like, os quais são peça chave para a identificação de sensores primários de infecções microbianas e têm fornecido informações significativas na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida (POLTORAK et al., 1998). Dentre os principais, destaca-se o receptor Toll-Like 4 (TLR4), o qual é facilmente encontrado na superfície de inúmeras células imunes como os monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (AKIRA et al., 2006). Além disso, esse receptor realiza a função de dímero, onde é dependente do complexo de proteínas MD-2 para que seja reconhecido pelo LPS (Figura 3) (TRIANATAFILOU & TRIANATAFILOU, 2002).

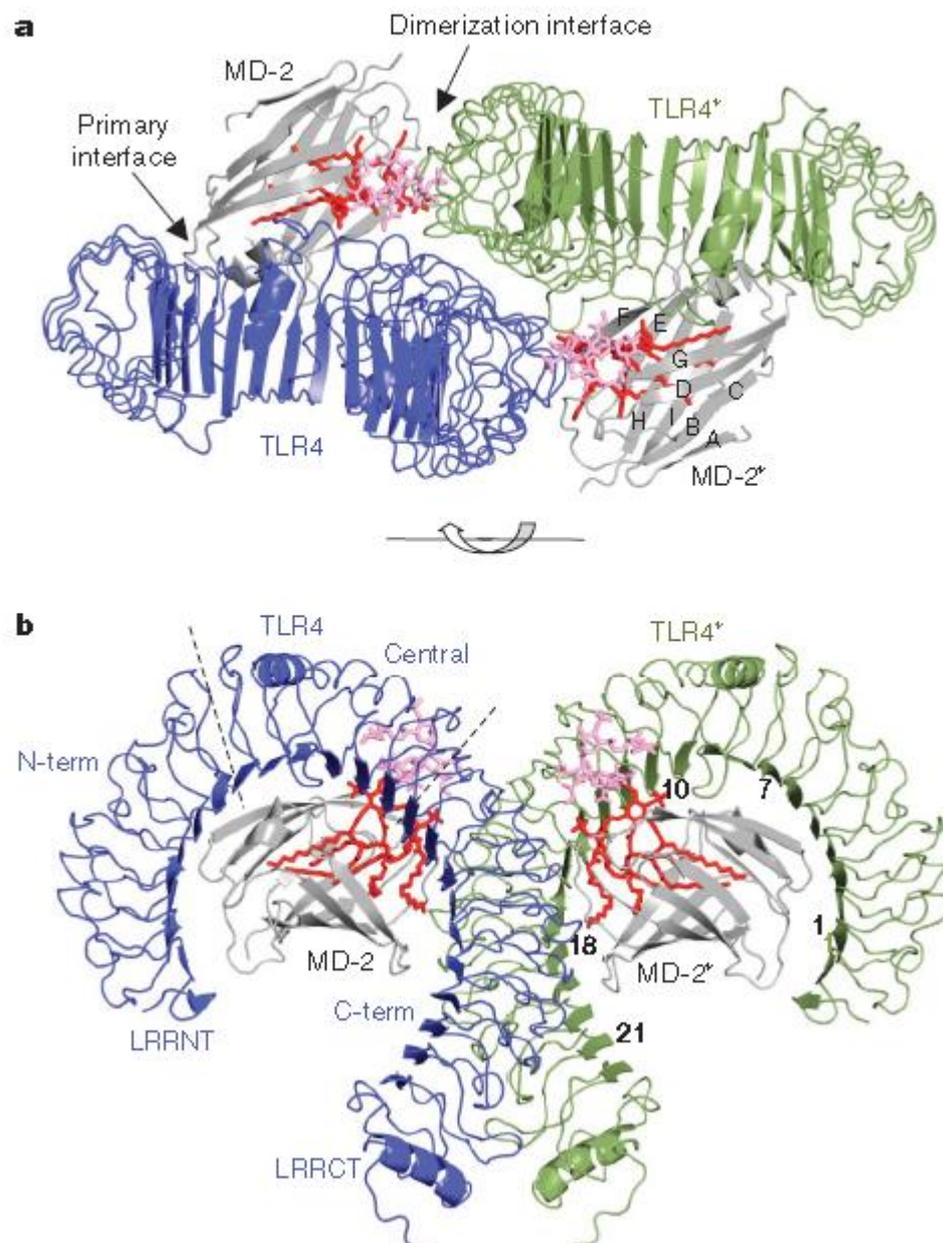


Figura 3. Estrutura geral do complexo TLR4-MD2-LPS (Fonte: PARK et al., 2009).

Juntamente com os receptores Toll-like, as moléculas de LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein, que no português significa proteína ligante de LPS), proteínas CD14 (na sua forma solúvel ou junto à membrana celular-sCD14 e mCD14, respectivamente) e mielóide diferenciadora 2 (MD-2) fazem a mediação do reconhecimento do LPS. Tais proteínas, quando em sua versão solúvel, atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por realizar a transferência de LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre

o receptor TLR4 e a proteína MD-2 (SHIMAZU et al., 1999; AKIRA & TAKEDA, 2004). Tal complexo é considerado a forma central de reconhecimento do LPS. Os receptores TLR4 quando ativados podem gerar inúmeras vias de sinalização como as proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), o ativador de proteína 1 (AP-1), o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1), o fator regulador de interferon 3 (IRF3), entre outros.

Na figura 4 está apresentada a ativação mediada por macrófagos da imunidade inata por LPS agonístico, onde a proteína LBP catalisa a reação de transferência de LPS monomerizado em estruturas intactas ligadas à membrana, como no caso de CD14, o mCD14, que se apresenta na superfície do fagócito e, por sua vez, inicia a liberação de um amplo espectro de mediadores endógenos via TLR4-MD-2.

Em imunorreações fisiológicas normais, concentrações comparativamente baixas e equilibradas desses mediadores como as citocinas inflamatórias e quimiocinas, lipídios biologicamente ativos e espécies reativas de oxigênio levam à ativação de agentes antimicrobianos, antivirais e mecanismos de defesa antitumoral, mas quando há a presença de alguma doença, os níveis desregulados e desequilibrados de mediadores também podem gerar risco de vida, como se observa em formas graves de sepse. Nos linfócitos T, células *Natural Killer* (NK) e muitos outros tipos de células, as interleucinas IL-12 ou IL-18 induzem a liberação de interferon gama (IFN- γ), levando a uma hipersensibilização de fagócitos mononucleares para o LPS endotxicamente ativo.

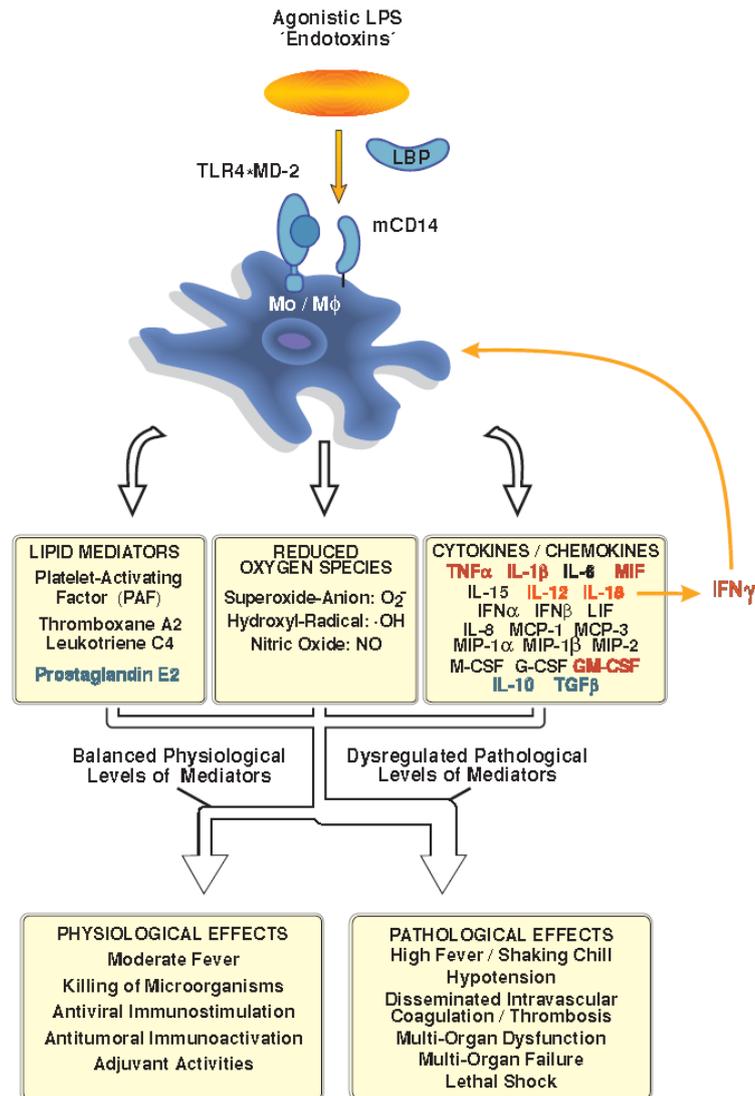


Figura 4. Ativação mediada por macrófagos da imunidade inata por LPS agonístico (Fonte: ALEXANDER & RIETSCHER, 2001).

Adicionalmente, a via do fator nuclear kappa B, mais conhecida como NF- κ B é considerada uma das principais vias de sinalização ativadas por LPS. No momento em que esse fator se desloca para o núcleo, ele promove consigo a transcrição de inúmeros genes que atuam em processos fisiopatológicos (e.g. doenças cardiovasculares, diabetes, vários tipos de câncer e doenças auto-imunes) e fisiológicos (e.g. ações sobre processos inflamatórios e imunes, apoptose, diferenciação celular e ativação da proliferação de células tumorais) (RAETZ & WHITFIELD, 2002; CRUZ-MACHADO, 2010). A sinalização desse fator por LPS gera o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, como ocorre nas vias dependente e independente da proteína de resposta primária

de diferenciação mielóide 88 (My88) (Figura 5). Essa via, quando ativada, gera uma ativação do complexo de quinases IKKs, que por sua vez ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína I κ B-alfa (conhecida ainda como NFKBIA).

A principal função exercida por essa proteína é a manutenção do NFKB no citoplasma e sua degradação permite a liberação do fator de transcrição e sua translocação ao núcleo da célula para se ligar aos elementos que respondam ao DNA (KAWAI & AKIRA, 2006; CARMODY & CHEN, 2007; LU et al., 2008). Caso não ocorra o processo de fosforilação da proteína I κ B-alfa e não haja a degradação proteossômica, o NFKB não será translocado ao núcleo (GHOSH et al., 1998).

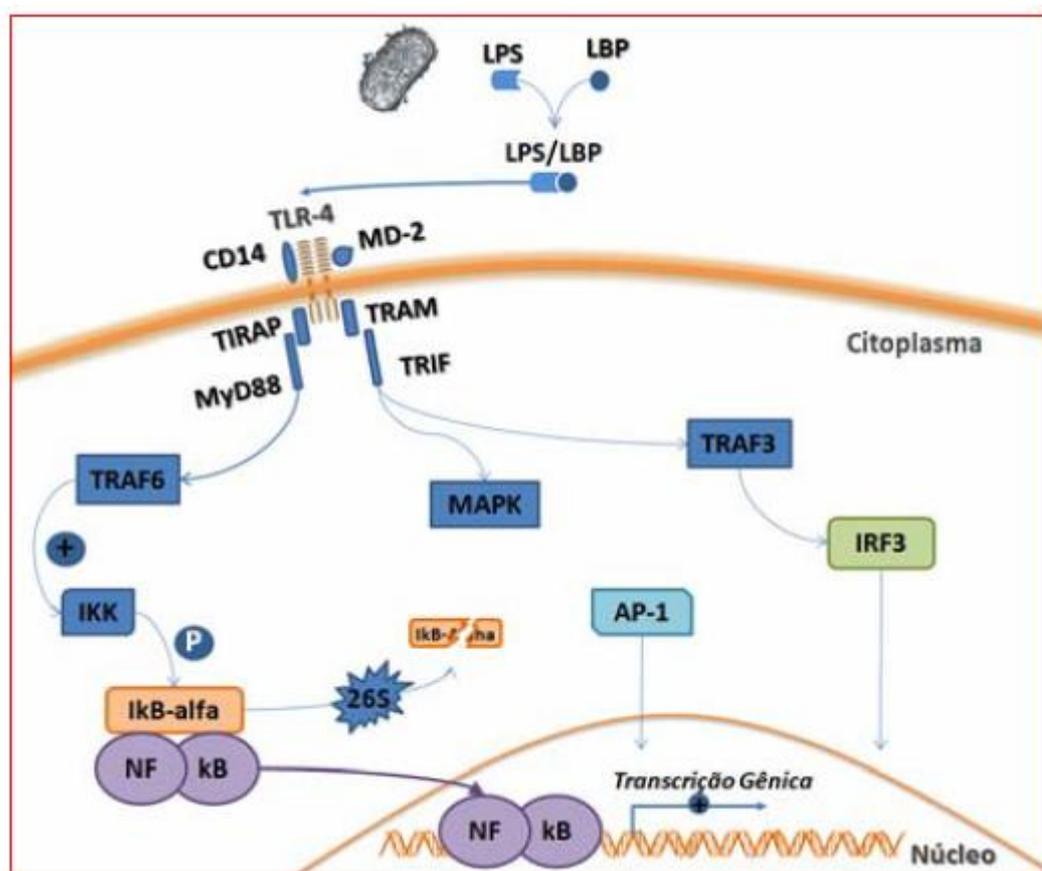


Figura 5. Via de ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFKB e de outros fatores de transcrição (Fonte: CRUZ-MACHADO, 2010).

De fato, o LPS é o principal componente da parede celular de todas as bactérias gram-negativas e desempenha um papel dominante na sepse [condição com alto risco de levar o paciente a óbito que surge quando a resposta do sistema imune a uma infecção danifica os tecidos e órgãos saudáveis (SINGER et al., 2016)], que, por sua vez, tem a liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias como característica principal a nível molecular (COHEN, 2002). A regulação espacial e temporal precisa da resposta imune inata que é essencial para que o hospedeiro se defenda contra a infecção por patógenos. No entanto, quando tais respostas se tornam super-amplificadas ou desreguladas, a ruptura resultante da homeostase pode levar ao desenvolvimento de imunopatologia. Em consonância com isso, um resultado deletério que se correlaciona com a infecção bacteriana é a sepse, que é uma síndrome clínica com alta taxa de mortalidade (ANGUS, et al., 2001).

Estudos usando agentes infecciosos ou endotoxinas como o lipopolissacarídeo, tanto em humanos com em animais, utilizam a medida da temperatura corporal como forma de avaliar a progressão da doença e definir os pontos chave da mesma (MEI et al., 2018). A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), que está caracterizada por uma resposta inflamatória que afeta todo o organismo, como é o caso do modelo de neuroinflamação por LPS, como resposta à inflamação, tende a causar febre ou hipotermia (sendo, este último, o que acomete animais da linhagem C57BL/6), aumentos na frequência respiratória e cardíaca e diminuição do número de leucócitos (BONE, 1991; BONE et al., 1992).

As formas mais comuns de mensuração da temperatura corporal em humanos são através dos termômetros de mercúrio e digital, os quais são medidas fáceis e não invasivas. Em animais, existem diversas formas de avaliar esse parâmetro, de modo que em sua maioria são processos invasivos como técnicas de avaliação direta no reto, tímpano ou esôfago dos animais, além de cateterismo na artéria pulmonar, que é um processo mais agressivo e usado somente em casos específicos (GODWIN, 1998; BRUNELL, 2012). Em razão disso, novas técnicas vem surgindo para avaliar esse parâmetro de forma menos invasiva, com menos contato dos pesquisadores com o animal e

que demande menos tempo e técnica dos pesquisadores no momento da coleta.

Dentre as novas técnicas, destacam-se o uso do termômetro infravermelho e o implante subcutâneo passivo de identificação por radiofrequência (RFID) (MEI et al., 2017). O estudo realizado por Mei e colaboradores (2017), comparou e avaliou esses dois métodos de mensuração da temperatura corporal em 435 roedores de quatro diferentes linhagens, com a utilização do LPS, o qual induz uma fase aguda de doença por um período aproximado de 36 horas acompanhadas de hipotermia. Foram realizadas análises da temperatura central e periférica dos animais de modo que o termômetro infravermelho é aceito como substituto do RFID, já que ambos medem corretamente a temperatura corporal dos animais, porém o infravermelho é mais barato e sua aplicabilidade é maior no âmbito da pesquisa.

2.2. Modelos animais de neuroinflamação

Devido aos mecanismos complexos e ainda pouco conhecidos em relação ao processo de neuroinflamação, numerosos modelos experimentais que mimetizam as condições das patologias neurodegenerativas têm sido desenvolvidos (MCGONIGLE & RUGGERI, 2014). Tais modelos vêm sendo utilizados com o objetivo de permitir o conhecimento dos eventos celulares envolvidos, bem como sugerir formas de intervenção terapêutica para restaurar a função neurofisiológica dos sujeitos. Os modelos empregados para o estudo dos eventos neurodegenerativos incluem modelos animais da doença de Alzheimer, encefalomielite alérgica experimental (modelo que simula da esclerose múltipla em animais), mal de Parkinson, demência, depressão, autismo, epilepsia e outros (RIAN & KELLY, 2016; BOBINSKI et al., 2011; LAU et al., 2011; LIU et al., 2013; SPIELMAN et al., 2016).

Neste cenário, a neuroinflamação induzida por LPS tem sido amplamente utilizada por pesquisadores, como apresentado no estudo de Hoogland et al. (2015) que sumarizou os resultados de estudos que induziram neuroinflamação através do LPS e outros patógenos vivos e mortos pelo calor. Nesse estudo, 39 utilizaram o LPS, com uma única dose em 12 estudos e 19 administrado o mesmo de forma intraperitoneal ou subcutânea. A maioria dos

estudos utilizou LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli* e a dosagem de LPS variou de 0,33 à 200 mg/kg em camundongos e 0,002 à 10mg/kg em ratos. A ampla maioria dos estudos apresentou como resultado principal a maior ativação microglial nos animais avaliados.

De fato, variações nos modelos animais de neurodegeneração e neuroinflamação podem mimetizar diferentes padrões das doenças e isso torna ideal a utilização deste método em estudos pré-clínicos que objetivem identificar os benefícios e dissecar os mecanismos de novas intervenções terapêuticas que servirão de base para a subsequente conversão para ensaios clínicos em pacientes com patologias neurodegenerativas.

2.2.1. Efeitos do exercício físico na neuroinflamação

Estudos têm mostrado que o exercício físico auxilia no tratamento de doenças neurodegenerativas como a EM, ELA, MA, MP e demais doenças degenerativas, pois além dos benefícios comuns a qualquer indivíduo, intervenções com exercício físico apresentam resultados efetivos favoráveis à redução dos sintomas da doença e diminuição das doses de medicação (GUNN et al., 2015; SANDOVAL, 2013; NAVARRO et al., 2010; SANADA et al., 2015).

Svensson et al. (2014) realizaram uma revisão de literatura que objetivou discutir os diferentes tipos de exercício sobre modelos animais de desordens neurodegenerativas, especialmente as doenças de Parkinson e Alzheimer, através dos resultados dos estudos de Nichol et al. (2008), Souza et al. (2013), Funk et al. (2011), Pang et al. (2006), Harrison et al. (2013), Van Dellen et al. (2008), Tajiri et al. (2010), Dutra et al. (2012), Landers et al. (2014), Cohen et al. (2003), Tilerson et al. (2003), Lau et al. (2011), Sung et al. (2012), Liu et al. (2013), Piao et al. (2013), Ma et al. (2013), Zwagerman et al. (2010), Ding et al. (2005), Wu C et al. (2007), Yi et al. (2012), Kawanishi et al. (2010), Itoh et al. (2004), Rosa et al. (2007), Kennard & Woodruff-Pak (2012), Wang et al. (2012) e Pervaiz & Hoffman-Goetz (2012). Os estudos incluídos nessa revisão foram realizados com ratos e camundongos das linhagens Swiss, C57BL/6, Long Evans, Sprague-Dawley, Wistar e Balb/c, submetidos aos modelos animais da doença de Huntington (HD), MA, MP, depressão, traumatismo craniano (TC), acidente vascular cerebral (AVC), neuroinflamação, diabetes e obesidade.

Seis estudos realizaram corrida voluntária na roda (NICHOL et al., 2008; FUNK et al., 2011; PANG et al., 2006; HARRISON et al., 2013; VAN DELLEN et al., 2008; PIAO et al., 2013), dois estudos realizaram exercício contínuo de intensidade moderada em meio aquático (SOUZA et al., 2013; LIU et al., 2013), dezessete estudos realizaram exercício contínuo de intensidade moderada em esteira para roedores (TAJIRI et al., 2010; DUTRA et al., 2012; LANDERS et al., 2014; TILERSON et al., 2003; LAU et al., 2011; SUNG et al., 2012; MA et al., 2013; ZWAGERMAN et al., 2010; DING et al., 2005; WU C et al., 2007; WU et al., 2011; Yi et al., 2012; KAWANISHI et al., 2010; ITOH et al., 2004; KENNARD & WOODRUFF-PAK, 2012; WANG et al., 2012; PERVAIZ & HOFFMAN-GOETZ, 2012), dois estudos realizaram exercício contínuo de intensidade alta em esteira para roedores (ROSA et al., 2007; WANG et al., 2012) e um estudo realizou treinamento forçado de membros superiores (COHEN et al., 2003).

As intensidades dos esforços contínuos realizados em esteira variaram de 11m/min à 26,8 m/min, com duração máxima de 60 minutos por dia, de modo que as intervenções apresentaram entre nove dias e seis meses de duração. Os estudos que realizaram exercício contínuo em meio aquático apresentaram duração de 60 minutos por dia, foram realizados durante cinco dias por semana e com tempo de intervenção que variaram de quatro a oito semanas. O estudo que realizou o treinamento forçado de membros superiores apresentou uma semana de duração e nesse período os membros superiores dos animais foram imobilizados com gesso. Os estudos que realizaram corrida voluntária na roda apresentaram entre duas semanas e seis meses de duração, onde os animais tinham acesso livre a roda de 14 horas/dia até 24 horas/dia.

Como resultados principais, os estudos que utilizaram a corrida voluntária na roda como protocolo de treinamento verificaram uma diminuição nas concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), atenuação na morte neuronal, redução na perda neuronal estriada, diminuição no volume da lesão e elevação nos níveis de TNF- α . O exercício contínuo de intensidade moderada em meio aquático foi capaz de restaurar os níveis de TNF- α , IL-1 β e interleucina 10 (IL-10), além de provocar reduções nos níveis de INF- γ e TNF- α . O exercício contínuo de intensidade

moderada em esteira aumentou os níveis de BDNF, a migração neuronal para o estriado lesionado, recuperou astrócitos e a função da tirosina hidroxilase e dopamina, além de ter gerado aumentos no GDNF, CD200, expressão de TrkB, nos níveis de IL-6 no hipocampo, IL-1 β , TNF- α e o número de linfócitos intestinais, gerou melhoras na neurogênese no hipocampo.

Em contrapartida, o exercício contínuo de intensidade moderada em meio aquático causou diminuição dos níveis de óxido nítrico (ON) e CD11b, supressão da via de sinalização p-MAPK, diminuição da expressão de TLR2, TLR4, MyD88, NF κ B p65, TLR4 mRNA, do volume e tamanho do infarto, da infiltração de leucócitos, da inflamação hipotalâmica e ativação microglial, dos níveis de TNF- α geral e no hipocampo, da expressão do receptor β ₂-adrenérgico, preveniu a perda celular dopaminérgica e alternou o fenótipo de macrófagos M1 para M2. O exercício contínuo de alta intensidade em esteira aumentou o estresse oxidativo no cérebro, os níveis de citocinas inflamatórias e diminuiu os níveis de INF- γ .

Outra revisão de literatura de Ryan & Kelly (2016) resumizou os estudos que examinaram os efeitos da mediação do exercício sobre o MA, função cognitiva, neurogênese hipocampal e neuroinflamação em modelos animais transgênicos do MA. Foram incluídos os estudos de Zhao et al. (2015), Lin et al. (2015), Bo et al. (2014), Liu et al. (2013), Liu et al. (2011), Ke et al. (2011), Moore et al. (2015), Yuede et al. (2009), Koo et al. (2013), Um et al. (2011), Cho et al. (2003), Cho et al. (2015), os quais realizaram exercício em esteira para roedores e os estudos de Tapia-Rojas et al. (2015), Xu et al. (2013) Yuede et al. (2009), Parachikova et al. (2008), Nichol et al. (2007), Revilla et al. (2014), Marlatt et al. (2013), Garcia-Mesa et al. (2012), Rodriguez et al. (2011), Walker et al. (2015), Adlard et al. (2005), Belarbi et al. (2011), Mirochnic et al. (2009), que realizaram corrida voluntária na roda. As intervenções variaram entre 10 dias e nove meses de duração, com animais com idades variando entre seis semanas até 24 meses. As intensidades dos esforços nos estudos em que os animais realizaram exercício contínuo na esteira variaram de 5m/min à 32 m/min, com duração máxima de 60 minutos por sessão de exercício. Nos estudos que utilizaram a roda de corrida, os animais tinham livre acesso à roda por períodos que variaram de duas horas à 24 horas.

Como resultados principais, os estudos que realizaram exercício contínuo na esteira verificaram aumento da performance dos animais jovens e idosos no teste de *Morris Water Maze* (MWM) e plasticidade sináptica em animais idosos, melhora na memória de curto e longo prazo, aumento da arborização dendrítica nas anidrases carbônicas 1 (CA1) e 3 (CA3), na alternância espontânea e esquiva passiva e diminuição no número de plaquetas A β em animais jovens, da solução hipocampal das proteínas A β 40 e A β 42 em animais jovens e idosos, da ativação microglial em animais jovens e idosos, da proteína ciclooxygenase (COX) e da caspase-3, da fosforilação de taurina (Tau), da expressão da proteína A β 42 em animais adultos, da solução cortical da solução das proteínas A β 40 e A β 42 e da expressão da p-Tau205 no córtex e hipocampo dos animais.

Os estudos que realizaram corrida voluntária na roda encontraram aumento da performance no teste de MWM, no número de neurônios CA3 no giro dentado (DG), na proliferação celular de bromodeoxiuridina (BrdU⁺) e na razão DCX⁺/BrdU⁺, da memória de reconhecimento, do volume hipocampal, das citocinas IL-11, CXCL-1 e CXCL-2 mRNA, da sobrevivência celular, da proliferação celular em HH3⁺, na alternância espontânea e nas razão BrdU⁺/NeuN⁺ e diminuição na proteína ácida fibrilar glial (GFAP⁺), nos depósitos de plaquetas e nos oligômeros A β , nas células p-Tau⁺, das plaquetas A β , da expressão de Tau e do mRNA hipocampal a β e app hipocampal.

Outra recente revisão de literatura realizada por Spielman e colaboradores (2016) resumiu os resultados de intervenções com atividade física e exercício físico sobre as modificações de respostas neuroimunes, especialmente transtornos depressivos menores (TDM), esquizofrenia e MP realizadas com humanos e animais. Vinte e oito estudos apresentam dados da relação de respostas neuroimunes e exercício físico em animais. Nesses estudos foram utilizados animais das linhagens BALB/c, Wistar, C57BL/6, Sprague Dawley, CD-1, APP/PS1, A/J, AKR/J, C(3)H/HeJ, C57Bl/6J, C(3)Heb/FeJ, CBA/J, DBA/2J, SWR/J, C57L/J, C3Heb/FeJ, MRL/MpJ, SPRET/Ei, CAST/Ei, Tg- NSE/htau23, C57BL/6N, Ps/2, além de ratos selvagens e transgênicos.

No que se refere ao tipo de exercício realizado, doze estudos utilizaram corrida voluntária na roda (YU et al., 2014; PIAO et al., 2013; KOHMAN et al.,

2012; FUNK et al., 2012; AGUDELO et al., 2014; BELARBI et al., 2011; GIBBONS et al., 2014; MARTIN et al., 2014; NICHOL et al., 2008; PUHL et al., 2015; SUIJO et al., 2013 e TAPIA-ROJAS et al., 2016), onze estudos realizaram exercício em esteira rolante própria para roedores (UYSAL et al., 2015; PACKER & HOFFMAN-GOETZ, 2015; KANG et al., 2013; KAWANISHI et al., 2010; KAWANISHI et al., 2013; KEMI et al., 2002; KNAB et al., 2009; LAU et al., 2011; LEEM et al., 2011, RADAK et al., 2013 e ZHAO et al., 2015), três estudos utilizaram natação (GYORKOS et al., 2014; LIU et al., 2013 e PRESTES et al., 2015) e um estudo utilizou um treinamento em um instrumento reticular redondo (YU et al., 2013).

Os estudos presentes nessa revisão encontraram que, de modo geral, o exercício físico foi capaz de melhorar a neurogênese, a potencialização prolongada e a função cognitiva, especialmente conhecimento e memória, aumentar as concentrações de BDNF, VEGF e GDNF e gerar aumentos do TNF- α e de apoptose hipocampal e no sentido oposto, foram capazes de reduzir a concentração de citocinas inflamatórias como as interleucinas 1 e 10, a proliferação da micróglia e o número de migróglia M1 e astrócitos ativados, a neurotoxicidade induzida por trimetil-estanho no hipocampo, gerar menores deposições de peptídeos beta amiloides no córtex e hipocampo e reduções nas concentrações de óxido nítrico sintetase.

2.2.2. Efeito do exercício físico sobre o LPS

Devido ao fato que o LPS está presente em bactérias gram-negativas (WANG & QUINN, 2010) e é fator determinante para o desenvolvimento de várias condições patológicas, como a sepse (ANGUS et al., 2001), lesão pulmonar aguda (GONÇALVES et al., 2012), inflamação no fígado (PEPPLER et al., 2016), neuroinflamação e neurodegeneração (LITTLEFIELD et al., 2015), entre outras, ele tem sido estudado para testar diversas terapias contra essas disfunções, principalmente em modelos animais. Seus efeitos deletérios ao organismo se dão, em grande parte, devido a uma resposta pró-inflamatória exacerbada e generalizada (RIETSCHEL & BRADE, 1992; BONE, 1993; RIETSCHEL et al., 1994), advinda de uma cascata inflamatória ativada pela administração de LPS, tanto a nível sistêmico, quanto a nível tecidual específico (ANGUS & VAN DER POLL, 2013).

Da mesma forma, o movimento físico tem se mostrado como um fator muito relevante para a prevenção e tratamento de várias doenças, principalmente crônicas degenerativas, como doença arterial coronariana, doença cardiovascular, acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes, obesidade, osteoporose, câncer de mama e cólon e depressão (WHO, 2010). Muitos dos fatores de risco para essas doenças, e a grande maioria delas, estão associados à inflamação sistêmica de baixo grau, como é o caso aterosclerose (LIBBY, 2002; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002), resistência à insulina (DANDONA; ALJADA; BANDYOPADHYAY, 2004), síndrome metabólica (HAN et al., 2002) e diabetes tipo 2 (BARZILAY et al., 2001; DUNCAN et al., 2003; FESTA et al., 2002) o que pode explicar em parte o efeito do movimento sobre essas disfunções, pois sabe-se que a atividade física, principalmente o exercício físico tem um efeito agudo e crônico anti-inflamatório (PETERSEN & PEDERSEN, 2005). Com isso em mente, é razoável hipotetizarmos que efeitos crônicos da atividade/exercício físico têm grande chance de influenciar a imunomodulação do organismo, de modo a protegê-lo contra os efeitos deletérios do LPS.

Devido a esse fato, alguns estudos estão utilizando a atividade física/exercício físico na prevenção ou tratamento de diversas disfunções associadas à inoculação de LPS em modelos animais. Realizou-se uma revisão sistemática nas principais bases de dados da saúde utilizando as palavras-chave “LPS”, “Lipopolysaccharide”, “Exercise”, “Physical Activity”, “Mice” e “Rat” estando presentes no título ou resumo dos manuscritos, na tentativa de encontrar estudos que relacionassem o efeito da atividade física/exercício físico em organismos submetidos ao LPS *in vivo*. Foram localizados apenas 13 estudos, onde 12 administraram o LPS após o treinamento físico e um deles administrou o LPS antes do treinamento.

No que se refere ao estudo que administrou o LPS antes do treinamento físico, Irahara et al. (2016) objetivaram verificar se o exercício aeróbico contínuo de baixa intensidade realizado durante um modelo de sepse aguda (induzido por LPS da bactéria *Escherichia coli*) poderia alterar o substrato utilizado no metabolismo energético e influenciar na sobrevivência de camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 11 semanas de vida. Para isso, os animais foram divididos em grupo controle (injeção de solução salina, 10 mL/kg de peso

corporal), grupo de menor dose de LPS (1 mg de LPS/kg de peso corporal), dose mediana de LPS (5 mg de LPS/kg de peso corporal) e grupo de maior dose de LPS (10 mg de LPS/kg de peso corporal), onde cada grupo continha 15-16 animais.

Em seguida, administrou-se solução salina ou LPS nos grupos e os mesmos foram divididos em grupo exercício e grupo sedentário (7-8 animais por grupo), totalizando oito grupos. Os grupos exercícios eram exercitados em esteira própria para roedores a uma velocidade de 12 m/min, sendo que foram realizadas 3 sessões de 30 minutos durante o primeiro dia e duas sessões de 30 minutos no segundo e terceiro dia após injeção do LPS.

Como resultado principal, os cálculos das proporções de sobrevivência revelaram que 12,5% e 50% dos animais sedentários nos grupos da dose mediana de LPS e da alta dose de LPS haviam morrido 72 horas após a administração do LPS, respectivamente. Em contrapartida, 100% dos camundongos dos outros grupos (controle sedentário e exercitado, baixa dose de LPS exercitado e sedentário, dose mediana de LPS exercitado e alta dose de LPS exercitado) sobreviveram. Como o exercício era de baixa intensidade, e, mesmo assim, os animais do grupo de alta dose precisaram de inúmeros estímulos para permanecerem ativos, os autores especularam que sair de um estado sedentário seja mais crítico do que o exercício ativo durante a sepse severa.

Outro achado importante deste estudo foi que, depois de 16 horas da indução do LPS, a oxidação de gordura aumentou em todos os grupos de exercício físico e nos sobreviventes do grupo de alta dose de LPS sedentário, além disso, o peso e a gordura epididimária foi menor nos grupos exercitados, enquanto que os níveis plasmáticos de lipídios hepáticos estavam elevados nestes mesmos grupos, sugerindo que o exercício físico (EF) induz o transporte de lipídios da gordura endógena para o sangue e fígado, de modo a utilizá-la como fonte de energia. Por fim, mRNA da PGC-1 α (uma enzima chave no metabolismo de gordura) e seus níveis proteicos estavam menores em todos os grupos de LPS sedentários em comparação ao grupo controle sedentário. Em contrapartida, todos os grupos exercitados estavam com valores mais elevados. Os autores concluíram que o exercício de baixa intensidade durante a fase aguda da sepse melhorou o metabolismo lipídico e

a sobrevivência de camundongos com sepse induzida por LPS, estimulando a expressão de PGC-1 α . Ainda, os autores salientaram o ineditismo do estudo, pois foi o primeiro a demonstrar que o exercício na fase aguda após o início da sepse pode exercer efeitos terapêuticos sobre sua fisiopatologia. A figura 6 foi retirada do estudo citado acima (IRAHARA et al., 2016) e exemplifica o percentual de sobreviventes até 72 horas após indução do LPS, em comparação aos diferentes grupos experimentais.

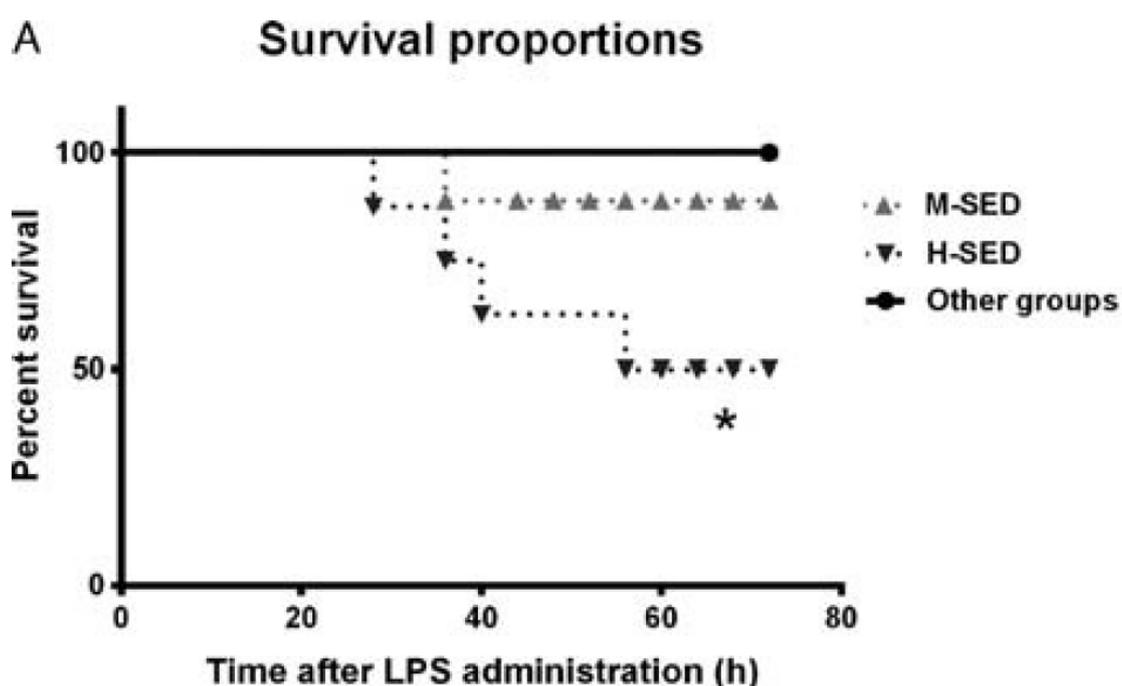


Figura 6. Relação entre o percentual de sobreviventes (eixo “y”) e o tempo em horas após a indução de LPS (eixo “x”) nos diferentes grupos experimentais (Fonte: IRAHARA et al., 2016). M-SED (grupo sedentário com dose mediana de LPS); H-SED (grupo sedentário com maior dose de LPS); Other groups (outros grupos, à saber: controle sedentário e exercitado, baixa dose de LPS exercitado e sedentário, dose mediana de LPS exercitado e alta dose de LPS exercitado); * $p < 0,05$ versus other groups.

No entanto, como o estudo de Irahara et al., (2016) foi o precursor em estudar os efeitos do exercício físico pós administração de LPS e até a presente data não foi encontrado outro estudo, esse se torna um campo muito fértil de pesquisa, visto que, sabe-se muito pouco a respeito das influências do exercício no tratamento de disfunções inflamatórias desencadeadas por LPS.

Referindo-se aos estudos sobre a influência do treinamento físico prévio à administração do LPS, verificou-se que são de difícil comparação, pois, dos 12 existentes (CHEN; CHEN; JEN, 2010; GONÇALVES et al., 2012; HUEY & MEADOR, 2008; ISHIZASHI et al., 1995; KATO et al., 2006; LITTLEFIELD et al., 2015; MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017; RAMOS et al., 2010; ROWSEY et al., 2006), 10 objetivaram verificar o efeito crônico do exercício físico/atividade física na prevenção de disfunções associadas ao LPS (CHEN; CHEN; JEN, 2010; GONÇALVES et al., 2012; HUEY & MEADOR, 2008; LITTLEFIELD et al., 2015; MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017; RAMOS et al., 2010; ROWSEY et al., 2006) e dois focaram no efeito agudo de uma sessão de exercício físico/atividade física sobre o LPS (ISHIZASHI et al., 1995; KATO et al., 2006).

Dos 10 que consideraram o efeito crônico, sete interviam com atividade física (caminhada na roda livre para roedores) (HUEY & MEADOR, 2008; LITTLEFIELD et al., 2015; MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017; ROWSEY et al., 2006) e os outros três, utilizaram diferentes protocolos de exercício físico, onde dois utilizaram exercício contínuo de baixa intensidade (GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2010) e o outro utilizou exercício contínuo de intensidade moderada (CHEN; CHEN; JEN, 2010). Do mesmo modo, aqueles que trabalharam com o efeito agudo, um deles utilizou 120 minutos de atividade física na roda voluntária (ISHIZASHI et al., 1995) e o outro uma hora exercício contínuo de intensidade leve em esteira motorizada para roedores (KATO et al., 2006).

Além disso, houve grande variação na dosagem do LPS e nos animais utilizados em cada estudo, pois, daqueles que pesquisaram sobre o efeito crônico, a dosagem do LPS variou entre 0,02 mg/kg de peso corporal administrado via intraperitoneal (MARTIN et al., 2013), 5 mg/kg de peso corporal também por via intraperitoneal (CHEN; CHEN; JEN, 2010), e até 10 mg/kg de peso administrado através de instilação intratraqueal (este último levando em conta que os autores injetaram 0,2 mg de LPS nos animais, independentemente do peso, e os animais pesavam 20 e 25 gramas) (GONÇALVES et al., 2012). Já no que se refere aos animais, a maioria utilizou

camundongos machos da linhagem C57BL/6 (CHEN; CHEN; JEN, 2010; HUEY & MEADOR, 2008; LITTLEFIELD et al., 2015; MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017), com idades variando de sete semanas (CHEN; CHEN; JEN, 2010) a 22 meses (LITTLEFIELD et al., 2015). No entanto, ainda tiveram estudos utilizando camundongos BALB/c (RAMOS et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012) e ratos *Sprague Dawley* fêmeas (ROWSEY et al., 2006).

Já no caso dos estudos sobre o efeito agudo, Ishizashi et al. (1995) administraram 0,2 mg de LPS por animal, utilizando camundongos ICR fêmeas com cinco semanas de idade, e Kato et al. (2006) utilizaram 0,02 mg de LPS por camundongo, sendo estas fêmeas da linhagem BALB/c e C57BL/6.

Porém, em referência à origem do LPS, a maioria dos estudos, tanto referentes ao efeito agudo, quanto ao efeito crônico, utilizou o LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli* (CHEN; CHEN; JEN, 2010; GONÇALVES et al., 2012; HUEY & MEADOR, 2008; ISHIZASHI et al., 1995; MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017; RAMOS et al., 2010; ROWSEY et al., 2006), porém, Kato et al. (2006) utilizou LPS da bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 e da bactéria *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, e Littlefield et al. (2015) não especificaram a origem do LPS.

No que se refere aos principais achados desses estudos, aqueles que pesquisaram sobre exercício físico previamente a administração do LPS, todos os quatro tiveram resultados positivos em favor do exercício (CHEN; CHEN; JEN, 2010; GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2010; KATO et al., 2006), sendo que Gonçalves et al. (2012) e Ramos et al. (2010) utilizaram como protocolo o exercício contínuo de intensidade moderada realizado pelo período de 60 minutos por dia, três dias na semana por cinco semanas (GONÇALVES et al., 2012) ou cinco dias na semana por seis semanas (RAMOS et al., 2010) e chegaram à conclusão que o exercício contínuo de baixa intensidade é suficiente para diminuir a inflamação pulmonar durante a lesão pulmonar aguda. No mesmo sentido, Chen, Chen e Jen (2010) foram os únicos a realizar estudo com exercício contínuo de intensidade moderada. Foi verificado que 60 minutos de corrida em esteira a 60% do VO_{2max} realizado em cinco dias da

semana, por oito semanas melhorou o perfil inflamatório e as respostas imunes induzidas pelo LPS.

O estudo de Kato et al. (2006) foi o único a verificar o efeito agudo de uma sessão de exercício físico sobre citocinas pró-inflamatórias após a administração de LPS. Os autores concluíram que uma hora de exercício de baixa intensidade realizado em esteira inibiu a produção do TNF- α induzido por lipopolissacarídeo administrado imediatamente após a sessão, mas não influenciou nos níveis de IL-6.

Em relação aos estudos sobre atividade física, todos foram feitos com atividade voluntário com rodinha livre, sendo que cinco deles reportaram efeito positivo da atividade física sobre o LPS (HUEY & MEADOR, 2008; ISHIZASHI et al., 1995; LITTLEFIELD et al., 2015; PEPPLER et al., 2016; PEPPLER et al., 2017), dois deles não encontraram associação (MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014) e um encontrou um efeito negativo (ROWSEY et al., 2006).

Daqueles que estudaram desfechos cerebrais, Littlefield et al. (2015) realizaram um treinamento nos animais que durou nove semanas e injetaram 250 μ g de LPS por quilo de peso 37 dias após o início da intervenção. Chegaram ao resultado que o LPS reduziu o número de novos neurônios em animais velhos e sedentários, porém a atividade física preveniu esse decréscimo. Além disso, os camundongos velhos exercitados aumentaram a proporção de micróglia co-rotulada com BDNF, indicando a promoção de um fenótipo neuroprotetivo na micróglia. Por fim, concluíram que a atividade física pode proteger contra reduções na neurogênese hipocampal induzidas por inflamação no cérebro envelhecido.

Em contrapartida, os outros dois estudos que investigaram algum desfecho cerebral (MARTIN et al., 2013; MARTIN et al., 2014) não encontraram associação com a prática de atividade física. Os autores concluíram que 24 horas após a administração de LPS houve aumento cerebral de TNF- α , IL-1 β e mRNA da IL-10, IL-6 e da indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), os quais não foram influenciados pela atividade física. Uma possível explicação para essa diferença entre os estudos é que a atividade física possa ter pouca influência sobre um cérebro mais saudável, com mais massa encefálica (cérebro jovem), porém como o estudo de Littlefield et al. (2015) pesquisou com animais velhos, conseguiu encontrar resultados positivos para essas variáveis, enquanto que

Martin et al. (2014) teve um grupo de camundongos jovens e não encontrou os mesmos resultados. Ademais, nos grupos de animais velhos dos trabalhos de Martin et al. (2013) e Martin et al. (2014), os desfechos cerebrais pesquisados foram citocinas inflamatórias, já no trabalho de Littlefield et al. (2015) foram o número de células neuronais e não-neuronais (micróglia), indicando que talvez a atividade física não influencie na atividade inflamatória cerebral mediada por citocinas, mas beneficie a arquitetura cerebral através de prevenções da neurodegeneração.

Outro órgão-alvo pesquisado foi o fígado, onde o estudo de Martin et al. (2014) não encontrou associação entre o exercício físico e níveis mais baixos de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-6) no fígado. Em contrapartida, Peppler et al. (2016) encontraram que a atividade física diminuiu a sinalização de IL-6 induzida por LPS e a expressão do mRNA de outros marcadores inflamatórios (TNF- α , quimiocina CCL2, óxido nítrico sintetase induzível, IL-10 e IL-1 β) no fígado. A explicação dessa diferença, ditada por Peppler et al. (2016), se deu no fato do estudo de Martin et al. (2014) ter utilizado uma dose pequena de LPS (i.e.: 0,33 mg/kg) e ter medido os níveis de citocinas após um período de tempo longo (i.e.: 24h), onde elas já deveriam estar naturalmente mais baixas. Para conseguir observar essa relação positiva, Peppler et al. (2016) administrou 2 mg de LPS/kg e analisou o fígado seis ou 12 horas após o LPS, indicando que para observarmos os efeitos positivos da atividade física no fígado após injeção de LPS é necessário que uma quantidade maior dessa endotoxina seja administrada e que períodos menores do que 24 horas sejam utilizados.

Houve dois estudos que ainda verificaram a influência da atividade sobre parâmetros da inflamação sistêmica de animais submetidos ao LPS. Peppler et al. (2016) conduziu um estudo que objetivou verificar o efeito crônico da atividade física e encontrou que a intervenção não influenciou parâmetros inflamatórios sistêmicos (níveis de IL-6 e a expressão do mRNA do TNF- α , quimiocina CCL2, óxido nítrico sintetase induzível, IL-10 e IL-1 β). Já Ishizashi et al. (1995) conduziu um estudo objetivando verificar o efeito agudo da prática de 120 minutos de atividade física realizada de forma voluntária na roda livre para roedores e verificou que as concentrações séricas de IL-1 e IL-6 no grupo AF estavam menores que o grupo sedentário 2h depois do LPS, indicando que

o efeito agudo sistêmico da atividade física é anti-inflamatório, mas, pela falta de intensidade e volume, esse efeitos sistêmicos não se tornem crônicos, como mostrado na falta de associação do estudo de Peppler et al. (2016).

No que se refere ao restante dos estudos, Huey & Meador (2008) concluíram que duas semanas de atividade física foram suficientes e puderam aumentar as proteínas de choque térmico no músculo esquelético, que ajudarão na proteção deste tecido, e os níveis plasmáticos e musculares de IL-6, lembrando que a IL-6 na musculatura esquelética tem caráter anti-inflamatório (BRANDT & PEDERSEN, 2010).

Peppler et al. (2017), chegaram ao resultado que 10 semanas de atividade física em roda livre pode atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS no tecido adiposo e isso ocorre em maior extensão no tecido adiposo subcutâneo inguinal comparado com o tecido adiposo epididimal.

O único estudo que teve resultados negativos foi Rowsey et al. (2006), o qual verificou a influência de 8 semanas e três dias de atividade física voluntária na temperatura corporal de Ratos *Sprague Dawley* submetidos ao LPS. Os autores concluíram que, enquanto que os sedentários tiveram uma diferença de temperatura de +0,6°C, os treinados tiveram de +1,2°C. Os autores apontam como uma explicação possível que a atividade física modificará vários componentes do sistema imune, principalmente as proteínas de fase aguda, que produzirão várias citocinas inflamatórias (como a IL-6) e isso aumentaria a temperatura corporal. O quadro 1 sumariza as características de todos os 12 estudos sobre a influência do treinamento físico prévio à administração do LPS encontrados na literatura científica.

Por fim, constata-se a pouca produção científica relacionando efeitos agudos e crônicos do exercício/atividade física sobre as modificações inflamatórias e imunológicas de organismos submetidos ao LPS. Além disso, salienta-se a necessidade de realizar novos estudos com exercício físico, pois somente quatro dos doze estudos trabalhou com esse tipo de metodologia, e não foi encontrado na literatura científica estudo utilizando como intervenção outras formas de exercício, como treinamento de força, treinamento anaeróbio ou exercício intermitente de alta intensidade. Finalmente, espera-se que novos estudos utilizem a temperatura corporal como desfecho principal, pois uma das alterações características da resposta imune é a modificação desta variável e o

único estudo que a pesquisou teve um resultado contrastando com a maioria dos demais trabalhos.

Quadro 1. Características dos 12 estudos sobre a influência do treinamento físico prévio à administração do lipopolissacarídeo (LPS).

Estudo	Tipo de intervenção (duração)	Modelo de treinamento	N/Animais/ idade	Origem/ dosagem do LPS/ via de administração/ momento	Principais resultados	Conclusão (+, = ou -)
Gonçalves et al. (2012)	EF 5 semanas	Exercício de baixa intensidade (60 min de caminhada à 50% da vel. máxima, 3 dias na semana)	32/ BALB-c machos/ NR	Escherichia coli/ 200µg por animal/ instilação intratraqueal/ 48h após última sessão de EF	EF protegeu os pulmões do efeito inflamatório da lesão pulmonar aguda induzida por LPS, parcialmente pela expressão de citocinas anti-inflamatórias e enzimas antioxidantes	O EF pode modular o balanço pró/anti-inflamatório e oxidativo/ antioxidativo nas fases iniciais da lesão pulmonar aguda (+)
Chen; Chen; Jen (2010)	EF 8 semanas	Exercício de intensidade moderada (60 min de corrida em esteira (60% VO ₂ max), 5 dias/semana)	8-10/ C57BL/6NCrj machos/ 7 semanas	Escherichia coli/ 5mg por kg/ injeção intraperitoneal/ 48h após última sessão de EF	EF aumentou o nível de mRNA da enzima MKP-1 (anti-inflamatória) em macrófagos peritoneais, diminuiu o nível basal da MAPK p38 (pró-inflamatória), aumentou a imunocoloração em macrófagos, diminuição dos níveis séricos de IL-6, TNF-α e menor infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal depois do LPS	O EF aumentou a expressão basal de MKP-1 em macrófagos, acelerou a regulação positiva de MKP-1 induzida por LPS e afetou as respostas imunes induzidas por LPS. (+)
Ramos et al. (2010)	EF 6 semanas	Exercício de baixa intensidade (60 min de natação sem carga adicional, 5 dias/semana)	40/ BALB/c machos/ NR	Escherichia coli/ 2,4mg por kg/ instilação intranasal/ 24 horas após a última sessão de EF	EF reduziu os níveis de óxido nítrico exalado, diminuiu o volume de neutrófilos na lavagem broncoalveolar e no parênquima pulmonar, mas não modificou a	EF inibe inflamação neutrofílica pulmonar, mas não remodela e não influencia na mecânica pulmonar prejudicada, na

					diminuição da resistência tecidual pulmonar e proporção volumétrica de fibras elásticas	lesão pulmonar aguda induzida por LPS (+)
Kato et al. (2006)	EF Efeito agudo	Exercício de baixa intensidade (1 hora de esteira a uma velocidade de 5 rotações por minuto)	22/ 8 BALB/c fêmeas e 14 C57BL/6 fêmeas/ 5 semanas	Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 e Porphyromonas gingivalis ATCC 33277/ 20 µg por animal/ injeção intraperitoneal/ imediatamente após o EF	O EF inibiu a produção do TNF-α induzido por lipopolissacarídeo, mas não influenciou nos níveis de IL-6	Sugere-se que o EF tenha uma ação defensiva contra o choque por endotoxina. (+)
Huey & Meador (2008)	AF 2 semanas	AF em roda livre para roedores	7-10 animais por grupo, 8 grupos/ camundongos IL-6-/- (Jackson labs strain B6.129S6- <i>Il6^{tm1Kopf}/J</i>) machos e camundongos IL-6+/+ (C57BL/6J)/ 3 meses	Escherichia coli/ 0,83 mg por kg/ injeção intraperitoneal/ ao final da intervenção	Os níveis plasmáticos e na musculatura esquelética de IL-6 dos animais IL-6+/+ submetidos ao LPS foram maiores no grupo da roda livre do que no grupo sedentário. Essa diferença não foi encontrada no músculo cardíaco. Nos animais IL-6+/+ e -/-, o treinamento aumentou os níveis de Hsp25, αβ-crystallin e Hsp72 no músculo esquelético, mas não no músculo cardíaco, com exceção dos animais IL-6-/- referentes à Hsp72 que tiveram níveis maiores na musculatura cardíaca	AF pode aumentar as PCT no músculo esquelético (protegem os tecidos) e os níveis plasmáticos e musculares de IL-6 (+)
Littlefield et al. (2015)	AF 9 semanas	AF em roda livre para roedores	42 (21 adultos e 21 velhos)/ C57BL/6 machos/ 4 meses (adultos) e 22 meses (velhos)	NR/ 250 µg por kg/ injeção intraperitoneal/ 37 dias após o início da intervenção	LPS reduziu o número de novos neurônios em animais velhos sedentários, AF preveniu esse decréscimo. AF aumentou a proporção de micróglia co-rotulada com BDNF em	AF pode promover um fenótipo neuroprotetivo na micróglia e proteger contra reduções na neurogênese hipocampal induzidas por inflamação no

					animais velhos	cérebro envelhecido (+)
Martin et al. (2013)	AF 10 semanas	AF em roda livre para roedores	206/ C57BL/6 machos/ 19 meses	Escherichia coli/ 0,02 ou 0,08 ou 0,16 ou 0,33 mg por kg/ injeção intraperitoneal/ ao final da intervenção	AF não protegeu contra os efeitos do LPS na anorexia, adipsia, perda de peso e redução da atividade locomotora. 24 horas pós LPS, houve um aumento no cérebro de TNF- α , IL-1 β e mRNA da IL-10, e um aumento no baço e no fígado de IL-1 β e IL-6, que não foram prevenidos com AF	AF não reduziu os sintomas clínicos da administração de todas as doses de LPS, nem as expressões gênicas cerebral e periférica das citocinas pró-inflamatórias 24 horas pós injeção. (=)
Martin et al. (2014)	AF 30 dias (adultos) e 70 dias (velhos)	AF em roda livre para roedores	80 (40 adultos e 40 velhos)/ C57BL/6 machos/ 4 meses (adultos) e 19 meses (velhos)	Escherichia coli/ 0,83 mg por kg (adultos) e 0,33 mg por kg nos velhos/ injeção intraperitoneal/ ao final da intervenção	AF não exerceu efeito sobre os sintomas do LPS (anorexia, perda de peso, aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda e diminuição na preferência pela sacarose). 4h (adultos) e 24h (velhos) pós LPS, obteve-se um aumento no TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IDO no cérebro	AF não afetou a resposta neuro-inflamatórias e as consequências comportamentais da administração de LPS em ratos jovens e velhos (=)
Peppler et al. (2016)	AF 10 semanas	AF em roda livre para roedores	80/ C57BL/6 machos/ 8 semanas	Escherichia coli/ 2 mg por kg/ injeção intraperitoneal/ ao final da intervenção	AF atenuou o aumento de massa gorda corporal e epididimal, melhorou a tolerância à glicose e à insulina, e aumentou as PCT hepáticas. Diminuiu a sinalização de IL-6 induzida por LPS e a expressão do mRNA de outros marcadores inflamatórios (TNF- α , quimiocina CCL2, óxido nítrico sintetase induzível,	Fornecer novas evidências de que a AF protege contra a cascata inflamatória induzida pelo LPS no fígado e que esses efeitos podem ser mediados via HSP70/72. (+)

					IL-10 e IL-1 β) no fígado, mas não de forma sistêmica. Em paralelo, aumentou-se o conteúdo da proteína hepática HSP70/72, que protege contra desafios inflamatórios	
Peppler et al. (2017)	AF 10 semanas	AF em roda livre para roedores	40/ C57BL/6J machos/ 8 semanas	Escherichia coli/ 2 mg por kg/ injeção intraperitoneal/ ao final da intervenção	AF atenuou o ganho de massa do tecido adiposo epididimal (eWAT) e do tecido adiposo subcutâneo inguinal (iWAT), melhorou a tolerância à glicose, aumentou os marcadores de biogênese mitocondrial em iWAT e eWAT e aumentou o teor de proteína UCP-1 em iWAT. No iWAT, diminuiu a expressão de mRNA de TNF- α , MCP-1 e folistatina, junto com a fosforilação de STAT3. AF teve um efeito principal na redução da expressão de mRNA de IL-1b, IL-6 e SOCS3 no iWAT. No eWAT, o efeito principal foi na redução da expressão de mRNA de IL-1b, MCP-1, IL-6 e folistatina.	AF pode atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS no tecido adiposo e isso ocorre em maior extensão no iWAT comparado com o eWAT. (+)
Rowsey et al. (2006)	AF 8 semanas e 3 dias	AF em roda livre para roedores	64/ Ratos Sprague Dawley fêmeas/ 45 dias	Escherichia coli/ 50 μ g por kg/ injeção intraperitoneal/ ao final da 8ª semana	Enquanto que os sedentários tiveram uma diferença de temperatura de +0,6°C, os treinados tiveram de +1,2°C	AF aumentou a resposta febril e levou a um aumento nos efeitos pirogênicos do LPS (-)

Ishizashi et al. (1995)	AF Efeito agudo	120 minutos de AF em roda voluntária	19/ camundongos ICR fêmeas/ 5 semanas	Escherichia coli/ 0,2 mg por animal/ injeção intravenosa/ imediatamente após a AF [7 dias antes, administrou-se uma injeção intraperitoneal da bactéria Propionibacterium acnes inativada (1 mg de peso molhado por animal)]	2 dos 9 animais do grupos AF sobreviveram, enquanto que os 10 animais do grupo sedentário morreram. A média de tempo de sobrevivência entre o grupo AF (n=7) foi de $10,75 \pm 4,51$ h, enquanto que no grupo controle (n=10) foi de $3,3 \pm 1,34$ h. As concentrações séricas de IL-1 e IL-6 no grupo AF estavam menores que o grupo sedentário 2h depois do LPS	AF aumentou o tempo de sobrevivência e a chance de sobreviver de animais submetidos ao LPS e isso pode ter acontecido, parcialmente, devido à menor produção de IL-1 e IL-6 (+)
-------------------------	------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------	--	--	---

N: número de animais; NR: não reportado; EF: exercício físico; AF: atividade física; LPS: lipopolissacarídeo; min: minutos; VO₂max: Consumo Máximo de Oxigênio; +: resultados positivos em favor do EF/AF; =: resultados em que o EF/AF não influenciou o LPS; -: Resultados negativos do EF/AF sobre o LPS; IL-6-/-: camundongos knockout para produção de IL-6; IL-6+/: camundongos com produção normal de IL-6; PCT: proteínas de choque térmico

2.3. Testes comportamentais em animais e suas relações com o exercício físico

Diversos modelos experimentais com animais vêm sendo utilizados desde o século XIX com o intuito de mimetizar condições patológicas que acometem humanos, visto que algumas doenças que afetam principalmente o SNC e outras áreas do corpo humano, são de difícil acesso ou sua manipulação se torna inviável ou impossível em sujeitos vivos (FUNCHAL & DANI, 2014). Nesse sentido, a utilização de modelos experimentais animais foi de fundamental importância para a ciência, de modo que estudos com análises histológicas profundas e testes comportamentais mais complexos puderam auxiliar os pesquisadores no descobrimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças.

A análise de parâmetros comportamentais de animais vem sendo amplamente utilizada por pesquisadores no sentido de verificar a extensão dos danos causados por determinada condição patológica. Dentre os parâmetros

físicos mais avaliados estão a memória e locomoção dos animais (ANTUNES & BIALA, 2012; BASSO et al., 1995; BROWN et al., 2001).

O teste comportamental de campo aberto foi originalmente criado por Hall em 1934, em que o pesquisador avaliava a quantidade de fezes e urina produzida pelos animais no sentido de indicar diferenças em parâmetros emocionais dos mesmos. Posteriormente, esse teste foi utilizado para avaliar as alterações comportamentais induzidas por intervenções como o choque eletroconvulsivo ou a administração de drogas psicotrópicas e em 1977 a realização do teste foi qualificada, de modo que o local de realização do experimento foi dividido em quadrantes centrais e periféricos e os animais que passassem mais tempo na região central eram considerados menos ansiosos e mais “exploradores” que os animais que optavam por caminhar na periferia (ROYCE, 1977).

Atualmente o teste é realizado em uma caixa sem tampa, de madeira, acrílica ou de vidro, medindo 56 cm x 40 cm x 30 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais, medindo 12 cm x 12 cm cada um. O teste tem duração de 5 minutos e são avaliados os seguintes parâmetros: número de quadrantes cruzados pelos animais (periféricos e centrais), tempo em que os animais permaneceram nos quadrantes centrais, número de *rearings* (elevação das patas dianteiras) realizados e a quantidade de fezes e urina deixada pelos animais na caixa, quando houver (CARVALHO et al., 2016). O tempo de realização do procedimento, as dimensões da caixa e os parâmetros avaliados podem variar de acordo com o protocolo utilizado. A figura 7 apresenta de forma ilustrativa o local de realização do teste de campo aberto.

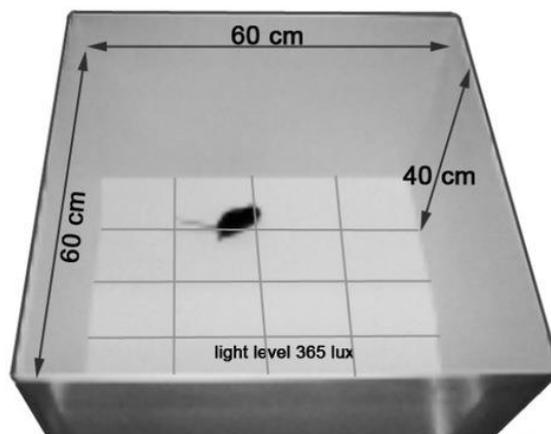


Figura 7. Imagem ilustrativa do teste de campo aberto (Fonte: domínio público).

O teste de memória de reconhecimento de objetos tem sido amplamente utilizado pelos pesquisadores em modelos animais de epilepsia, EM, MP, MA, depressão e ansiedade (LEGER et al., 2013; HANSEN et al., 2010; BERTAINA-ANGLADE et al., 2006, ZHANG et al., 2012), entre outros, já que esses protocolos fornecem informações importantes sobre o reconhecimento de estímulos e sobre o comportamento natural adotado pelos roedores quando colocados em um local novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). Inicialmente esse teste foi planejado para ser realizado em uma caixa de madeira aberta medindo 65 x 45 x 65 centímetros (ENNACEUR & DELACOUR, 1988) porém atualmente são usados diferentes materiais com cores e formatos diversos, apesar disso, a forma do equipamento de teste mais usado ainda é o retangular ou quadrangular (ANTUNES & BIALA, 2012). A figura 8 representa de forma ilustrativa esse teste.

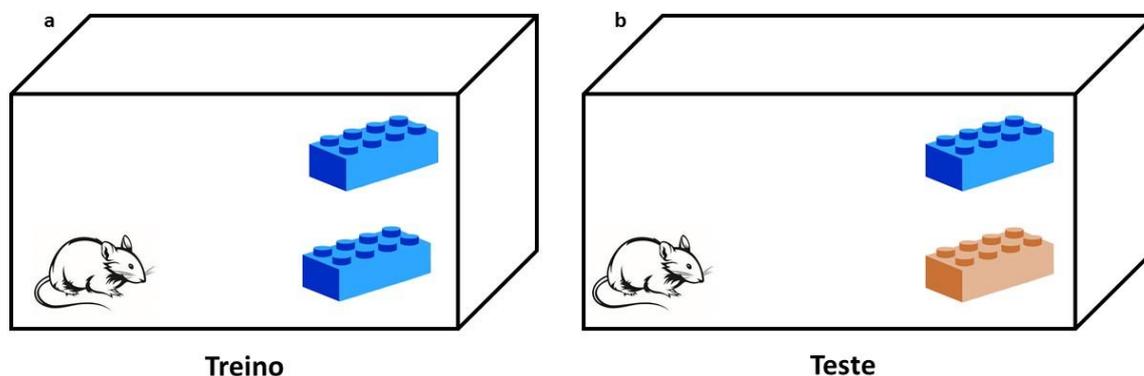


Figura 8. Ilustração do teste de memória de reconhecimento de objetos. A figura **a** demonstra o treino e a figura **b** o teste. Fonte : o autor.

No estudo de Carvalho et al. (2016), os pesquisadores descreveram que utilizaram uma caixa de madeira sem tampa, com dimensões de 30 x 30 x 30 cm, sendo um pouco menores das quais o teste foi inicialmente planejado. Três paredes da caixa foram pintadas de preto e uma era de material acrílico, com o chão coberto por folha de acetato de vinil etílico. Os pesquisadores utilizaram

uma lâmpada com intensidade de 40 lux, a qual ficou posicionada 60 cm acima do equipamento, de modo a fornecer iluminação constante durante a realização do teste, juntamente com o ar-condicionado que garantiu um isolamento sonoro do local de realização do experimento. Foram utilizados blocos de tijolo de plástico, nas cores branco vermelho e azul, que apresentavam formato retangular, de pirâmide e em forma de escada, de modo que entre cada teste, os objetos e a lâmpada eram limpos com álcool à 30%.

Foram realizadas três sessões com os animais: 1) habituação, 2) treinamento e 3) teste, cada um deles com a duração de 10 min. Primeiramente os roedores realizavam a sessão um e retornavam para suas gaiolas. Vinte e quatro horas após era realizada a sessão dois, em que dois objetos iguais eram apresentados aos animais (objeto A), e o tempo de exploração que correspondia ao toque do nariz do animal ou da aproximação do mesmo ao objeto (uma distância menor que dois cm) foi gravado com através de dois cronômetros. Ficar sentando ou escalar a caixa não eram considerados movimentos de exploração. A sessão três foi realizada 24 hs após a sessão 2. No teste, os animais foram recolocados na caixa e um dos objetos familiares (isto é, o objeto A) foi substituído por um novo objeto (isto é, objeto B). O tempo gasto explorando o objeto familiar e os novos objetos foram computados. Para saber o resultado final do teste os pesquisadores realizaram um cálculo considerando a diferença de tempo gasto explorando o objeto novo (B) e o objeto familiar (A) $\times 100$ dividido pela soma do tempo gasto explorando o objeto novo (B) e o familiar (A), e utilizaram isso como um parâmetro cognitivo ($[(T_{\text{objetoB}} - T_{\text{objetoA}}) / (T_{\text{objetoB}} + T_{\text{objetoA}})] / 100$).

Adicionalmente, estudos tem mostrado que o exercício físico atua de forma positiva sobre a memória e debilidades físicas de pacientes com doenças neurodegenerativas, através do aumento da neurogênese, plasticidade hipocampal, aumento das neurotrofinas cerebrais como o BDNF e GDNF, além de melhoras em parâmetros físicos como mobilidade, equilíbrio, diminuição da rigidez articular, entre outros aspectos (PAN et al., 2017; DUZEL; VAN PRAAG; SENDTNER, 2016; SCHIMIDT et al., 2014, CHANG et al., 2012).

Em virtude disso, alguns estudos buscaram avaliar parâmetros comportamentais de animais submetidos a protocolos de exercício físico e verificar quais os efeitos dessas intervenções sobre a memória e locomoção

dos mesmos. O estudo de Costa et al. (2017) realizou uma intervenção de 14 dias com ratos wistar machos que se exercitaram em esteira motorizada para roedores, uma vez por dia, durante 30 minutos à 20 cm/s. Os animais desse estudo foram divididos em quatro grupos experimentais, onde metade deles recebeu uma injeção de oxidopamina, que é um composto orgânico sintético neurotóxico, o qual gera um quadro de destruição dos neurônios dopaminérgicos e conseqüentemente simula a doença de Parkinson.

Os pesquisadores desse estudo encontraram resultados positivos no teste de campo aberto, onde animais exercitados apresentaram uma recuperação parcial da mobilidade em comparação com os que não realizaram exercício.

Na mesma direção, Vianna e colaboradores (2017), encontraram que animais que realizaram exercício contínuo de intensidade moderada na esteira e que receberam uma injeção de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), que é uma neurotoxina que provoca sintomas da doença de Parkinson, apresentaram performances cognitivas/motivacionais normais em comparação com seus pares sedentários. Ao mesmo tempo, exibiram expressão normal do receptor transmembranar da imunoglobulina (RAGE), além de neuroproteção sobre a regulação do gene DJ-1 no córtex frontal.

Outros três recentes estudos investigaram os efeitos do exercício físico sobre parâmetros neuronais, através da realização de testes comportamentais. No estudo de Lu et al. (2017), os pesquisadores dividiram os animais em quatro grupos experimentais (grupo controle, grupo de estresse traumático, grupo estresse traumático + exercício e grupo estresse traumático + droga - clonazepan).

Os animais do grupo exercitado efetuaram um treinamento em esteira motorizada própria para roedores, onde iniciaram o protocolo em uma intensidade de 9 m/min, por 10 minutos, onde o princípio da sobrecarga foi aplicado, de modo que na sexta semana os animais correram por um período de 60 minutos à 15 m/min. Através do teste de campo aberto, puderam constatar que os animais exercitados realizaram um número maior de cruzamentos, especialmente no quadrante central e de rearings em comparação com o grupo sedentário.

Adicionalmente, Cevik, Sahin e Tamer (2018), em seu estudo com 32 ratos wistar machos, submeteram os animais a um protocolo de 14 dias de isolamento social seguidos por quatro semanas de exercício, realizados cinco dias na semana, com duração de 20, 50, 50 e 60 minutos, da primeira à sexta semana, respectivamente. Os pesquisadores não encontraram diferenças na memória e no aprendizado, entretanto o exercício físico foi capaz de reduzir o nível de ansiedade dos roedores.

Os achados de Sosa et al. (2015) deixam clara a importância da realização do exercício físico para quadros neurodegenerativos e a necessidade de utilização de testes comportamentais para avaliar a extensão dos danos, já que nesse estudo verificaram que oito semanas de exercício físico de intensidade moderada (9–13 m/min, por 30 min, durante cinco dias por semana) em ratos wistar machos com isquemia cerebral por reperfusão puderam reverter completamente as alterações na atividade motora dos mesmos.

2.4. Acetilcolinesterase (AChE) e sódio potássio ATPase (Na⁺K⁺-ATPase)

O sistema nervoso dos seres vivos é responsável por processar e armazenar as informações, tanto do meio interno como do meio externo do corpo. Esse está dividido em sistema nervoso central (SNC), que engloba o encéfalo e a medula espinhal e o sistema nervoso periférico (SNP) que compreende os nervos e gânglios nervosos (BEAR, 2002), sendo subdividido em sistema nervoso periférico visceral e somático. A parte eferente do sistema nervoso visceral está subdividida em sistema nervoso periférico autônomo simpático e parassimpático.

Para que a informação seja levada até o seu local de destino, é necessário que existam neurotransmissores, os quais são as substâncias responsáveis por realizar a conexão entre dois ou mais neurônios, de modo a realizar a sinapse (BEAR, 2002).

Eles podem ser da ordem dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, adrenalina, acetilcolina, serotonina e dopamina) ou inibitórios (GABA, endorfina, dopamina e serotonina). Para que uma sinapse nervosa ocorra, os neurotransmissores serão liberados na fenda sináptica, de modo a estimular ou inibir o neurônio pós-sináptico (BEAR, 2002).

O primeiro neurotransmissor identificado no organismo foi a acetilcolina a qual age nas junções neuromusculares esqueléticas, gerando as contrações musculares, nas sinapses entre o nervo vago e as fibras musculares, gerando uma resposta inibitória, representada pela brade cardíaca, nas sinapses do sistema motor visceral, controlando o sistema nervoso parassimpático, além de agir em diversos sítios do SNC, controlando a atenção, aprendizado e memória.

A síntese de acetilcolina acontece a partir da acetilcoenzima A (Acetil CoA) e da colina, em uma reação catalisada pela colina-acetiltransferase. A colina está presente no plasma e é captada pelos neurônios colinérgicos a partir de um transportador de colina. Após a síntese, catalisada pela colina-acetiltransferase, ela é envolvida em vesículas, através de transportadores vesiculares de acetilcolina. A vesícula passa então a ser estocada e fica à espera de um estímulo, o qual ocorre através do potencial de ação. Após o estímulo, a vesícula se funde e libera acetilcolina na fenda sináptica, que irá agir em seus receptores (BEAR, 2002).

Em muitas sinapses colinérgicas, a ação pós-sináptica da acetilcolina não é encerrada pela recaptação como ocorre com os demais neurotransmissores e sim, por uma poderosa enzima de hidrólise denominada acetilcolinesterase. Essa enzima encontra-se aderida a célula pré-sináptica e é degradada pela acetilcolina em ácido acético e colina. A colina por sua vez, será recaptada pelo terminal axonal colinérgico e ressintetizada na forma de acetilcolina, recomeçando esse ciclo (BEAR, 2002).

Para receber a acetilcolina, existem receptores colinérgicos, os quais podem ser do tipo metabotrópicos ou ionotrópicos, no entanto, a acetilcolina não é o único ligante desses receptores. A nicotina apresenta grande afinidade pelo receptor ionotrópico e a muscarina, pelo metabotrópico. Dessa forma, essas substâncias são ligantes agonistas dos receptores e estes, por sua vez, recebem o nome de seus agonistas: receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (BEAR, 2002).

Os receptores nicotínicos apresentam um canal iônico dependente de ligante, de modo que por eles passam principalmente os íons sódio (Na^+). Esses receptores estão presentes nos gânglios autonômicos e nas junções neuromusculares.

O outro tipo de receptor colinérgico, o muscarínico, é metabotrópico, ou seja, é considerado um receptor acoplado à proteína G. Esse tipo de receptor está subdividido em 5, de M1 até M5. Os ímpares (M1, M3 e M5) agem via Gq, gerando uma resposta excitatória e os pares (M2 e M4), agem via Gi, a via que inibe a adenilciclase, gerando uma resposta inibitória. Os receptores nicotínicos e muscarínicos podem ser encontrados no coração, músculo liso e nas glândulas endócrinas.

Após promover a entrada de íons, no caso dos receptores ionotrópicos ou gerar uma cascata de sinalização, no caso dos metabotrópicos, a acetilcolina ligada no receptor, entra na fenda sináptica via endocitose, formando um endossomo primário, o qual apresenta dois destinos: ser digerido ou ser separado em receptor e acetilcolina, sendo que o receptor retorna à membrana pós-sináptica e a ACh que ficou no citosol da célula pós-sináptica é degradada em um lisossomo. A acetilcolina que permanece na fenda sináptica é degradada pela enzima acetilcolinesterase em colina e ácido acético. A maioria da colina resultante, é liberada no terminal axonal colinérgico e ressintetizada na forma de acetilcolina (BEAR, 2002). A síntese de acetilcolina está representada abaixo na Figura 9.

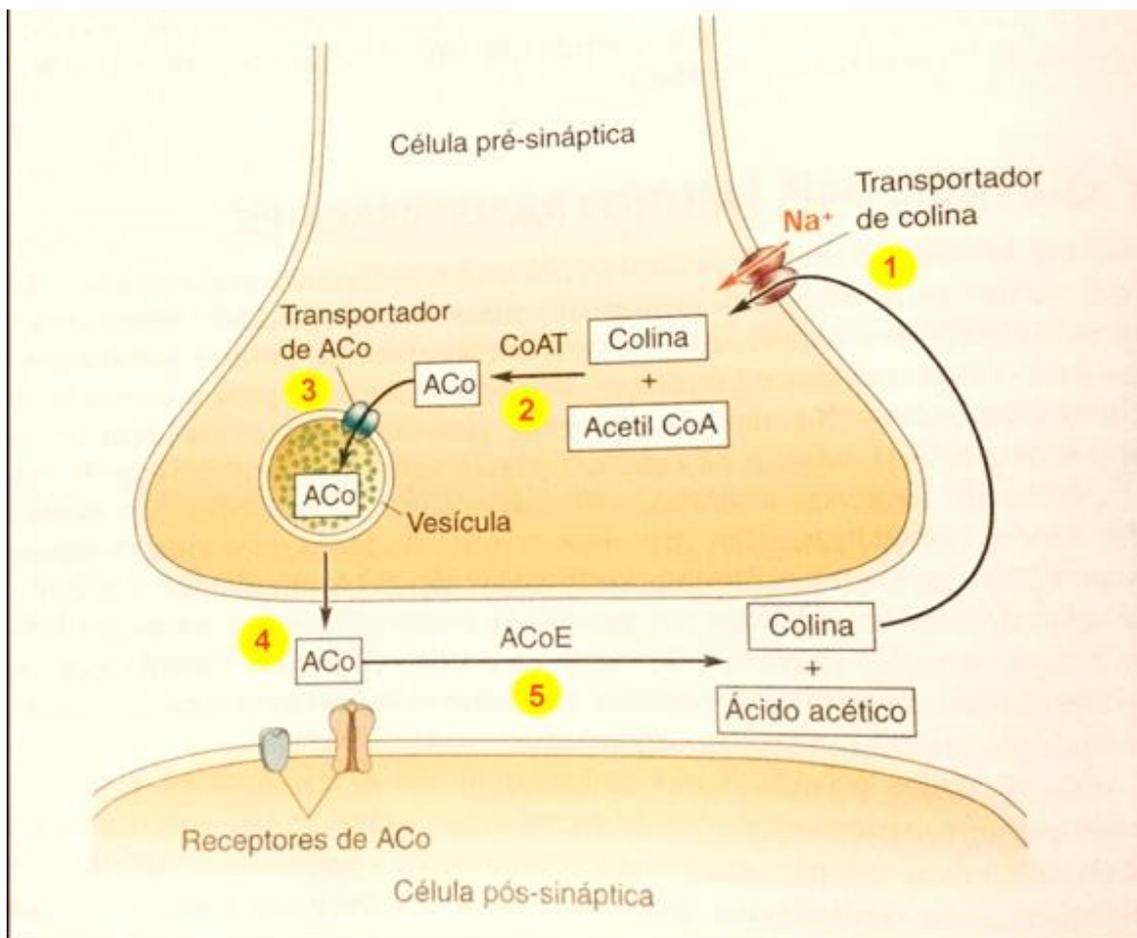


Figura 9. Representação da síntese de acetilcolina (Fonte: BEAR, 2002).

A ACh está relacionada com a ocorrência de algumas patologias como o mal de Alzheimer visto que essa doença gera uma degradação de neurônios diminuindo a atuação desse neurotransmissor, o qual é degradado pela ação das enzimas. No tratamento do Alzheimer, são comumente utilizados os medicamentos inibidores de acetilcolinesterase, chamados também de anticolinesterásticos, de forma que sua utilização evita a degradação de ACh (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011; MUFSON et al., 2008).

A doença de Huntington, a qual é responsável pela morte de células cerebrais, gera impulsos involuntários nos sujeitos por ela acometidos e tais movimentos podem ser explicados pela redução na síntese de acetilcolina (CICHETTI et al., 2000).

Outra enzima importante na transmissão dos impulsos nervosos é a Sódio potássio ATPase (Na^+ , K^+ ATPase). Essa enzima foi inicialmente descoberta por Jens Christian Skou, há 60 anos (SKOU, 1957). Ela é composta

por duas subunidades equimolares: a subunidade alfa, que possui uma massa molecular de -113 kDa e a subunidade beta, a qual possui uma massa molecular total de 55 kDa (JORGENSEN, 1992). Adicionalmente outra subunidade menor foi identificada: a gama, que também é conhecida por FXYD₂, que possui um peso molecular 14 kDa e é conhecida por aumentar a atividade da Na⁺K⁺-ATPase com o ATP, fazendo com que a atividade da bomba de sódio e potássio seja regulada (THERIEN et al; 1997; THERIEN et al; 1999; GEERING, 2006).

As subunidades alfa apresentam as isoformas α_1 , α_2 e α_3 , as quais realizam atividades importantes no organismo humano. A isoforma α_1 está presente na maioria dos tecidos, enquanto a isoforma α_2 é predominante no músculo esquelético e também é detectada no cérebro e no coração. A isoforma α_3 é limitada essencialmente ao tecido neural e cardíaco.

As subunidades beta apresentam as isoformas β_1 e β_2 , as quais são predominantes nas células de mamíferos, onde o β_1 é expressa de forma ubíqua e β_2 aparece principalmente no tecido neural. Até agora, a isoforma β_3 só foi identificada em *Xenopus*, um gênero de rã nativa da África subsaariana (LINGREL ET AL., 1990; SWEADNER, 1989; GOOD; RICHTER; DAWID, 1990).

A enzima Na⁺K⁺-ATPase também realiza uma importante reação conhecida como “Bomba de sódio e potássio”, em que executa o transporte de íons sódio (Na⁺) que estão no meio intracelular para o meio extracelular e a troca de íons potássio (K⁺) do meio extracelular para o intracelular contra um gradiente de concentração, de modo a manter o potencial elétrico da célula, numa relação de 3 Na⁺/2 K⁺. Nessa reação, ocorre a degradação de adenosina tri fosfato (ATP) em adenosina di fosfato (ADP) e fosfato inorgânico (KAPLAN, 2002).

Esse procedimento é fundamental para os processos de contração muscular e condução dos impulsos nervosos, de modo que a bomba é a responsável por garantir que haja um equilíbrio inicial após um potencial de ação. Uma célula excitável, como é o caso do neurônio, precisa apresentar um potencial elétrico; a parte interna da membrana, por sua vez, apresenta um potencial elétrico negativo e a parte externa, positivo. Para que uma célula possa desencadear o processo conhecido como potencial de ação, ela precisa

inverter as cargas. Essa inversão vai se dar pelo transporte de íons e para que isso ocorra, a célula precisa despolarizar, de modo que canais de sódio irão se abrir para ingressar no interior da célula e logo em seguida, canais de potássio se abrirão para que o potássio que está no lado externo da célula, migre para o lado interno da mesma, gerando assim o potencial de ação (GUYTON & HALL, 2017).

A bomba de sódio e potássio tem o papel principal de reequilibrar a célula para que um potencial de ação possa novamente ocorrer. Como esse processo é ativo, ou seja, com gasto de energia, se faz necessário utilizar o ATP para alimentá-lo, onde 3 sódios saem e 2 potássios entram da célula, de modo a garantir o equilíbrio. Dessa forma, o aumento da atividade na bomba de sódio e potássio atuará de forma a facilitar a condução dos impulsos nervosos (GUYTON & HALL, 2017).

Estudos tem mostrado que a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ quando desregulada no organismo está associada a déficits de memória e aprendizado e que o treinamento de uma tarefa motora gera aumentos na atividade dessa enzima no hipocampo, que é o local responsável pela retenção da memória (MOSELEY et al., 2007; HEO et al., 2012). Do mesmo modo a enzima acetilcolinesterase apresenta um papel chave no sistema colinérgico pois é a principal responsável por degradar a acetilcolina na fenda sináptica (MUFSON et al., 2008) e esta é diminuída em treinamentos cognitivos (SERGUTINA & RAKHMANOVA, 2014).

O exercício físico por sua vez, tem sido utilizado como uma estratégia preventiva contra alterações neuroquímicas decorrentes de doenças. Nesse sentido, Vanzella e colaboradores (2017), verificaram que animais submetidos a 20 minutos diários de exercício em esteira motorizada, três vezes por semana, por quatro semanas, apresentaram aumentos na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, sem diferenças significativas na AChE nos animais exercitados.

Ainda relacionando os efeitos do exercício físico à atividades dessas duas enzimas, Ben et al. (2009) desenvolveram um estudo com ratos wistar fêmeas ovariectomizadas, que realizaram exercício contínuo de intensidade moderada em esteira motorizada. As sessões de exercício ocorreram durante três dias na semana, com vinte minutos de duração, no período de quatro semanas. Os pesquisadores constataram que ratas ovariectomizadas

apresentaram um aumento da atividade da AChE, tanto no córtex como no hipocampo, de modo que o exercício físico atuou na completa reversão desses efeitos. Do mesmo modo, no que se refere à atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase, os pesquisadores verificaram aumentos da atividade dessa enzima no córtex (14%) e hipocampo (11%), onde o exercício também apresentou um efeito de reversão dessas aumentos. E tais achados indicam que os resultados não foram positivos para a Na^+K^+ -ATPase, já que para que haja uma ampla e rápida condução dos impulsos nervosos, se faz necessário que essa enzima esteja com níveis mais elevados no organismo dos animais.

Souza e colegas (2009), buscaram verificar em seu estudo, o efeito de seis semanas de natação sobre o comportamento convulsivo induzido por pentilenetetrazol (PTZ) e os efeitos em diferentes estruturas, que incluíram a atividade das enzimas AChE e Na^+K^+ -ATPase, no córtex cerebral de ratos wistar idosos. Os pesquisadores constaram que a administração de PTZ, diminuiu a atividade da Na^+K^+ -ATPase e que o exercício apresentou um efeito protetivo contra a inibição da atividade dessa enzima.

Do mesmo modo, no estudo de Castro et al. (2017), os pesquisadores também encontraram que o exercício físico foi responsável por prevenir a diminuição da atividade da sódio e potássio ATPase em animais que realizaram exercício contínuo por cinco dias na semana, durante seis semanas, com 60 minutos de duração cada sessão.

3. Materiais e métodos

3.1. Delineamento

Trata-se de estudo experimental de modelo pré-clínico.

3.2. Animais

Para a realização deste estudo serão utilizados 30 camundongos fêmeas (110 dias de idade) da espécie C57BL/6, que serão divididos de forma aleatória entre os grupos de experimentação (10 animais por grupo). Esse número amostral está em concordância com o estudo de Liu et al. (2013) para os testes comportamentais. Os animais serão fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas e mantidos em condições experimentais controladas, à temperatura ambiente entre 24-27°C, água e comida "ad

libitum”, distribuídos em gaiolas coletivas (com quatro camundongos por gaiola) e com o ciclo claro/escuro de 12h durante todo o período do estudo.

3.3. Contensão e transporte dos animais

Para a contenção e transporte dos animais, a manobra inicial consistirá em sua retirada da gaiola (suspendendo o animal pela base da cauda) para que, em seguida, rapidamente apoiá-lo em uma superfície na qual ele possa se agarrar (i.e.: a tampa da gaiola). Após esses procedimentos, o pesquisador pressionará o camundongo levemente sobre a tampa da gaiola, segurando, primeiramente a pele da região dorso-cervical, entre os dedos indicador e polegar. Em seguida, sua cauda será fixada entre os outros dedos e a palma da mão, para a limitação total de seus movimentos.

3.4. Randomização e protocolo de treinamento

Os animais serão aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: controle (GC) (n=10), exercício intermitente de alta intensidade (GHIIT) (n=10) e exercício contínuo de intensidade moderada (GCON) (n=10).

A intensidade dos exercícios dos grupos GHIIT e GCON será baseada no estudo de Schefer & Talan (1996) em que os animais chegaram à exaustão à velocidade de 25 m/min, sendo essa velocidade correspondente ao consumo máximo de oxigênio ($v\dot{V}O_{2max}$).

Devido ao fato que a linhagem de camundongos C57BL/6 é considerada isogênica (SEONG et al., 2004), o que significa que sua compatibilidade genética é muito próxima ao 100%, é plausível utilizar as intensidades dos esforços de modo igual para todos os animais, respeitando a característica de cada protocolo de exercício.

Os animais dos grupos GHIIT e GCON realizarão seus protocolos de exercício em esteira para roedores da marca Bonther®, composta por dez baias para camundongos com uma faixa de velocidade e inclinação variando de 10 à 100 cm/s e -10 à 30 graus, respectivamente.

Com isso, os animais do grupo GHIIT se exercitarão baseados em uma adaptação do protocolo descrito em Afzalpour et al. (2015), em esteira própria para roedores marca Bonther® composta por dez baias para camundongos com uma faixa de velocidade e inclinação variando de 10 a 100 cm/s e -10 a 10

graus, e iniciarão seus treinamentos da seguinte forma: nos dias ímpares, realizarão quatro esforços de 30 segundos de duração a uma intensidade correspondente a 100% da vVO_{2max} com base no estudo de Schefer & Talan (1996), separados por intervalos de 60 segundos. Alternadamente, nos dias pares, os animais se exercitarão realizando três esforços de três minutos a uma intensidade correspondente a 90% da vVO_{2max} , separados por intervalos de 60 segundos. Todos intervalos serão realizados de forma ativa a 68% da Vvo_{2max} em ambas intensidades (Tabela 1).

Os camundongos do grupo GCON também se exercitarão baseados em uma adaptação do protocolo descrito em Afzalpour et al. (2015) em esteira própria para roedores. O treinamento começará a uma intensidade de 80% da vVO_{2max} com duração de 20 minutos ininterruptos. O princípio da sobrecarga será exercido pelo aumento do tempo e dos esforços nos grupos GCON e GHIIT, respectivamente, como descrito na tabela 1.

Tabela 1. Protocolos de treinamento dos grupos treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intervalado de alta intensidade

Semana	Dia	GCON (tempo, intensidade)	GHIIT*	
			(esforços, intensidade, duração do esforço)	
			Dia ímpar	Dia par
Semana 1	1	20 min, 80%	4 esforços, 100%, 30 s	
	2	22 min, 80%		3 esforços, 90%, 3 min
	3	24 min, 80%	6 esforços, 100%, 30 s	
	4	26 min, 80%		3 esforços, 90%, 3 min
	5	28 min, 80%	8 esforços, 100%, 30 s	
Semana 2	1	30 min, 80%		4 esforços, 90%, 3 min
	2	32 min, 80%	10 esforços, 100%, 30 s	
	3	34 min, 80%		4 esforços, 90%, 3 min
	4	36 min, 80%	12 esforços, 100%, 30 s	
	5	38 min, 80%		5 esforços, 90%, 3 min
Semana 3	1	40 min, 80%	14 esforços, 100%, 30 s	
	2	42 min, 80%		5 esforços, 90%, 3 min
	3	44 min, 80%	16 esforços, 100%, 30 s	
	4	46 min, 80%		6 esforços, 90%, 3 min
	5	48 min, 80%	18 esforços, 100%, 30 s	
Semana 4	1	50 min, 80%		6 esforços, 90%, 3 min
	2	52 min, 80%	20 esforços, 100%, 30 s	
	3	54 min, 80%		7 esforços, 90%, 3 min
	4	56 min, 80%	21 esforços, 100%, 30 s	
	5	58 min, 80%		7 esforços, 90%, 3 min
Semana 5-6	1-10	60 min, 80%	21 esforços, 100%, 30 s	7 esforços, 90%, 3 min

*Entre cada esforço haverá um descanso ativo à 68% vVO_{2max} com 60 s de duração. Intensidade: percentual da vVO_{2max}; GCON: treinamento contínuo de intensidade moderada; GHIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; min: minutos; s: segundos.

Anteriormente ao início do treinamento, os grupos supracitados serão familiarizados com a corrida numa esteira motorizada própria para roedores com uma sessão de caminhada contínua de 30 minutos, sendo os primeiros 15 minutos a uma velocidade de 10 m/min e o restante a uma velocidade de 16 m/min. O treinamento ocorrerá durante cinco dias na semana (de segunda à sexta-feira) por seis semanas. Caso algum animal se recuse a correr, permanecendo cinco segundos no final da esteira, o mesmo será retirado do aparelho e excluído do estudo. O grupo GC será exposto ao mesmo local em que ocorrerá o treinamento (esteira própria para roedores), porém sem realizar exercício.

3.5. Modelo animal de neuroinflamação

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, será induzida neuroinflamação nos animais através da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) proveniente da bactéria *Escherichia coli* (055:B5) obtida pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O LPS será dissolvido em soro fisiológico e será utilizada uma dosagem de 250 µg/kg como descrito anteriormente por Sparkman et al. (2005a, 2005b) e Kranjac et al. (2013).

3.6. Parâmetros comportamentais

O teste comportamental de campo aberto ocorrerá no dia anterior a eutanásia e o teste de memória de reconhecimento de objetos será realizado no mesmo dia da eutanásia.

3.6.1. Teste comportamental de campo aberto

Este teste permite avaliar a atividade locomotora dos animais. O aparato consiste em uma caixa medindo 56 cm x 40 cm x 30 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais, medindo 12 cm x 12 cm cada um. A sessão de campo aberto terá duração de 5 minutos com cada animal e durante este tempo, um observador irá registrar o número de quadrantes cruzados pelos animais (periféricos e centrais), o tempo em que os animais permaneceram nos quadrantes centrais, o número de *rearings* (elevação das patas dianteiras)

realizados e a quantidade de fezes deixada pelos animais na caixa, quando houver (MARISCO et al., 2013).

3.6.2. Teste de memória de reconhecimento de objetos

O teste de memória de reconhecimento de objetos será realizado conforme o estudo de Mello et al. (2008). Serão fixados objetos de plástico no piso de numa caixa experimental medindo 56 cm x 40 cm x 30 cm. No primeiro dia, os animais serão colocados em contato com dois objetos iguais (A) e poderão explorar livremente os mesmos por 5 minutos. O teste será repetido 180 minutos mais tarde, onde um dos objetos será trocado por outro (B) para testar a memória de curto prazo (MCP), após o programa de treinamento físico e cada animal será introduzido na arena por mais 5 minutos. As posições dos objetos (familiares ou novos) serão permutados aleatoriamente para cada animal experimental e a caixa será limpa entre os ensaios.

A exploração será definida como cheirar ou tocar no objeto com o nariz e/ou patas dianteiras. Sentar-se ou virar-se ao redor do objeto não será considerado como comportamento exploratório. O tempo que o animal irá gastar para explorar cada objeto será gravado por um observador cego ao tratamento e será expressa como a porcentagem do tempo total de exploração que será calculado em segundos (ROSSATO et al., 2007).

3.7. Temperatura corporal

A temperatura corporal será medida com um termômetro infravermelho modelo FR1DZ1 da marca G-Tech. A temperatura será verificada no momento prévio e após 1 hora, 6 horas e 12 horas da administração de LPS.

3.8. Eutanásia e amostras biológicas

A eutanásia dos animais ocorrerá 24 horas após a indução de LPS, onde serão coletados o sangue total e o encéfalo. O sangue será utilizado para a separação soro, enquanto que o encéfalo será dissecado em córtex cerebral e hipocampo. Também será realizada a retirada do coração, fígado e do músculo gastrocnêmio da pata direita dos animais. A figura 10 apresenta o diagrama logístico da intervenção.

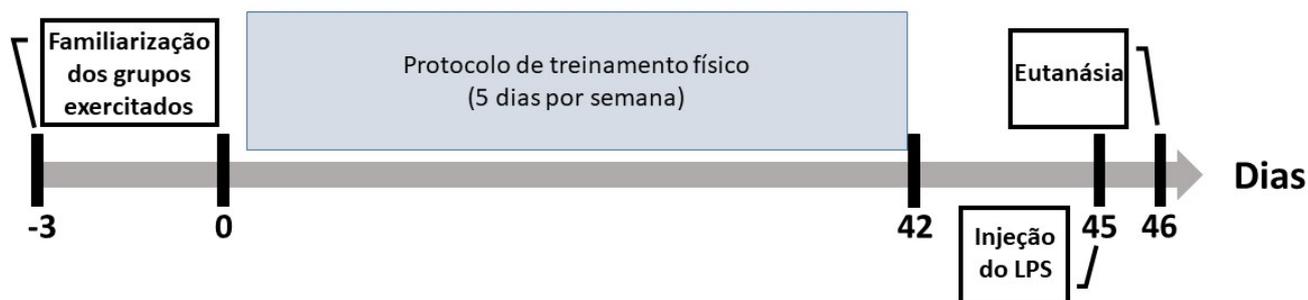


Figura 10. Diagrama logístico da intervenção.

3.9. Análise em estruturas cerebrais

3.9.1. Determinação da atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase

A atividade da Na⁺ K⁺ ATPase será medida no sobrenadante de córtex, hipocampo e extraído como descrito previamente no estudo de Carvalho et al. (2016) com pequenas modificações. O meio de ensaio consistirá em tampão 30 Tris-Hcl (inmM) (pH 7,4), 0,1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl₂ e 100 µg de proteína ou ausência de ouabaína (4 mM) num volume final de 200 µl. A reação será iniciada pela adição de ATP até uma concentração final de 3 mM. Após 30 minutos à 37°, a reação será encerrada pela adição de 50 µl de TCA a 50% (p/v). Serão utilizadas concentrações de substratos saturantes e a reação será linear com a proteína e com o tempo. Controles adequados serão incluídos nos ensaios para a hidrólise não enzimática de ATP. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) que será liberado será quantificada colorimetricamente, conforme descrito anteriormente (FISKE & SUBBAROW, 1927), onde será utilizado KH₂PO₄ como padrão de referência. A absorbância será medida em 630 nm. A atividade específica da Na⁺, K⁺- ATPase será calculada subtraindo a atividade insensível à ouabaína da atividade total (na ausência de ouabaína) e será expressa em nmol de Pi/mg de proteína/min.

3.9.2. Avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

O córtex cerebral e o hipocampo serão homogeneizadas em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) e centrifugadas a 1500 rotações por minuto. A atividade da AChE total será determinada através do método de Ellman et al. (1961) e será expressa em µmoles de AcSCh/h/mg de proteína.

3.10. Operacionalização das variáveis

A operacionalização das variáveis está descrita na tabela 2.

Tabela 2. Operacionalização das variáveis que serão avaliadas no estudo.

Variáveis	Definição	Escala	Operacionalização
<i>Desfechos primários</i>			
Temperatura corporal	Numérica contínua	°C	_____
Teste comportamental de campo aberto	Numérica contínua	Número de quadrantes cruzados	_____
Teste de memória de reconhecimento de objetos	Numérica contínua	Tempo (segundos) que explorou cada objeto	_____
Atividade da enzima Na+ K+ ATPase	Numérica contínua	nmol de Pi/mg de proteína/min	_____
Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	Numérica contínua	AcSCh/h/mg de proteína	_____
<i>Desfechos secundários</i>			
<i>Exposição</i>			
Tipo de treinamento físico	Categórica nominal	Escala de 1 a 3	1= sedentário 2= exercício contínuo de intensidade moderada 3= exercício intermitente de alta intensidade

4. Processamento e análise de dados

Os escores serão digitados no programa Excel® versão 2013 e, após a checagem para a ocorrência de erros, serão transferidos para o software estatístico STATA 12.0. Inicialmente será utilizado o teste de Shapiro-wilk para verificar a distribuição das variáveis, e o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias.

Para as análises entre os desfechos que apresentarem distribuição paramétrica entre os grupos, será utilizada a ANOVA de uma entrada, seguindo do *post-hoc* de Bonferroni. Para seus pares não-paramétricos, utilizar-se-á o comando Ladder para verificar as possíveis normalizações. Caso haja alguma possibilidade de normalização (e.g.: transformação logarítmica) a

mesma será realizada e a análise seguirá o proposto para dados paramétricos. Caso a normalização não seja possível, será utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o *post-hoc* de Dunn. Os resultados serão considerados significativos para $p < 0,05$.

5. Seleção e treinamento dos auxiliares de pesquisa

Atuarão como auxiliares de pesquisa, os alunos integrantes do Grupo de Estudos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício da Escola Superior de Educação Física da UFPel.

Os auxiliares de pesquisa passarão por um treinamento de sete dias em que serão orientados sobre o manuseio e alimentação dos animais, métodos de utilização da aparelhagem de laboratório e demais procedimentos que serão realizados no estudo.

6. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 9086-2016.

7. Divulgação dos resultados

Os resultados serão divulgados através da tese de doutorado exigida pelo programa, publicação no formato de artigo científico em revistas da área da saúde, apresentação de comunicações em eventos acadêmicos da área de atividade física e saúde, além de informativo veiculado na imprensa local.

8. Orçamento

VARIÁVEL	PRODUTO	Quantidade	PREÇO (em reais)
Esteira para roedores com 6 tapetes	Esteira motorizada para 6 ratos ou 8 camundongos ou 10 baias – inclinação de -30 à 30 graus, Bonther produtos e equipamentos para laboratório LTDA	1 unidade	R\$ 9.500,00
Termômetro infravermelho	Termometro inflavermelho de marca X, para mensuração da temperatura corporal dos animais	1 unidade	200,00
Luvras cirúrgicas	Luvras de cirúrgicas de látex	4 caixas com 50 pares	80,00
Enzima sódio e potássio ATPase (Na⁺K⁺ ATPASE)	Kit comercial para camundongos da marca Sigma Aldrich	1 caixa	2150,00
Enzima acetilcolinesterase (AChE)	Kit comercial para camundongos da marca Sigma Aldrich	1 caixa	2150,00
TOTAL (R\$)			R\$ 14.080,00

10. Referências Bibliográficas

- AFZALPOUR, M. E.; CHADORNESHIN, H. T.; FOADODDINI, M.; EIVARI, H. A. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. **Physiology & Behavior**, v. 147, p. 78–83, 2015.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001.
- ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v.29, p.1303–1310, 2001.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, p. 93–110, 2012.
- BALLARD, C. G.; GREIG, N. H.; GUILLOZET-BONGAARTS, A. L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and **disease**. **Current Alzheimer Research**, v. 2, p. 307-318, 2005.
- BASSO, D, M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 12, n. 1, 1995.
- BEAR, Mark F. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BEN, J.; SOARES, F. M. S.; CECHETTI, F.; VUADEN, F. C.; BONAN, C. D.; NETTO, C. A. et al. Exercise effects on activities of Na⁺,K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. **Brain Research**, v. 1302, p. 248-255, 2009.
- BEN, J. Efeito neuroprotetor do exercício físico em ratas adultas ovariectomizadas. **Dissertação de mestrado**. UFRGS: Porto Alegre, 2010.
- BERTAINA-ANGLADE, V.; ENJUANES, E.; MORILLON, D.; LA ROCHELLE, C. D. The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity.

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 54, n. 2, p. 99-105, 2006.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.2, p.169–176, 2003.

BROWN, R. E.; STANFORD, L.; SCHELLINCK, H. M. Developing Standardized Behavioral Tests for Knockout and Mutant Mice. **ILAR Journal**, v. 41, n. 3, 2000.

BRUNELL, M. K. Comparison of Noncontact Infrared Thermometry and 3 Commercial Subcutaneous Temperature Transponding Microchips with Rectal Thermometry in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, p. 479–484, 2012.

BONE, R.C. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea of comparable definitions. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, p. 332-333, 1991.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B. et al. American College of Chest physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992.

BUDEBERG, B. S.; KERSCHENSTEINER, M.; MERKLER, D.; STADELMANN, C.; SCHWAB, M. E. Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 153, p. 158–170, 2004.

CAMPBELL IL, KRUCKER T, STEFFENSEN S, AKWA Y, POWELL HC, LANE T, CARR DJ, GOLD LH, HENRIKSEN SJ AND SIGGINS GR. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- α . **Brain Research**, v. 835, p. 46-61, 1999.

CARMODY, R. J.; CHEN, Y.H. Nuclear Factor-kB: Activation and regulation during Toll-like receptor signaling. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, p. 31-41, 2007.

CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BOHNERT, C.; ZAGO, A. M.; ABDALLA, F. H.; VIEIRA, J. M.; et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 378–390, 2016.

- CASTRO, M. R. T.; FERREIRA, A. P. O.; BUSANELLO, G. L.; SILVA, L. R. H.; JUNIOR, M. E. P. S.; FIORIN, F. S et al. Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats. **Journal of Physiology**, v. 595.17, p. 6023–6044, 2017.
- CEVIK, O. S.; SAHINA, L.; TAMER, L. Long term treadmill exercise performed to chronic social isolated rats regulate anxiety behavior without improving learning. **Life Sciences**, v. 200, p. 126–133, 2018.
- CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurology*, v. 5, n. 3, p. 235-45, 2006.
- CHANG, Y. K.; LABBAN, J. D.; GAPIN, J. I.; ETNIER, J. L. The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. **Brain Research**, v. 1453, p. 87-101, 2012.
- CHEN, M.; CHEN, H.; JEN, C. J. Exercise Training Upregulates Macrophage MKP-1 and Affects Immune Responses in Mice. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2173-2179, 2010.
- CHEN, W-W.; ZHANG, X.; HUANG, W-J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 3391-3396, 2016.
- CICCHETTI, F.; PRENSA, L.; WU, Y.; PARENT, A. Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Research. Brain Research Reviews*, v. 34, p. 80-101, 2000.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, p.885–891, 2002.
- COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, p. 464-472, 2007.
- COSTA, R. O.; GADELHA-FILHO, C. V. J.; COSTA, A. E. M.; FEITOSA, M. L.; ARAÚJO, D. P.; LUCENA, J. D. et al. The Treadmill Exercise Protects against Dopaminergic Neuron Loss and Brain Oxidative Stress in Parkinsonian Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUNHA, M. J.; BEN, J.; SOARES, F. M. S.; CECHETTI, F.; VUADEN, F. C.; BONAN, C. D.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. S. Efeito do Exercício Físico na Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e Acetilcolinesterase em Ratas Adultas Ovariectomizadas. **X Salão de Iniciação Científica – PUCRS**, 2009.

DUZEL, E.; VAN PRAAG, H.; SENDTNER, M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? **Brain**, v. 139, n. 3, p. 662-673, 2016.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47–59, 1988.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Central cholinergic systems and cognition. **Annual Review Psychology**, v. 48, p. 649-684, 1997.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The nature of the Binorganic phosphate in voluntary muscle. *Science*, v. 65, n. 1686, p. 401–403, 1927.

FUNCHAL, Cláudia; DANI, Caroline. **Neurociências: modelos experimentais em animais**. 1 ed. EDIPUCRS: Porto Alegre, 2014. 280 p.

FUNK, J. A.; GOHLKE, J.; KRAFT, A. D.; MCPHERSON, C. A.; COLLINS, J. B.; HARRY, G. J. Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: Possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis fator receptor-mediated neurotoxicity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. 1063–1077, 2011.

FURTADO, M.; KATZMAN, M. A. Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 1-2, p. 37-48, 2015.

GALANOS, C., LÜDERITZ, O., RIETSCHEL, E.T., WESTPHAL, O., BRADE, H., BRADE, L., FREUDENBERG, M., SCHADE, U., IMOTO, M., YOSHIMURA, H., KUSUMOTO, S., SHIBA, T. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 148, p.1–5, 1985.

GOODWIN, S. D. Comparison of Body Temperatures of Goats, Horses, and Sheep Measured With a Tympanic Infrared Thermometer, an Implantable Microchip Transponder, and a Rectal Thermometer. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 37, p. 51–55, 1998.

GONÇALVES, C. T. R.; GONÇALVES, C. G. R.; ALMEIDA, F. M.; LOPES, F. D. T. Q. S.; DURÃO, A. C. C. S.; SANTOS, F. A.; SILVA, L. F. F.; MARCOURAKIS, T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; VIEIRA, R. P.; DOLHNIKOFF, M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. **Critical Care**, v. 16, R199, 2012.

GHOSH, S.; MARY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The Open Field Test. **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**, v. 42, p. 1-20, 2009.

GUNN, H.; MARKEVICS, S.; HAAS, B.; MARSDEN, J.; FREEMAN, J. Systematic Review: The effectiveness of interventions to reduce falls and improve balance in adults with multiple sclerosis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, suppl. 0003-9993, n. 15, p. 00455-4, 2015.

HALL, John E. **Fundamentos de Fisiologia**. 13^a ed. Elsevier, 2017. 568p p.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385–403, 1934.

HANSEN, K. F.; SAKAMOTO, K.; WAYMAN, G. A.; IMPEY, S.; OBRIETAN, K. Transgenic miR132 Alters Neuronal Spine Density and Impairs Novel Object Recognition Memory. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15497, 2010.

HEINRICH, D. E.; YETHON, J. A.; WHITFIELD, C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 221–232, 1998.

HEO, S.; CSASZAR, E.; JUNG, G.; BEUK, T.; HÖGER, H.; LUBEC, G. Hippocampal levels and activity of the sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha-3 (AT1A3) are paralleling memory training in the multiple T-Maze

in the C57BL/6J mouse. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 702–712, 2012.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 58-65, 2008.

HOF, P. R. and MOBBS, C. V. (eds): Handbook of the neuroscience of aging. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, pp1-53, 2010.

HOOGLAND, I. C. M.; HOUBOLT, C.; WESTERLOO, D. J. V.; GOOL, W. A. V.; BEEK, D. V. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 1-13, 2015.

HUEY, K. A.; MEADOR, B. M. Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and alphaB-crystallin [corrected] responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 3, p. 1025, 2009.

ISHIZASHI, H.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K.; TSUJITA, J.; HORI, S. Effect of exercise on endotoxin shock with special reference to changes in concentration of cytokines. **Japanese Journal of Physiology**, v. 45, p. 553-560, 1995.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 511-535, 2002.

KATO, T.; KANEKO, S.; KIMIZUKA, R.; OKUDA K. Periodontopathic bacterial endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production was inhibited by exercise in mice. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 262-266, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 816–825, 2006.

KNAB, A. M.; BOWEN, R. S.; MOORE-HARRISON, T.; HAMILTON, A. T.; TURNER, M. J.; LIGHTFOOT, J. T. Repeatability of exercise behaviors in mice. **Physiology & Behavior**, v. 98, n.4, p. 433-40, 2009.

KONDZIELA, W. Eine neue method zur messung der muskularen relaxation bei weissen mausen. **Archive of International Pharmacodynamics and Therapeutics**, v. 152, p. 277-84, 1964.

KRANJAC, D.; KOSTER, K. M.; KAHN, M. S.; EIMERBRINK, M. J.; WOMBLE, B. M.; COOPER, B. G. et al. Peripheral administration of D-cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure. **Behavioral Brain Research**, v. 243, p. 38–43, 2013.

KUNKEL-BAGDEN, E.; HAI-NING, D.; BREGMAN, B. S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v. 119, p. 153–164, 1993.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, p. 2531–2537, 2013.

LEVENSON, R. W.; STURM, V. E.; HAASE, C. M. Emotional and behavioral symptoms in neurodegenerative disease: A model for studying the neural bases of psychopathology. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, p. 581–606, 2014.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787-95, 2006.

LIN, Y.; DONG, J.; YAN, T. et al. Involuntary, forced and voluntary exercises are equally capable of inducing hippocampal plasticity and the recovery of cognitive function after stroke. **Neurological Research**, v. 37, p. 893–901, 2015.

LITTLEFIELD, A. M; SETTI, S. E.; PRIESTER, C.; KOHMAN, R. A. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 1-12, 2015.

LIU, W.; SHENG, H.; XU, Y.; LIU, Y.; LU, J.; NI, X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: Relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. **Behavioural Brain Research**, v. 242, p. 110– 116, 2013.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytocine**, v. 42, p. 145-151, 2008.

LU, C. Y.; LIU, X.; JIANG, H.; PAN, F.; HO, C. S. H.; HO, R. C. H. Effects of Traumatic Stress Induced in the Juvenile Period on the Expression of Gamma-Aminobutyric Acid Receptor Type A Subunits in Adult Rat Brain. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MARISCO, P. C.; CARVALHO, F. B.; ROSA, M. M.; GIRARDI, B. A.; GUTIERRES, J. M.; JAQUES, J. A.; SALLA, A. P.; PIMENTEL, V. C. et al. Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities. **Neurochemistry Research**, v. 38, n. 8, p. 1704–1714, 2013.

MARTIN, S.A.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W.; WOODS, J.A. Voluntary wheel running does not affect lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in young adult and aged mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n.1, p.52-63, 2014.

MARTIN, S.A.; PENCE, B.D.; GREENE, R.M.; et al. Effects of voluntary wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain Behavior Immunology**, v. 29, p. 113-123, 2013.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochemistry Pharmacology*, v. 87, n. 1, p. 162-71, 2014.

MEI, J.; RIEDEL, N.; GRITTNER, U.; ENDRES, M.; BANNEKE, S.; EMMRICH, J. V. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Scientific Reports**, v. 8, p. 3526, 2018.

MELLO, P. B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 2, p. 301-309, 2008.

METZ, G. A. S.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M. E.; FOUAD, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. **Brain Research**, v. 883, p. 165– 177, 2000.

METZ, G. A. S.; WHISHAW, I. Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, p. 169–179, 2002.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; HARTUNG, H-P.; ZETTL, U. K. Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 92, p. 386–404, 2010.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.

MOSELEY, A. E.; WILLIAMS, M. T.; SCHAEFER, T. L.; BOHANAN, C. S.; NEUMANN, J. C.; BEHBEHANI, M. M. et al. Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 616–626, 2007.

MUFSON, E. J.; COUNTS, S. E.; PEREZ, S. E.; GINSBERG, S. D. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1703–1718, 2008.

NAVARRO, F.; BACURAU, A. V. N.; ALMEIDA, S. S.; BARROS, C. C.; MORAES, M. R.; PESQUERO, J. L.; RIBEIRO, S. M. L.; ARAÚJO, R. C.; ROSA, L. F. B. P. C.; BACURAU, R. F. P. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, p. 266-273, 2010.

O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K.; MILLER, D. B. Defining "Neuroinflammation" Lessons from MPTP- and Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1139, p. 318–330, 2008.

PAN, X.; JIANG, T.; ZHANG, L.; ZHENG, H.; LUO, J.; HU, X. Physical Exercise Promotes Novel Object Recognition Memory in Spontaneously Hypertensive Rats after Ischemic Stroke by Promoting Neural Plasticity in the Entorhinal Cortex. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 185, 2017.

PARILLO, J.E. Pathogenic mechanisms of septic shock. **The New England Journal Medical**, v. 328, p. 1471–1477, 1993.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B.; LEE, H.; LEE, J. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. **Nature**, v. 458, p. 1191-1196, 2009.

PEPPLER, W.T.; ANDERSON, Z.G.; MacRAE, L.M.; MacPHERSON, R.E.K.; WRIGHT, D.C. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. **Adipocyte**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

PEPPLER, W.T.; ANDERSON, Z.G.; SUTTON, C.D.; RECTOR, R.S.; WRIGHT, D.C. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. **American Journal of Physiology Regular Integrative Comportamental Physiology**, v.310, p.R934–R942, 2016.

PERSING, D. H., COLER, R. N., LACY, M. J., JOHNSON, D.A., BALDRIDGE, J. R., HERSHBERG, R. M., REED, S. G. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. **Trends Microbiology**, v.10, p. S32–37, 2002.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1154-1162, 2005.

PETRONILHOA, E. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, p. 1-14, 2011.

PFEIFFER R. Untersuchungen über das Cholera gift. **Z Hygiene**, v.11, p. 393–412, 1892.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085-2088, 1998.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAMOS, D.S.; OLIVO, C.R.; QUIRINO SANTOS LOPES, F.D.; et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Medicine and Science Sports and Exercise**, v. 42, n. 1, p.113-119, 2010.

RIETSCHEL, E.T., KIRIKAE, T., SCHADE, F.U., MAMAT, U., SCHMIDT, G., LOPPNOW, H., ULMER, A.J., ZÄHRINGER, U., SEYDEL, U., DI PADOVA, F., SCHREIER, M., BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 217–225, 1994.

ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L. R. M.; MYSKIW, J. C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein

synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 14, p. 36–46, 2007.

ROWSEY, P. J.; METZGER, B. L.; CARLSON, J.; GORDON, C. J. Effects of chronic exercise conditioning on thermal responses to lipopolysaccharide and turpentine abscess in female rats. **Archives of Toxicology**, v. 80, p. 81–87, 2006.

ROYCE, J. R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological Bulletin**, v. 84, p. 1098–1106, 1977.

RYAN, S. M.; KELLY, A. M. Exercise as a pro-cognitive, pro-neurogenic and anti-inflammatory intervention in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Ageing Research Review**, v. 27, p. 77-92, 2016.

SANADA, K.; DÍEZ, M. A.; VALERO, M. S.; PÉREZ-YUS, M. C.; DEMARZO, M. M.; GARCÍA-TORO, M.; GARCÍA-CAMPAYO, J. Effects of non-pharmacological interventions on inflammatory biomarker expression in patients with fibromyalgia: a systematic review. **Arthritis Research Therapy**, v. 17, p. 272, 2015.

SANDOVAL, A. E. G. Exercise in Multiple Sclerosis. **Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America**, v. 24, p. 605–618, 2013.

SERGUTINA, A. V.; RAKHMANOVA, V. I. Brain Acetylcholinesterase Activity in Wistar and August Rats with Low and High Motor Activity (a Cytochemical Study). **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 157, n. 4, p. 450-453, 2014.

SCHEFER, V.; TALAN, M. I. Oxygen consumption in adult aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of diferente intensity. **Experimental Gerontology**, v. 31, n. 3, p. 387-392, 1996.

SCHIMIDT, V. L.; VIEIRA, A.; ALTERMANN, C.; MARTINS, A.; SOSA, P.; SANTOS, F. W. et al. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 242-250, 2014.

SOSA, P. M.; Schimidt, H. L.; Altermann, C.; Vieira, A. S.; Cibir, F. W. S.; Carpes, F. P. et al. Physical exercise prevents motor disorders and striatal oxidative imbalance after cerebral ischemia-reperfusion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p.798-804, 2015.

SOUZA, A. A.; BRAGA, S. A.; SOBRINHO, H. M. R. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Espaço Vida Saudável**, v. 43, n. 1, p.79-89, 2016.

VAN DER SCHYF, C. J. The use of multi-target drugs in the treatment of neurodegenerative diseases. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 293-298, 2011.

SEONG, E.; SAUNDERS, T. L.; STEWART, C. L.; BURMEISTER, M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 2, p. 59-62, 2004.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1777-1782, 1999.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C.S.; SEYMOUR, C.W.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v.315, n.8, p.801–810, 2016.

SMITH, P. F. Lipoglycans from mycoplasmas. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 157-86, 1984.

SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; LIMA, F. D. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 811–823, 2009.

SOUZA, A. A.; BRAGA, S. A.; SOBRINHO, H. M. R. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Estudos Vida e Saúde**, v. 43, n. 1, p. 79-89, 2016.

SOUZA, P. S.; GONÇALVES, E. D.; PEDROSO, G. S.; FARIAS, H. R.; JUNQUEIRA, S. C.; MARCON, R. et al. Physical Exercise Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood-Brain Barrier Disruption. **Molecular Neurobiology**, [Epub ahead of print], 2016.

SPARKMAN, N. L.; MARTIN, L. A.; CALVERT, W. S.; BOEHM, G. W. Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. **Behavioral Brain Research**, v. 159, n. 1, p. 145–151, 2005.

SPARKMAN, N. L.; KOHMAN, R. A.; SCOTT, V. J.; BOEHM, G. W. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1–2, p. 244–251, 2005.

SPARKMAN, N. L.; KOHMAN, R. A.; GARCIA, A. K.; BOEHM, G. W. Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 3, p. 278–288, 2005.

SPIELMAN, L. J.; LITTLE, J. P.; KLEGERISA, A. Physical activity and exercise attenuate neuroinflammation in neurological diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 125, p. 19–29, 2016.

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

SVENSSON, M.; LEXELL, J.; DEIERBORG, T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. **Neurorehabilitation Neural Repair**, v. 29, n. 6, p. 577-89, 2015.

TRIANATAFILOU, M.; TRIANATAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPSactivation cluster. **Trends in Immunology**, v. 23, p. 301–304, 2002.

TUIN, A.; VLAG, A.H.V.D.; VOENEN-WEEMAES, A.M.M.A.V.; MEIJER, D.K.F.; POELSTRA K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 290, p. 377-385, 2006.

VIANNA, S. D.; PITA, I. R.; LEMOS, C.; RIAL, D.; COUCEIRO, P.; RODRIGUES-SANTOS, P. et al. The effects of physical exercise on nonmotor symptoms and on neuroimmune RAGE network in experimental parkinsonism. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, p. 161–171, 2017.

WANG, X.; QUINN, P. J. **Endotoxins: Structure, Function and Recognition**; 1. Ed. Holanda: Springer Netherlands. 2010. 415 p.

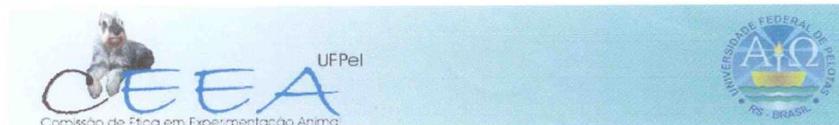
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008**. WHO, Geneva, 2008.

ZAREI, S.; CARR, K.; REILEY, L.; DIAZ, K.; GUERRA, O.; ALTAMIRO, P. F. et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **Surgical Neurology International**, v. 6, p. 171, 2015.

ZHANG, R. U.; XUE, G.; WANG, S.; ZHANG, L.; SHI, C.; XIE, X. Novel Object Recognition as a Facile Behavior Test for Evaluating Drug Effects in A β PP/PS1 Alzheimer's Disease Mouse Model. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 31, n. 4, p. 801-12, 2012.

11. Anexos

ANEXO 1- PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Pelotas, 15 de dezembro de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeitos preventivos de diferentes tipos do exercício físico sobre surtos escleróticos induzidos por encefalomielite alérgica experimental em camundongos”** registrada com o nº 23110.009086/2016-60, sob a responsabilidade de **Airton José Rombaldi** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 12/12/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	16/12/2016 a 01/06/2019	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6	
Nº de animais	138	
Idade	8 semanas	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central - UFPEL	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 9086-2016**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável:

2. Relatório de Trabalho de Campo

(Tese de Nicole Gomes Gonzales)

Relatório de trabalho de campo

Neste relatório serão apresentados de forma detalhada os passos da pesquisa e alguns aspectos importantes que não foram expostos no projeto e nos artigos presentes nesta tese.

Para que a pesquisa ocorresse, inicialmente foi firmada uma parceria com as professoras Francieli Stefanello e Rosélia Spanevello, as quais atuam no departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), que fica localizado no campus Capão do Leão, em Pelotas/RS. Após alguns imprevistos com o tema inicial de pesquisa, foi elaborado um projeto sobre diferentes modelos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e do sistema colinérgico em animais submetidos à neuroinflamação por Lipopolissacarídeo (LPS), o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da mesma instituição referida acima.

Antes mesmo da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, os pesquisadores realizaram a compra de uma esteira motorizada específica para camundongos, da marca Bonther®, para a realização dos protocolos de exercício com os animais. Em razão de atrasos na entrega da esteira, os pesquisadores precisaram modificar o projeto enviado ao Comitê de Ética e solicitaram que os animais utilizados no estudo apresentassem três meses de idade, que era novo prazo previsto pela empresa que elaborou a esteira, para a realização da entrega da mesma. Por falta de financiamento para a pesquisa, a compra da esteira se deu através de verba própria de cada pesquisador, com o valor dividido entre quatro pesquisadores (dois doutorandos, um mestrando e o orientador dos mesmos).

A esteira utilizada no estudo apresenta 10 baias individuais com tampa, onde ao final da mesma há uma grade de choque, que estimula os animais a continuar a realização do exercício. O equipamento ainda apresenta a possibilidade de alterar a inclinação, que varia de -10° à 10° . Juntamente com a esteira, há um visor eletrônico com possibilidade de alteração da velocidade da esteira, da unidade de medida da velocidade, se em metros por minuto (m/min)

ou centímetros por segundo (cm/s) e com um botão para ligar e desligar a mesma.

Logo após a aprovação do projeto no Comitê de Ética em experimentação animal, os pesquisadores se dirigiram ao Biotério Central da UFPel e reservaram pelo período de seis semanas, uma das duas salas disponíveis para a realização dos experimentos. Assim que os animais foram liberados para o início do estudo, os pesquisadores retornaram ao Biotério para que lá fossem instruídos sobre os procedimentos adotados no manuseio e retirada dos animais e sobre as normas de utilização da sala de experimentos. Cabe ressaltar a receptividade dos funcionários deste setor e a disponibilidade e auxílio fornecidos pela veterinária responsável pelo Biotério.

Quase a totalidade das pesquisas com animais realizadas com roedores na UFPel fazem uso do Biotério Central e é lá que os animais ficam acondicionados, sob condições climáticas controladas, com ciclo claro/escuro adequado, onde diariamente os funcionários desse setor realizam a limpeza das salas, verificam a quantidade de água e comida dos animais, além de realizem, duas vezes por semana, a troca dos animais para gaiolas limpas. Adicionalmente, para evitar contaminações e garantir a saúde de todos os animais, todos os pesquisadores que forem retirar animais do Biotério precisam seguir o seguinte protocolo: os pesquisadores devem ingressar pela área “limpa”, com protetores nos pés e jalecos brancos, sem nenhum animal; logo após realizarem a retirada das caixas com os animais que utilizarão na pesquisa, devem sair pela área “suja” e antes de entrarem em contato com a rua novamente, devem retirar os protetores dos pés e as luvas, realizando o descarte das mesmas.

No dia do recebimento dos animais, os pesquisadores acomodaram os mesmos em uma das três salas para roedores existentes no biotério, separando os animais em caixas com no máximo quatro animais cada; além disso, identificaram através de um crachá que ficou afixado na frente de cada caixa, o nome do grupo experimental, o número da caixa, o número de animais por caixa e o nome dos pesquisadores responsáveis pelo estudo, bem como o mês que se iniciou o estudo.

As coletas de dados iniciaram no período da manhã, especificamente as 8h30min, do mês de julho de 2017. Nos primeiros dias de estudo, verificou-se que os animais ainda se encontravam no ciclo claro e por isso se encontravam sonolentos e com pouca disposição para realizar a corrida na esteira. Em razão disso, a intervenção foi inteiramente realizada no período da tarde, iniciando as 13h30min.

Os pesquisadores sempre retiravam os animais suspensos pela cauda e os colocavam delicadamente na esteira, sempre evitando a realização de movimentos bruscos, tanto com os animais quanto no manuseio da esteira, além de conversas altas e utilização de perfumes ou qualquer outro cheiro forte que pudesse afetar os animais. Na sala de experimentos, os pesquisadores ajustaram o ar condicionado para 22°C para manter o ambiente neutro, exceto nos dias mais frios, que a temperatura do ar precisava ser de aproximadamente 25°C, para evitar hipotermia dos roedores.

O presente estudo utilizou três grupos experimentais: o grupo sedentário (que não realizava exercício - GC) (n=10), o grupo exercício contínuo de intensidade moderada (em que os animais realizavam corridas contínuas na esteira - GCON) (n=10) e o grupo exercício intermitente de alta intensidade (em que os animais realizavam estímulos curtos na esteira com intensidade elevada acompanhados por períodos de recuperação ativa - GHIIT) (n=10).

Para a realização da intervenção eram necessários pelo menos quatro pesquisadores para auxiliar na coleta, especificamente quando se tratava do grupo de exercício intermitente de alta intensidade, já que a estimulação elétrica utilizada era baixa e os animais muitas vezes optavam por ficar neste espaço em vez de correr e, constantemente, os pesquisadores precisavam fornecer incentivos manuais, realizando pequenos toques ou assopros nos roedores para que continuassem correndo.

O primeiro grupo retirado do Biotério para a sala de experimentação era o sedentário, sendo os animais colocados na esteira unicamente para passar pelo mesmo estresse do manuseio e do contato com o equipamento que os demais animais, porém sem realizar o exercício. Os pesquisadores seguiram uma ordem de colocação dos animais na esteira, onde sempre iniciavam

colocando os mesmos da direita para a esquerda nas baias, para que sempre os mesmos animais retornassem para as mesmas caixas, sendo retirados também sempre na mesma ordem em que foram colocados.

O segundo grupo a se exercitar era o de exercício contínuo de intensidade moderada (GCON), em que os animais iniciaram correndo por 20 minutos por sessão e com a aplicação do princípio da sobrecarga, finalizaram com 60 minutos de exercício por sessão de treinamento.

O último grupo que era colocado na esteira em cada dia era o de exercício intermitente de alta intensidade (GHIIT), em que os animais realizavam nos dias pares um HIIT longo (três minutos por estímulo) e nos dias ímpares um HIIT curto (30 segundos por estímulo) e assim como no outro grupo de exercício, o princípio da sobrecarga foi aplicado e o número de estímulos realizados pelos animais em cada sessão foi sendo aumentando a cada dia.

Os pesquisadores iniciaram treinando os grupos experimentais com estimulação elétrica de 0,5 mA, para evitar que os mesmos sofressem alguma lesão ou se machucassem ao tocar na grade de eletrificada. No entanto, essa intensidade fazia com que os animais ficassem sobre a da grade sem realizar o exercício. Em razão disso, a partir da segunda sessão de treinamento, o estímulo foi aumentado para 1,5 mA (o que segundo a literatura ainda é um valor baixo e aceitável para estudos com animais).

Porém esse fato não fez com que os animais corressem mais e necessitassem de menos estímulos manuais dos pesquisadores e diante de tal fato, os pesquisadores necessitaram contatar mais ajudantes para que a partir do terceiro dia de treinamento, pelo menos cinco pesquisadores atuassem na intervenção.

Cabe destacar que, por diversas vezes, em razão das atividades acadêmicas e pessoais dos ajudantes de pesquisa, não se tinha o número mínimo de quatro auxiliares e neste momento do estudo os auxiliares de bioterismo da UFPel fizeram toda a diferença. Esses funcionários desempenham um importante papel no biotério, o qual está relacionado com a

limpeza e organização das salas em que os animais se encontram. No entanto, para essa pesquisa, gentilmente se disponibilizaram a ajudar os pesquisadores na coleta de dados, onde por inúmeras vezes acumularam tarefas diárias e até mesmo, excediam seu horário de trabalho, para que a presente pesquisa pudesse ocorrer. Sem dúvida, este auxílio foi peça chave para que a pesquisa ocorresse com qualidade e tranquilidade.

Outro fato inusitado que ocorreu durante o estudo, está relacionado com a estrutura da esteira. Na segunda sessão de treinamento, um dos animais do grupo contínuo percebeu que o equipamento possui uma tampa e vendo que poderia sair daquele espaço sem o auxílio dos pesquisadores, iniciou a realizar contínuos saltos contra tampa da mesma e como um dos objetivos do estudo era investigar parâmetros cerebrais, as “cabeçadas” dadas por aquele animal afetariam sobremaneira esse desfecho e em razão disso, esse animal precisou ser retirado do treinamento e posteriormente excluído do estudo.

Outro ponto de destaque se refere a técnica desenvolvida para medir a temperatura dos animais. Inicialmente, para padronizar a medida de temperatura corporal e verificar se, efetivamente, o termômetro infravermelho utilizado estava medindo a temperatura correta, os pesquisadores fizeram uso de outros camundongos fêmeas que não participavam do estudo para verificar a concordância entre resultados das medidas retais (realizadas com um termômetro convencional), com os das medidas realizadas pelo termômetro infravermelho, o qual era apontado para a região anogenital dos mesmos animais.

Após a comparação dos resultados, os pesquisadores identificaram que as medidas concordavam entre si. A maior dificuldade que permaneceu logo após a comparação dos resultados, estava no fato de garantir que os animais permanecessem alguns segundos imóveis para que o laser do termômetro infravermelho fosse apontado para a região anogenital dos mesmos. Na primeira tentativa, optou-se por cobrir os animais com um pano limpo e imobilizá-lo contra uma superfície plana. Todavia, o animal ficava estressado, fazia força e tentava morder os pesquisadores, aumentando assim, seu nível de estresse. Como a utilização do termômetro infravermelho foi escolhido para

evitar estressar os animais, esta técnica foi desconsiderada pelos pesquisadores.

Com isso, os pesquisadores optaram por suspender os animais pela cauda, de modo a manter as patas dianteiras dos mesmos em contato com a serragem da caixa que ficavam armazenados e dessa forma, os animais não ficavam estressados e seu comportamento se resumia a cavar a serragem para tentar fugir, porém sem reagir contra os pesquisadores. Assim como a esteira motorizada, o termômetro infravermelho utilizado por adquirido pelos próprios pesquisadores.

No dia anterior ao da eutanásia e no dia em que a mesma ocorreu, os pesquisadores dividiram as funções que cada um deveria executar para garantir agilidade na coleta dos materiais e nos testes realizados com os animais. No entanto, no que se refere a aferição da temperatura, por um descuido dos auxiliares de pesquisa, três animais do grupo HIIT chegaram ao laboratório para ser eutanasiados e foram mortos sem ter realizado a última medida da temperatura corporal.

Por fim, cabe destacar que pela falta de financiamento e de modo a reduzir os custos com a pesquisa, parcerias adicionais foram realizadas para que fossem realizadas as análises de alguns parâmetros do estudo. Com isso, os kits para medir os parâmetros oxidativos e o LPS foram adquiridos com as professoras do curso de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas.

Além do apoio financeiro, se faz importante relatar o enorme apoio fornecido pelos alunos do grupo de pesquisa das professoras Rosélia e Francieli, os quais auxiliaram na coleta dos tecidos, análise dos parâmetros cerebrais e inflamatórios e testes comportamentais utilizados.

3. Artigo original

(Tese de Nicole Gomes Gonzales)

O artigo será traduzido para o inglês, submetido ao periódico Acta Physiologica e já se encontra formatado nas normas do mesmo, as quais podem ser encontradas no Anexo 1.

Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre atividade locomotora, memória e atividades das enzimas acetilcolinesterase e sódio potássio ATPase em animais submetidos à neuroinflamação por LPS

Resumo

Objetivos: Comparar os efeitos de seis semanas de exercício intermitente de alta intensidade e exercício contínuo de intensidade moderada sobre atividade locomotora, memória e atividade das enzimas AChE e Na⁺K⁺-ATPase de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 induzidas à neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS). **Métodos:** Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (GC) (n=10), grupo exercício contínuo de intensidade moderada (GCON) (n=10) e grupo exercício intermitente de alta intensidade (GHIT) (n=10). Setenta e duas horas após a última sessão de exercício os animais receberam uma injeção com 250 µg/kg de LPS advindos da bactéria *Escherichia coli*. **Resultados:** Os protocolos de exercício físico não modificaram nenhum dos parâmetros avaliados pelo teste de campo aberto. O grupo HIIT apresentou maior percentual de exploração do objeto no teste de memória de reconhecimento de objetos em comparação com o grupo GCON [F(2,25)=5,01, p=0,01]. O grupo HIIT apresentou maior atividade da enzima AChE e reduzida atividade da enzima da Na⁺K⁺-ATPase em córtex cerebral e o GCON demonstrou maior atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase no hipocampo. **Conclusão:** Seis semanas de exercício intermitente de alta intensidade e contínuo de intensidade moderada foram moderada geraram melhoras na memória de curto prazo dos animais, observada através do teste de memória de reconhecimento de objetos, com resultados mais significativos no grupo HIIT em comparação com os demais grupos. Após o treinamento

foram observadas elevações na atividade da AChE e reduções na Na⁺K⁺-ATPase no córtex cerebral de animais que realizaram HIIT. Estudos adicionais são necessários para verificar quais mecanismos neuroquímicos estão relacionados ao exercício físico e de que forma interferem no padrão comportamental e na memória dos animais.

Palavras-chave: Exercício aeróbio; Treinamento intermitente de alta intensidade; Campo aberto; Memória de reconhecimento de objetos; AChE; Na⁺K⁺-ATPase.

1. Introdução

Segundo O'Callagan, Sriram e Miller¹, a neuroinflamação é caracterizada por uma degeneração no sistema nervoso central (SNC) em que ocorrem significativas perdas nas estruturas e funções neuronais, as quais resultam em desequilíbrios funcionais e mentais.

Esses desequilíbrios afetam especialmente adultos de meia idade e idosos² e podem levar a ocorrência de inúmeras doenças degenerativas como o mal de Parkinson³ e de Alzheimer⁴, esclerose múltipla⁵, esclerose lateral amiotrófica⁶, além de doenças neuropsiquiátricas como a depressão e a ansiedade, entre outras^{7,4}.

Em virtude da complexidade dessas doenças e pelo alto grau invasivo causado pelas enfermidades, os modelos animais têm sido amplamente utilizados para estudar neuroinflamação⁸⁻¹². Neste cenário, a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS) é um dos modelos mais utilizados pelos pesquisadores em razão do baixo custo de aquisição dessa toxina e pela alta efetividade na indução da inflamação⁹. Estudos que investigaram os níveis

dessa endotoxina em animais, verificaram que os mesmos respondem ao LPS através da alteração da temperatura corporal (com febre ou hipotermia), aumentos na frequência respiratória e cardíaca e diminuição do número de leucócitos¹⁰⁻¹³.

Novas terapias vêm sendo utilizadas, tanto de forma adjuvante ou isoladas, que incluem a realização de exercício físico, no sentido de fornecer alternativas menos invasivas e com menor custo para os pacientes¹⁴⁻¹⁵. No entanto, estudos em que há a utilização de protocolos de exercício físico, focam suas intervenções em atividades de baixa e moderada intensidade, especialmente através de exercício contínuo (como caminhada, corrida e natação) e em virtude disso, justifica-se a realização do exercício intermitente de alta intensidade, de modo a compreender os efeitos crônicos do mesmo na prevenção de doenças neurodegenerativas¹⁶⁻¹⁸.

Do mesmo modo, as patologias neurodegenerativas causam em sua maioria déficits cognitivos e motores, de forma que, nos modelos animais de neuroinflamação, são comumente verificadas alterações significativas na locomoção e na coordenação motora¹⁹. Em razão disso, faz-se necessário investigar parâmetros comportamentais em estudos com animais, no sentido de verificar o grau de extensão da doença e de debilidade física dos mesmos.

Adicionalmente, diversos estudos têm mostrado que o exercício físico atua na modulação da memória, promovendo a neurogênese e neuroplasticidade hipocampal, melhoras na aprendizagem, memória espacial, elevando os níveis de fatores neurotróficos no cérebro como BDNF e GDNF, além de gerar reduções na perda neuronal, estresse oxidativo hipocampal, declínio cognitivo, etc²⁰⁻²⁴.

A investigação de parâmetros cerebrais associados ao exercício em animais também tem sido foco dos pesquisadores na atualidade, no sentido de verificar mecanismos adicionais que auxiliem no combate a doenças neurodegenerativas. Dessa forma, a análise da atividade de enzimas como a acetilcolinesterase (AChE) e sódio potássio ATPase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$), que estão altamente relacionadas com a transmissão dos impulsos nervosos, são necessárias nesse processo. Entretanto, observa-se uma escassez de estudos que tenham investigado essa associação em animais exercitados submetidos à neuroinflamação por LPS.

Por essa razão, este estudo teve como objetivo determinar os efeitos de seis semanas de diferentes modelos de exercício - intermitente de alta intensidade e contínuo de intensidade moderada, sobre a atividade locomotora, memória e atividade das enzimas acetilcolinestraxe e Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$ em cérebro de camundongos submetidos a um modelo de neuroinflamação induzido por LPS.

2. Resultados

Dos 30 animais que iniciaram no estudo, dois foram excluídos por se refugarem a corrida, totalizando um número total de 28 animais para análise final (grupo sedentário: $n=10$; grupo contínuo: $n=9$; e grupo HIIT: $n=9$).

A temperatura corporal foi determinada no presente estudo como variável controle, de modo a confirmar os efeitos da inoculação da endotoxina. Neste sentido, verificou-se que o LPS atuou na medida que, em relação a linha de base, reduziu significativamente a temperatura corporal dos animais sedentários [$F(3,27)=11,15$, $p<0,001$], porém sem modificar a variável entre

os animais exercitados [grupo contínuo: $F(3,24)=2,27$, $p=0,15$; grupo HIIT: $F(3,21)=3,19$, $p=0,12$] (dados não apresentados em tabelas ou figuras).

Em referência ao teste de campo aberto, nota-se que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas no que se refere ao número de cruzamentos periféricos [$F(2,25)=0,69$, $p=0,5$], centrais [$F(2,25)=2,24$, $p=0,1$] e totais [$F(2,25)=0,83$, $p=0,4$], bem como no número de fezes deixadas no local pelos animais [$F(2,25)=0,7$, $p=0,5$] e tempo que os mesmos permaneceram nos quadrantes centrais, entre os grupos investigados [$F(2,24)=1,58$, $p=0,2$] (figura 2).

A figura 3 apresenta o resultado do teste de memória de reconhecimento de objetos. Nota-se que o grupo HIIT apresentou um percentual de exploração maior do que o grupo contínuo [$F(2,25)=5,01$, $p=0,01$], sendo que a média do percentual de exploração do HIIT foi mais que o dobro do grupo contínuo (63,12% contra 25,29%, respectivamente).

No que se refere a atividade cerebral da acetilcolinesterase (AChE), observou-se que 12 horas após a injeção do LPS, o grupo HIIT apresentou uma maior atividade dessa enzima no córtex cerebral em comparação com o grupo sedentário [$F(2,12)=9,21$, $p=0,004$]. Em adição, houve tendência linear ($p=0,002$), indicando que quanto maior é a intensidade do exercício, maior são os efeitos crônicos da ativação da AChE mediante LPS (figura 5). Concomitantemente, nota-se que os modelos de exercício não influenciaram na atividade da AChE no hipocampo [$F(2,12)=0,34$, $p=0,7$] (figura 4).

A figura 4 apresenta também os resultados da atividade da enzima sódio potássio ATPase (Na^+, K^+ -ATPase), onde nota-se que, após 12 horas da administração do LPS, o grupo HIIT apresentou uma menor atividade desta

enzima no córtex cerebral, em comparação com o grupo controle [$F(2,9)=4,81$, $p=0,04$], e o grupo contínuo apresentou uma maior atividade no hipocampo quando comparado ao HIIT [$F(2,9)=8,81$, $p=0,008$]. Adicionalmente, percebe-se que houve uma tendência linear de queda da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no córtex cerebral conforme a intensidade do exercício aumenta ($p=0,01$).

3. Discussão

Pode-se verificar que no presente estudo a neuroinflamação induzida por LPS de fato aconteceu, pois observou-se que a temperatura corporal dos animais sedentários, teve uma queda estatisticamente significativa, após a injeção da endotoxina e permaneceu mais baixa até doze horas após. Nesse sentido, as modificações observadas pelos modelos de exercício são válidas nesse contexto e pelo menos em relação à temperatura corporal, ambos os protocolos de exercício foram efetivos para prevenir sua queda.

No que se refere aos parâmetros comportamentais investigados, o teste de campo aberto não apresentou diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos aspectos avaliados, o que representa um dado positivo, pois demonstra que o teste de memória de reconhecimento de objetos não foi influenciado por possíveis déficits locomotores entre os grupos.

Com isso, podemos perceber que o teste de memória de reconhecimento de objetos apresentou diferenças estatisticamente significativas onde o grupo HIIT apresentou um maior percentual de exploração ($p=0,01$), indicando que esse grupo apresentou uma melhora na memória em relação aos demais grupos. Ressalta-se que este foi o primeiro estudo avaliando esse teste em animais exercitados posteriormente submetidos ao

LPS, tornando-o um achado muito relevante pois essa endotoxina é fator determinante para neuroinflamação e, conseqüentemente, perda de memória²⁸.

Corroborando com o parágrafo anterior, cabe destacar que um estudo prévio da literatura também já demonstrou através do teste de reconhecimento de objetos que administração de LPS causa déficits de memória. Tais efeitos do LPS na memória podem estar associados ao aumento nos níveis de estresse oxidativo, redução na Na⁺ K⁺ ATPase e aumento nas citocinas pró-inflamatórias induzidas²⁹.

Os achados do nosso estudo corroboram, ao menos em parte, com outros dados da literatura, os quais também já demonstraram que o exercício físico é capaz de melhorar a memória. Piao e colaboradores³⁰ verificaram que animais com traumatismo craniano, que realizaram atividade física de forma aguda na roda livre apresentaram uma melhora na memória no teste de reconhecimento de objetos, quando comparado ao grupo sedentário. Do mesmo modo, Griffin et al.³¹ constataram que ratos Wistar machos submetidos a um protocolo de uma semana de exercício contínuo de intensidade moderada na esteira apresentaram maior exploração no teste de reconhecimento de objetos no período teste em comparação ao treino, indicando que o exercício induziu melhoras na performance dos animais neste aspecto.

Entretanto é importante destacar que de acordo com os nossos resultados, os déficits de memória induzidos por um modelo de neuroinflamação só foram prevenidos com exercícios mais intensos como o HIIT. Um possível mecanismo que explique esse achado, se deve ao reforço das defesas antioxidantes advindas de uma maior intensidade, que já se mostrou superior ao modelo de exercício em intensidade moderada, e isso

pode ter evitado desequilíbrios de memória e aprendizagem²⁴. Em razão disso, futuros estudos devem ir em busca dos mecanismos bioquímicos chave que fazem com que o exercício intermitente de alta intensidade se sobressaia positivamente aos demais modelos de treinamento.

Para elucidar os mecanismos neuroprotetores do exercício físico frente a neuroinflamação induzida por LPS, o presente estudo avaliou a atividade das enzimas Na⁺K⁺-ATPase e AChE, as quais têm fornecido importantes informações sobre o aprendizado e memória e estão correlacionadas com a sinapse colinérgica e com a excitação do SNC³²⁻³³.

Nesse sentido, foi constatado que a atividade da enzima e AChE foi aumentada no córtex cerebral do grupo HIIT em comparação ao grupo sedentário ($p=0,004$), com tendência linear de aumento conforme aumento da intensidade do exercício ($p<0,01$). Além disso, não foram observadas alterações na atividade desta enzima no hipocampo dos animais exercitados.

A enzima AChE é umas das principais enzimas envolvidas na degradação do neurotransmissor acetilcolina e um aumento na atividade desta enzima tem sido discutido em vários modelos experimentais como um dos mecanismos envolvidos em déficits de memória devido ao fato disso levar a uma diminuição da acetilcolina na fenda sináptica³⁴⁻³⁶.

Embora não possamos explicar o exato mecanismo pelo qual o HIIT aumentou a atividade desta enzima em córtex cerebral de ratos expostos ao LPS, é importante considerar que este aumento pode estar associado ao fato que o exercício físico leva a uma maior produção de neurotransmissores, inclusive de acetilcolina. Assim, um aumento na atividade da AChE seria importante no controle dos níveis basais de acetilcolina para manter o

organismo em homeostase³⁷. Além disso, o córtex cerebral se relaciona mais ao aspecto motor dos animais³⁸. Como os grupos não tiveram diferenças no teste de campo aberto, e isso indica que eles não apresentaram diferenças nas questões motoras, tem-se mais um indício de que a elevação da AChE encontrada não se relacionou com reduções clinicamente relevantes de acetilcolina.

No entanto, verifica-se que a atividade da AChE pode variar de acordo com os diferentes protocolos de exercício e nesse sentido, Vanzella e colaboradores²⁶ realizaram quatro semanas de exercício contínuo de intensidade moderada em esteira com ratos Wistar machos jovens, adultos e idosos e encontraram que a atividade da AChE foi diminuída no hipocampo após o treinamento cognitivo nos animais idosos, porém sem diferenças em relação ao exercício físico. Ademais, quatro semanas de exercício contínuo de intensidade moderada não foram suficientes para modificar a atividade da AChE em ratos Wistar fêmeas adultas³⁹.

No que se refere a atividade da sódio potássio ATPase (Na^+, K^+ -ATPase), foi verificado que a atividade da mesma foi reduzida nos animais que realizaram HIIT ($p=0,04$), tanto no córtex cerebral em relação ao sedentário e no hipocampo em relação ao contínuo, e houve tendência de diminuição da atividade dessa enzima no córtex cerebral conforme a intensidade do exercício aumentava.

Os resultados obtidos no nosso estudo foram diferentes dos descritos por Vieira e colaboradores²⁹. Neste estudo os pesquisadores demonstraram que após seis semanas de HIIT ocorreu um aumento na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase tanto em córtex cerebral quanto em hipocampo de ratos. Os

autores explicam que esse achado foi suprimido pela cafeína e os resultados ainda são inconclusivos, visto que essa substância gera uma série de alterações em associação com o exercício e mais estudos são necessários no sentido de verificar o efeito isolado do exercício físico na atividade da Na^+K^+ -ATPase.

Em contrapartida, quando a intervenção foi realizada com exercício contínuo de intensidade moderada, Ben e colaboradores³⁹ obtiveram que 1 mês desse tipo de treinamento em ratos Wistar fêmeas foi incapaz de afetar a atividade da Na^+K^+ -ATPase no córtex cerebral dos animais, indicando que intensidades maiores sejam necessárias para ocorrer a modulação dessa enzima.

Obtendo resultados contrários aos supracitados, assim como no presente estudo, Teixeira et al.⁴⁰ em seu trabalho com diferentes protocolos de dieta associados ao exercício físico em esteira, demonstraram que animais exercitados alimentados com gordura vegetal hidrogenada e banha, apresentaram uma redução significativa dos níveis de Na^+K^+ -ATPase no hipocampo cerebral em comparação com seus pares sedentários e sem diferenças significativas da atividade dessa enzima no hipocampo. Tais achados sugerem que uma dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados traz inúmeros malefícios a saúde, inclusive alterações cerebrais e o exercício físico pode proteger contra déficits de aprendizagem. No entanto os efeitos do exercício na atividade dessa enzima, como bem como a sua influência nas funções neuronais, merecem maiores investigações no sentido de compreender os exatos mecanismos que auxiliam na memória e aprendizado.

Porém, os resultados referentes à enzima Na^+, K^+ -ATPase são de difícil discussão, pois contradizem a resposta encontrada no teste de memória e reconhecimento de objetos. Pois, enquanto o teste de memória indica que o HIIT foi mais eficiente para prevenir os déficits de memória induzidos pela administração do LPS, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase diminuiu no hipocampo em comparação ao grupo contínuo, indicando um prejuízo à memória.

Da mesma forma, os grupos de animais não tiveram diferenças no teste de campo aberto, indicando que a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex no grupo HIIT não interferiu nos aspectos motores dos animais. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que existem outros moduladores mais expressivos do que a Na^+, K^+ -ATPase que respondem positivamente ao exercício e expliquem a melhora na memória de curta duração.

Conclui-se com o presente estudo, que seis semanas de exercício intermitente de alta intensidade, quando comparado ao exercício contínuo de alta intensidade, gerou melhoras significativas na memória de curto prazo dos animais. Os autores concluem ainda, que o grupo HIIT apresentou maior atividade da enzima AChE e reduzida atividade da enzima da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral, além de aumentos da atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de animais que realizaram exercício contínuo de intensidade moderada, o que contradiz os resultados encontrados no testes comportamentais.

De forma a elucidar os mecanismos pelos quais as enzimas $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase e AChE participam nesse processo, faz-se necessário que novos

estudos avaliem parâmetros bioquímicos adicionais, especialmente os níveis do neurotransmissor acetilcolina.

4. Materiais e Métodos

4.1. Delineamento

Trata-se de estudo experimental de modelo pré-clínico.

4.2. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados 30 camundongos fêmeas (110 dias de idade) da espécie C57BL/6, divididas de forma aleatória entre os grupos de experimentação (10 animais por grupo). O cálculo de tamanho de amostra foi baseado nos resultados da atividade da Na^+K^+ -ATPase, do estudo de Souza et al.⁴¹, totalizando cinco animais por grupo, para um poder de 90% e um alfa (erro do tipo 1) de 1% e baseado nos valores do teste de campo aberto do estudo de Hsueh et al.⁴², totalizando cinco Artigos que utilizaram a medida da atividade da enzima AChE não permitiram que fosse realizado o cálculo de tamanho de amostra, de modo que, com o n utilizado, o cálculo de poder a posteriori determinou o poder foi de 99%.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas e mantidos em condições experimentais controladas com água e comida “ad libitum”, distribuídos em gaiolas contendo quatro animais cada e com o ciclo claro/escuro de 12 h, sendo que o treinamento foi realizado no período da tarde.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 23110.009086/2016-60.

4.3. Randomização e protocolo de treinamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: controle (sedentário) (n=10), exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) (n=10) e exercício contínuo de intensidade moderada (contínuo) (n=10).

A intensidade dos exercícios dos grupos HIIT e contínuo foi baseada no estudo de Schefer e Talan⁴³ em que camundongos C57BL/6 chegaram à exaustão à velocidade de 25 m/min, sendo essa a velocidade correspondente ao consumo máximo de oxigênio (vVO_{2max}). Devido ao fato que essa linhagem é considerada isogênica⁴⁴, sua compatibilidade genética é muito próxima de 100%, sendo plausível utilizar os resultados do estudo acima⁴⁵ para prever a vVO_{2max} de outros camundongos C57BL/6.

Com isso, os animais do grupo HIIT se exercitaram baseados em uma adaptação do protocolo descrito em Afzalpour et al.⁴⁶, em esteira própria para roedores da marca Bonther® composta por dez baias para camundongos com uma faixa de velocidade variando de 10 a 100 cm/s e com inclinação de zero grau. Eles iniciaram seus treinamentos da seguinte forma: nos dias ímpares, realizaram quatro esforços de 30 segundos de duração a uma intensidade correspondente a 100% da vVO_{2max} (i.e.: 25 m/min), separados por intervalos de 60 segundos.

Alternadamente, nos dias pares, os animais se exercitaram realizando três esforços de três minutos a uma intensidade correspondente a 90% da vVO_{2max} (i.e.: 22 m/min), separados por intervalos de 60 segundos. Todos os intervalos foram realizados de forma ativa a 68% da vVO_{2max} (i.e.: 17 m/min) em ambas intensidades (Tabela 1).

Os camundongos do grupo contínuo também se exercitaram baseados em uma adaptação do protocolo descrito em Afzalpour et al.⁴⁶, em esteira própria para roedores. O treinamento iniciou a uma intensidade de 80% da vVO_{2max} (i.e.: 20 m/min) com duração de 20 minutos ininterruptos. O princípio da sobrecarga foi exercido pelo aumento na duração e do número de esforços nos grupos contínuo e HIIT, respectivamente, como descrito na tabela 1. Os animais foram estimulados a correr através de estimulações manuais suaves dos pesquisadores e por choques elétricos de baixa intensidade (1,5 mA), os quais ocorriam quando os camundongos encostavam na parte de trás da respectiva baia.

Anteriormente ao início do treinamento, os grupos supracitados foram familiarizados com a corrida numa esteira motorizada própria para roedores com uma sessão de caminhada contínua com duração de 30 minutos, sendo os primeiros 15 minutos a uma velocidade de 10 m/min e o restante a uma velocidade de 16 m/min. O treinamento ocorreu durante cinco dias na semana, por seis semanas consecutivas. Caso algum animal se recusasse a correr, permanecendo cinco segundos no final da esteira, o mesmo seria retirado do equipamento e excluído do estudo.

O grupo sedentário também foi exposto a manipulação e ao equipamento em que ocorreu o treinamento, porém sem realizar o exercício.

4.4 Modelo animal de inflamação

Setenta e duas horas após a última sessão de treinamento físico, foi administrada uma injeção intraperitoneal de LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli* (055:B5) obtida pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O LPS foi dissolvido em soro fisiológico sendo utilizada a dosagem de 250 µg/kg, como descrito anteriormente⁴⁷⁻⁴⁹.

4.5 Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a indução de LPS, através de anestesia profunda e perfusão transcardíaca, onde foi realizada a retirada do cérebro dos animais, o qual foi dissecado e as estruturas cerebrais córtex e hipocampo foram retiradas para a posterior análise bioquímica.

A figura 1 ilustra a logística do experimento, desde a familiarização dos grupos contínuo e HIIT à esteira motorizada, até a eutanásia.

4.6 Medida da temperatura corporal

Verificou-se a temperatura corporal dos animais, como variável de controle, objetivando verificar o impacto do LPS, no momento prévio à administração do LPS e em três momentos posteriores à administração (uma, seis e 12 horas após) através de um termômetro infravermelho modelo FR1DZ1 da marca G-Tech. Para avaliação dessa medida, os pesquisadores suspendiam o animal pela cauda e o deixavam em contato com a serragem da caixa em que eles ficavam armazenados e o laser era apontado para o esfíncter anal dos roedores.

4.7 Parâmetros comportamentais

4.7.1 Teste comportamental de campo aberto

O teste comportamental de campo aberto foi realizado no dia anterior da eutanásia e teve como objetivo avaliar a atividade locomotora dos animais. O aparato utilizado consistiu em uma caixa medindo 56 cm x 40 cm x 30 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais, medindo 12 cm x 12 cm cada um. A sessão de campo aberto teve duração de 5 minutos com cada animal e durante este tempo, um observador registrou o número de quadrantes cruzados pelos animais (periféricos e centrais), o tempo em que os animais permaneceram nos quadrantes centrais, o número de *rearings* (elevação das patas dianteiras) realizados e a quantidade de fezes deixada pelos animais na caixa, quando houve⁵⁰.

Nesse teste, a maior exploração dos quadrantes centrais, o maior tempo que os animais permanecem nesse espaço e o maior número de *rearings* realizados, indicam que estão menos debilitados fisicamente. O número de dejetos deixados pelos roedores durante o teste indica que, quanto maior o número de fezes depositadas no espaço de teste, mais estressados se encontram os animais.

4.7.2 Teste de memória de reconhecimento de objetos

O teste de memória de reconhecimento de objetos foi realizado no dia da eutanásia e o mesmo baseou-se no estudo de Mello et al.²⁰. No teste foram fixados objetos de plástico no piso de numa caixa experimental medindo 56 cm x 40 cm x 30 cm. No primeiro dia, os animais foram colocados em contato com dois objetos iguais (A) e puderam explorar livremente os mesmos por 5 minutos. O

teste foi repetido 180 minutos mais tarde, onde um dos objetos foi trocado por outro (B) para testar a memória de curto prazo (MCP), após o programa de treinamento físico e cada animal foi introduzido na arena por mais 5 minutos. As posições dos objetos (familiares ou novos) foram permutadas aleatoriamente para cada animal experimental e a caixa foi limpa entre os ensaios.

A exploração ficou definida como cheirar ou tocar no objeto com o nariz e/ou patas dianteiras. Sentar-se ou virar-se ao redor do objeto não foi considerado um comportamento exploratório. O tempo que o animal expendeu para explorar cada objeto foi gravado por um observador cego ao tratamento e expresso posteriormente como a porcentagem do tempo total de exploração que foi calculado em segundos⁵¹.

5 Análise em estruturas cerebrais

5.1 Determinação da atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase

A atividade da Na⁺ K⁺ ATPase foi medida no sobrenadante de córtex, hipocampo e extraído como descrito previamente no estudo de Carvalho et al.⁵² com pequenas modificações. O meio de ensaio consistiu em tampão 30 Tris-HCl (inmM) (pH 7,4), 0,1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl₂ e 100 µg de proteína ou ausência de ouabaína (4 mM) num volume final de 200 µl. A reação foi iniciada pela adição de ATP até uma concentração final de 3 mM. Após 30 minutos à 37°, a reação foi encerrada pela adição de 50 µl de TCA a 50% (p/v). Foram utilizadas concentrações de substratos saturantes e a reação ocorreu de forma linear com a proteína e com o tempo. Controles adequados foram incluídos nos ensaios para a hidrólise não enzimática de ATP. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) que foi liberado foi quantificado colorimetricamente, conforme descrito anteriormente⁴⁴,

onde utilizou-se KH_2PO_4 como padrão de referência. A absorvância medida foi de 630 nm.

A atividade específica da Na^+ , K^+ -ATPase foi calculada subtraindo a atividade insensível à ouabaína da atividade total (na ausência de ouabaína) e foi expressa em nmol de Pi/mg de proteína/min.

5.2 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

O córtex cerebral e o hipocampo foram homogeneizadas em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) e centrifugados a 1500 rotações por minuto. A atividade da AChE total foi determinada através do método de Ellman et al.⁵⁴ e expressa em μmoles de AcSCh/h/mg de proteína.

6. Processamento e análise de dados

Os escores foram digitados no programa Excel[®] versão 2013 e, após a checagem para a ocorrência de erros, foram transferidos para o software estatístico STATA 12.0. Inicialmente utilizou-se o teste de Shapiro-wilk para verificar a distribuição das variáveis, e o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias.

Para as análises dos desfechos que apresentaram distribuição paramétrica, entre os grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma entrada, seguindo do *post-hoc* de Bonferroni. Para seus pares não-paramétricos, o comando Ladder foi utilizado para verificar as possíveis normalizações. As variáveis foram transformadas para a opção mais significativa de normalização e a análise transcorreu seguindo o modelo paramétrico. A temperatura corporal foi analisada de modo intra-grupo por uma

ANOVA de medidas repetidas, seguindo o *post-hoc* Tukey HSD e utilizando o valor p da correção de Greenhouse-Geisser. As variáveis foram expressas em média \pm erro padrão (EP) e as variáveis transformadas foram expressas com os valores não transformados. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

7. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

- 1- O'callaghan JP, Sriram K, Miller DB. Defining "Neuroinflammation" Lessons from MPTP- and Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Anna N Y Acad Sci*. 2008;1139:318–330.
- 2- Hoff P, Mobbs C (Eds.). Handbook of the Neuroscience of Aging. 1st ed. Academic Press. 2009. 710 p.
- 3- Souza AA, Braga SA, Sobrinho HMR. Neuroinflamação na doença de Parkinson. *Espaço Vida Saudável*. 2016;43(1):79-89.
- 4- Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016;13:3391-3396.
- 5- World Health Organization. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. WHO, Geneva, 2008.
- 6- Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamiro PF et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015;6:171.

- 7- Furtado M, Katzman ma. Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Res.* 2015;229(1-2):37-48.
- 8- Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* 2010;92:386–404.
- 9- Hoogland ICM, Houbolt C, Westerlo DJV, Gool WAV, Beek DV. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015;12:1-13.
- 10- Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea of comparable definitions. *Ann Inter Med.* 1991;114:332-333.
- 11- Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation.* 2015;12:74.
- 12- Seeman S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci.* 2017;24:60.
- 13- Bone RC, Balk, RA, Cerra FB. et al. American College of Chest physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 1992;101:1644-1655.
- 14- Ryan SM, Kelly AM. Exercise as a pro-cognitive, pro-neurogenic and anti-inflammatory intervention in transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Ageing Res Rev.* 2016;27:77-92.
- 15- Stranahan AM, Martin B, Maudsley S. Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research.* 2012;9(1):86–92.

16- Gonçalves CTR, Gonçalves CGR, Almeida FM, et al. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care*. 2012;16(5):R199.

17- Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(1):113-119.

18- Littlefield AM, Setti SE, Priester C, Kohman RA. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. *J Neuroinflammation*. 2015;12:138.

19- Ribeiro FM, Camargos ERS, Souza LC, et al. Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatri*. 2013;35:S82–S91.

20- Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad*. 2008;80(2):301-309.

21- Tapia-Rojas C, Aranguiz F, Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol*. 2016;26:62–74.

22- Gibbons TE, Pence BD, Petr G, Ossyra JM, Mach HC, Bhattachary TK, Perez S, Martin SA, McCusker RH, Kelleys KW, Rhodesc JS, Johnson RW, Woods JA. Voluntary wheel running, but not a diet containing (-)-epigallocatechin-3-gallate and β -alanine, improves learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Behav Brain Res*. 2014;272 :131–140.

- 23- Kim TW, Sung YH. Regular exercise promotes memory function and enhances hippocampal neuroplasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Neuroscience*. 2017;346:173-181.
- 24- Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav*. 2017;184:6-11.
- 25- Souza LC, Filho CB, Goes ATR, Fabbro LD, Gomes MG, Savegnago L et al. Neuroprotective Effect of Physical Exercise in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Induced by β -Amyloid1–40 Peptide. *Neurotox Res*. 2013;24(2):148-63.
- 26- Vanzella C, Sanches EF, Odoryk FK, Nicola F, Kolling J, Longoni A et al. Forced Treadmill Exercise Prevents Spatial Memory Deficits in Aged Rats Probably Through the Activation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Hippocampus. *Neurochem Res*. 2017;42(5):1422-1429.
- 27- Pan X, Jiang T, Zhang L, Zheng H, Luo J, Hu X. Physical Exercise Promotes Novel Object Recognition Memory in Spontaneously Hypertensive Rats after Ischemic Stroke by Promoting Neural Plasticity in the Entorhinal Cortex. *Front Behav Neurosci*. 2017; 8;11:185.
- 28- Wang X, Quinn PJ. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, 1st edn. Netherlands: Springer Netherlands; 2010.
- 29- Vieira JM, Carvalho FB, Gutierrez JM, Soares MSP, Oliveira OS, Rubin MA et al. Caffeine prevents high-intensity exercise-induced increase in enzymatic antioxidant and Na⁺-K⁺-ATPase activities and reduction of anxiolytic like behaviour in rats. *Redox Rep*. 2017;22(6):493-500.

- 30- Piao CS, Stoica BA, Wu J, Sabirzhanov B, Zhao Z, Cabatbat R et al. Faden. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*. 2013;54:252–263.
- 31- Griffin EW, Bachara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise Enhances Hippocampal-Dependent Learning in the Rat: Evidence for a BDNF-Related Mechanism. *Hippocampus*. 2009;19:973–980.
- 32- Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci*. 2017;134:1-21.
- 33- Fordyce DE, Farrar RP. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behav Brain Res*. 1991;46:123-133.
- 34- Watanabe T, Yamagata N, Takasaki K, Sano K, Hayakawa K, Katsurabayashi S et al. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2009;1249:222–228.
- 35- Watanabea T, Takasakia K, Yamagataa N, Fujiwaraa M, Iwasakia K. Facilitation of memory impairment and cholinergic disturbance in a mouse model of Alzheimer's disease by mild ischemic burden. *Neurosci Lett*. 2013;536:74–79.
- 36- Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Acetylcholinesterase activity in an experimental rat model of Type C hepatic encephalopathy. *Acta Histochem*. 2011;113(3):358-62.
- 37- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci*. 2000;3:120–125.

- 38- Teskey GC, Kolb B. Functional Organization of Rat and Mouse Motor Cortex. *Animal Models of Movement Disorders: Volume II. Neuromethods.* 2011;62:117-137)
- 39- Ben J, Soares FMS, Cechetti F, Vuaden FC, Bonan CD, Netto CA et al. Exercise effects on activities of Na⁺,K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Res.* 2009; 1302: 248-255.
- 40- Teixeira AM, Pase CS, Bouffleur N, Roversi K, Barcelos RCS, Benvegnú DM, et al. Exercise affects memory acquisition, anxiety-like symptoms and activity of membrane-bound enzyme in brain of rats fed with different dietary fats: impairments of trans fat. *Neuroscience.* 2011;195:80–88.
- 41- Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia.* 2009;50(4):811-23.
- 42- Hsueh SC, Chen KY, Lai JH, Wu CC, Yu YW, Luo Y, Hsieh TH, Chiang YH. Voluntary Physical Exercise Improves Subsequent Motor and Cognitive Impairments in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 8;19(2):E508.
- 43- Schefer V, Talan MI. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp Gerontol.* 1996;31(3):387-392.
- 44- Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends in Genetics.* 2004;20(2):59-62.
- 46- Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol Behav.* 2015;147:78–83.

47. Sparkman NL, Kohman RA, Scott VJ, Boehm GW. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. *Physiol Behav.* 2005;86(1–2):244–251, 2005.
48. Sparkman NL, Kohman RA, Garcia AK, Boehm GW. Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 2005;85(3):278–288.
49. Kranjac D, Koster KM, Kahn MS, Eimerbrink MJ, Womble BM, Cooper BG, Chumley MJ, Boehm GW. Peripheral administration of D-cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure. *Behav Brain Res.* 2013;243:38–43.
- 50- Marisco PC, Carvalho FB, Rosa MM, Girardi BA, Gutierrez JM, Jaques JA et al. Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities. *Neurochem Res.* 2013;38(8):1704–1714.
- 51- Rossato JI, Bevilaqua LRM, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2007;14:36–46.
- 52- Carvalho FB, Gutierrez JM, Bohnert C, Zago AM, Abdalla FH, Vieira JM et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *J Nutr Biochem.* 2016;26:378–390.
- 53- Fiske CH, Subbarow Y. The nature of the Binorganic phosphate in voluntary muscle. *Science.* 1927;65(1686):401–403.
- 54- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88-90.

Tabela 1. Protocolos de treinamento dos grupos treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intervalado de alta intensidade.

Semana	Dia	GCON (tempo, intensidade)	GHIIT*	
			(esforços, intensidade, duração do esforço)	
			Dia ímpar	Dia par
Semana 1	1	20 min, 80%	4 esforços, 100%, 30 s	
	2	22 min, 80%		3 esforços, 90%, 3 min
	3	24 min, 80%	6 esforços, 100%, 30 s	
	4	26 min, 80%		3 esforços, 90%, 3 min
	5	28 min, 80%	8 esforços, 100%, 30 s	
Semana 2	1	30 min, 80%		4 esforços, 90%, 3 min
	2	32 min, 80%	10 esforços, 100%, 30 s	
	3	34 min, 80%		4 esforços, 90%, 3 min
	4	36 min, 80%	12 esforços, 100%, 30 s	
	5	38 min, 80%		5 esforços, 90%, 3 min
Semana 3	1	40 min, 80%	14 esforços, 100%, 30 s	
	2	42 min, 80%		5 esforços, 90%, 3 min
	3	44 min, 80%	16 esforços, 100%, 30 s	
	4	46 min, 80%		6 esforços, 90%, 3 min
	5	48 min, 80%	18 esforços, 100%, 30 s	
Semana 4	1	50 min, 80%		6 esforços, 90%, 3 min
	2	52 min, 80%	20 esforços, 100%, 30 s	
	3	54 min, 80%		7 esforços, 90%, 3 min
	4	56 min, 80%	21 esforços, 100%, 30 s	
	5	58 min, 80%		7 esforços, 90%, 3 min
Semana 5-6	1-10	60 min, 80%	21 esforços, 100%, 30 s	7 esforços, 90%, 3 min

*Entre cada esforço haverá um descanso ativo à 68% vVO_{2max} com 60 s de duração. Intensidade: percentual da vVO_{2max}; GCON: treinamento contínuo de intensidade moderada; GHIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; min: minutos; s: segundos.

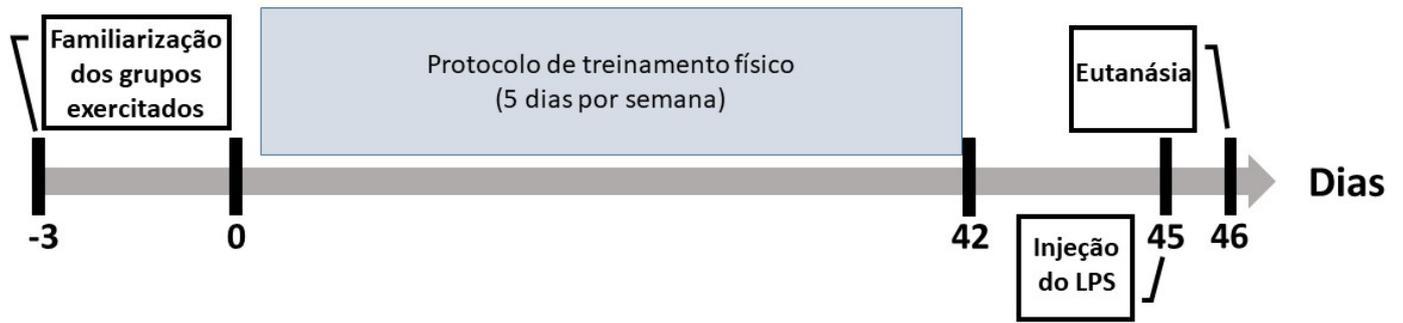


Figura 1. Design experimental.

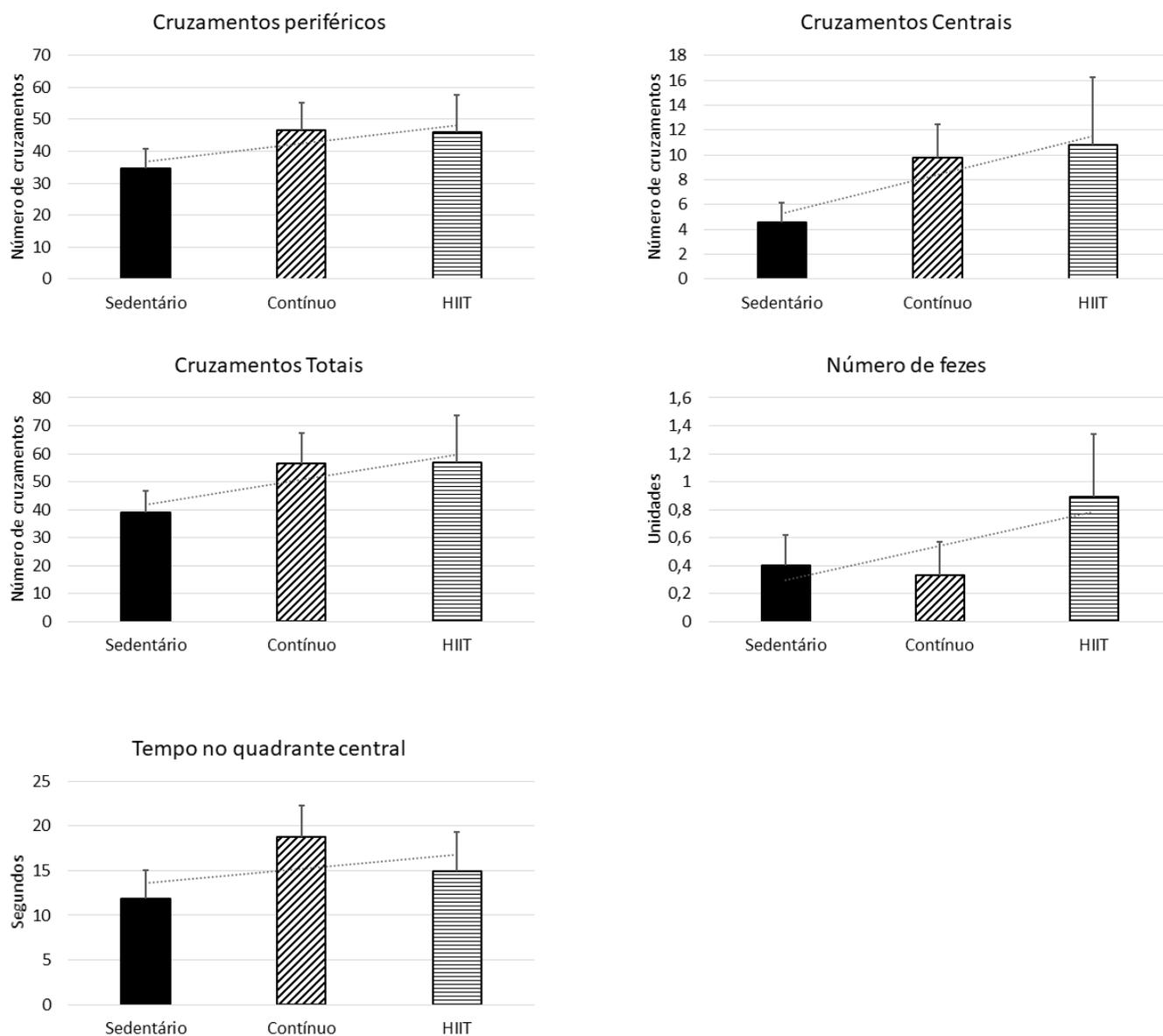


Figura 2. Resultados do teste de campo aberto 12 horas após a injeção de LPS. Os valores das variáveis “cruzamentos periféricos”, “cruzamentos totais” e “número de fezes” foram transformados e analisados pela sua raiz quadrada, já “cruzamentos centrais” e “tempo no quadrante central” foram transformados e analisados pelo seu logaritmo (valores das transformações não representados nos gráficos). Sem diferenças estatisticamente significativas nos cruzamentos periféricos ($[F(2,25)=0,69, p=0,5]$), cruzamentos totais ($[F(2,25)=0,83, p=0,4]$), número de fezes ($[F(2,25)=0,7, p=0,5]$), bem como nos cruzamentos centrais ($[F(2,25)=2,24, p=0,1]$) e tempo no quadrante central ($[F(2,24)=1,58, p=0,2]$). Valores expressos em média \pm EP (n = 8-10 por grupo).

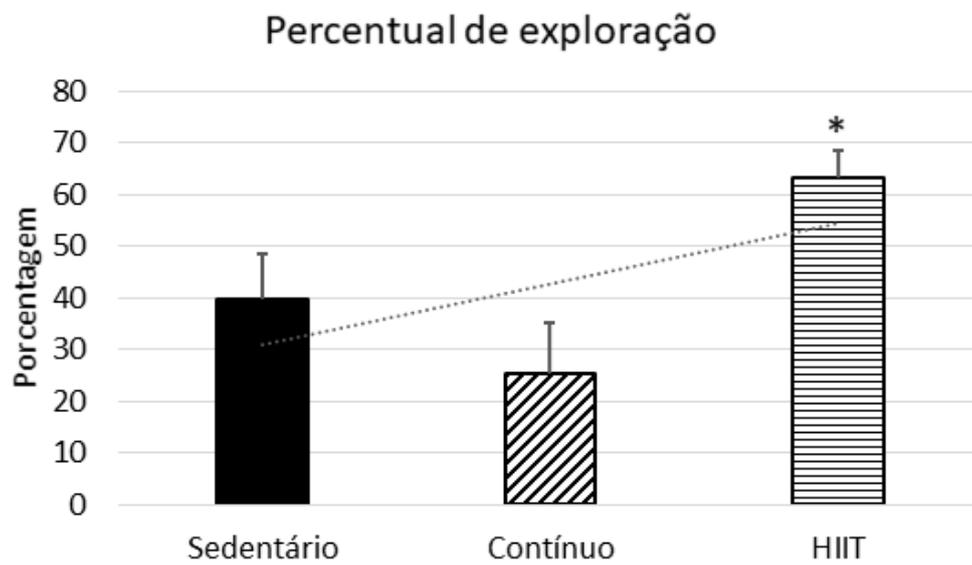


Figura 3. Resultados do teste de reconhecimento de objetos 12 horas após a injeção de LPS. *diferença estatisticamente significativa do grupo contínuo ($[F(2,25)=5,01, p=0,01]$). Valores expressos em média \pm EP (n = 9-10 por grupo)

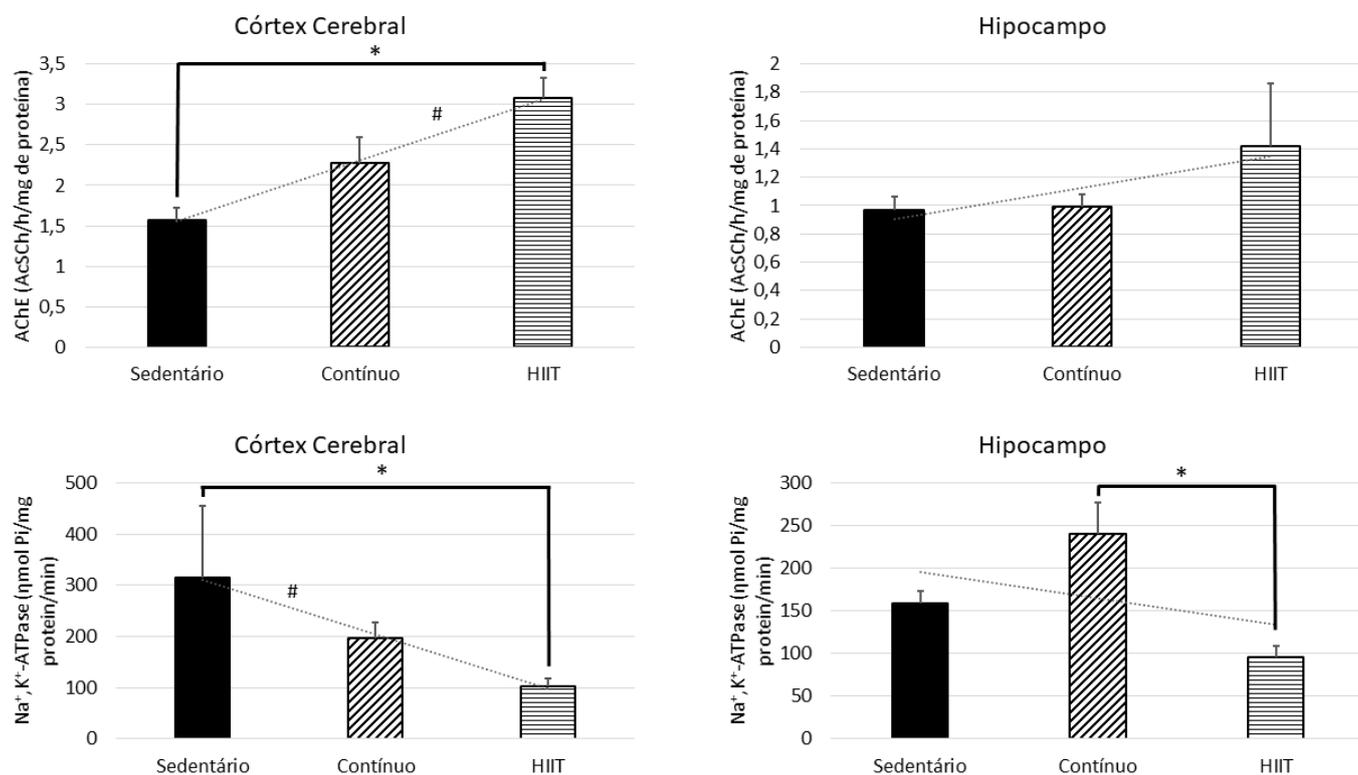


Figura 4. Níveis cerebrais (córtex e hipocampo) das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e sódio potássio ATPase (Na^+, K^+ -ATPase), 12 horas após a injeção de LPS. Os valores da AChE no hipocampo e da Na^+, K^+ -ATPase no córtex cerebral foram transformados e analisados pelo inverso da raiz quadrada (valores das transformações não representados no gráfico) *Diferença estatisticamente significativa entre grupos ($[F(2,12)=9,21, p=0,004]$ para a atividade da AChE no córtex cerebral e $[F(2,9)=4,81, p=0,04; F(2,9)=8,81, p=0,008]$ para a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo, respectivamente); #Análise de variância de tendência linear ($p=0,002$ para atividade da AChE e $p=0,01$ para Na^+, K^+ -ATPase). Valores expressos em média \pm EP ($n = 4-5$ por grupo).

4. Press-Release
(Tese de Nicole Gomes Gonzales)

Diferentes tipos de exercício físico previnem contra déficits locomotores e auxiliam na memória de camundongos: considerações iniciais

Sabe-se que o exercício físico gera inúmeros benefícios para os sujeitos que o praticam, desde melhoras na resistência física, reforço muscular, perda de peso, prevenção de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, obesidade, entre outras, até mesmo auxiliando na melhora da memória e aprendizagem.

Nesse sentido, pesquisadores do curso de doutorado em Educação Física e Bioquímica e Bioprospecção da UFPel, desenvolveram uma pesquisa para verificar os efeitos de dois tipos de exercício físico sobre a locomoção, memória e atividade de duas enzimas, envolvidas no processo da transmissão dos impulsos nervosos e no adequado funcionamento das sinapses colinérgicas em animais induzidos à neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS).

Nesse estudo, camundongos foram submetidos a dois modelos de exercício físico: 1) exercício intermitente de alta intensidade na esteira (mais conhecido como HIIT), em que o sujeito realiza curtos períodos de corrida (30 segundos aproximadamente) numa intensidade elevada, intercalados por momentos de recuperação ativa e 2) exercício contínuo de intensidade moderada (mais conhecido como aeróbio), em que o praticante fica um período prolongado (aproximadamente 20 minutos) realizando caminhada ou corrida na esteira.

Foi verificado que os animais que realizaram os dois modelos de exercício não apresentaram alterações na sua atividade locomotora. Adicionalmente, ficou demonstrado que os animais que se exercitaram apresentaram melhores resultados no teste comportamental que avalia a memória e isso indica que o exercício físico, especialmente o HIIT, pode ser uma nova alternativa na prevenção de doenças que afetam o cérebro desses animais.

Os pesquisadores também avaliaram duas enzimas que estão envolvidas na transmissão dos impulsos nervosos, a AChE e a Na⁺K⁺-ATPase e encontraram que o grupo que realizou exercício intermitente de alta

intensidade apresentou aumentos na atividade da AChE e reduções na Na⁺K⁺-ATPase, no córtex cerebral.

O próximo passo dos pesquisadores que investigam a associação entre exercício físico e parâmetros cerebrais, deve ser a busca por intervenções realizadas com humanos, para verificar se tais efeitos também podem ser encontrados, o que traria mais uma opção não medicamentosa para a prevenção de doenças de ordem cerebral.

5. Anexos

(Tese de Nicole Gomes Gonzales)

Anexo 1. Normas de submissão da revista Acta Physiologica

[Skip to Main Content](#)

Wiley Online Library

[This Journal](#)

Search term

[Login / Register](#)

ACTA PHYSIOLOGICA

Navigation Bar

Menu

- [HOME](#)
- [ABOUT](#)
- [CONTRIBUTE](#)
- [BROWSE](#)

Follow jornal

• [ALERT](#)

• [FACEBOOK PAGE](#)

•

Author Guidelines

Acta Physiologica is published in an online-only format.

General

Acta Physiologica, the official journal of the Federation of European Physiological Societies, is published by the Scandinavian Physiological Society and contains original contributions to physiology and related sciences such as pharmacology and biochemistry, provided the physiological relevance is evident either from the title, the content of the article or an explanatory statement by the author. The journal is read internationally and welcomes submission of original papers and reviews by authors from throughout the world. No affiliation to a Scandinavian institution is required. Examination of all submitted papers by at least two well-respected specialists guarantees a high scientific standard of the papers accepted for publication.

Electronic submission

When preparing typescripts for submission, authors should follow the style of the journal. Submissions should be made online at ScholarOne Manuscripts by clicking [here](#). Authors will need their entire manuscript in a digital format (text, tables and figures) plus a user ID and password, which can be obtained by visiting the site. Any number of files and file types can be uploaded but authors are reminded that not all users will have access to specific software. Figures should be TIFF, EPS or PDF. For guidance on submitting electronic artwork please click [here](#).

All manuscripts must be accompanied by a valid email address.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agrément

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Accepted Articles

Acta Physiologica now offers Accepted Articles for all articles within a short time of acceptance.

Accepted Articles is a service whereby peer reviewed, accepted articles are published online as and when they are ready, prior to their ultimate inclusion in an online issue and without having been copy-edited. It has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Readers should note that all articles published within Accepted Articles have been fully refereed, but have not been through the copy-editing and proof correction process. Wiley Blackwell cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of Wiley Blackwell.

Accepted Articles appear in PDF-only format, without the accompanying full-text HTML. Accepted Articles are fully citable using the DOI number.

Author Services

Author services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to online publication. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production. The author will receive an email with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete email address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen should complete the Copyright Transfer Agreement (see above) and the OnlineOpen payment form available [here](#).

Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated the same way as any other article. They go through the Journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licenses the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

A revised manuscript received by the editorial office later than two months after it has been returned to the author for final revision may be treated and dated as a new submission

Genomic and/or Proteomic high-throughput studies

High-throughput data (genomic or proteomic, e.g. microarrays or next-generation sequencing) must comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) criteria. Editors and reviewers must be able to access the data at the time of submission, e.g. through the provision of a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/>), ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) or CYBEX (<http://cibex.nig.ac.jp/data/index.html>) accession number. Upon acceptance, data must be publicly available, and no more amendments to the data must be made.

Guidelines for Nucleic Acid and Protein Sequence reporting

If a manuscript reports novel protein or nucleotide sequences, authors are requested to, prior to submission, upload the sequence information to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>), or the DNA Databank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) and provide an accession number in the manuscript upon submission. Upon acceptance, data must be publicly available, and no more amendments to the data must be made.

Clinical Trial Registration

Clinical trials are studies that prospectively assign human beings to either intervention/treatment or control groups, usually to report clinical/health-related outcomes. All clinical trials must, prior to subject enrolment, be registered in a public clinical trials registry. Trial identification numbers and registry URLs must be provided in the manuscript. Appropriate clinical trials registries provide, free

of charge, public information on the trial and are managed by independent not-for-profit providers, examples include ISRCTN (<http://isrctn.org>), UMIN-CTR (<http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>), Australian-New Zealand Clinical Trials Registry (<http://www.anzctr.org.au/Default.aspx>), Netherlands Trial Registry (<http://www.trialregister.nl/trialreg/index.asp>), a primary register of WHO International Clinical Trials Registry Platform (www.who.int/ictrp/network/primary/en/index.html) or ClinicalTrials.gov .

Ethical Approval

Animal experiments

Papers describing animal experiments on vertebrates can be accepted for publication only if the procurement of animals, the husbandry and the experiments conform to the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' (Council of Europe No 123, Strasbourg 1985). Equally important is an appropriate definition of the animals used, i.e., genetics, control of homeostatic influences, nutrition and health status.

Human experiments

All papers describing experiments on human subjects must include a statement that the experiments were performed with the written informed consent of each subject. With regard to this the editors wish to draw the attention of authors to the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) according to the revision valid at the time of data acquisition. A statement of approval by the Official Ethics Committee is required.

Reporting Guidelines

Acta Physiologica requires, if applicable to the study format reported in the manuscript, adherence to current [reporting guidelines](#), as given by the EQUATOR Network, an international initiative that seeks to improve reliability and value of medical research literature by promoting transparent and accurate reporting of research studies.

Statistics

Appropriate statistical methods should be used to establish significance. When data deviate from a normal distribution, nonparametric tests should be used or transformation of data should be performed. When more than two simultaneous comparisons are made, ANOVA, multiple t-test or similar techniques (not Student's t-tests) should be employed. Authors are encouraged to seek professional advice.

For further information see Altman D. G. et al., 1983. Statistical guidelines for contributions to Medical journals. *Br Med J* **286**, 1489-1493.

Language

Manuscripts must be written in English. Revision of the language is not the responsibility of the editor, and manuscripts otherwise acceptable but written in incorrect English will be returned for language revision.

British spellings should be used for haemoglobin, anaemia, etc., and 'z' spellings for characterize, categorize, etc., but not for dialyse, analyse, etc.

Authors are requested to use negative indices for derived units throughout in text, tables and figures: eg., mmol L⁻¹ , counts mg⁻¹ (not mmol/L, counts/mg, etc.).

Manuscripts

Manuscripts must be word-processed, double-spaced throughout on one side of standard A4 paper. All pages should be correctly numbered at the top right hand corner, beginning with the title page. The manuscript should include the following:

- Title page with the author's name, department, university and country. A short title not exceeding 40 letters and spaces should be included. The name, full address, telephone and fax numbers and an e-mail address of the author to whom proofs are to be sent should be given on the title page. The title of the paper should be as informative as possible and must not include abbreviations and symbols. The animal species should appear in the title.
- An abstract not exceeding 250 words in length. The abstract should have four headings: Aim, Methods, Results and Conclusion. It should describe briefly and concisely the aim of the investigation, the methods used, the results including quantitative figures and the conclusions drawn. Novel aspects and physiological relevance should be emphasized. Up to six keywords should be appended to the abstract in [alphabetical order](#). Do not use abbreviations in the abstract.

Please note that clear, descriptive and search-optimized titles and abstracts are important considerations to the journal. Guidelines available [here](#).

- Introduction
- Results
- Discussion
- Materials and methods
- Acknowledgements
- Conflict of interest
- References
- Tables with their headings
- Legends to figures
- Figures. For online submission figures should be of sufficient quality to allow reasonable interpretation by editors and reviewers; publication quality images can either be provided at upload or with the final accepted manuscript.
- Physiological relevance. The authors should point out the physiological relevance of the paper, if this is not clearly evident from the title or content of the article.

Conflict of Interest

A conflict of interest exists when professional judgment concerning a primary interest (such as patients' welfare or the validity of research) may be influenced by a secondary interest (such as financial gain) (ICMJE, 2013). This occurs, for example, when an author or the author's institution has financial or personal relationships with other people or organisations that inappropriately influence (bias) his or her actions. Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships, academic competition, or intellectual passion. A conflict can be actual or potential, perceptions of conflict of interest are as important as actual conflicts of interest and full disclosure to the Editor is mandatory.

All submissions to *Acta Physiologica* must include disclosure or all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none.

References

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for [here](#). For the use of Reference Manager, please read the following instructions:

1. Insert the references from Reference List (in RMX file) of Reference Manager into the text.
2. To format the references, save the [Acta Physiologica Output Style \(OS file\)](#) on the desktop.
3. Then, click the arrow icon on the Bibliography Tool Bar located on the lower right corner- a new window "Reference Manager 12 Format Bibliography" will appear.
4. In this window, browse and select [Acta Physiologica Output Style \(OS file\)](#) by clicking on the browse icon located to the left of the Reset icon, and then click OK.

5. The selected OS file will appear in the Style window on the Bibliography of Reference Manager toolbar in the MS Word document.
6. Finally, click Update Citations and Bibliography to format the references.

The number of references should be restricted as much as possible. They should be listed at the end of the paper, as exemplified below. Observe the punctuation most carefully. Abbreviate journal titles according to the *Index Medicus*. References to books should include the editor(s), publisher and place of publication.

References should be listed double-spaced, in order of their appearance in the text. Superscripted numbers in the text should be used to indicate references; these superscripted numbers must be placed immediately after a comma or period if cited at the end of a phrase or sentence.

1. Example A, Secondly B, Thirdson C: An example of how to cite. *Acta Physiologica* (Oxford, England), 217: 311-324, 2016.
2. Fourthfellow DE, Fifth FG: Pathophysiology of citing. In: *The Brain*, 5th ed., edited by Sixten HIJ, Philadelphia, Pounders, 2001, pp 2136–2148
3. Sevenstead KL: Reference points in the normotensive ruminator. [Abstract]. *Acta Physiologica* (Oxford, England), 21: 4185, 2016.

References to material available on the World Wide Web can be given, but only if the information is available without charge to readers on an official site. Authors will be asked to provide electronic copies of the cited material for inclusion on the APH homepage at the discretion of the Editors. The format for citations is as follows:

After-Eight PLS (2014). How do taste buds function? (WWW document). <http://www.sensor.tongue.mil/meta/bibliography.html>

Electronic Submission

Authors must ensure that files have been updated to incorporate all revisions, and hence that the version on the file is the correct version. Please include all parts of the text in a single file, i.e. maintext, references, legends and tables. Files should be formatted double-spaced with no hyphenation and automatic wordwrap (no hard returns within paragraphs). Please type your text consistently, e.g. take care to distinguish between '1' (one) and 'l' (lower-case L) and '0' (zero) and 'O' (capital O), etc. Please do not use carriage returns at the end of lines within a paragraph. Turn hyphenation option off.

eLocators

Articles published in this journal can now be cited using eLocators rather than page numbers. eLocators are unique identifiers for an article that serve the same function page numbers have traditionally served in the print world. the eLocator will become the primary means of citation, just as page numbers have been in the past- a readable and meaningful citation reference. Every article now has a unique identifier (eLocator) instead of page number. The eLocator appears as the last identifier (e2819) in a citation, replacing the page number. For more information, please visit the author services eLocator page [here](#).

Figures

It is in the interest of authors to follow the guidelines below, as this would lessen the risk of errors in redrawing/correction and also reduce both the time and costs of manuscript preparation which may help to keep subscription costs down.

Figures should be submitted online with the original submission. These figures should be of sufficient quality for review. Publication quality images can be uploaded with the submission or sent on disk with hardcopy at acceptance. Submit four copies of each hardcopy figure. Figures must be numbered in sequence with Arabic numerals.

Figures submitted should be of a size suitable to withstand 50% reduction for either a single column of 77 mm width or a double column of 159 mm width.

Each figure should have a legend containing sufficient information to make the figure intelligible without reference to the text. In the full text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Figures should ideally be EPS (line art) or TIFF (photographs) files. For further details please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/>

Acta Physiologica welcomes topical and interesting colour or B & W images for the cover. If you have such an image please send to the editor either via email to carola.neubert@charite.de or on disk. These need not necessarily have previously been published. The figures should be supplied in the format detailed above and should have a suitable legend of no more than 100 words, including publication details. We reserve the right to redraw images prior to publication, subject to discussion.

Some further points about figures

- Headings, symbols, histograms and the like should be identified in the figure and not in the figure legend. Unnecessary explanations or other distracting material should be avoided in figures.
- In case where there are several parts to a figure, please label them in lower case in parentheses, e.g. (a), (b), etc., preferably in the upper left corner inside figure.
- Axes should be labelled centrally with an initial capital followed by all lower case letters.
- Vertical labelling on the vertical axis.
- Axis units should follow the labelling in parentheses.
- Curve points should not be so large as to merge on reduction.
- The dots in tints should be sufficiently large that they do not disappear on reduction.
- Unless otherwise indicated, tables and figures will be placed near their first mention in the text (usually in the results section).
- Figures in colour may be enclosed.

For further information on guidelines to figure, please click [here](#)

Electronic Artwork

We would like to receive your artwork in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Detailed information on our digital illustrations standards is available [here](#).

Tables

Tables should be provided double-spaced on separate pages. Each table should have only three dividing lines – to separate the titles and data. (No vertical rules should be used.) Tables should ideally be created in a word processor table editor. Avoid including multiple data in single table cells.

Mathematics

In-line equations should be typed as text. The use of graphics programs and 'equation editors' should be with care. Displayed equations (unless prepared by the 'MathType Equation Editor') may be re-keyed by our typesetter.

Supporting Information

The *Acta Physiologica Online* gives authors the opportunity to include data that would be inappropriate or impractical to include in the article itself. These data may substantially enhance the importance of the research and may also be of benefit to readers. Authors are encouraged to include

data such as videos, 3-D structures/images and any other supporting information. All supporting information must be submitted with the original manuscript via [ScholarOne Manuscripts](#).

Supplementary material guidelines including acceptable file formats and sizes are available [here](#).

Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: <http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Preprints

Acta Physiologica will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of their manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Data Sharing

Acta Physiologica expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. Exceptions may be granted at the discretion of the editor for sensitive information such as human subject data or the location of endangered species. Authors are expected to provide a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, to accompany their paper.

Supplements

Theses and monographs may be published as supplements to the Journal, the cost of publication being paid by the author. Permission and instructions for the publication of supplements must be obtained from the Chief Editor. The covers may be supplied by Wiley Blackwell (quotations may be obtained direct from the Publisher), or printed by the author according to information given by the Publisher or the Editorial office.

Abbreviations and terminology

Abbreviations should be kept to a minimum and, if not internationally accepted, defined at first mention. Do not use abbreviations in the abstract. Unnecessary abbreviations make reading difficult. Quantities and units should be expressed according to the recommendations of the *Système International d'Unités* (SI), although certain non-SI units are permissible.

For fuller instructions about abbreviations authors are advised to consult 'SI Units in Medicine', (1978) by Urban & Schwarzenberg, Inc. Baltimore Munich.

Data Citation

Authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the Joint Declaration of Data Citation Principles: *Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)*

Authorship and Originality

The manuscript must be accompanied by a covering letter, where each author attests that: 1) the manuscript is not under consideration elsewhere and that the research reported will not be submitted for publication elsewhere until a final decision is made by APH as to the acceptability of the manuscript; 2) the manuscript represents original work without fabrication, fraud or plagiarism; and 3) he/she takes full responsibility for the content of the manuscript. The corresponding author may sign on behalf of all authors, but by doing so attests that all coauthors agree to the terms and responsibilities outlined above.

All individuals mentioned in the Acknowledgements should have given written permission to the corresponding author to do so, available upon request.

It is not acceptable to withdraw a submitted manuscript that is under review.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

- [Submit an Article](#)
- [Browse free sample issue](#)
- [Get content alerts](#)
- [Recommend to a librarian](#)

- [Subscribe to this journal](#)

OFFICIAL JOURNAL OF THE FEDERATION OF EUROPEAN PHYSIOLOGICAL SOCIETIES
(FEPS)



More from this journal

- [News](#)
- [Acta Physiologica Awards](#)
- [New iPad/iPhone app!](#)
- [Podcasts](#)
- [Special Issues](#)
- [Acta Physiologica on Facebook](#)
- [Wiley's Physiology Collection](#)
- [Wiley's Sports Medicine and Orthopedics Collection](#)
- [Wiley Job Network](#)
- [Journal Information](#)
- [Jobs](#)

About Wiley Online Library

- [Privacy Policy](#)
- [Terms of Use](#)
- [Cookies](#)
- [Accessibility](#)

Help & Support

- [Contact Us](#)

Opportunities

- [Subscription Agents](#)
- [Advertisers & Corporate Partners](#)

Connect with Wiley

- [The Wiley Network](#)
- [Wiley Press Room](#)

Copyright © 1999-2018 [John Wiley & Sons, Inc.](#) All rights reserved

WILEY