

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



TESE

**EFEITOS CRÔNICOS DE DIFERENTES MODELOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL, PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS
E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO
LIPOPOLISSACARÍDEO**

MATHEUS PINTANEL SILVA DE FREITAS

Pelotas, RS

2018

MATHEUS PINTANEL SILVA DE FREITAS

**EFEITOS CRÔNICOS DE DIFERENTES MODELOS DE EXERCÍCIO FÍSICO
SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL, PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS
E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Educação Física).

Orientador: Prof. Dr. Airton José Rombaldi

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F863e Freitas, Matheus Pintanel Silva de

Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em animais submetidos ao lipopolissacarídeo / Matheus Pintanel Silva de Freitas ; Airtin José Rombaldi, Francieli Moro Stefanello, orientadores. — Pelotas, 2018.

185 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. Sistema imune. 4. lipoglicanos. 5. Estresse oxidativo. I. Rombaldi, Airtin José, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, orient. 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:

- À minha mãe, Jane, pelo amor incondicional e por abdicar de uma parte de sua própria vida em meu favor e da minha educação. Foi dela que vieram os primeiros ensinamentos e a vontade de sempre querer aprender mais. Tu foste a pessoa mais determinante para que eu conseguisse conquistar o mais alto título acadêmico e, enfim, completar minha formação. Te amo!

- À minha namorada, companheira e melhor amiga, Nicole, pela parceria e amor durante todos esses anos de vida acadêmica, por sermos um o braço direito do outro durante a realização dessa pesquisa e por toda a ajuda dentro e fora da pós-graduação. És parte fundamental de tudo isso, e este momento se torna mais especial pois posso dividi-lo contigo. Só mais difícil do que achar as palavras para te agradecer, era fazermos os camundongos correrem...

- Ao meu orientador, amigo e professor, Airton Rombaldi, por, desde a graduação ter confiado e investido em mim. Por ter sido meu “pai científico” e me ensinado bem mais do que conteúdos, mas me dado ferramentas para que eu conseguisse buscar por mim mesmo o conhecimento. Tenho orgulho de hoje completar minha formação e ganhar o título de Doutor sob tua orientação. Tenhas em mente que sempre me espelharei em ti.

- À minha coorientadora, Francieli Stefanello (Fran), pelos ensinamentos, paciência e tranquilidade. Não sabes o quanto foste determinante na minha pós-graduação e, certamente, sem ti, eu não conseguiria chegar até aqui.

- À professora Rosélia Spanevello (Rose), por sempre tentar achar uma solução factível para os problemas na tese e pelos ensinamentos passados. Tua ajuda foi imprescindível para a realização e conclusão deste trabalho.

- Ao Jessié, por ter dado a ideia que salvou minha pesquisa de doutorado, estar sempre pronto para ajudar, ser parte fundamental nas coletas e análises deste estudo.

- À Pathise por ter coordenado as análises de estresse oxidativo.

- Às integrantes do Laboratório de Biomarcadores e do Neurocan, por ter sido partes fundamentais nas coletas dos dados.

- À minha vó, Oscarina, por entender meu afastamento devido aos compromissos acadêmicos e pelo carinho, amor e preocupação, sempre querendo que eu tome vitaminas.
- Ao meu vô, Dorvil (*in memoriam*), pelo amor incondicional dado a mim. Ainda nos encontraremos novamente.
- À minha sogra, Leilá, por toda ajuda e incentivo dado a mim, sempre acreditando e não medindo esforços para garantir minha tranquilidade e sucesso nas tarefas da pós-graduação.
- Ao meu sogro, Nelci, por toda a ajuda dada durante o doutorado, principalmente garantindo minha locomoção e cuidando de obrigações que eu não podia cumprir devido aos compromissos com a pós-graduação, como a obra do apartamento.
- Ao meu padrasto, Paulo, pelo incentivo e amizade. Agradeço pela torcida sincera para meu sucesso.
- Aos meus colegas de doutorado e, principalmente, amigos, Rodrigo e Aline. Agradeço muito a amizade, o companheirismo e a força que sempre me deram, bem como por prezarem pela minha saúde durante o doutoramento, me cedendo a academia de vocês para realizar meu treinamento físico. Vocês são ímpares! Um dos grandes presentes que o doutorado me deu.
- Ao colega do mestrado, Natan, pela parceria e por compartilhar as loucuras científicas que pessoas sem incentivo financeiro, com pouco dinheiro, mas cheias de ideias e ideais fazem.
- 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 Zaneti
- Aos auxiliares de bioterismo que, além de cumprirem de forma brilhante seu trabalho, garantindo o correto funcionamento do biotério e o bem-estar dos animais, tornara-se protagonistas na realização da intervenção. Obrigado Ju, Cris, Patrícia e Cristiano, vocês foram incríveis.

- Aos professores Gustavo Ferreira (Guto) e Rafael Orcy (Rafa) pelas contribuições valiosas no projeto desta pesquisa, da vontade sempre de ajudar no que for necessário, na troca de conhecimento e nos ensinamentos. Vocês são incríveis e terão sempre minha admiração.
- Ao professor Marcelo Cozzensa, que além de ser um grande amigo e exemplo profissional, ter aceito fazer parte da banca de defesa deste trabalho. Marcelinho, tens em mim um amigo e uma pessoa que te admira muito.
- Ao professor Jean Osse, pela parceria nas análises dos parâmetros inflamatórios deste trabalho.
- À médica veterinária Anelize Campello, por ter nos acolhido gentilmente no biotério e ter sido parte fundamental na coleta de dados, pois sem a Ane e sua técnica impecável para realizar punção cardíaca dos animais, esse trabalho não teria sido concluído.
- Aos meus amigos que compõe o, carinhosamente chamado, Grupinho Feliz, Otávio, Marcelo, Maurício, Matheus e Joubert. Vocês sempre me dão força e serão, para sempre, os irmãos que escolhi. Certamente vocês fazem parte dessa conquista!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Resumo

FREITAS, Matheus Pintanel Silva de. **Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em animais submetidos ao lipopolissacarídeo.** 2018. 185f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Educação Física. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Objetivo: Comparar os efeitos crônicos protetores de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, níveis séricos de citocinas inflamatórias e parâmetros cerebrais de estresse oxidativo em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à indução de inflamação sistêmica por lipopolissacarídeo (LPS). **Métodos:** Os animais foram divididos em grupo controle (sedentário) (n=10), exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) (n=10) e exercício contínuo de intensidade moderada (contínuo) (n=10). O treinamento durou 6 semanas e, setenta e duas horas após a última sessão, foi injetado nos animais uma dose de 250 µg/kg de LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli*. **Resultados:** O grupo sedentário teve uma queda na temperatura corporal na primeira hora pós LPS, permanecendo baixo nas 12 horas seguintes [$F(3,27)=11,15$, $p=<0,001$], o que não aconteceu nos grupos exercícios. Ademais, o grupo HIIT teve valores superiores do conteúdo tiólico total no hipocampo do que o grupo contínuo [$F(2,12)=4,52$, $p=0,03$]. Porém, os modelos de exercício não exerceram efeitos protetores nos demais parâmetros oxidantes e antioxidantes analisados no córtex cerebral e hipocampo, bem como sobre os níveis séricos de IL-6 e TNF- α . **Conclusão:** Este foi o primeiro estudo comprovando que seis semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intermitente de alta intensidade foram igualmente suficientes para prevenir a queda de temperatura advinda da administração de LPS em camundongos C57BL/6, significando que ambos são eficientes como forma de combater um dos sintomas mais característicos do LPS e, por consequência, de infecções por bactérias gram-negativas. Adicionalmente, o HIIT foi suficiente para aumentar o conteúdo tiólico total do hipocampo.

Palavras-chave: Exercício aeróbio; Treinamento intervalado de alta intensidade; Sistema imune; Inflamação; Lipoglicanos; Estresse oxidativo

Abstract

FREITAS, Matheus Pintanel Silva de. **Chronic effects of different models of physical exercise on body temperature, inflammatory parameters and oxidative stress in animals submitted to lipopolysaccharide.** 2018. 185f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Educação Física. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aim: To compare the chronic protective effects of different models of physical exercise on body temperature, serum levels of inflammatory cytokines and brain parameters of oxidative stress in C57BL/6 female mice submitted to induction of systemic inflammation by (lipopolysaccharide) LPS. **Methods:** Animals were divided into three groups: control (sedentary) (n=10), intermittent high intensity exercise (n=10) and continuous moderate intensity exercise (n=10). The training lasted 6 weeks and, seventy-two hours after the last session, a dose of 250 µg/kg of LPS from the bacterium *Escherichia coli* was injected in the animals. **Results:** The sedentary group had a decrease in body temperature in the first hour after LPS, remaining low in the following 12 hours [$F(3.27)=11.15$, $p=<0.001$], which did not happen in the exercise groups. In addition, the HIIT group had higher values of total thiol content in the hippocampus than the continuous group [$F(2.12)=4.52$, $p = 0.03$]. However, exercise models did not exert protective effects on the other oxidative and antioxidant parameters analyzed in the cerebral cortex and hippocampus, as well as on the serum levels of IL-6 and TNF- α . **Conclusion:** This was the first study to demonstrate that six weeks of moderate continuous training and high intensity interval training were also sufficient to prevent the temperature decrease resulting from the administration of LPS in C57BL / 6 mice, meaning that both are efficient as a form to combat one of the most characteristic symptoms of LPS and, consequently, of gram-negative bacteria infections. In addition, HIIT was sufficient to increase hippocampal antioxidant defenses.

Keywords: Aerobic Exercise; High Intensity Interval Training; Immune System; Inflammation; Lipoglycans; Oxidative Stress.

Sumário

Introdução geral	12
1. Projeto de pesquisa.....	13
2. Relatório de trabalho de campo	136
3. Artigo original	141
4. Press-release	173
5. Anexos	176

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 DO TRABALHO DE CAMPO: descrição detalhada sobre alguns pontos que chamaram atenção durante o decorrer do trabalho de campo;
- 3- ARTIGO ORIGINAL: Efeito protetor de diferentes modelos de exercícios físicos em camundongos C57BL/6 expostos ao lipopolissacarídeo. 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 Matheus Pintanel Silva de Freitas)

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 a temperatura corporal, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em animais submetidos ao lipopolissacarídeo

MATHEUS PINTANEL SILVA DE FREITAS

PELOTAS, RS,

2018

Matheus Pintanel Silva de Freitas

Efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em animais submetidos ao lipopolissacarídeo

Projeto de Doutorado que será apresentado 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 Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2018

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Airton José Rombaldi

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)

Sumário

1. Introdução	20
1.1 Objetivo geral	22
1.2 Objetivos específicos	22
1.3 Justificativa.....	23
1.4 Hipóteses	24
2. Revisão de Literatura	24
2.1 Sistema imune	24
2.2 Inflamação.....	28
2.3 Desfechos inflamatórios	31
2.3.1 Interleucina-6 (IL-6).....	31
2.3.1.1 Histórico e estrutura molecular	31
2.3.1.2 Funções, valores de referência e relações com patologias ..	33
2.3.1.3 Efeitos da IL-6 como miocina e sua relação com o exercício físico	36
2.3.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	48
2.3.2.1 Função do TNF- α no organismo: Efeitos agudos e crônicos	50
2.3.2.2 Efeitos do exercício físico no TNF- α	56
2.4 Estresse oxidativo	60
2.5 Desfechos oxidativos	62
2.5.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	62
2.5.2 Conteúdo tiólico total	63
2.5.3 Enzima superóxido dismutase	63
2.5.4 Enzima catalase (CAT)	67
2.6 Lipopolissacarídeo (LPS)	70
2.7 Relação entre o exercício físico e o lipopolissacarídeo (LPS).....	79
3. Materiais e métodos	92
3.1 Delineamento	92
3.2 Animais	92
3.3 Contensão e transporte dos animais.....	92
3.4 Randomização e protocolo de treinamento.....	92
3.5 Modelo animal de inflamação.....	94
3.6 Eutanásia	95
3.7 Avaliação da temperatura corporal	95
3.8 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	95

3.8.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	96
3.8.2 Medida do conteúdo tiólico total	96
3.8.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)	96
3.8.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	96
3.8.5 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)	96
3.9 Determinação das citocinas inflamatórias	97
3.10 Tabela de operacionalização das variáveis.....	97
3.11 Processamento e análise de dados	97
3.12 Seleção e treinamento dos auxiliares de pesquisa	98
3.13 Local de realização	98
3.14 Financiamento.....	98
3.15 Aspectos éticos	99
4. Divulgação dos resultados	99
5. Cronograma	99
6. Orçamento.....	100
7. Referências Bibliográficas	101
8. Anexos	135
8.1. Anexo 1: Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa animal ...	135

1. Introdução

O organismo dispõe de uma série de órgãos, células, moléculas, hormônios e moduladores interativos, que servem para protegê-lo de qualquer material não próprio, os quais podem ser algum tipo de patógeno (vírus, micróbios, bactérias, fungos, ectoparasitas, protozoários, vermes, entre outros) ou, até mesmo, um enxerto de um órgão advindo de transplante (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). Juntas, essas defesas denominam-se sistema imune.

O processo inflamatório é essencial para que haja resposta imune perante infecções, pois ele é responsável por aumentar a permeabilidade endotelial e promover a quimiotaxia (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). No entanto, a inflamação sistêmica é prejudicial ao organismo ao passo que ela produz danos vasculares que podem levar a várias doenças, falência de órgãos e até à morte (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). Em adição, inflamação sistêmica de baixo grau é associada com algumas disfunções como resistência à insulina, aterosclerose, neurodegeneração, crescimento tumoral (LEONARD, 2007; PEDERSEN; SALTIN, 2006; PRADHAN et al., 2001) e aumento para o risco de câncer (COUSSENS; WERB, 2002). Níveis elevados de biomarcadores inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6) e proteína c-reativa (PCR) são associados com aumento do risco de vários tipos de câncer (DOSSUS et al., 2010; HEIKKILA et al., 2009; SIEMES et al., 2006; TSILIDIS et al., 2008; WANG et al., 2011), doença cardiovascular (REILLY et al., 2005), osteoporose (PFEILSCHIFTER et al., 2002), diabetes mellitus (KADOGLOU et al., 2007) e caquexia geriátrica (YEH et al., 2001).

O estresse oxidativo também desempenha um papel importante nas respostas imunes, onde em proporções fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas por leucócitos e outras células inflamatórias, são envolvidas no processo fagocítótico, sinalização celular e resposta imune (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). No entanto, tanto as ERO, quanto as espécies reativas de nitrogênio, quando em condição crônica podem aumentar o dano tecidual, o que pode desencadear várias disfunções, como a carcinogênese (COUSSENS; WERB, 2002), estando envolvidos na patogênese

de várias doenças, como doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento precoce (SOUTHORN; POWIS, 1988).

Dentre os organismos patógenos existentes, destaca-se as bactérias, que são classificadas em gram-negativas e gram-positivas. As primeiras são células bacterianas que apresentam em sua estrutura pequenas porções de peptídeoglicanos, e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e demais macromoléculas complexas. Já as bactérias gram-positivas apresentam uma parede celular consistente e com grandes quantidades de peptídeoglicanos em sua estrutura, porém não possuem uma membrana externa como as bactérias gram-negativas (MADIGAN et al., 2016).

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 (ANGUS et al., 2001; GONÇALVES et al., 2012; PEPPLER et al., 2016; LITTLEFIELD et al., 2015), 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 em nível tecidual específico (ANGUS & van der POLL, 2013).

Da mesma forma, o movimento tem se mostrado como um fator muito relevante para a prevenção e tratamento de várias doenças, principalmente crônicas degenerativas (WHO, 2010). Muitos dos fatores de risco para essas doenças, e a grande maioria delas, estão associados à inflamação sistêmica de baixo grau (LIBBY, 2002; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; DANDONA; ALJADA; BANDYOPADHYAY, 2004; HAN et al., 2002; 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, e principalmente o exercício físico, determinam um conjunto de efeitos agudos e crônicos anti-inflamatórios (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. Porém, pesquisas sobre a influência do exercício físico em humanos estão estudando organismos saudáveis e com a concentração de marcadores imunológicos normais já na linha base (FREITAS et al., 2016). Neste sentido, falta verificar a influência do exercício sobre organismos posteriormente submetidos a agentes patógenos, de modo a averiguar efetivamente as possíveis melhorias que o exercício físico pode trazer para o sistema imune (FREITAS et al., 2016).

No entanto, do ponto de vista ético, esse tipo de intervenção (intervir com o exercício físico e posteriormente administrar um agente patógeno) é inapropriada para ser realizada com humanos e, devido a isso, estudos desta natureza estão utilizando a atividade/exercício físico na prevenção ou tratamento de diversas disfunções associadas à inoculação de LPS em modelos animais. Porém, até o presente momento, foram encontrados apenas 12 estudos que administraram o LPS após um período de treinamento físico em camundongos C57BL/6, BALB-c, ICR e Ratos Sprague Dawley (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).

1.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivará verificar os efeitos protetivos de diferentes modelos de exercício físico (treinamento intervalado de alta intensidade – HIIT; e treinamento contínuo de intensidade moderada) sobre respostas inflamatórias e de estresse oxidativo em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à indução de inflamação sistêmica por LPS.

1.2. Objetivos específicos

Comparar os efeitos protetivos de diferentes modelos de exercício físico (HIIT e treinamento contínuo de intensidade moderada), iniciados seis semanas antes da injeção de LPS, sobre:

1. a temperatura corporal dos animais;
2. o nível cerebral (córtex e hipocampo) de marcadores do estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio -ROS- e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS-);
3. a atividade de enzimas antioxidantes e substâncias antioxidantes não enzimáticas (catalase -CAT-, superóxido dismutase -SOD- e conteúdo tiólico total) no cérebro (córtex e hipocampo);
4. os níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α).

1.3. Justificativa

Levando em conta a existência de apenas de 12 trabalhos que administraram o LPS após um período de treinamento físico, salienta-se a necessidade de realizar novos estudos com exercício físico, pois somente quatro dos doze estudos trabalharam com esse tipo de metodologia (CHEN; CHEN; JEN, 2010; GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2010; KATO et al., 2006), sendo que o restante utilizou intervenções com atividade física. Além disso, dos estudos que utilizaram exercício físico, a intervenção foi somente com exercício contínuo de intensidades leve ou moderada, não sendo encontrado na literatura científica estudo utilizando como intervenção outras formas de exercício físico utilizando cargas de alta intensidade, como exercício de força, ou exercício intermitente de alta intensidade. Finalmente, nenhum desses estudos com exercício físico utilizou a temperatura corporal como desfecho principal, e essa é uma das alterações características da resposta imune, sendo indispensável para monitorar a progressão da doença (MEI et al., 2018). No caso de camundongos C57BL/6, há uma alteração marcada no sentido da hipotermia (MEI et al., 2018).

Por fim, levando em conta que o LPS é fator determinante para o desenvolvimento de neuroinflamação e neurodegeneração (LITTLEFIELD et al., 2015) e que as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT) compõem o principal sistema de defesa antioxidante que pode proteger as células cerebrais contra o dano oxidativo (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005; ANDREAZZA et al., 2008), faz-se

necessário determinar os parâmetros oxidantes e anti-oxidantes cerebrais em organismos submetidos ao LPS.

1.4. Hipóteses

1.4.1. Espera-se que a temperatura corporal dos grupos exercício tenha uma queda menos acentuada do que o grupo sedentário após a administração de LPS, em virtude do efeito anti-inflamatório do exercício (PETERSEN & PEDERSEN, 2005);

1.4.2. Espera-se que os níveis dos marcadores pró-inflamatórios (IL-6 e TNF- α), e de estresse oxidativo estejam mais baixos nos grupos exercício, pois ambos modelos de exercício já se mostraram eficientes em promover reforços imunológicos semelhantes (BARTLETT et al., 2017), porém, com queda mais acentuada no grupo contínuo de intensidade moderada, pois sabemos que os níveis de IL-6 são mais influenciados pelo volume do que pela intensidade do exercício físico, da mesma forma que o TNF- α é um dos compostos que estimulam a produção de IL-6;

1.4.3. Espera-se que as enzimas antioxidantes estejam mais ativadas e o conteúdo tiólico total esteja mais elevado nos grupos exercício físico em comparação ao grupo controle, devido ao efeito antioxidante do exercício (POWERS; JI; LEEUWENBURGH, 1999; SHERN-BREWER et al, 1998; VINCENT et al., 1999).

2. Revisão de Literatura

2.1 Sistema imune

No corpo humano existe uma série de defesas contra toda e qualquer partícula estranha que entre no organismo. Essa partícula estranha é denominada “material não próprio” e pode ser qualquer tipo de patógeno (vírus, micróbios, bactérias, fungos, ectoparasitas, protozoários, vermes, etc.) e, até mesmo, um enxerto de um órgão capaz de salvar vidas (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). Para essa defesa, o corpo dispõe de uma série de órgãos, células, moléculas, hormônios e moduladores interativos, que juntos formam nosso

sistema imune. Além da eliminação de vírus, bactérias, fungos e macromoléculas estranhas, o sistema imune é responsável pela remoção de células mortas, estabelecimento de memória imunológica e por impedir o crescimento anormal de células cancerosas, combatendo os tumores (PLAYFAIR & CHAIN, 2013).

Didaticamente, o sistema imune é dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. Ressalta-se que essa divisão é somente para facilitar a compreensão de forma teórica, pois ambas atuam simultaneamente no organismo. Além do mais, as duas são constituídas por elementos celulares e humorais (i.e., livres no soro ou nos líquidos corporais).

A imunidade inata é composta pela pele, membranas mucosas, temperatura corporal, algumas subpopulações de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células *natural killers* –NK–) e barreiras inflamatórias. Ela responde aos estímulos de maneira não específica, isso quer dizer que todo o organismo não próprio que tentar entrar em nosso corpo, independentemente do que seja, encontrará resistências externas a essa entrada (pele e membranas mucosas) e, caso essas defesas falhem, será atacado de modo “impessoal” por todas as células que compõem a imunidade inata (as subpopulações de leucócitos supracitadas) que se utilizarão de processos fagocíticos, citotóxicos e inflamatórios para eliminá-los (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). A imunidade inata, então, não apresenta memória imunológica devido ao fato dos ataques serem indiscriminados, não havendo meios para que elas se previnam de um novo ataque desse invasor.

Todos patógenos possuem em sua estrutura uma molécula chamada antígeno, que, via de regra, são peptídeos presentes nessas células, porém podem ser proteínas próprias expressas em concentrações acima do normal, como no caso de tumores. O sistema imune adaptativo tem a habilidade de reconhecer essas substâncias e, com isso, produzir respostas específicas ao patógeno. A imunidade adaptativa é constituída pela subpopulação de leucócitos denominada linfócitos (subdividindo-se em linfócitos T e linfócitos B), bem como pelas imunoglobulinas (Ig), que também são conhecidas como anticorpos. Os linfócitos respondem seletivamente a milhares de antígenos diferentes, sendo que os linfócitos B são os responsáveis pela secreção de anticorpos (IgA, IgD,

IgE, IgG e IgM, com a produção de IgG correspondendo à 75% da produção total de imunoglobulinas), neutralização de toxinas bacterianas e alguns vírus, realização da opsonização (facilitação da fagocitose) e ativação do sistema complemento (conjunto de proteínas que auxiliam as células imunes na atuação contra qualquer patógeno, pertencendo à imunidade inata). Já os linfócitos T auxiliam os linfócitos B na produção de Ig, destroem células infectadas por vírus, ativam macrófagos e secretam citocinas que induzem a inflamação (PLAYFAIR & CHAIN, 2013).

Os linfócitos T ainda se subdividem em células T auxiliares (ajudam na comunicação e ativação de outros leucócitos, bem como na estimulação das células B para produzirem mais anticorpos), células T citotóxicas (aqueles que atacam e destroem diretamente o patógeno) e células T regulatórias (sua ação é prioritariamente induzir imunossupressão, inibindo o sistema imune para evitar sua hiperativação).

Como os linfócitos respondem de maneira específica aos抗ígenos, após uma infecção ser controlada e eliminada do organismo, eles têm a capacidade de ficarem pré-ativados para combater o mesmo agente infeccioso da forma mais eficiente e rápida, caso o mesmo volte a penetrar em nosso corpo. A esse fenômeno que chamamos de memória imunológica (PLAYFAIR & CHAIN, 2013), e como pode-se ver, o sistema imune adaptativo que é o responsável por ela. Conceituando, memória imunológica nada mais é do que um padrão de resposta imunológica permanentemente alterado perante determinado抗ígeno.

No entanto, como já foi citado, as imunidades inata e adaptativa atuam de forma simultânea. Geralmente, a resposta inata precede e desencadeia a adaptativa, isso devido ao fato da não especificidade da primeira perante o invasor (portanto, uma resposta rápida), enquanto que a segunda deve reconhecer o抗ígeno e secretar Ig's adequadas (demandando tempo para isso).

A imunidade inata é ativada quando as células utilizam conjuntos especializados de receptores para reconhecer diferentes micro-organismos invasores, contribuindo para a ativação de um número limitado de mecanismos básicos de eliminação de micro-organismos, basicamente com neutrófilos (que correspondem a aproximadamente 95% de todos os leucócitos

polimorfonucleares) e macrófagos realizando fagocitose de bactérias e com a liberação de interferons antivirais (proteínas produzidas pelos leucócitos e fibroblastos para interferir na replicação de vírus, bactérias e células tumorais, além de estimular outras células de defesa). Já a maioria das respostas adaptativas é exercida via interação entre 1) anticorpo com o sistema complemento; 2) anticorpo com células fagocíticas (como, por exemplo, macrófagos); e 3) células T com macrófagos; mesmo que alguns mecanismos atuem de forma independente contra os抗ígenos. A Figura 1 apresenta um esquema simplificado dos mecanismos envolvidos nas respostas inatas e adaptativas e suas interações.

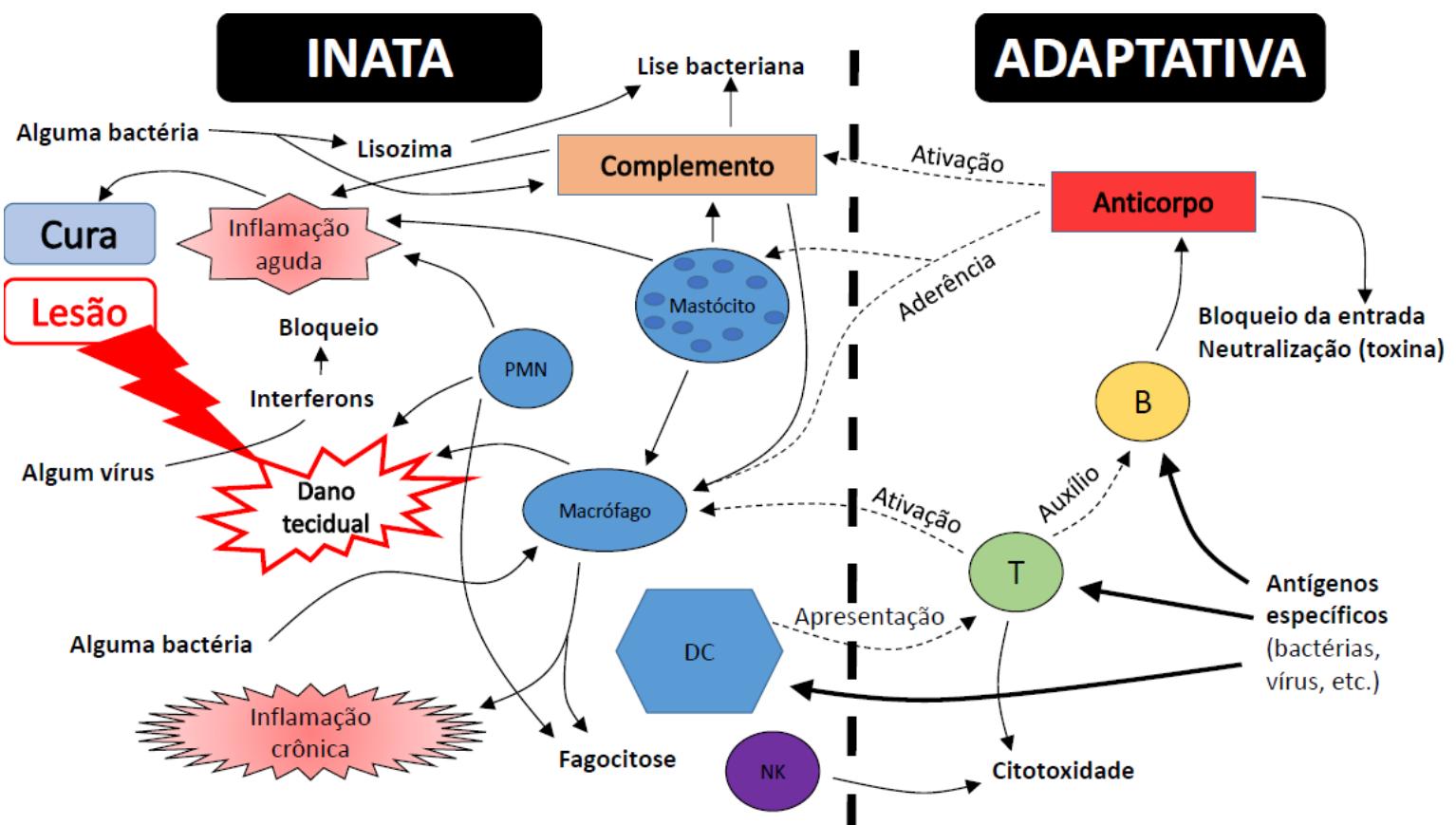


Figura 1. Esquema simplificado dos mecanismos da imunidade inata e adaptativa, bem como sua interação.

PMN (leucócito polimorfonuclear ou granulócitos: compreendem cerca de 80% dos leucócitos no sangue, compreendendo os neutrófilos, eosinófilos e basófilos); DC (célula dendrítica: apresentam抗ígenos para os linfócitos T); NK (célula *natural killer*); T (linfócito T); B (linfócito B). Adaptado de Playfair & Chain (2013).

2.2 Inflamação

A inflamação é produzida exclusivamente por compostos da imunidade inata, mais precisamente por três mecanismos distintos: 1) quando o sistema complemento é ativado; 2) pelas proteínas de fase aguda; e 3) pelos mastócitos (célula similar aos basófilos) quando danificados. A inflamação tem a função de promover a quimiotaxia (processo de atração de células em direção a um gradiente químico) de leucócitos polimorfonucleares e monócitos para o local infectado (foco de inflamação) e aumentar a permeabilidade do endotélio vascular, de modo a facilitar o ingresso dos componentes imunes séricos no tecido lesado (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). O aumento de permeabilidade endotelial é o maior responsável pelos principais sintomas da inflamação, que são: rubor, calor, edema e dor. A figura 2 exemplifica de forma simplificada as principais etapas da inflamação aguda.

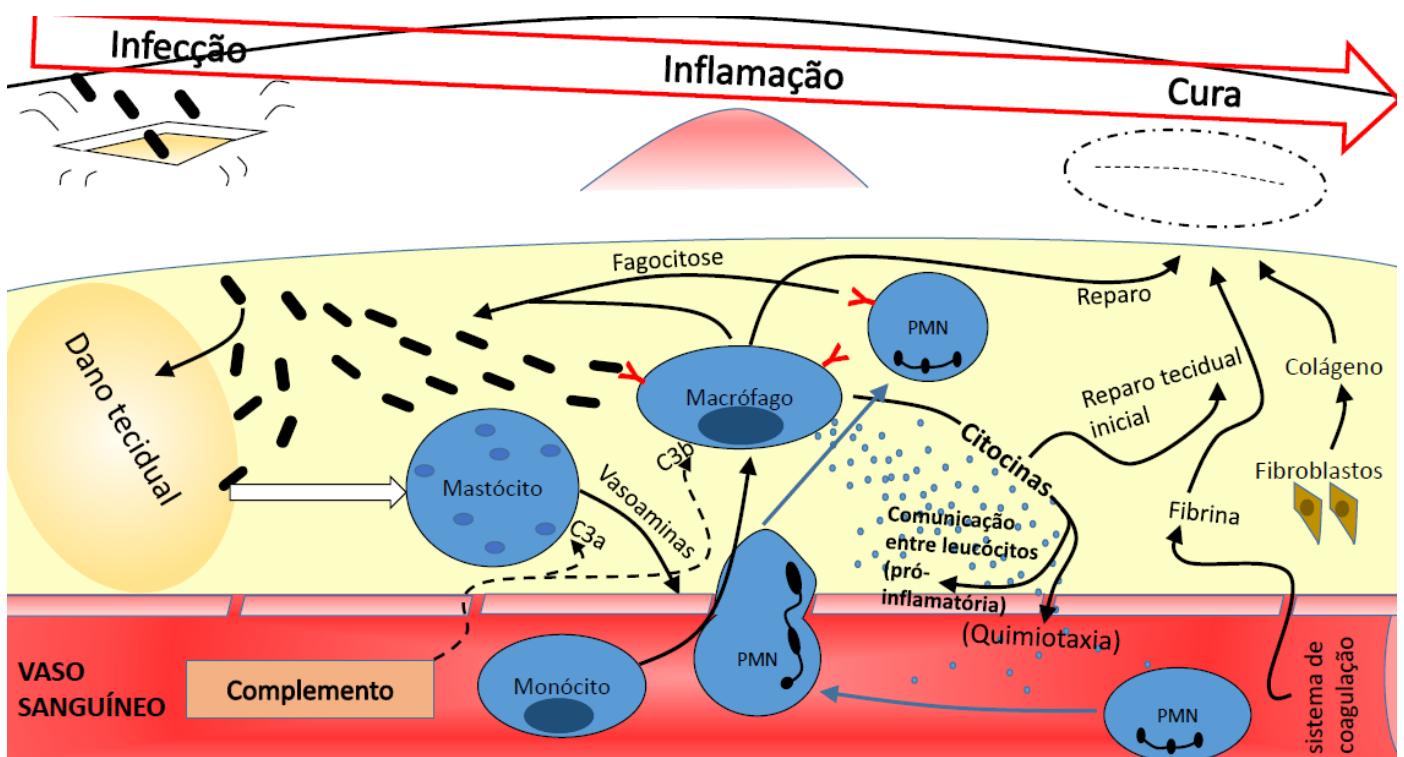


Figura 2. Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na inflamação aguda perante uma invasão bacteriana (hastes pretas). PMN (leucócito polimorfonuclear ou granulócitos: compreendem cerca de 80% dos leucócitos no sangue, compreendendo os neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Adaptado de Playfair & Chain (2013).

Esse efeito agudo da inflamação é natural e indispensável ao correto funcionamento do sistema imune. Porém, caso a inflamação não cesse após alguns dias, pode se tornar crônica. De forma crônica, ela induzirá uma constante ativação imunológica, o que danificará o organismo, pois, ao passo que ele fica constantemente ativado, também passará a destruir células sadias. Isto se dá porque, com a ativação constante de macrófagos e monócitos via inflamação, as enzimas produzidas por eles, que são responsáveis pela remoção de células mortas, podem danificar as células sadias, bem como alguns compostos eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos, que são produzidos pela enzima Ciclo-oxigenase (COX) – principalmente pela a isoenzima COX-2 – a qual a expressão é induzida por mediadores pró-inflamatórios vindos de monócitos e magrófagos) podem bloquear a função dos leucócitos. Além disso, as enzimas lisossômicas (enzimas bactericidas) também são capazes de gerar danos aos tecidos normais.

A inflamação crônica se dá devido à ausência de qualquer resposta imune específica ou por ação persistente de抗ígenos, em particular nas infecções intracelulares, como tuberculose, brucelose, leishmaniose, esquistossomose, entre outras (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). Ela está ligada a danos vasculares que podem levar a doenças severas, falência de órgãos e até à morte (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). Além disso, a inflamação sistêmica de baixo grau é associada com várias disfunções, como a resistência à insulina, aterosclerose, neurodegeneração, crescimento tumoral (LEONARD, 2007; PRADHAN et al., 2001; PEDERSEN & SALTIN, 2006) e aumento do risco de câncer (COUSSENS & WERB, 2002).

Com essas informações, torna-se importante conhecer, quantificar e analisar os processos inflamatórios e imunes do organismo, inclusive ligados ao exercício físico, pois esses aspectos podem limitar a performance física, como também a prática do exercício pode influenciá-los, de modo a induzir processos inflamatórios, anti-inflamatórios, imunossupressores e adaptações ao sistema imunológico.

Para desencadear respostas imunes (como a divisão e diferenciação celular, além da secreção de anticorpos) e inflamatórias, as células do sistema imune necessitam comunicar-se entre si. Essa comunicação só pode ser feita de duas formas: 1) interação receptor-receptor, por contato direto; 2) por intermédio de moléculas chamadas citocinas (PLAYFAIR & CHAIN, 2013). As citocinas são moléculas proteicas, glicolisadas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Tem função autócrina (agindo na própria célula produtora), parácrina (atuando em células próximas) e endócrina (quando sua ação é à distância). Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígena. Podem ter funções pró-inflamatórias (induzem que o sistema imune inato produza inflamação) e anti-inflamatórias (inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias).

As citocinas são subdivididas nas seguintes categorias:

- . **Adipocinas:** Secretadas pelo tecido adiposo;
- . **Miocinas:** Produzidas e secretadas pelas células musculares (miócitos) em resposta à contração muscular;
- . **Quimiocinas:** Responsáveis por promover a quimiotaxia;
- . **Linfocinas:** Produzidas pelos linfócitos;
- . **Interferons:** Envolvidos nas respostas antivirais;
- . **Fatores de necrose tumorais:** Citocinas que podem causar a morte celular (apoptose);
- . **Interleucinas:** Termo inicialmente utilizado para designar as citocinas que agiam sobre os leucócitos. Porém se utiliza, hoje, para a designação de moléculas de citocinas mais recentes. São produzidas principalmente por quatro tipos de células T (células T auxiliares do tipo 2 – Th2; células reguladoras Tr1, Th1, Th17 e células T CD8+), mas também, monócitos, macrófagos, células teciduais (como as dendríticas) que apresentam papel importante na ativação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003).

Ademais, concentrações elevadas desses compostos, como a interleucina-6 (IL-6) e outro biomarcador inflamatório (proteína C-reativa), são associadas com o aumento do risco para diversos tipos de cânceres (SIEMES et al., 2006; TSILIDIS et al., 2008; HEIKKILA et al., 2009; WANG et al., 2011; DOSSUS et al., 2010), doença cardiovascular (REILLY et al., 2005), osteoporose (PFEILSCHIFTER et al., 2002), diabetes mellitus (KADOGLOU et al., 2007) e caquexia geriátrica (YEH et al., 2001). Devido a isso, parece razoável a utilização das citocinas como parâmetros de avaliação (ou biomarcadores) da atividade inflamatória e imune.

Dentre os métodos existentes para realizar sua quantificação sérica, destaca-se o uso da técnica denominada *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), a qual é um dos procedimentos mais confiáveis e validados para mensurar as citocinas individualmente (LENG et al., 2008). Seu funcionamento se baseia na utilização de um anticorpo específico para a citocina de interesse, onde a ligação antígeno-anticorpo se dará de forma natural. Porém, esse anticorpo é ligado a uma enzima, e, no passo final, uma substância contendo o substrato da enzima é adicionada. A reação posterior produzirá uma mudança na cor do substrato, tornando-o detectável.

2.3 Desfechos inflamatórios

2.3.1 Interleucina-6 (IL-6)

2.3.1.1 Histórico e estrutura molecular

Em 1968, alguns estudos (MILLER; MITCHELL, 1968; CLAMAN; CHAPERON; SELNER, 1968) reportaram uma interação entre as células T e B durante a produção de anticorpos. Devido às tecnologias da época, somente foi possível observar que algumas atividades nos sobrenadantes de células T cultivadas induziam a proliferação e diferenciação de células B. Isso permitiu apenas que os cientistas pudessem teorizar que possivelmente as células T secretavam algumas moléculas que estimulavam as células B a produzirem anticorpos.

Essas moléculas foram subsequentemente descobertas e denominadas fatores de crescimento das células B e/ou fatores de diferenciação das células

B. Seus estudos iniciais começaram em 1973, com a descoberta de fatores solúveis que aumentavam a produção de anticorpos (KISHIMOTO; ISHIZAKA, 1973; KISHIMOTO; ISHIZAKA, 1973b; KISHIMOTO; ISHIZAKA, 1973c) e de um fator de substituição de células T (SCHIMPL; WECKER, 1973). Entre os anos de 1975 e 1980, concluiu-se que linfócitos de coelho ou células B de murinos induziam a produção de Ig em células B (KISHIMOTO et al., 1975; PARKER et al., 1980) e foram descobertos dois fatores envolvidos no crescimento e na diferenciação de células B (KISHIMOTO et al., 1978). Já, em 1982, foi realmente conhecido o fator de crescimento de células B (HOWARD et al., 1982). Seis anos depois, foi constatado que sua subdivisão (o fator de crescimento de células B-II) induzia o crescimento e a produção de IgM em células B de murinos (posteriormente essa substância foi denominada como IL-5) (KINASHI et al., 1986).

Em 1986, uma nova interleucina humana foi descoberta, chamada de fator estimulador de células B-2 (BSF-2), a qual fazia parte dos fatores de diferenciação de células B, cuja função era induzir os linfócitos a produzirem Ig (HIRANO et al., 1986). Atualmente, esse fator é conhecido como IL-6.

O gene da IL-6 está localizado no cromossomo 7p21 do genoma humano (SEHGAL et al., 1986) e no cromossomo 5 de ratos (MOCK et al., 1989). Os genes da IL-6 humana já foram clonados e sequenciados, contendo em sua estrutura quatro introns e cinco exons (ZILBERSTEIN et al., 1986; YASUKAWA et al., 1987). Ela é uma glicoproteína de cadeia simples com uma massa molecular relativa variando de 21kDa a 30kDa, dependendo da fonte celular e método de preparação (HIRANO et al., 1985; CAYPHAS et al., 1987; VAN DAMME et al., 1987; VAN DAMME et al., 1988), contendo 185 resíduos de aminoácidos (XU et al., 1997), onde sua estrutura tridimensional em solução foi determinada pela técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear multidimensional heteronuclear, tendo como resultado que a IL-6 é uma proteína que contém cinco α -hélices intercaladas com alças de comprimento variável, sendo que quatro dessas hélices constituem um feixe clássico com a quinta hélice localizada na alça do espectro de dicroísmo circular (XU et al., 1997) (Figura 3)

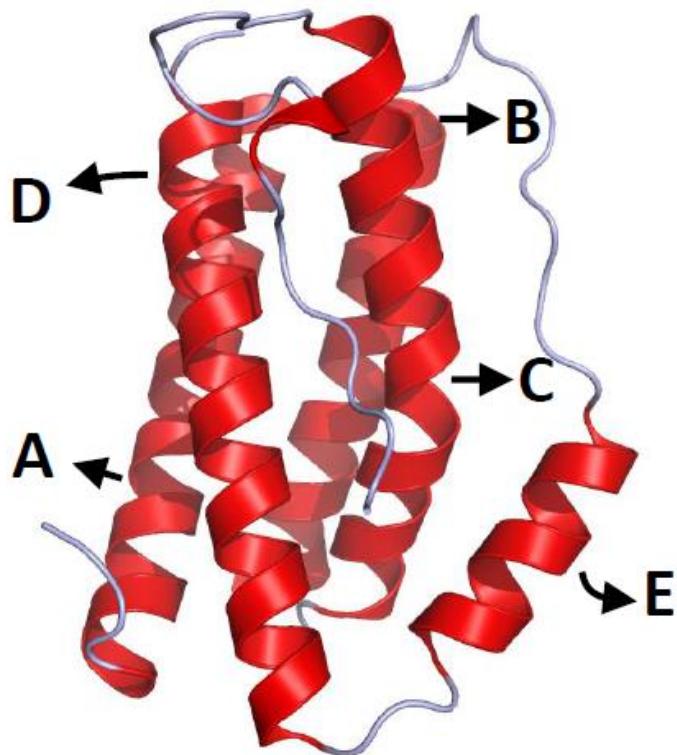


Figura 3. Imagem estéreo da estrutura da IL-6 obtida pela técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear multidimensional heteronuclear (Domínio público). Cada hélice individual está nomeada (A, B, C, D e E).

2.3.1.2 Funções, valores de referência e relações com patologias

Como essa molécula tem várias funções, ela já foi chamada de muitos nomes, como BSF-2, e foi considerada um novo interferon. Porém, posteriormente, descobriu-se que ela não tinha ação antiviral (HIRANO et al., 1988). Ademais, nominaram-na fator de crescimento de hibridoma, fator de crescimento de plasmocitoma e fator estimulador de hepatócitos, que induziam reações de fase aguda (GAULDIE et al., 1987; ANDUS et al., 1987), devido ao fato da IL-6 exibir um grande efeito estimulador no crescimento de plasmocitoma de murinos (SUEMATSU et al., 1992) e mieloma humano (KAWANO et al., 1988). Além disso, como ela induz a produção de células do sistema imune pelo progenitor mielóide, ela também foi referida como indutor tipo 2 de macrófagos e granulócitos (SHABO et al., 1988). Em adição a todas essas funções, a IL-6 tem um papel chave na inflamação, dado que é um dos principais indutores de várias proteínas de fase aguda (proteínas que produzem inflamação), como a proteína C-reativa, amilóide A sérica, fibrinogênio, haptoglobina, entre outros (HEINRICH PC; CASTELL JV & ANDUS, 1990).

Dentre as funções que a IL-6 desempenha, destacam-se a influência que ela tem sobre as respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias. Além disso, ela é capaz de induzir o crescimento de células T e diferenciação de células T citotóxicas através do aumento da expressão do receptor de IL-2 (NOMA et al., 1986) e produção de IL-2 (HIBI et al., 1990), bem como induzir a proliferação de timócitos (local de maturação dos linfócitos T). Na hematopoiese, uma ação conjunta de IL-6 e IL-3 suportam a formação de colônias de blastócitos (células embrionárias, ainda não diferenciada) que se diferenciarão em macrófagos e megacariócitos (YOSHIZAKI et al., 1998).

Nesse mesmo sentido, a IL-6 tem efeitos pronunciados na massa óssea, podendo induzir a diferenciação de osteoclastos e sua ativação *in vitro* (TAMURA et al., 1993), porém pode estar envolvida na inflamação sinovial e dano periarticular à cartilagem e ao osso, devido aos altos níveis séricos dessa citocina se correlacionarem com a gravidade da destruição radiográfica (DASGUPTA et al., 1992) e com a diminuição da produção de agrecano (proteína central proteoglicada cartílago-específica) e colágeno do tipo II pelos condrócitos (LEGENDRE et al., 2003). Essas duas substâncias juntas formam um componente fundamental para a estrutura e função da cartilagem das articulações. Além disso, parece estar envolvida em danos às cartilagens e ossos (KUDO et al., 2003).

Outra função da IL-6 é induzir a expressão endotelial de moléculas de adesão e a produção endotelial da proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) (ROMANO et al., 1997), que é uma proteína responsável pela quimiotaxia de monócitos, e parece que tem relação direta com a quimiotaxia de outros tipos de leucócitos, pois ratos *knockout* para a síntese de IL-6 acumulam menos leucócitos no local da inflamação (ROMANO et al., 1997) e ocorre a diminuição da migração de linfócitos e monócitos para o tecido infectado através do endotélio das vênulas pós-capilares (HURST et al., 2001). Ademais, há o envolvimento no recrutamento de células vasculares mesenquimais e neoangiogênese *in vivo* (GIRAUDO et al., 1996) e na indução da proliferação de fibroblastos sinoviais (MIHARA et al., 1995). É devido ao fato que a IL-6 exerce diversos eventos proliferativos, diferenciativos e de maturação, dependendo da

natureza da célula alvo, bem como diferentes funções no organismo, que essa proteína ganha o status de citocina pleiotrópica (KISHIMOTO, 2006).

Em condições fisiológicas, os níveis séricos de IL-6 variam de 1 a 5 pg/mL, valores considerados muito baixos, embora seu volume possa aumentar mais de 100.000 vezes durante fases iniciais de inflamação (KISHIMOTO, 1989; KISHIMOTO, 2005). Essa citocina está envolvida na resposta imune inata, o que significa que há uma elevação dos seus níveis séricos caso ocorra alguma infecção, sendo produzida por monócitos e macrófagos (KISHIMOTO, 2005). Também pode estar envolvida na resposta imune adquirida, induzindo os linfócitos B a produzirem imunoglobulinas (KISHIMOTO, 1989).

Como já vimos, a IL-6 exibe um papel importante em processos inflamatórios e, devido a essa ação pró-inflamatória, ela é um importante biomarcador de inflamação. E por esse motivo que é natural que a produção exacerbada e crônica dessa interleucina esteja associada ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes, inflamatórias e, até mesmo, canceres (KISHIMOTO, 1989; KISHIMOTO, 2005; AKIRA; TAGA & KISHIMOTO, 1993; TANAKA; KISHIMOTO, 2012).

Mesquida et al. (2014), em seu artigo de revisão, apresentam uma tabela modificada de Simon (2011), enumerando as seguintes doenças onde a IL-6 desempenha um papel na patogênese:

- doenças inflamatórias: artrite reumatoide crônica, artrite juvenil, doença de Still do adulto, doença de Castleman, doença de Graves, osteoartrite, doença inflamatória intestinal, doença intersticial pulmonar, esclerose sistêmica, inflamação intraocular, policondrite recidivante, espondilite anquilosante, sepse, asma e endometriose;
- doenças neurológicas: esclerose múltipla, doença de Alzheimer, esquizofrenia, depressão, mania e estresse psicológico;
- canceres: câncer de mama, câncer de próstata, carcinoma de células renais metastático, mieloma múltiplo e câncer colorretal;

- infecções: infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus linfotrópico da célula humana do tipo 1 (HTLV-1), malária cerebral, infecção meningocócica e infecções do trato urinário.

É devido ao fato que a IL-6 é um ótimo marcador inflamatório e à relação de que seus níveis elevados são fatores de risco para inúmeras doenças, que essa citocina é um desfecho tão importante e estudado, sendo uma das citocinas mais pesquisadas nas ciências biológicas e da saúde.

2.3.1.3 Efeitos da IL-6 como miocina e sua relação com o exercício físico

É importante salientar, principalmente para as ciências que estudam o movimento humano, que além de uma interleucina, a IL-6 é uma miocina.

Como já foi mencionado, as miocinas são citocinas, proteínas pequenas ou peptídeos, que são produzidos e liberados pelos miócitos em resposta à contração muscular (PEDERSEN et al., 2007), ou seja, em resposta ao movimento corporal. Essa é uma área recente do conhecimento, visto que o termo miocina foi proposto pela primeira vez em 2003 por Pedersen et al. (2003).

Do mesmo modo que as citocinas, as miocinas têm efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, com efeitos sistêmicos ocorrendo em concentrações picomolares (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2012; PEDERSEN, 2013). Estão envolvidas em alterações metabólicas associadas ao exercício físico, adaptações ao treinamento, participando da regeneração e reparos dos tecidos, imunomodulação, sinalização, expressão e diferenciação celular, bem como na manutenção do funcionamento corporal saudável (PEDERSEN et al., 2007).

Ao contrário da IL-6 quando citocina, que tem ação pró-inflamatória, a IL-6 quando miocina tem ação anti-inflamatória. Isso se dá, devido às vias de sinalização de IL-6 se diferirem de maneira muito prenunciada entre os miócitos (que produzem a miocina) e os monócitos/macrófagos (que produzem a citocina) (BRANDT & PEDERSEN, 2010). A via de sinalização de IL-6 em macrófagos ou monócitos é dependente da ativação da via de sinalização de NF-κB (factor nuclear kappa B) (BRANDT & PEDERSEN, 2010), que é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição, desempenhando um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção.

No entanto, a expressão intramuscular de IL-6 pelos miócitos é regulada por uma rede de cascatas de sinalização, incluindo as vias Ca2/NFAT e glicogênio/p38 MAPK (BRANDT & PEDERSEN, 2010). Dessa forma, quando a IL-6 é sinalizada em monócitos ou macrófagos, cria-se uma resposta pró-inflamatória, enquanto que a ativação e sinalização da IL-6 no músculo é totalmente independente de uma prévia resposta de TNF ou ativação de NF-κB (BRANDT & PEDERSEN, 2010).

Falando especificamente sobre a relação entre a IL-6 e a atividade/exercício físico, em 1991, Northoff & Berg (1991), foram os primeiros a reportarem aumentos plasmáticos na concentração de IL-6 em resposta ao exercício. Nessa época, ainda não se tinha o conhecimento de que o músculo atuava como um órgão endócrino em resposta a ação contrátil. Foi somente 17 anos depois que a IL-6 foi descoberta como miocina, sendo a primeira molécula dessa classe conhecida pela ciência, a qual era secretada na corrente sanguínea em resposta às contrações musculares (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2008).

No que se refere aos efeitos agudos, seus níveis plasmáticos aumentam mais drasticamente do que qualquer outra citocina (OSTROWSKI et al., 1998a; PEDERSEN & HOFFMANN-GOETZ, 2000) e podem aumentar em até 100 vezes em resposta ao exercício físico (mesmo que aumentos menores sejam mais frequentes), porém a magnitude da resposta é dependente da intensidade e, especialmente, da duração do exercício, enquanto que o modo de exercício parece ter pouco efeito (FISCHER, 2006).

No entanto, para se ter uma resposta sistêmica pronunciada no organismo, é necessário realizar exercício físico prolongado, envolvendo massa muscular significante na atividade contrátil (FISCHER, 2006), como já foi notificado em uma corrida de 246 km de distância, onde seus níveis plasmáticos aumentaram 8.000 vezes (MARGELI et al., 2005). Porém, deve-se ter em mente que os níveis de IL-6 têm seu pico imediatamente após o exercício ou pouco depois, seguido de uma diminuição rápida aos níveis pré-exercício (FISCHER et al., 2004; OSTROWSKI et al., 1998b).

O ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) é responsável pela transferência de informação do DNA até o local de síntese de proteínas. Em

resposta ao exercício, é detectável um aumento no conteúdo do mRNA de IL-6 no músculo esquelético envolvido na atividade após 30 minutos, com aumentos de até 100 vezes sendo detectados ao final da sessão de exercício (KELLER et al., 2001; STEENSBERG et al., 2002), aumentando, assim, a síntese de IL-6. Através de biópsias no músculo vasto lateral de humanos, com técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, constatou-se que as fibras musculares contráteis são uma fonte de mRNA de IL-6 (HISCOCK et al., 2004; PENKOWA et al., 2003).

Aparentemente, os níveis de IL-6 que se acumulam no interstício (líquido claro e transparente que banha as células de todos os animais) das fibras musculares envolvidas no exercício podem ser de cinco a 100 vezes superiores aos encontrados na circulação (LANGBERG et al., 2002; ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003). No entanto, quando foi medido simultaneamente as concentrações arterio-venosa de IL-6 e o fluxo sanguíneo da perna, foi demonstrado que grandes quantidades de IL-6 podem ser liberadas pela perna exercitada.

No ano de 1997, um estudo sugeriu que o aumento nos níveis de IL-6 advindos do exercício físico era devido ao dano muscular, ou seja, quanto mais danos às fibras musculares a atividade proporcionasse, maiores seriam os níveis séricos de IL-6 (BRUUNSGAARD et al., 1997). No entanto, atualmente já é sabido que o exercício excêntrico (que proporciona um maior dano muscular) não é associado com maiores incrementos nos níveis de IL-6 quando comparado à exercícios que envolvam contrações concêntricas (que proporciona um menor dano muscular) (FISCHER, 2006). O que geralmente acontece é que o exercício excêntrico pode resultar em um pico tardio e um decréscimo mais lento dos níveis plasmáticos de IL-6 durante a recuperação (HELLSTEN, et al., 1997; MacINTYRE et al., 2001; WILLOUGHBY; McFARLIN; BOIS, 2003).

Em contraste, as respostas da IL-6 são sensíveis à intensidade do exercício (OSTROWSKI; SCHJERLING; PEDERSEN, 2000), o que pode representar indiretamente a massa muscular envolvida no exercício físico, devido ao fato que o músculo por si só é uma importante fonte de IL-6 plasmática (FISCHER et al., 2004; STEENSBERG et al., 2000), pois como já foi observado,

exercícios envolvendo uma massa muscular limitada (e.g.: músculos dos membros superiores) podem ser insuficientes para o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 a valores acima do pré-exercício (BERGFORS et al., 2005; HIROSE et al., 2004; NOSAKA & CLARKSON, 1996). Não parece ser o caso da corrida, visto que ela envolve porções maiores da musculatura, sendo por isso um dos exercícios que mais aumentam os níveis plasmáticos de IL-6 (FISCHER, 2006).

No entanto, a variável que mais determina a amplitude dos níveis de IL-6 pós-exercício é a duração, pois mais do que 50% das variações plasmáticas dessa miocina após o exercício são explicadas unicamente pela duração da sessão, resultado que foi gerado através de uma regressão linear com os dados de 74 estudos e aproximadamente 800 sujeitos, tendo um $R^2 = 0,51$ e um $P < 10^{-12}$ (FISCHER, 2006). No entanto, como o exercício realizado em alta intensidade geralmente é associado à baixa duração e o contrário é verdadeiro, a relação entre o volume plasmático de IL-6 e o aumento de duração pode ser ainda mais pronunciado se ajustado para a intensidade do exercício.

Para exemplificar essa relação, estudo recente (DORNELES et al., 2016) verificou o efeito agudo de dois modelos de exercícios físicos intervalados (moderada e alta intensidade) sobre níveis sistêmicos de IL-6 em indivíduos com sobrepeso/obesidade e eutróficos. O exercício intermitente de alta intensidade (HIE) consistia em 10 tiros de 60 segundos à 85-90% da potência máxima (Pmax) por 75 segundos à 50% da Pmax. O exercício intermitente de intensidade moderada (MIE) foi realizado com 10 séries de 60 segundos à 70-75% da Pmax por 60 segundos à 50% da Pmax. Os indivíduos com sobrepeso/obesidade apresentaram um aumento progressivo nos níveis de IL-6 tanto imediatamente, quanto 30 minutos após o HIE, enquanto que os eutróficos apresentaram um aumento significante somente 30 minutos após o exercício. O MIE, por outro lado, não foi suficiente para modificar os níveis circulantes de IL-6. Com isso vemos que quando a duração do exercício é baixa, apenas aquele de intensidade alta teve uma elevação significativa de IL-6.

No mesmo sentido, caso o volume das sessões de exercício se equipararem, um protocolo de HIE (um minuto de esforço à 100% da velocidade

do consumo máximo de oxigênio - $VO_{2\text{max}}$, por um minuto de descanso) pode promover respostas inflamatórias similares ao exercício contínuo de intensidade moderada (70% da velocidade do $VO_{2\text{max}}$), inclusive aumentando os níveis séricos de IL-6 pós-exercício (CABRAL-SANTOS et al., 2015).

Vale ressaltar que a IL-6 pode atuar no músculo que realiza a contração durante o exercício ou no tecido adiposo durante a recuperação, enquanto que a maioria dos outros órgãos e células-alvo são expostos apenas à IL-6 liberada para a circulação sistêmica, sendo que a relação dose-resposta e o *timing* devem ser considerados.

A relação dose-resposta devido ao fato que aumentos consideráveis de IL-6 no plasma ocorrerão apenas se o exercício envolver uma massa muscular considerável, por um tempo considerável a uma intensidade considerável. Caso contrário, o aumento pode ser muito pequeno ou não existir. Mesmo assim, os maiores valores de IL-6 plasmática induzidos pelo exercício físico dificilmente excederão 100 pg/mL. No que se refere ao *timing*, o pico plasmático de IL-6 ocorrerá imediatamente após (ou um pouco depois) do término do exercício físico e, devido a isso, os efeitos sistêmicos induzidos por essa miocina são esperados para ocorrer de forma mais importante durante a recuperação do exercício.

No estudo de Cormie et al. (2015), os níveis séricos de IL-6 não se modificaram após alguma das três sessões diferentes de treinamento resistido. Em cada sessão experimental (separadas pelo período de sete a 10 dias entre elas) eram realizados seis exercícios para membros superiores. Foram realizadas três séries em cada exercício, onde somente a carga levantada e o número de repetições completadas em cada série diferiam entre as três condições experimentais. A sessão de baixa intensidade envolvia séries de 15 a 20 repetições máximas (RM), a intensidade moderada correspondia a séries de 10 a 12 RM e a alta intensidade, de seis a oito RM. Provavelmente a falta de incremento dos níveis plasmáticos de IL-6 se deu ao fato da baixa quantidade de massa muscular envolvida nas sessões e ao baixo tempo das mesmas. Porém, isso não indica, necessariamente, que não ocorreram aumentos nos

níveis intramusculares de IL-6, pois, como já mencionado, são cinco à 100 vezes superiores as concentrações plasmáticas.

Em pessoas saudáveis, com idade variando de 18 a 30 anos, uma sessão de 30 minutos de exercício aeróbico contínuo à 75% do $VO_{2\text{max}}$, foi suficiente para elevar os níveis plasmáticos de IL-6 (MAHARAJ et al., 2015).

A IL-6 ainda atua de forma aguda em modificações metabólicas e hormonais, como é no caso que a infusão de IL-6 recombinante humana (rhIL-6) aumenta o consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono (CAREY et al., 2006; TSIGOS et al., 1997). Além disso, a elevação aguda de IL-6 menor que 200 pg/mL, tanto em indivíduos normais quanto com diabetes tipo 2, não foi suficiente para modificar a taxa de aparecimento de glicose (TA), desaparecimento de glicose (TD) ou glicose plasmática no estado pós-absortivo (PETERSEN et al., 2005; STEENSBERG et al., 2003a; KROGH-MADSEN et al., 2006), sendo preciso aproximadamente 200 pg/mL para aumentar a TD e a oxidação de glicose (CAREY et al., 2006). No entanto, aumentos muito menos pronunciados de IL-6 plasmática vinda do exercício, aumentou tanto a TA quanto a TD (FEBBRAIO et al., 2004). Provavelmente alguns cofatores do exercício que são capazes de modular os efeitos da IL-6 explicam essas diferenças (FEBBRAIO et al., 2004).

O aumento de rhIL-6 também é diretamente correlacionado com o aumento da lipólise e a oxidação de gordura (Van HALL et al., 2003; PETERSEN et al., 2005), e essa relação foi confirmada devido ao fato do efeito lipolítico se manter em adipócitos em cultura, sugerido um efeito direto da IL6 no tecido adiposo (PETERSEN et al., 2005). Com o exercício físico, foi observado um aumento de rh-IL-6 no tecido adiposo (KELLER et al., 2003), que parece ser mediado pelas catecolaminas (KELLER et al., 2004).

Além disso, a IL-6 tem efeitos em vários hormônios, como no cortisol (TSIGOS et al., 1997), promovendo o aumento do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (NAITO et al., 1988) e sua anulação (quando injetado um anticorpo anti-IL-6) (PERLSTEIN et al., 1993) e, também, estimulando a liberação de corticotrofina pela glândula pituitária (HANISCH et al., 2000) e cortisol pelo córtex adrenal (GONZALEZ-HERNANDEZ et al., 1994). Aumentos consistentes de

cortisol podem ser alcançados com níveis plasmáticos de IL-6 a partir de 50 pg/mL (FISCHER, 2006). Ademais, o aumento do cortisol pós-exercício é atenuado caso a liberação de IL-6 seja inibida pela suplementação de vitaminas C e E (FISCHER et al., 2004).

No entanto, durante um *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (padrão ouro para diagnóstico de resistência à insulina) não acontece o aumento de cortisol em resposta à IL-6 (CAREY et al., 2006). Isso pode indicar que outros fatores induzidos pelo exercício também façam parte da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (FISCHER, 2006). Ademais, os níveis de cortisol podem estar envolvidos na regulação dos níveis de IL-6 (quando em grande quantidade) através de um *feedback* negativo (PAPANICOLAOU et al., 1996).

Níveis elevados de IL-6 aumentam as concentrações plasmáticas de glucagon e hormônio do crescimento (GH) (FISCHER, 2006), bem como quando a concentração de IL-6 chega a valores iguais ou superiores de 300 pg/mL, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina (Van HALL et al., 2003).

A IL-6 tem efeitos agudos imunorregulatórios importantes, como o fato de que infusões de rhIL-6 aumentam o cortisol plasmático (como visto acima), o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), IL-10, receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa (sTNF-R) e proteína C-reativa (CRP) (ROWSEY & KLUGER, 1994; STEENSBERG et al., 2003b; TILG et al., 1994).

O aumento na concentração de cortisol é importante visto que ele tem propriedades anti-inflamatórias (BARNES, 1998). Pode-se notar que após uma infusão de rh-IL-6, ocorre um significante aumento do cortisol em uma hora (STEENSBERG et al., 2003b).

Como o exercício físico intenso é associado com a redução da capacidade antimicrobiana dos neutrófilos (PEDERSEN & HOFFMANN-GOETZ, 2000), e isso parece ser mediado pelo cortisol (MANDELL; RUBIN; HOOK, 1970), bem como esse hormônio pode reduzir o número de linfócitos através do aumento da apoptose, é possível que altos níveis sistêmicos de IL-6 (como observado após um exercício prolongado e intenso) pode, em parte, ser responsável pelas

mudanças nas subpopulações leucocitárias e capacidade antimicrobials (FISCHER, 2006).

Além disso, a IL-1ra tem a função de atenuar o efeito da citocina pró-inflamatória IL-1, pela redução da transdução de sinais através do receptor de IL-1 (GABAY et al., 1997). Após infusão de rhIL-6, os níveis plasmáticos de IL-1ra ficam maiores por até uma hora (STEENSBERG et al., 2003b). Além disso, a IL-10 é capaz de inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo o TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , estimulada pelo LPS (MOORE et al., 1993; PRETOLANI, 1999). Linfócitos e monócitos são as principais fontes de IL-10, que aumenta sua concentração plasmática por duas horas, em resposta à infusão de rhIL-6 (STEENSBERG et al., 2003b).

Infusões de IL-6 também induzem um aumento tardio de CRP a partir do fígado através da ativação do fator de transcrição citoplasmático 3 (STAT3) (STEENSBERG et al., 2003b; ZHANG et al., 1996). A CRP pode contribuir para o aumento plasmático de IL-1ra durante a recuperação do exercício, aumentando a liberação de IL-1ra a partir de monócitos (PUE et al., 1996).

Por fim, enquanto que a citocina pró-inflamatória TNF- α pode estimular a produção de IL-6 como citocina (PLOMGAARD et al., 2005), a IL-6 como miocina não estimula a produção de TNF- α (STEENSBERG et al., 2003b). Ao invés disso, IL-6 atenua a produção estimulada por LPS de TNF- α (SCHINDLER et al., 1990, STARKIE et al., 2003). Em adição, IL-6 pode atenuar o efeito do TNF- α pela indução do sTNF-R (TILG et al., 1994).

Em suma, a produção e liberação de IL-6 pelos miócitos quando em atividade, pode facilitar uma resposta anti-inflamatória através de efeitos no fígado bem como em diferentes subpopulações de leucócitos (FISCHER, 2006), aumentando a produção de compostos anti-inflamatórios como o cortisol plasmático, o IL-1ra, IL-10 e sTNF-R.

A partir deste ponto, serão abordados os efeitos crônicos do exercício físico sobre essa miocina. Vários estudos epidemiológicos verificaram uma associação negativa entre a quantidade de atividade física regular e os níveis basais de IL-6, de modo que quanto mais ativas as pessoas eram, menores

volumes plasmáticos de IL-6 elas tiveram (CESARI et al., 2004; COLBERT et al., 2004; PANAGIOTAKOS et al., 2005). Considerando que os níveis basais de IL-6 se referem à citocina de características pró-inflamatórias, não à miocina anti-inflamatória, a diminuição dos seus níveis resulta em diminuição da atividade inflamatória e, por consequência, dos níveis inflamatórios sistêmicos.

De fato, essa associação se confirmou em estudos experimentais utilizando cargas de exercício físico. Goldhammer et al., (2005) concluíram que 12 semanas de treinamento aeróbio contínuo em intensidade moderada (70 a 80% da frequência cardíaca máxima individual) reduziu os níveis séricos de IL-6 de uma média de 2,5 ($\pm 1,5$) para 1,4 ($\pm 0,6$) pg/mL. Nota-se que, mesmo os níveis iniciais estando dentro da normalidade, ocorreu uma diminuição significativa dessa citocina, caracterizando o potencial de influência crônica que o exercício contínuo de intensidade moderada tem sobre ela.

No mesmo sentido, três sessões semanais (com duração de 25-30 minutos) de treinamento contínuo de intensidade moderada por 10 meses foi suficiente para diminuir os níveis séricos de IL-6 em idosos de ambos os sexos. Nesse estudo, as médias dos níveis de linha base também estavam com valores normais, variando de aproximadamente 4,5 a 5,1 pg/mL (sabe-se que os valores de referência vão até 5,0 pg/mL, no entanto 0,1 pg é praticamente irrelevante), porém após a intervenção, reduziram para aproximadamente 3 pg/mL (KOHUT et al., 2006). O mesmo estudo verificou que o mesmo volume de treinamento de força e flexibilidade não alterou esse parâmetro (KOHUT et al., 2006). Vale ressaltar que os valores de linha base estavam praticamente normais.

Em contrapartida, no que se refere ao treinamento de força, 14 semanas de treinamento resistido, com três sessões semanais com duração média de uma hora cada, realizando três séries variando de 17 a 12 repetições, em cinco exercícios para os membros superiores, dois para o tronco e cinco para os membros inferiores, a uma intensidade variando de 40 a 70% de 1RM, realizado por 15 homens com fatores de risco para síndrome metabólica, com média de idade de 57,5 ($\pm 7,1$) anos, foram suficientes para reduzir nos níveis séricos de repouso de IL-6. Porém, a amostra estava, em média, com níveis altos dessa citocina nas análises de linha base ($155 \pm 50,2$ pg/mL) que foram diminuídos

para 124 ($\pm 26,7$) pg/mL (MARTINS et al., 2015). Isso ressalta que o exercício resistido tem potencial para modificar os níveis séricos de repouso da IL-6.

Porém, parece que o potencial desse tipo de treinamento em reduzir os níveis de IL-6 é menor do que o do exercício contínuo e é significativo apenas em altas concentrações dessa citocina, pois no estudo de Karabulut et al. (2013), do mesmo modo que o de Kohut et al. (2006), os níveis séricos de IL-6 não se modificaram após seis semanas de treinamento resistido de alta intensidade ou treinamento resistido de baixa intensidade com restrição do fluxo sanguíneo, em homens idosos. Eram realizadas três sessões por semana, com três exercícios para membros superiores (três séries de oito repetições à 80% de 1RM) para ambos os grupos e dois exercícios para membros inferiores, onde o grupo de alta intensidade realizava três séries de oito repetições à 80% de 1RM e o grupo com restrição do fluxo sanguíneo realizava uma série de 30 repetições, seguida de duas séries de 15 repetições à 20% de 1RM. Além dos grupamentos musculares exercitados serem menores, os níveis de IL-6 de linha base estavam bem abaixo do que o estudo de Martins et al. (2015), sendo uma média de 14 ($\pm 4,8$) pg/mL no grupo de restrição do fluxo sanguíneo e 7 ($\pm 0,8$) pg/mL no grupo de alta intensidade.

Além disso, em esquiadores jovens (20 a 29 anos) treinados ($VO_{2\max}$ de 70 a 82 mL/kg.min) apresentavam níveis basais inferiores de IL-6 durante a temporada de treinamento do que fora da temporada (RONSEN et al., 2001).

Em contrapartida, outros estudos não demonstraram mudanças nos níveis basais de IL-6 em resposta ao treinamento físico. O estudo de Bruunsgaard et al. (2004), do mesmo modo que os estudos de Kohut et al. (2006) e Karabulut et al. (2013) que foram citados previamente, demonstrou que três sessões de 45 minutos por semana de treinamento resistido por 12 semanas não alterou os níveis de IL-6 em pessoas com mais de 85 anos. Vale ressaltar que os valores de linha base estavam dentro da normalidade. O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Donges, Duffield e Drinkwater (2010), com 10 semanas de treinamento resistido onde 35 pessoas de ambos os sexos, sedentárias realizaram sete exercícios (quatro para membros superiores e três para membros inferiores em uma intensidade de 70 a 75% de 10 repetições

máximas (RM), sendo que da 1^a à 4^a semana os indivíduos realizaram duas séries de 10 repetições em cada aparelho. Da 5^a à 10^a, realizaram três séries de oito repetições. Como o estudo anterior, os valores de IL-6 nas análises de linha base estavam normais.

O mesmo ocorreu com exercício contínuo de intensidade moderada (LARSEN et al., 2001), onde três meses com três sessões semanais de aproximadamente 30 minutos desse protocolo de treinamento à intensidade de 80% da frequência alvo não foi suficiente para alterar os níveis plasmáticos de IL-6 –valores normais na linha base– em homens com insuficiência cardíaca e média de idade de 67 (\pm 8) anos. O mesmo ocorreu no estudo de Donges, Duffield e Drinkwater (2010), com o grupo que realizou 10 semanas de treinamento contínuo, em uma intensidade de 70 a 75% da frequência cardíaca máxima (FCM) em que cada sessão durou de 30 a 50 minutos.

Imayama et al. (2012) também realizaram uma intervenção, com mulheres pós-menopausadas com sobre peso/obesidade, que durou 12 meses com 225 minutos por semana de exercício contínuo de intensidade moderada à vigorosa (70 a 85% da frequência cardíaca máxima) em que os níveis séricos de IL-6 na linha base já estavam dentro da normalidade. Como resultado, obtiveram o mesmo: não houve mudanças nos níveis séricos de IL-6.

No mesmo sentido, 18 meses de treinamento concorrente (30 minutos de exercício contínuo, 15 minutos de treinamento resistido e 15 minutos de volta a calma por sessão), realizados em três sessões semanais, com a intensidade do exercício contínuo sendo prescrita na faixa entre 50-75% da frequência cardíaca de reserva, e do exercício resistido sendo duas séries de 12 repetições em quatro exercícios de membros inferiores, não alteraram os níveis basais de IL-6 de indivíduos com sobre peso e obesidade com mais de 60 anos de idade. Novamente, os níveis de linha base estavam dentro dos valores normais (NICKLAS et al., 2004).

Aparentemente, as pesquisas que objetivam verificar o efeito crônico do exercício físico sobre o perfil inflamatório de indivíduos, através da avaliação de citocinas pró-inflamatórias (como é o caso da IL-6), precisam pesquisá-las em

um grupo amostral que não esteja com esses marcadores dentro dos valores normais, pois é pouco provável que a mesma responda ao exercício.

Para comprovar isso, analisemos o estudo Gondim et al. (2015). Os autores realizaram uma intervenção de 12 meses, com duas sessões semanais de treinamento (cada sessão tinha duração de 60 minutos) com exercício aquático de intensidade moderada ($66 \pm 10\%$ da frequência cardíaca máxima para a idade). Participaram desse estudo 29 homens e 114 mulheres com a média de idade de 56 (± 10) anos, os quais foram separados em três grupos conforme seu índice de massa corporal (IMC): 1) eutróficos; 2) sobrepeso; 3) obesos. Nota-se que nas análises dos níveis séricos de IL-6, somente o grupo dos obesos estava com valores acima dos normais, sendo por volta de 6 pg/mL. Como resultado, apenas o grupo dos obesos reduziu os níveis de IL-6 após os 12 meses de treinamento, chegando a valores próximos de 3 pg/mL, sendo que os outros grupos não tiveram modificações. É importante ressaltar que nenhum grupo teve modificações no peso, IMC, massa magra, massa gorda e percentual de massa gorda, garantindo assim, que a redução dos níveis de IL-6 não foi devido ao fato de que o grupo de obesos poderia ter perdido mais gordura do que os outros grupos.

Em contrapartida, enquanto os níveis plasmáticos de IL-6 parecem diminuir em função do treinamento, seu receptor (IL-6R) parece ter o comportamento contrário. Em resposta a 10 semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada, o conteúdo basal do mRNA do IL-6R na musculatura treinada aumentou em aproximadamente 100% (KELLER et al., 2005). Devido a isso, é possível supor que a diminuição dos níveis de IL-6 é parcialmente contrabalanceada pelo aumento da expressão do IL-6R, por meio de que a sensibilidade à IL-6 é aumentada (FISCHER, 2006). No entanto, na circulação, os níveis de IL-6R não são alterados de modo crônico ou agudo (KELLER et al., 2005).

Em suma, como efeito crônico, se observa a redução da formação de IL-6 em condições basais e após um evento agudo de exercício físico, caracterizando adaptações normais ao treinamento (FISCHER, 2006).

2.3.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

É conhecido que as citocinas são moléculas proteicas que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Elas têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina, quando sua ação é à distância. Ademais, atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígena (VARELLAL & FORTE, 2001).

No fim do século XIX, William Coley, um cirurgião de Nova York, descreveu remissão de tumores após infecção bacteriana. Em 1975, a proteína responsável por este processo foi identificada e chamada Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (TERLIKOWSKI, 2001), devido à capacidade de necrosar tumores.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é um citocina pró-inflamatória que exerce papel essencial na resposta à infecção, facilitando as interações intercelulares e é essencial na resposta do hospedeiro a um micro-organismo invasor (BRADDING et al., 1994). Está envolvido na patogênese de processos inflamatórios localizados e sistêmicos. Está ligado à resposta de defesa à inflamação do organismo, gerando um potente mecanismo de *feedback* do tecido, e prossegue para a formação de grande número de leucócitos defensivos que ajudam a remover a causa da inflamação (BRADDING et al., 1994).

O TNF- α apresenta largo espectro de ação que inclui recrutamento de neutrófilos (através da indução de moléculas de adesão na parede vascular endotelial) e indução da síntese de citocinas e quimiocinas (GONZALEZ-GAY; GONZALEZ-JUANATEY; MARTIN, 2005). Além disso, é reconhecido como sendo uma das citocinas pleiotrópicas (podem atuar sobre tipos celulares diferentes) expressa em quantidades aumentadas pelos monócitos ativados, macrófagos, linfócitos e mastócitos, como um homotímero composto por três moléculas de TNF 17-kD (BRADDING et al., 1994) que atuam como fator de defesa do hospedeiro em respostas imunológicas e inflamatórias (MACKAY et al., 1993). A figura 4 ilustra a estrutura molecular do TNF- α .

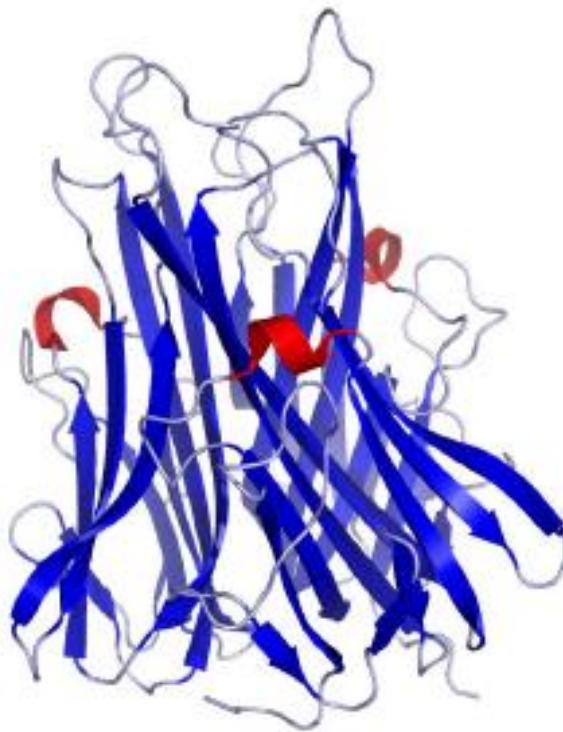


Figura 4. Estrutura do TNF- α (Domínio público).

O TNF- α ativa células endoteliais a secretar vários fatores, incluindo o plasminogênio tipo 1 (PAI-1), IL-1, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e IL-6 (DOSNE et al., 1988). A atividade do TNF- α , também resulta em alterações fenotípicas do endotélio, caracterizadas por aumento da permeabilidade e na indução ou regulação positiva de várias moléculas de adesão celular, tais como E-selectinas, as quais aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias e têm significado importante para a migração dos glóbulos brancos, moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que atuam favorecendo a migração e adesão monocitária e moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), que permitem a ligação entre as células ou entre células e a matriz extracelular (NAWROTH et al., 1986). A expressão regulada dessas moléculas de adesão e seus contra-receptores sobre os glóbulos brancos media a adesão e o extravasamento dos mesmos durante uma reação inflamatória (SPRINGER, 1990).

O TNF- α existe em duas formas: uma transmembrana de 26kda e outra secretada de 17Kda, ambas biologicamente ativas. Ele é estruturalmente relacionado à linfotoxina- α (LT α , também chamada FNT β) e seu nível sérico normal é de 1.36pg/mL (GURROLA-DÍAZ et al., 2009). A atividade do TNF- α é mediada através da ligação aos receptores de membrana (p55 e p75 TNFR) encontrados em diferentes células, como leucócitos, células dendríticas, células endoteliais vasculares e células mesenquimais. Uma molécula de TNF- α deve se combinar a dois ou mais TNFRs para iniciar a transdução do sinal intracelular. A atividade do TNF- α é naturalmente regulada pela produção de TNFRs solúveis os quais tornam o TNF- α biologicamente indisponível, impedindo sua ligação aos receptores de membrana celular (GUSTAFSON & SMITH, 2006). A principal atividade biológica do TNF- α é uma acentuada citólise (morte celular) e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral importantíssima (VARELLAL & FORTE, 2001).

O TNF- α é sintetizado principalmente por macrófagos, sendo que monócitos, neutrófilos, células T e NK (*natural killer*), após estimulação por lipopolissacarídeo (LPS), também o sintetizam. A produção é estimulada por interferons (IFN), IL-1, interleucina 2 (IL-2), GM-CSF, substância P, bradicina, imunocomplexos, inibidores de cicloxygenase (COX) e pelo fator ativador de plaquetas (PAF). A produção é inibida por ciclosporina, dexametasona, prostaglandina E₂(PGE₂), IL-6 e antagonistas do PAF. O TNF- α e TNF- β se ligam aos mesmos receptores no início, mas intracelularmente, após a endocitose deste complexo, exercem atividades distintas (VARELLAL & FORTE, 2001).

2.3.2.1 Função do TNF- α no organismo: Efeitos agudos e crônicos

Como já descrito acima, a inflamação faz parte da resposta imediata do organismo a uma infecção ou agressão e dá início ao processo imunológico de eliminação do agressor. Este processo é uma cascata de reações celulares e vasculares que inclui aumento do afluxo de sangue ao local, um aumento da permeabilidade vascular e da movimentação de leucócitos para o local, o que leva ao aparecimento dos sinais característicos como, rubor, edema, calor e dor.

A transmigração dos leucócitos para os locais da agressão é induzida pelas moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e selectinas). Os primeiros a chegar ao local são os granulócitos, seguidos pelos monócitos e linfócitos. Estas células são responsáveis pela morte do agente agressor, pela eliminação dos resíduos e pela reparação tecidual (PEREIRA, 2007). A sua atividade é induzida por determinados agentes, como o lipopolissacarídeo, componente das membranas das bactérias Gram negativas, que impele os monócitos e macrófagos a produzir citocinas como o TNF- α , a IL-1, a IL-6, a IL-8, eicosanóides, óxido nítrico, metaloproteínases e outros mediadores. As citocinas vão regular a resposta de todo o organismo à infecção ou agressão (PEREIRA, 2007).

Embora a inflamação aguda seja resposta normal e benéfica para o organismo e auto-limitada em indivíduos saudáveis, se esta se tornar incontrolada ou for inapropriada, pode causar danos graves no organismo e até mesmo doenças. Isto pode acontecer se houver excessiva pró-inflamação ou excessiva contra-inflamação, e o segundo caso leva a imunodepressão. No primeiro caso, observa-se expressão aumentada ou a existência de formas solúveis em circulação de moléculas de adesão, retenção de leucócitos em locais não usuais, produção de mediadores inflamatórios e danos nos tecidos (PEREIRA, 2007; CALDER, 2006a; KLEIN-PLATAT et al., 2005).

O TNF- α tem papel adaptativo na resposta imune e na cicatrização de feridas em níveis fisiológicos. As ações do TNF- α são semelhantes às da IL-1, como ação na hematopoesia (formação e desenvolvimento das células sanguíneas), na ativação de neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e aumento da migração transendotelial, fato que confere uma importante ação fisiológica na defesa contra microorganismos (NAWROTH et al., 1986; VARELLAL & FORTE, 2001). É ainda um pirógeno endógeno, aumenta a reabsorção óssea, promove a lipólise (degradação de lipídios em ácidos graxos e glicerol), aumenta a proliferação de fibroblastos e eleva as concentrações das proteínas quando há fase aguda de inflamação. (NAWROTH et al., 1986; VARELLAL & FORTE, 2001).

O excesso de TNF- α pode levar a sérias consequências, pois seus efeitos são antagonistas pelos inibidores de TNF- α , que são: infiximabe, etanercepte, adalimumabe, certolizumabe e golimumabe (AZEVEDO et al., 2011). Altas concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-6 são particularmente destrutivas e estão implicadas em doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal. A inflamação está também implicada em doenças cardiovasculares e doenças degenerativas e, ainda, na obesidade, na síndrome metabólica e na Diabetes Mellitus Tipo 2, pois sabe-se que os adipócitos produzem citocinas inflamatórias (PEREIRA, 2007). A produção excessiva destas citocinas pode provocar perda de massa gorda, muscular e óssea, características das doenças inflamatórias crônicas e da caquexia (PEREIRA, 2007; CALDER, 2006b; KLEIN-PLATAT et al., 2005).

A figura 5 exemplifica de forma simplificada as vias de sinalização do TNF- α .

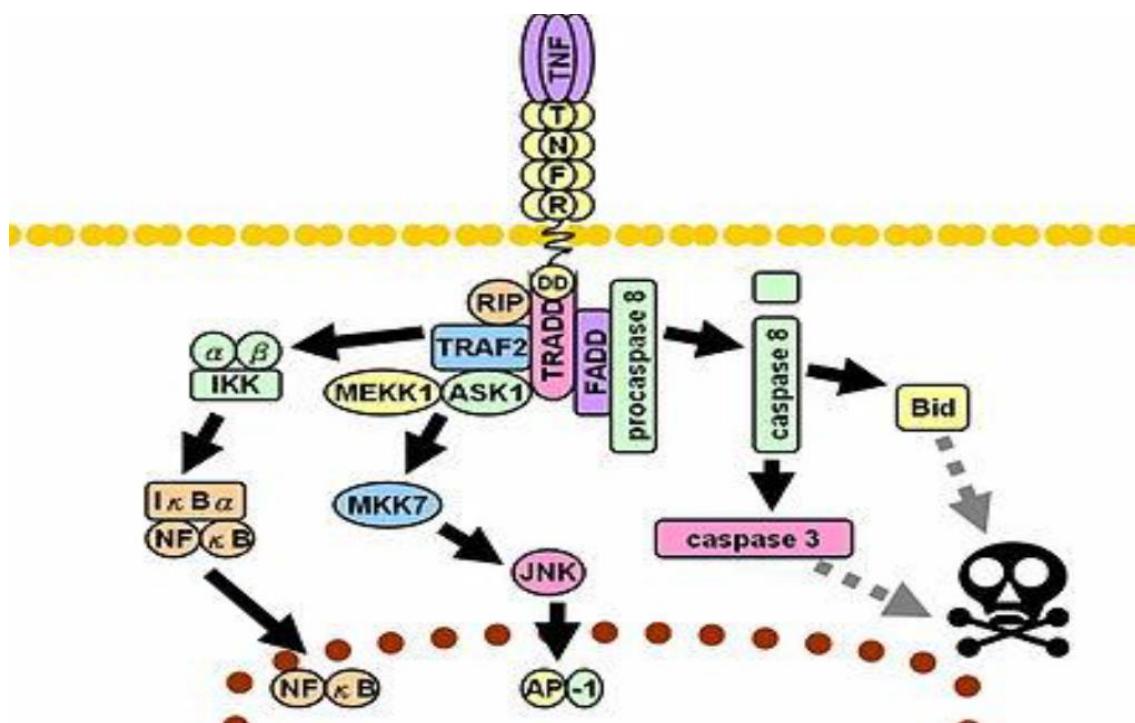


Figura 5. Vias de sinalização do TNF- α . As linhas cinza tracejadas representam várias etapas (Domínio público).

Uma vez iniciada na doença intestinal inflamatória pelo reconhecimento imune inato anormal de bactérias por células parenquimatosas (por exemplo, células epiteliais intestinais) e células hematopoiéticas (por exemplo, células dendríticas), a resposta inflamatória imune é perpetuada pela ativação das células T. Uma cascata sequencial de mediadores inflamatórios amplia a resposta; cada etapa constitui um alvo potencial para terapia.

As citocinas inflamatórias, como a IL-1, a IL-6 e o TNF- α exercem efeitos diversificados sobre os tecidos. Promovem a fibrogênese, a produção de colágeno, a ativação das metaloproteinases teciduais e a produção de outros mediadores inflamatórios; também ativam a cascata da coagulação nos vasos sanguíneos locais. Essas citocinas são normalmente produzidas em resposta à infecção, porém são habitualmente eliminadas ou inibidas no momento apropriado para limitar a lesão tecidual. Na doença intestinal inflamatória, a sua atividade não é regulada, resultando em desequilíbrio entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Certos tratamentos, como compostos de ácido aminossalicílico (5-ASA) são potentes inibidores desses mediadores inflamatórios, por meio da inibição de fatores de transcrição, como o NF- κ B, que regulam sua expressão (LONGO & FAUCI, 2014).

Outra doença que está relacionada com altas concentrações de TNF- α é a síndrome metabólica que é caracterizada pela obesidade, enfraquecimento do metabolismo da glicose, dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial, sendo que todos independentemente aumentam o risco de doenças ateroscleróticas e diabetes tipo II (ALTINTAS et al., 2011). O excesso de gordura visceral representa uma das principais anomalias subjacentes juntamente com o baixo grau de inflamação crônica. O último é geralmente definido pelos níveis superiores a 3 mg/L da proteína C-reativa. A hipertrofia dos adipócitos como resultado do excesso da ingestão calórica resulta na secreção de quimiocinas CCL2, que por sua vez, recrutam macrófagos.

A maioria dos macrófagos está localizada em torno de adipócitos mortos, cujos números aumentam dramaticamente em indivíduos obesos (CAWTHORM et al., 2007; GUSTAFSON & SMITH, 2006). O TNF- α afeta o metabolismo lipídico pelos adipócitos em vários níveis. Ele diminui a absorção de ácidos

graxos livres a partir da circulação, reduz a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos) e também aumenta a lipólise. Além disso, impede o desenvolvimento normal de pré-adipócitos completamente diferenciados de células adiposas pela ativação da via WnT.

O TNF- α também atenua a sinalização do receptor de insulina, regula os genes envolvidos na ação da insulina e neutraliza os fatores de transcrição que regulam a sensibilidade a ela (ALTINTAS et al, 2011; CAWTHORM et al., 2007; GUSTAFSON & SMITH, 2006). A resistência à insulina também pode ser observada em indivíduos com doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide. Indivíduos acometidos por essa doença têm um aumento do risco de mortalidade por doenças cardiovasculares de 50% em comparação com a população em geral (AVINA-ZUBIETA et al., 2008). A inibição do TNF- α em pacientes com artrite reumatoide ou espondilite anquilosante resulta em uma melhora na sensibilidade à insulina em pessoas com maior resistência a esse composto. A inibição do TNF- α também causa alterações no perfil lipídico, incluindo aumentos no colesterol HDL, bem como no colesterol total e nos triglicerídeos. Além disso, reduz o risco de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares quando comparados a pacientes que não foram tratados com estes inibidores (GONZALEZ-GAY; GONZALEZ-JUANATEY; MARTIN, 2005).

Por muitos anos, a fisiopatologia da aterosclerose foi considerada como acúmulo de lipídios na parede arterial (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006). No entanto, nas últimas duas décadas, o crescente desenvolvimento no campo da biologia vascular tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas são de fato uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, essencialmente inflamatórias por natureza. Em pacientes vulneráveis, a aterosclerose se desenvolve por meio da influência de condições que traumatizam o endotélio, como envelhecimento, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, diabetes, tabagismo e a própria obesidade. Esses fatores danificam o endotélio e estimulam reação inflamatória/proliferativa na parede vascular.

Tal reação aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias primárias, como a IL-1 e o TNF- α . As citocinas são responsáveis pela expressão de

moléculas de adesão leucocitária, pela molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e P-, E-, e L-selectinas, e pelo aumento de substâncias quimiotáticas [proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), ambas amplificadoras da cascata inflamatória]. Componentes envolvidos na adipogênese incluem a lipase lipoproteica, angiotensinogênio, adiposina, adiponectina, IL-6, prostaglandinas, TNF- α e óxido nítrico. Essas moléculas possuem ação moduladora dos depósitos lipídicos e distribuição corporal de gordura (GOMES et al., 2010). Ao mesmo tempo, as principais fontes de citocinas (adipocinas/adipocitocinas) são os tecidos subcutâneos e viscerais.

Assim, o aumento da massa de tecido adiposo está associado com alterações na produção de adipocina, como superexpressão de TNF- α , IL-6, PAI-1 e subexpressão de adiponectina em tecido adiposo. A condição pró-inflamatória associada com essas alterações sugere ligação entre resistência à insulina e disfunção endotelial no estágio inicial do processo de atherosclerose, em indivíduos obesos e em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006).

O TNF- α é uma citocina com ação autócrina, parácrina e endócrina. Em humanos obesos, há forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo da glicose. Pelo TNF- α , este efeito ocorre em razão da supressão da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do IRS-1 e a atividade do receptor de insulina quinase (PI3K). Tal fato resulta redução da síntese e translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana com consequente diminuição na captação de glicose pelas células mediada pela ação da insulina. Esta redução de sensibilidade periférica à insulina ocasiona o aumento da glicogênese hepática e reduz o *clearance* (depuração ou purificação plasmática) da glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, caracterizando um quadro de hiperinsulinemia.

A expressão de RNAm e a secreção de TNF- α são elevadas em obesos, correlacionando positivamente com o aumento do volume dos adipócitos (MONTAGUE et al., 1998), tanto no depósito visceral quanto subcutâneo. Dessa forma, sua expressão no tecido adiposo tem sido implicada como o fator causal na patogênese da obesidade ligada à resistência à insulina (VOUP et al., 2008;

CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006). Em estudo comparando indivíduos de peso normal (IMC=19 a 24kg/m²) e obesos (IMC=32 a 54kg/m²), houve correlação positiva entre níveis de TNF- α e o acúmulo de tecido adiposo, principalmente em indivíduos obesos (MONTAGUE et al., 1998).

Altas concentrações de TNF- α no sangue de pacientes com septicemias (infecção generalizada grave) se correlacionam com a piora do prognóstico (VARELLAL & FORTE, 2001). Em animais de laboratório, injeções de TNF- α , mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante ao choque séptico (falência circulatório aguda de causa infecciosa), sugerindo uma importante ação deletéria quando sintetizado em quantidades excessivas (VARELLAL & FORTE, 2001; SPRINGER, 1990). Em contrapartida, o TNF pode ser útil no tratamento de neoplasias secundárias a AIDS, principalmente no sarcoma de Kaposi (câncer raro no tecido conjuntivo). Injeções intralesionais ou sistêmicas são aplicadas, havendo certa regressão da neoplasia (SPRINGER et al., 1990). Assim, receptores solúveis de TNF- α (sTNF-R1) podem ser utilizados como adjuvante na terapia convencional (VARELLAL & FORTE, 2001; SPRINGER, 1990).

2.3.2.2. Efeitos do exercício físico no TNF- α

O exercício físico (EF) é uma atividade física estruturada para atingir objetivos funcionais ou morfológicos, pois promove diversas adaptações crônicas no organismo, estas adaptações podem ser listadas como a alteração da composição corporal (massa muscular, percentual de gordura, etc.), regulação de marcadores fisiológicos como frequência cardíaca e pressão arterial, influencia no metabolismo (anabolismo e catabolismo) de diversas substâncias e influencia a resposta inflamatória, melhorando as defesas do corpo contra mecanismos ligados ao aparecimento de doenças crônicas (LEANDRO et al., 2002).

Tanto o “estresse” psicológico quanto o produzido pelo EF são acompanhados por um aumento da descarga de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que exercem influência sobre uma série de processos fisiológicos, sendo um fator a mais na modulação da imunidade (MARTÍNEZ &

ALVAREZ-MON, 1999). A resposta ao “estresse” se reflete em modificações bioquímicas, endocrinológicas, hematológicas e fisiológicas, que pretendem levar o organismo à sua situação homeostática ideal. A hipertemia provocada pelo EF estimula a síntese de mediadores imunológicos (citocinas), que são capazes de produzir um aumento das proteínas de fase aguda e da proliferação de linfócitos. O sistema imunológico pode se alterar secundariamente ao “estresse” e desencadear repercussões metabólicas, sistêmicas e locais, implicadas nessa redução do desempenho físico (MARTÍNEZ & ALVAREZ-MON, 1999).

Já está bem definido que o EF, enquanto modelo mensurável de indução de estresse provoca alterações funcionais no sistema imunológico. Diferentes tipos e cargas de EF podem provocar alterações distintas nos parâmetros imunes. Na base desta influência poderá estar à inter-relação existente entre o sistema nervoso, o sistema endócrino e o sistema imune. O EF ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal que parece possuir uma relação intrínseca com os componentes do sistema imune (BLALOCK, 1994). Nesse sentido, é importante conhecer como o efeito agudo do exercício moderado ou intenso podem influenciar alguns parâmetros da imunidade tanto celular como humoral (LEANDRO et al., 2002).

De forma geral, o EF agudo intenso afeta a produção tecidual e sistêmica das citocinas, especificamente as interleucinas e o TNF- α , assemelhando-se à resposta inflamatória a algum trauma ou infecção. Particularmente os EF excêntricos, intervalados de alta intensidade ($>100\% \text{ VO}_{2\text{max}}$) ou os intensos de longa duração ($>80\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ por mais de 60 minutos) provocam alterações metabólicas (redução da saturação da hemoglobina arterial e aumento na temperatura corporal) e lesões musculares. A hipoxemia e as lesões teciduais associadas a estes tipos de exercício induzem a alteração na resposta imune com liberação de citocinas pró-inflamatórias incluindo o TNF- α (LEANDRO et al., 2002). O efeito crônico do exercício está associado com a redução da concentração da proteína C-reativa, dos níveis de IL-6 e do TNF- α e, simultaneamente, com aumento de substâncias anti-inflamatórias, como a IL-4

e IL-10, reforçando a natureza anti-inflamatória do exercício (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006).

Distúrbios musculares são observados em várias patologias como a sepsia, trauma, síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer e outros. Nessas condições, a perda de massa muscular está associada com altos níveis circulantes de TNF- α (RODRIGUEZ et al., 2015). Essa citocina perturba o equilíbrio da musculatura esquelética, aumentando a degradação proteica e reduzindo a síntese da mesma. O TNF- α ativa a degradação proteica através da via de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF- κ B). Essa ativação pode resultar da ativação da via dependente de ubiquitina (RODRIGUEZ et al., 2015).

Um estudo espanhol teve como objetivo verificar as mudanças pré e pós-exercício nos marcadores plasmáticos acarretadas pelo dano muscular, peroxidação lipídica e nas citocinas em oito ciclistas semi-profissionais do sexo masculino, em resposta a uma competição de ciclismo com duração de três dias consecutivos. Os autores determinaram os níveis plasmáticos das citocinas antes da primeira etapa e após a terceira etapa. Foi observado que o exercício aumentou significativamente ($p<0,05$) os níveis de TNF- α (nível basal $\mu=1,41\pm0,35$ e pós-prova $\mu=3,84\pm0,7$), IL-6 (nível basal $\mu=8,08\pm0,87$ e pós-prova $\mu=11,4\pm4,2$), IL-2 (nível basal $\mu=0,866\pm0,45$ e pós-prova $\mu=1,88\pm0,36$) e do Interferon-gama (IFNy) (nível basal $\mu=2,65\pm0,34$ e pós-prova $\mu=5,19\pm0,54$), enquanto os níveis de IL-1 β não foram alterados. Segundo os autores as mudanças observadas nas citocinas pró-inflamatórias após o exercício pode ser reflexo de um estado inflamatório causado pela repetição do exercício (MARTÍNEZ et al., 2015).

Um estudo incluindo 686 adultos jovens não treinados com objetivo de verificar a associação da força máxima e da resistência muscular com os biomarcadores inflamatórios em pessoas com e sem obesidade abdominal, não observou uma diferença significativa nos níveis de TNF- α entre pessoas com ou sem a condição estudada. Já a força máxima foi inversamente associada com a concentração de TNF- α naqueles indivíduos sem obesidade abdominal, o mesmo não sendo observado em indivíduos com obesidade abdominal. O TNF-

α não foi associado com qualquer variável de aptidão física analisada (força máxima, aptidão cardiorrespiratória e resistência muscular).

Segundo os autores este achado corrobora com um estudo utilizando o mesmo delineamento transversal (STEENE-JOHANNESSEN et al., 2013). Apesar dos autores não terem observado associações com a população estudada, o treinamento de resistência tem sido associado com a redução dos níveis de TNF- α em mulheres obesas pós-menopáusicas e em mulheres idosas (VAARA et al., 2014).

Além disso, um treinamento físico contínuo de intensidade moderada em esteira ergométrica durante 12 semanas com 23 mulheres não treinadas acometidas por síndrome metabólica e que mensurou a resposta do exercício no estresse oxidativo e inflamatório, encontrou que os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFNy reduziram após as 12 semanas de treinamento ($p<0,001$). Isso indica que o exercício contínuo de intensidade moderada induz benefícios tanto na aptidão física quanto na promoção da saúde através da redução do dano oxidativo e no estado pró-inflamatório (FARINHA et al., 2015).

Um estudo que verificou os efeitos do EF em esteira ergométrica de baixa a alta intensidade com duração de 12 semanas e frequência de 5 vezes na semana sobre a resposta inflamatória aguda em ratos Wistar, encontrou que os EF de baixa intensidade, em esteira ergométrica, aumentaram o volume de edema inflamatório agudo em ratos, provavelmente ocasionado pelo aumento na síntese e na secreção de prostaglandinas e/ou aumento nos níveis plasmáticos das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , entre outros fatores. Tal fato não foi observado com os exercícios de alta intensidade, mostrando assim, a influência da intensidade, frequência e duração dos exercícios sobre este parâmetro inflamatório (LANA; PAULINO; GONÇALVES, 2007).

Nesse sentido, uma revisão sobre EF como fator de prevenção aos processos inflamatórios decorrentes do envelhecimento concluiu que, em conjunto, a IL-6 e o TNF- α são as principais citocinas associadas à aterosclerose, sarcopenia e déficits cognitivos. Embora os mecanismos não sejam totalmente elucidados, o EF reduz os níveis circulantes de citocinas pró-

inflamatórias e aumenta a liberação de substâncias anti-inflamatórias (BRITO et al., 2011).

Rodriguez et al. (2015) desenvolveram um estudo para determinar se o treinamento de endurance atenuava os efeitos negativos induzidos por uma injeção aguda de TNF- α na musculatura esquelética de ratos. Observou-se que, independentemente do treinamento (6 semanas de treinamento de endurance a 60% da velocidade máxima), o TNF- α aumentou o RNA mensageiro das citocinas e houve baixa regulação vinculada a síntese de proteínas. A fosforilação de IKK α/β e I κ B α induzida pelo TNF- α foi atenuada em ratos treinados, sugerindo ativação alterada de NF- κ B. Isso foi associado com baixa indução de vários marcadores de degradação de proteínas, ou seja, o treinamento de resistência protege a musculatura esquelética contra a ativação de vias de sinalização de degradação de proteínas induzidas pelo TNF- α .

Na literatura podemos verificar mais estudos sobre resposta imune ao exercício agudo, porém muito menos é conhecido a respeito dos efeitos crônicos do EF na função imune (DOS SANTOS et al., 2007). Esse fato justifica-se por causa da dificuldade de separar os efeitos da aptidão física do verdadeiro efeito do EF na função imunológica, e devido ao longo tempo de duração que esses estudos necessitam para serem realizados. Assim, as mudanças induzidas pelo EF intenso podem durar pelo menos 24 horas e até o mesmo o exercício moderado induz mudanças significativas por diversas horas. Por não ser fácil persuadir os atletas para absterem-se de seu programa normal de treinamento físico, mesmo por somente um dia, pode ser difícil obter resultados da função imune no seu verdadeiro estado de descanso (DOS SANTOS et al., 2007).

2.4 Estresse oxidativo

Os radicais livres são definidos como qualquer elemento químico que, em sua camada orbital mais externa, possua um ou mais elétrons desemparelhados, sendo altamente instáveis e muito reativos. Pode-se citar como exemplo o ânion superóxido, radical hidroxila e radical peroxila. Entretanto, existem algumas espécies não radicalares, tais como o peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet*, que podem ser tão prejudiciais quanto os radicais livres.

Dessa forma, o conjunto de espécies não radicais e radicais livres classifica-se como espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente geradas no metabolismo, principalmente na cadeia respiratória mitocondrial, que em operação normal, 2-5% do oxigênio consumido é incompletamente reduzido. A formação dessas espécies é fisiologicamente importante no processo fagocitário, na sinalização celular e na resposta imune (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Com isso, podemos dizer que elas possuem uma ação benéfica relacionada com nossa atividade imunológica, pois quando estão em proporções fisiológicas, exercem funções metabólicas essenciais para a homeostasia celular. Em uma lesão muscular oriunda da realização de um exercício excêntrico, por exemplo, os neutrófilos, monócitos e linfócitos são recrutados para o local de inflamação, onde produzem ERO e enzimas proteolíticas para limpar e reparar o tecido lesado (STUPKA, et al., 2000).

Entretanto, quando em excesso, podem danificar proteínas, DNA celular (causando mutações) ou a bicamada lipídica da membrana celular (peroxidação lipídica) (BERG; YOUDIM; RIEDERER, 2004; McARDLE et al., 2011). Isso aumenta o dano tecidual e pode iniciar diversas doenças crônicas como a carcinogênese (COUSSENS & WERB, 2002), podendo estar envolvido na patogênese de diversas doenças, como enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento prematuro (MENEGUINI, 1987; SOUTHORN; POWIS, 1988). Adicionalmente, pode aumentar o fracionamento proteico e a atrofia muscular durante longos períodos de inatividade física (McARDLE et al., 2011).

Nesse sentido, quando há um desequilíbrio entre a proporção de substâncias oxidantes e o sistema antioxidante, de maneira que os primeiros sejam predominantes, chamamos de estresse oxidativo (McARDLE et al., 2011). A produção de ERO é aumentada devido ao elevado consumo de oxigênio durante exercícios aeróbios (PATTWELL & JACKSON, 2004) e de força (McBRIDE et al., 1998). Entretanto, em decorrência do exercício físico, o organismo sofre adaptações que levam ao aumento das defesas antioxidantes, como as enzimas glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase

(POWERS; JI; LEEUWENBURGH, 1999; SHERN-BREWER et al, 1998; VINCENT et al., 1999).

2.5 Desfechos oxidativos

2.5.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação do estresse oxidativo de forma direta é complicada devido ao fato que as espécies reativas de oxigênio possuem meia-vida extremamente curta (ESTERBAUER, 1996). Para contornar esse problema e ainda ter uma medida a respeito do estresse oxidativo, pode-se realizar a quantificação de vários produtos oriundos de reações pró-oxidantes, como é o caso da peroxidação lipídica. Esse processo ocorre geralmente com ácidos graxos poli-insaturados, devido as várias duplas ligações entre as quais se encontram os grupos metíleno (-CH₂-) que possuem hidrogênios particularmente reativos, e se caracteriza pela captura de elétrons dos lipídios por radicais livres nas membranas celulares (ESTERBAUER, 1996).

É devido a isso que a detecção do estresse oxidativo tem se baseado amplamente na quantificação de compostos como o malondialdeído, que são produtos vindos da degradação inicial de substratos sob ataque de radicais livres (JANERO, 1990). A reação do malondialdeído com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é uma das formas mais utilizadas de estimar o estresse oxidativo (LIU et al., 1997), onde os produtos resultantes desta técnica são chamados de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

TBARS mede, em última instância, o malondialdeído presente na amostra e aquele gerado a partir de hidroperóxidos lipídicos pelas condições hidrolíticas da reação (TREVISAN et al., 2001). No entanto, o malondialdeído é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formados através da decomposição de certos produtos primários e secundários de peroxidação lipídica (JANERO, 1990). Além disso, apenas certos produtos geram esse composto, e ele não é o único produto final da formação e decomposição de peróxido graxo, nem uma substância gerada exclusivamente pela peroxidação lipídica (JANERO, 1990).

Com isso, pode-se concluir que a determinação do malondialdeído e o teste de TBA podem oferecer, na melhor das hipóteses, uma janela estreita e um tanto empírica sobre o complexo processo de peroxidação lipídica, sendo que estudos sobre esse desfecho que utilizem essas medidas requerem cautela, discrição e (especialmente em sistemas biológicos) dados correlativos de outros índices de formação e decomposição de peróxido de gordura (JANERO, 1990).

2.5.2 Conteúdo tiólico total

O conteúdo tiólico total refere-se aos compostos tiólicos que contém o grupo sulfidrila ($-C-SH$) em sua estrutura, como a glutationa, cisteina, homocisteína e cisteinil-glicina. Esses tióis também são encontrados como dissulfuretos de baixa massa molecular (simétricos), isto é, homocistina, cistinilglicina, cistina e dissulfeto de glutationa (ROSSI et al. 2008). No plasma humano, a concentração de grupos sulfidrilas de proteínas está na faixa de 0,4 a 0,5 mM, enquanto que a de tióis de baixa massa molecular está na faixa de 0,1 a 20 mM (GIUSTARINI et al., 2006; MANSOOR; SVARDAL; UELAND, 1992).

Os tióis representam a maior parte do conjunto global de antioxidantes em animais e, portanto, desempenham um papel importante na proteção contra danos causados por espécies reativas de oxigênio. Eles são responsáveis pelo sequestramento de radicais livres e são capazes de quelar íons metálicos danosos, sendo fundamentais na defesa antioxidante dos eritrócitos e no plasma (KEMP; GO; JONES, 2008).

2.5.3 Enzima superóxido dismutase

Superóxido dismutase (SOD) é uma enzima importante devido ao seu papel crucial na eliminação do radical superóxido (O_2^-), que é um potente agente oxidante. Átomos de metal específicos, como cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe) e níquel (Ni), são cofatores essenciais de vários tipos de SOD devido à sua alta reatividade com o O_2^- . Em humanos e outros mamíferos, existem apenas três tipos de SOD (SOD1, SOD2 e SOD3) (WEISIGER & FRIDOVIC, 1973; MARKLUND et al., 1982; KELLER et al., 1991).

No que se refere à SOD1, trata-se de um dímero (tem duas unidades) que utiliza o Cu e o Zn como cofatores e é encontrada no citoplasma celular (CHANG

et al., 1988; KELLER et al., 1991; CRAPO et al., 1992). A SOD2 é um tetrâmero (quatro subunidades) que utiliza o Mn como cofator, estando presente nas mitocôndrias (WEISIGER & FRIDOVIC, 1973; BARRA et al., 1984). Por fim, a SOD3 também é um tetrâmero, porém utiliza o Cu e Zn como cofatores e está localizada no ambiente extracelular (MARKLUND, 1982; MARKLUND et al., 1982; MARKLUND et al., 1986). As figuras 6, 7 e 8 demonstram as estruturas da SOD1, SOD2 e SOD3, respectivamente. Caso tenhamos deficiência em qualquer tipo de SOD teremos uma queda na resistência ao estresse oxidativo, levando a diferentes níveis de danos teciduais (LI et al., 1995; ELCHURI et al., 2005; MULLER et al., 2006; SENTMAN et al., 2006).

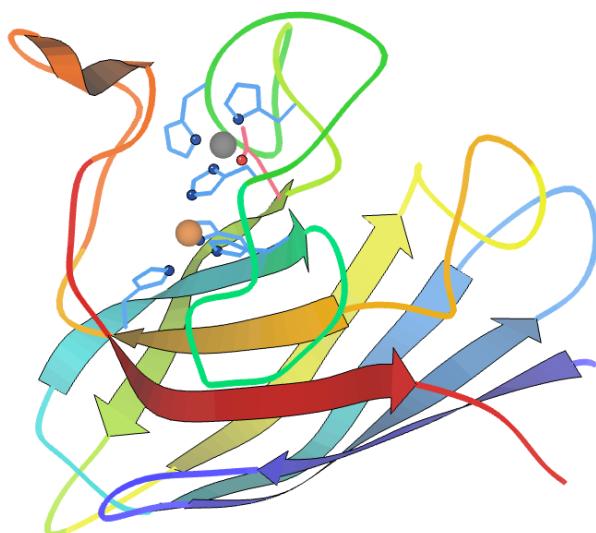


Figura 6. Estrutura da enzima superóxido dismutase 1 (SOD1) humana. Azul: N-terminal; vermelho: C-terminal; esfera laranja: cofatorada com cobre; esfera cinza: cofatorada com zinco (domínio público).

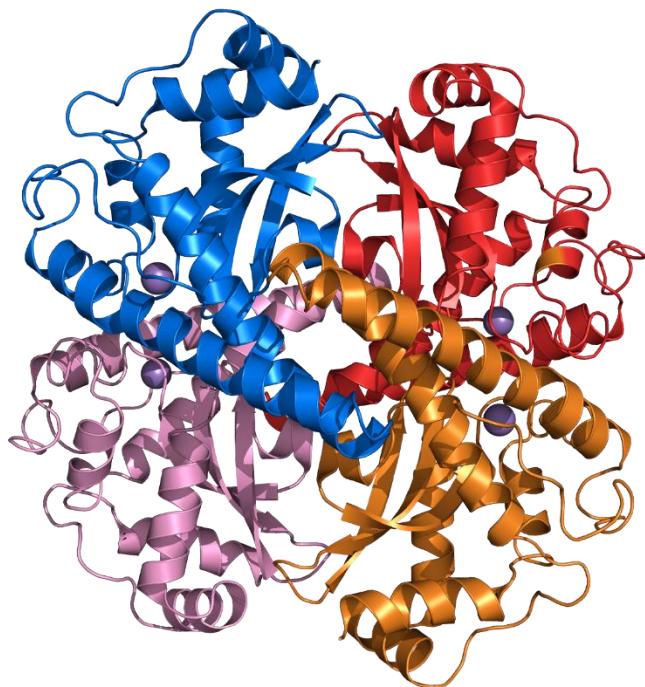


Figura 7. Estrutura molecular da enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) de humanos. Esferas roxas: cofatorada com manganês (domínio público).

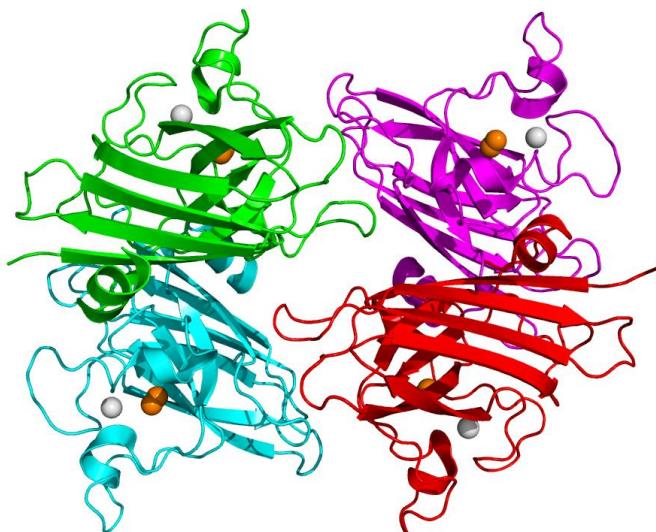
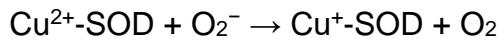
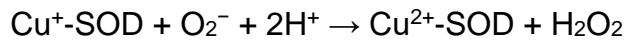


Figura 8. Estrutura molecular enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) de humanos. Esferas laranjas: cofatorada com cobre; esferas cinzas: cofatorada com zinco (domínio público).

Sua função está na catalização da dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Elas irão adicionar ou remover das moléculas de superóxido, transformando assim, o O_2^- em uma das duas espécies menos agressivas: o O_2 molecular ou o H_2O_2 . Essa reação pode ser exemplificada, para SOD que utilize o Cu e o Zn como cofatores, nas seguintes expressões:

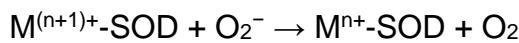


(equação de redução do cobre e oxidação do superóxido)

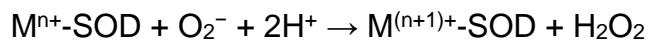


(equação da oxidação do cobre e redução do superóxido)

Porém, a equação geral, aplicável a todas as diferentes formas da SOD que utilizem metais como cofatores, pode ser escrita das seguintes formas:



ou



Onde M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2).

Em uma série de tais reações, o estado de oxidação e a carga do cátion metálico oscilam entre n e n + 1: +1 e +2 para Cu, ou +2 e +3 para os demais metais.

Superóxido é produzido como um subproduto do metabolismo aeróbio e, caso não seja regulado, causará vários tipos de danos celulares (HAYYAN; HASHIM; AL NASHEF, 2016). Já o peróxido de hidrogênio também causará danos oxidativos, porém sua degradação ocorrerá por outra enzima, a catalase, como será abordado em seguida.

No entanto, o superóxido é um agente oxidante mais poderoso que o peróxido de hidrogênio, tornando ele uma das principais ERO na célula. Isso faz com que a SOD tenha um papel antioxidante fundamental, sendo comprovado em roedores knockout para essa enzima. Camundongos que não produzem SOD2 morrem alguns dias depois do nascimento devido a um grande estresse oxidativo (LI et al., 1995), já os que não produzem SOD1 desenvolvem uma ampla gama de patologias, como, por exemplo, o câncer de fígado (carcinoma

hepatocelular) (ELCHURI et al., 2005) e aceleração da sarcopenia relacionada à idade (MULLER et al., 2006). Já camundongos com nenhuma produção de SOD3 não apresentam defeitos óbvios e exibem uma expectativa de vida normal, embora sejam mais sensíveis à lesão hiperóxica (SENTMAN et al., 2006). No que se refere a ativação, a diminuição da atividade da SOD3 tem sido associada a doenças pulmonares, como Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) ou Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (YOUNG et al., 2006; GANGULY et al., 2009; GONGORA et al., 2008).

Já, em humanos, mutações na SOD1 podem causar esclerose lateral amiotrófica (ELA) familiar (MILANI et al., 2011; DENG et al., 1993; CONWIT, 2006; AL-CHALABI; LEIGH, 2000) e há evidência que essa enzima, sob condições de estresse celular, pode contribuir para uma fração significante dos casos de ELA esporádica, porém o mecanismo pelo qual a SOD é envolvida nessas patologias ainda não é conhecido, o que se sabe é que não é devido à perda de atividade enzimática ou a uma diminuição na estabilidade conformacional da proteína da SOD1.

Além disso, a superexpressão de SOD1 tem sido associada aos distúrbios neurais observados na síndrome de Down (GRONER et al., 1994). Em pacientes com talassemia, a SOD aumentará como uma forma de mecanismo de compensação. No entanto, no estágio crônico, a SOD não parece ser suficiente e tende a diminuir devido à destruição de proteínas da reação massiva oxidante/antioxidante (RUJITO; MULATSIH; SOFRO, 2015). No entanto, as outras duas isoformas da SOD (SOD2 e SOD3) ainda não foram ligadas a nenhuma doença humana.

2.5.4 Enzima catalase (CAT)

Catalase foi uma das primeiras enzimas investigadas na família da peroxidase, é conhecida por estar presente na quase totalidade de organismos expostos ao oxigênio (SCHROEDER et al. 1982; AGAR et al., 1986; MUELLER et al., 1997; BAI & CEDERBAUM, 2001; ZAMOCKY FURTMULLER; OBINGER, 2008). Primeiramente encontrada em peroxissomos, a catalase decompõe H_2O_2 em H_2O e O_2 (ZAMOCKY FURTMULLER; OBINGER, 2008).

Como o acúmulo de H₂O₂ e seu produto ·OH pode causar dano oxidativo severo à célula, a catalase fornece proteção essencial para praticamente todos os organismos (HO et al., 2004; VEAL; DAY; MORGAN, 2007; RAY; HUANG; TSUJI, 2012). Além disso, como H₂O₂ atua como uma importante molécula de sinalização celular, sua decomposição é regulada por múltiplas enzimas antioxidantes (LEAMAN et al., 1996; BAE et al., 2000; BRIVANLOU; DARNELL Jr, 2002; CAI, 2005. VEAL; DAY; MORGAN, 2007).

Relacionadas com a catalase, a peroxirredoxina (Prx) e a glutationa peroxidase (GPx) são eficientes sequestrantes de H₂O₂ e estão envolvidas na mediação de seus níveis (MILLS, 1957; KIM et al., 1988; RHEE et al., 2001; RHEE et al., 2005; VEAL; DAY; MORGAN, 2007). Devido a essa diversidade, a importância da catalase na regulação de H₂O₂ foi questionada com a descoberta de GPx e Prx em 1957 e 1988, respectivamente (MILLS, 1957; KIM et al., 1988; RHEE et al., 2001).

Especificamente, em um modelo de camundongos *knockout* para catalase estabelecido por Ho et al. (2004), os animais não desenvolveram defeitos proeminentes sob condições normais. No entanto, quando lesões oxidativas específicas foram impostas a vários tecidos, como fígado, pulmão e cérebro, esses ratos mostraram diferentes níveis de suscetibilidade ao estresse oxidativo. Portanto, a proteção exercida pela catalase é dependente do tecido e influenciada pela presença do nível de outro antioxidante como a GPx (HO et al., 2004).

Catalase é uma enzima contendo quatro subunidades idênticas. Cada subunidade é caracterizada por quatro domínios, cada um com um peso molecular de aproximadamente 57 kDa (TANFORD; LOVRIEN, 1962; REID et al., 1981; FITA; ROSSMANN, 1985). Cada cadeia polipeptídica liga um grupo hemo, semelhante ao que existe na hemoglobina, possuindo então cada hemo um íon de ferro. É este centro metálico que reage com o peróxido de hidrogénio. Porém, algumas catalases são não-hémicas, possuindo em vez do grupo hemo um centro binuclear de manganês (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004). A figura 9 exemplifica a estrutura da catalase.

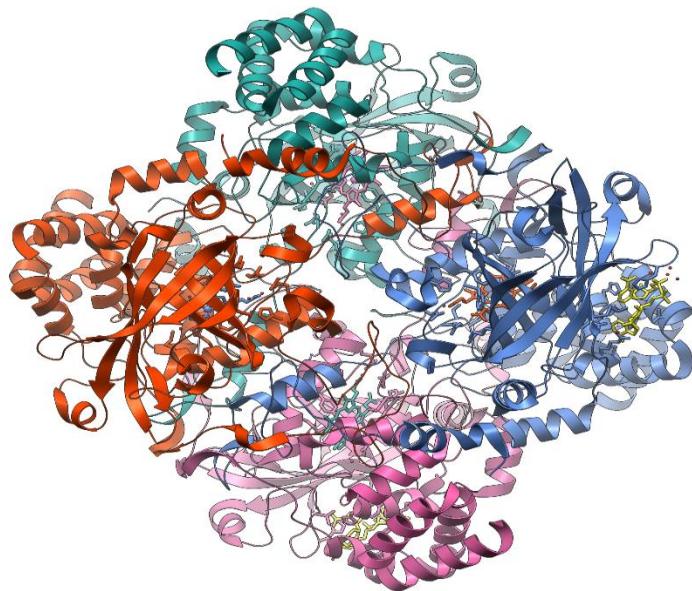


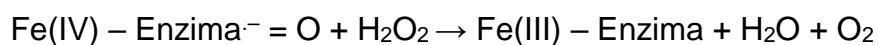
Figura 9. Estrutura molecular da catalase (domínio público).

Para converter H_2O_2 em H_2O e O_2 esta enzima utiliza Fe através de um mecanismo de duas etapas (SEAH; KAPLAN, 1973; BAI; CEDERBAUM, 2001; ZAMOCKY FURTMULLER; OBINGER, 2008). O primeiro passo é caracterizado pela oxidação do Fe (III) no centro do heme por H_2O_2 para gerar o intermediário $[\text{Fe} (\text{IV}) - \text{enzima} = \text{O}]$ e H_2O . Isto é seguido pela segunda etapa de redução na qual outra molécula de H_2O_2 acessa e recupera a catalase de volta ao seu estado normal com a produção de H_2O e O_2 como produtos finais (FITA; ROSSMANN, 1985; ZAMOCKY FURTMULLER; OBINGER, 2008). As equações abaixo demonstram, respectivamente, o processo catalítico fundamental (demonstrado nas duas primeiras) e a reação geral (na terceira delas) (ZAMOCKY FURTMULLER; OBINGER, 2008).

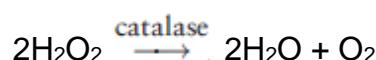
1^a etapa de oxidação



2^a etapa de oxidação



Reação geral



2.6 Lipopolissacarídeo (LPS)

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 ao invés de causarem toxicidade pela secreção de um produto ou toxina. 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 produzido e está contido nas próprias bactérias (BEUTLER & RIETSCHEL, 2003). O LPS é classificado, então, como endotoxina e possui elevado grau de toxicidade que está relacionado com a membrana externa de bactérias da classe gram-negativa, sendo liberado quando há a multiplicação das bactérias ou quando são destruídas 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 reagentes químicos específicos. São células bacterianas que apresentam em sua estrutura pequenas porções de peptideoglicanos, 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 peptideoglicanos em sua estrutura, porém não possuem 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 & WHITFIELD, 2002). Ele está dividido em três partes: lipídio A, núcleo e antígeno O, como está apresentado na Figura 10.

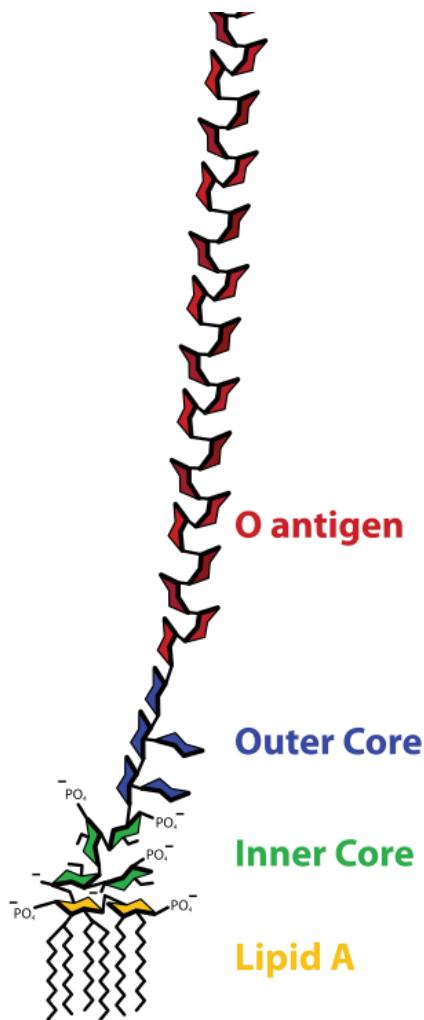


Figura 10. Estrutura de um lipopolissacárido (domínio público). Amarelo (lipídeo A); Verde (núcleo interno); Azul (núcleo externo); Vermelho (antígeno O).

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 Tool Like 4 (TLR4) (PERSING et al., 2002; RIETSCHEL 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* (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-manoze, 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, fosfolipídeos, peptideoglicanos e as lipoproteínas, os quais estão apresentados na figura 11. As lipoproteínas são responsáveis por estabilizar a membrana externa e fixá-la à camada de peptideoglicano; os peptideoglicanos, 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抗ígenos dependentes de células T e as atividades imunossupressoras e imunoestimuladoras que realizam (SMITH, 1984). Os fosfolipídeos 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 fosfolipídeos e proteínas (MADIGAN, 2016).

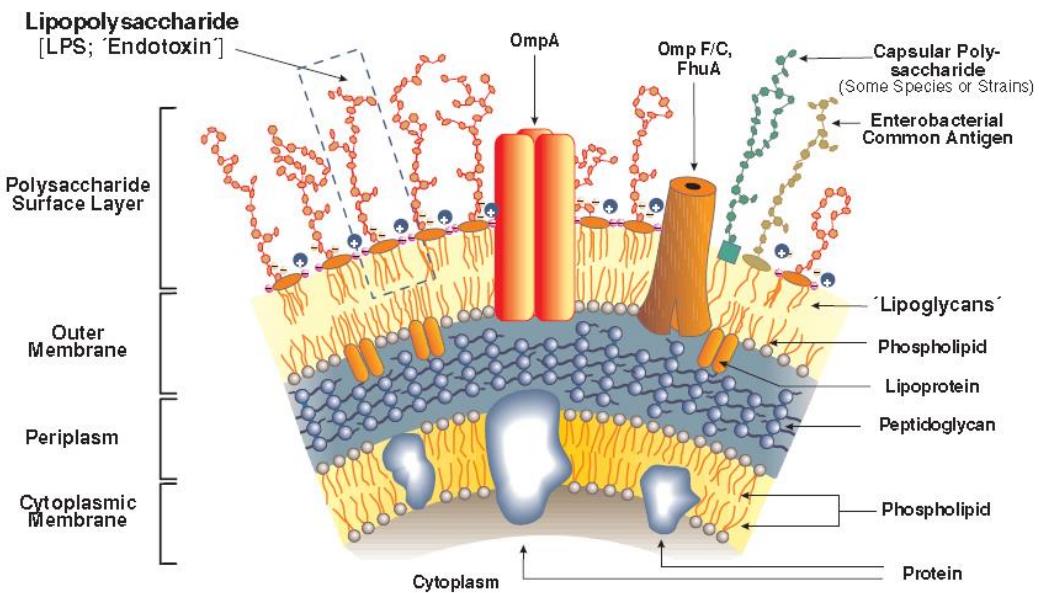


Figura 11. Arquitetura da parede celular de um lipopolissacarídeo (Retirado de ALEXANDER & RIETSCHEL, 2001).

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 12) (TRIANTAFILOU & TRIANTAFILOU, 2002).

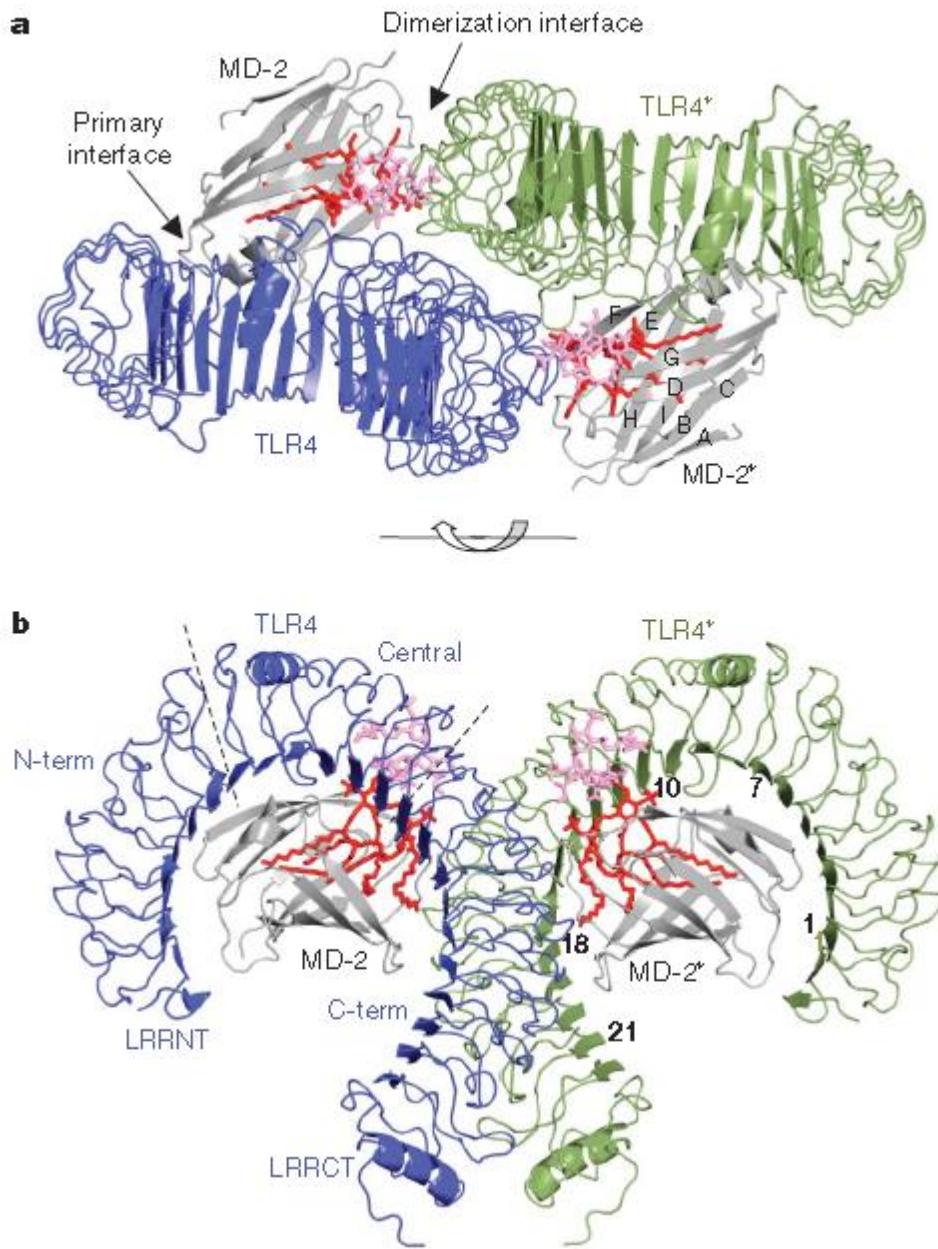


Figura 12. Estrutura geral do complexo TRL4-MD2-LPS (Retirado de PARK et al., 2009).

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; TAKEDA & AKIRA, 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), etc.

Na figura 13 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, a IL-12 ou IL-18 induzem a liberação de IFN- γ , levando a uma hipersensibilização de fagócitos mononucleares para o LPS endotoxicamente ativo.

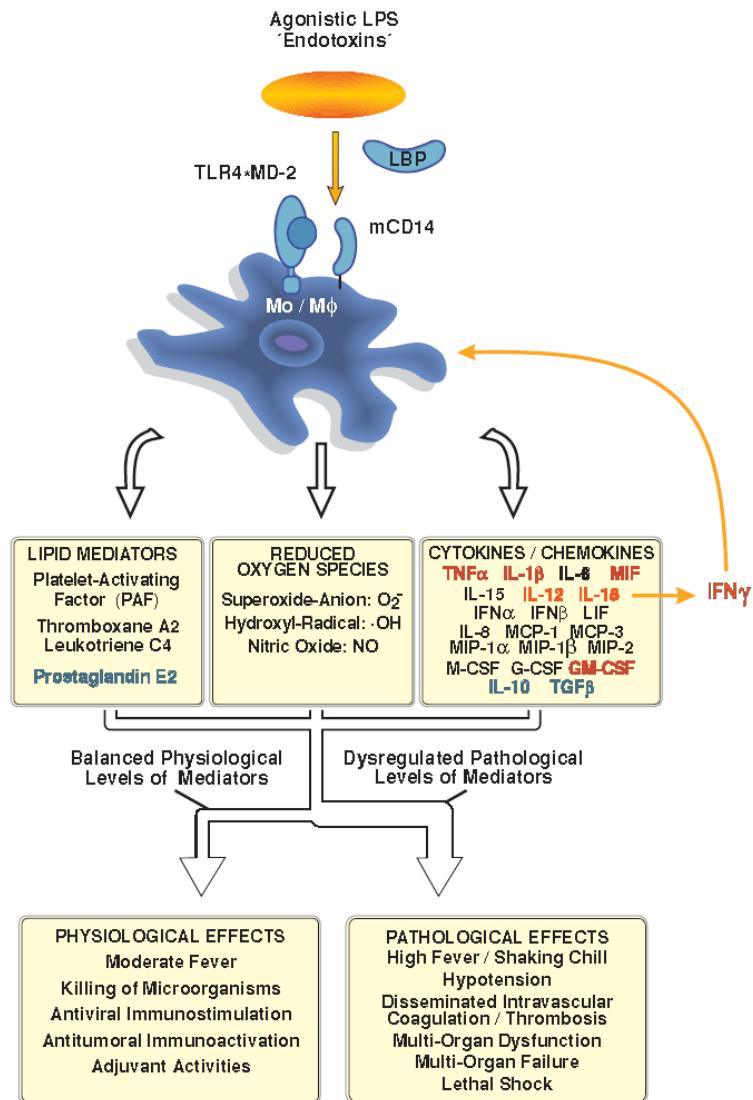


Figura 13. Ativação mediada por macrófagos da imunidade inata por LPS agonístico (Fonte: ALEXANDER & RIETSCHEL, 2001).

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 14). Essa via, quando ativada, gera uma ativação do complexo de quinases IKKs, que por sua vez ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteassômica 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 proteassômica, o NFKB não será translocado ao núcleo (GOSH et al., 1998).

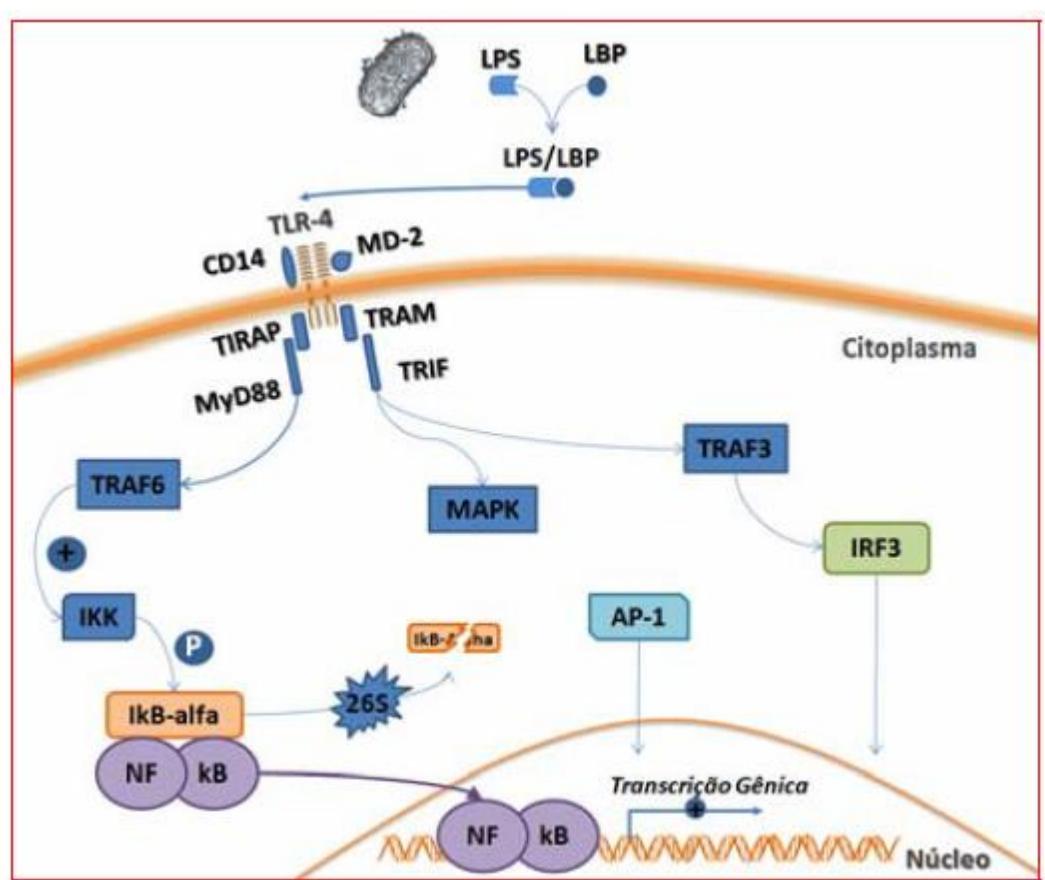


Figura 14. Via de ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFKB e de outros fatores de transcrição (Fonte: CRUZ-MACHADO, 2010).

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 LPS, tanto em humanos como 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 da ocasionada por LPS, tende a causar febre ou hipotermia em resposta à inflamação, bem como 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 (GOODWIN, 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 medida.

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.

2.7 Relação entre o exercício físico e o lipopolissacarídeo (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 colôn 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 protege-lo contra os efeitos deletérios do LPS.

Devido a esse fato, alguns estudos estão utilizando a atividade/exercício físico na prevenção ou tratamento de diversas disfunções associadas à inoculação de LPS em modelos animais. Realizou-se uma pesquisa 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/exercício físico em organismos submetidos ao LPS *in vivo*. Até o presente momento, foram encontrados 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 aeróbio 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 sobrevida 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 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.

Com isso, os autores concluem 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 salientam 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 15 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.

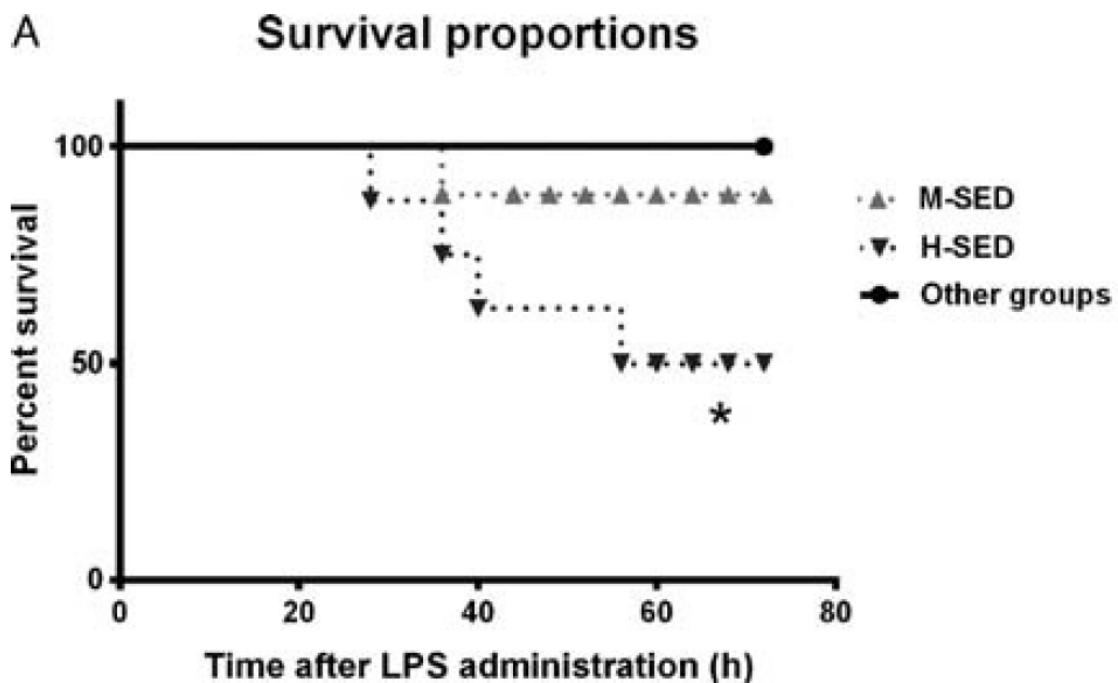


Figura 15. Relação entre o percentual de sobreviventes (eixo “y”) e o tempo em horas após a indução de LPS (eixo “x”) nos diferentes grupos experimentais (retirado de Irahara et al., 2016). M-SED (grupo sedentário com dose mediana de LPS); H-SED (grupo sedentário com maior dose de LPS); Other groups (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/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/atividade física sobre o LPS (ISHIZASHI et al., 1995; KATO et al., 2006).

Dos 10 que avaliaram o efeito crônico, sete interviram 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 estes 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; Jen (2010) foram os únicos a realizarem um estudo com exercício contínuo de intensidade moderada. Foi verificado 60 minutos de corrida em esteira a 60% do $VO_{2\max}$ realizado em cinco dias da semana, por oito semanas melhorou o perfil inflamatório e as respostas imunes induzidas pelo LPS.

Kato et al. (2006) foi o único estudo 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 movimento voluntário com rodinha livre, sendo que cinco deles tiveram um resultado 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 µg 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 micrógia co-rotulada com BDNF, indicando a promoção de um fenótipo neuroprotetivo na micrógia. 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. Eles chegaram à conclusão que 24 horas após a administração de LPS houve um aumento no cérebro 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 desfecho 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.

Houveram 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 podem 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 relatou resultados negativos foi aquele de Rowsey et al. (2006), o qual verificou a influência de oito 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 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 diminuição da resistência tecidual pulmonar e proporção volumétrica de fibras elásticas	EF inibe inflamação neutrofílica pulmonar, mas não remodela e não influencia na mecânica pulmonar prejudicada, na 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 lipopolissacárido, 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/ camundongo IL-6-/- (Jackson labs strain B6.129S6- <i>Il6tm1Kopf/J</i>) machos e camundongo 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, $\alpha\beta$ -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 previneu esse decréscimo. AF aumentou a proporção de micrógia co-rotulada com BDNF em animais velhos	AF pode promover um fenótipo neuroprotetivo na micrógia e proteger contra reduções na neurogênese hipocampal induzidas por inflamação no 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	AF não reduziu os sintomas clínicos da administração de todas as doses de LPS, nem as expressões gênicas cerebrais

					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 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, 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	Fornece 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. (+)
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	AF pode atenuar a resposta inflamatória induzida por LPS no tecido adiposo e isso ocorre em maior extensão no iWAT comparado com o eWAT.

					biogénese 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.	(+)
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 8 ^a 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/ camundongo 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 grupo 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±4,51h, enquanto que no grupo controle (n=10) foi de 3,3±1,34h. 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

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). Com esse número amostral teremos um poder estatístico (β) de 80% adotando um erro de tipo 1 (α) de 5% para os parâmetros de estresse oxidativo (pois seriam necessários 2 animais por grupo) e um β de 90% adotando um α de 1% para as citocinas inflamatórias (pois seriam necessários três animais por grupo). O cálculo de tamanho de amostra foi realizado baseado no estudo de Afzalpour et al. (2015). Os animais serão fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas e mantidos em condições experimentais controladas com água e comida “ad libitum”, distribuídos em gaiolas contendo de três a quatro animais cada e com o ciclo claro/escuro de 12h, onde a intervenção será realizada no início da manhã.

3.3 Contenção 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 possa-se 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 divididos aleatoriamente 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 camundongos C57BL/6 chegaram à exaustão à velocidade de 25 m/min, sendo essa a velocidade correspondente ao consumo máximo de oxigênio ($\text{vVO}_{2\text{max}}$).

Devido ao fato que essa linhagem é considerada isogênica (Seong et al., 2004), sua compatibilidade genética é muito próxima de 100%, o que significa que é plausível utilizar os resultados do estudo de Schefer & Talan (1996) para predizer a $\text{vVO}_{2\text{max}}$ de outros camundongos C57BL/6.

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 da 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 $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (i.e.: 25 m/min), 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 $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (i.e.: 22 m/min), separados por intervalos de 60 segundos. Todos intervalos serão realizados de forma ativa a 68% da $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (i.e.: 17 m/min) 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 $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (i.e.: 20 m/min) com duração de 20 minutos ininterruptos. O princípio da sobrecarga será exercido pelo aumento na duração e do número de esforços nos grupos GCON e GHIIT, respectivamente, como descrito na tabela 1. Além disso, caso seja necessário, a parte de trás da esteira dará pequenos choques de 1,5 mA para proporcionar motivação para o exercício físico.

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 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 ocorrerá durante cinco dias na semana (de segunda à sexta-feira), por seis semanas consecutivas. Caso algum animal se recuse a correr, permanecendo cinco segundos no final da esteira, o mesmo será retirado do aparelho e excluído do estudo.

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

Semana	Dia	GCON (tempo, intensidade)	GHIIT*	
			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% $\text{vVO}_{2\text{max}}$ com 60 s de duração. Intensidade: percentual da $\text{vVO}_{2\text{max}}$; GCON: treinamento contínuo de intensidade moderada; GHIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; min: minutos; s: segundos.

O grupo GC será exposto ao mesmo local em que ocorrerá o treinamento (i.e., esteiras próprias para roedores), porém sem realizar exercício físico.

3.5 Modelo animal de inflamação

Setenta e duas horas após a última sessão de treinamento físico, para evitar a influência de possíveis efeitos agudos do exercício, será administrada uma 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 Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorrerá 24 horas após a indução de LPS, através de anestesia profunda do animal e perfusão transcardíaca, onde serão coletados o sangue total (utilizado para a separação do soro, o qual será utilizado para análise dos parâmetros inflamatórios) e o cérebro (para análise dos parâmetros de estresse oxidativo).

A figura 16 ilustra toda logística do experimento, desde a familiarização dos grupos GCON e GHIIT, até a eutanásia.

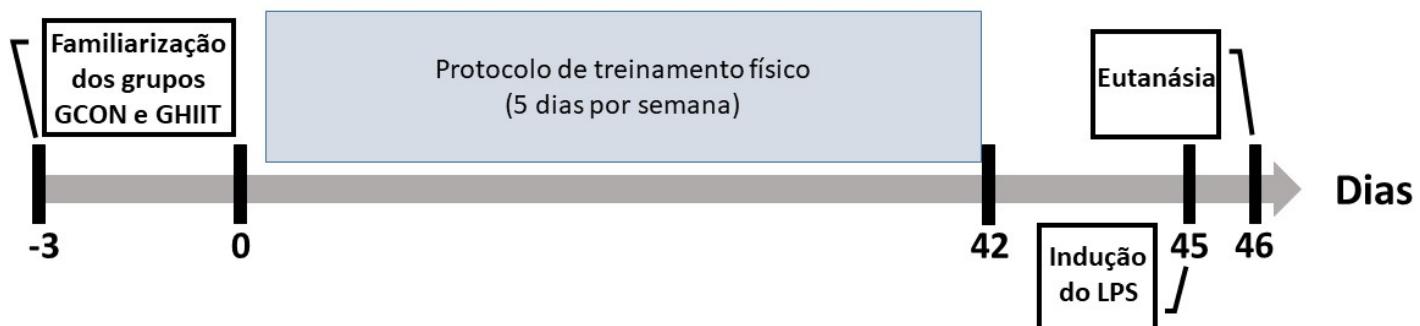


Figura 16. Diagrama que descreve a logística da intervenção.

3.7 Avaliação da temperatura corporal

A temperatura corporal dos animais será checada no momento prévio e em três momentos pós administração do LPS (uma, seis e 12 horas após) através de um termômetro infravermelho modelo FR1DZ1 da marca G-Tech.

3.8 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

Após a eutanásia, o cérebro será retirado, sendo o córtex e o hipocampo separados para análise posterior. Uma parte das estruturas cerebrais serão homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM e 140 mM KCl pH 7,4. Os homogenatos serão centrifugados e o sobrenadante será utilizado para a determinação dos seguintes parâmetros:

3.8.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Será realizada pelo método de Esterbauer & Cheeseman (1990). Os resultados serão expressos em nmol de TBARS/mg de proteína.

3.8.2 Medida do conteúdo tiólico total

Será realizada pelo método de Aksenov & Markesberry (2001). Os resultados serão expressos em nmol de TNB/mg de proteína.

3.8.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)

Será determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). Os resultados serão expressos em unidades de atividade de CAT (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μ mol de H_2O_2 /min/mg de proteína). A atividade expressa em U/mg de proteína.

3.8.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

O método utilizado será conforme Oberley & Spitz (1985). Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%. A atividade expressa em U/mg de proteína.

3.8.5 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A formação de ROS será determinada de acordo com Ali et al. (1992), com algumas modificações. Nesse ensaio, a oxidação do diacetato de 2,7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) para diclorofluoresceína fluorescente (DCF) será mensurada pela detecção de ROS intracelular. A intensidade da fluorescência emitida pelo DCF será registrada a uma excitação de 525 e 488 nm 60 mintuos após a adição de DCFH-DA ao meio. Os níveis de ROS serão expressos em μ mol/g de tecido.

3.9 Determinação das citocinas inflamatórias

A quantificação das citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) no soro será avaliada por Elisa, utilizando seus kits comerciais (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), seguindo instruções do fabricante.

3.10 Tabela de operacionalização das variáveis

Variáveis	Definição	Escala	Operacionalização
Desfechos primários			
Temperatura corporal	Numérica contínua	°C	-----
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Numérica contínua	nmol TBARS/mg de proteína	-----
Conteúdo tiólico total	Numérica contínua	nmol TNB/mg de proteína	-----
Atividade da catalase	Numérica contínua	U/mg de proteína	-----
Atividade da superóxido dismutase	Numérica contínua	U/mg de proteína	-----
Determinação do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS)	Numérica contínua	µmol/g de tecido	-----
Interleucina-6	Numérica contínua	pg/mL	-----
Fator de necrose tumoral alfa	Numérica contínua	pg/mL	-----
Exposição			
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

3.11. 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 Bartlet 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. A temperatura corporal será 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 (caso a variável seja paramétrica ou normalizada), ou pelo teste de Friedman, no caso de um comportamento não paramétrico. Os resultados serão considerados significativos para $p < 0,05$.

3.12. 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 dos animais, métodos de utilização da aparelhagem de laboratório e demais procedimentos que serão realizados no estudo.

3.13. Local de realização

Toda a intervenção será realizada no biotério central da Universidade Federal de Pelotas e as análises no Laboratório de Biomarcadores da mesma universidade

3.14. Financiamento

Não haverá financiamento para este estudo, sendo que os pesquisadores assumirão todos os custos

3.15. Aspectos éticos

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

4. 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.

5. Cronograma

6. Orçamento

VARIABEL	PRODUTO	PREÇO
TNF-ALPHA	LEGEND MAX™ Mouse TNF- α ELISA Kit with Pre-coated Plates	\$ 295,00
IL-6	Mouse IL-6 ELISA Kit for serum, plasma and cell culture supernatant (Sigma): RAB0308	R\$ 2.189,00
TBARS	TBARS Parameter Assay Kit, 2 Plate	\$ 319,00
SOD	Mouse/Rat SOD1/Cu-Zn SOD Antibody	\$ 99,00
CAT	Human/Mouse/Rat Catalase Antibody	\$ 99,00
Conteúdo tiólico total	Human/Mouse/Rat thiol content Antibody	\$ 99,00
Esteira para roedores com 10 baias	Esteira própria para roedores 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	R\$ 10.000,00
TOTAL (R\$)		R\$ 14.259,16

7. Referências Bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGAR, N.S.; SADRZADEH, S.M.; HALLAWAY, P.E.; EATON, J.W. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? **J Clin Invest**, v. 77, p. 319–321, 1986.
- AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv Immunol**, v. 54, p. 1–78, 1993.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.
- AL-CHALABI, A.; LEIGH, P.N. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, n. 4, p. 397–405, 2000.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001.
- 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.
- AKSENOV M.Y, MARKESBERY W.R. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.
- ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637–648, 1992.
- ALTINTAS, M.M.; AZAD, A.; NAYER, B.; CONTRERAS, G.; ZAIAS, J.; FAUL, C.; REISER, J.; NAYER, A. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. **J Lipid Res.** v.52, p.480–488, 2011.
- ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J. Affect. Disord**, v. 111, p. 135–144, 2008.

ANDUS, T.; GEIGER, T.; HIRANO, T.; NORTHOFF, H.; GANTER, U.; BAUER, J., et al. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN- β 2) regulates β -fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. **FEBS Lett**, v. 221, n. 1, p. 18-22, 1987.

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.

ANGUS, D.C.; van der POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, v.369, p.840–851, 2013.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H.D. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. **Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 241–269, 2003.

AVINA-ZUBIETA, J.A.; CHOI, H.K.; SADATSAFAVI, M.; ETMINAN, M.; ESDAILE, J.M.; LACAILLE, D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Arthritis Rheum**. v.59, p.1690–1697, 2008.

AZEVEDO, F.A.; SILVA, M.B.G.; MARINELLO, D.K.; SANTOS, F.D.; SILVA, G.B.G.S. Leucopenia e trombocitopenia induzidas por etanercepte: relato de dois casos e revisão da Rateratura. **Rev Bras Reumatol**. v.52, n.1, p.107-112, 2011.

BAE, Y.S.; SUNG, J.Y.; KIM, O.S.; et al. Platelet-derived growth factorinduced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem**, v. 275, p. 10527–10531, 2000.

BAI, J.; CEDERBAUM, A.I. Mitochondrial catalase and oxidative injury. **Biol Signals Recept**, v. 10, p. 189–199, 2001.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clin Sci (Lond)**, v. 94, n. 6, p. 557-572, 1998.

BARRA, D.; SCHININA, M.E.; SIMMACO, M.; et al. The primary structure of human-liver manganese superoxidedismutase. **J Biol Chem**, v. 259, p. 2595–2601, 1984.

BARTLETT, D.B.; SHEPHERD, S.O.; WILSON, O.J.; et al. Neutrophil and Monocyte Bactericidal Responses to 10 Weeks of Low-Volume High-Intensity Interval or Moderate-Intensity Continuous Training in Sedentary Adults. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 12, 2017.

BARZILAY, J.I.; ABRAHAM, L.; HECKBERT, S.R.; et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. **Diabetes**, v.50, p.2384–2389, 2001.

BERG D.; YOUDIM M.B.; RIEDERER. P. Redox imbalance. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 201-213, 2004.

BERGFORS, M.; BARNEKOW-BERGKVIST, M.; KALEZIC, N.; LYSKOV, E.; ERIKSSON, J.W. Short-term effects of repetitive arm work and dynamic exercise on glucose metabolism and insulin sensitivity. **Acta Physiol Scand**, v. 183, n. 4, p. 345-356, 2005.

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

BLALOCK, J.E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol Today**. v.15, p.504-511, 1994.

BONE, R.C. Gram-Negative Sepsis: a Dilemma of Modern Medicine. **Clin Microb Rev**, v.6, n.1, p.57-68, 1993.

BRADDING, P.; ROBERTS, J.Á.; BRITTEN, K.M.; MONTEFORT, S.; DJUKANOVIC, R.; MUELLER, R.; HEUSSER, C.H.; HOWARTH, P.H.; HOLGATE, S.T. Interleukin 4, 5 and 6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell a source of these cytokines. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.10, n.5, p.471-80, 1994.

BRANDT, C.; PEDERSEN, B.K. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 520258, 2010.

BRITO, C.J.; VOLP, A.C.P.; NÓBREGA, O.T.; JÚNIOR, F.L.S.; MENDES, E.L.; ROAS, A.F.C.M.; BARROS, J.F.; CÓRDOVA, C. Exercício físico como fator de

prevenção aos processos inflamatórios decorrentes do envelhecimento. **Motriz**, v.17, n.3, p.544-555, 2011.

BRIVANLOU, A.H.; DARNELL Jr, J.E. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, v. 295, p. 813–818, 2002.

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.

BRUUNSGAARD, H.; BJRREGAARD, E.; SCHROLL, M.; PEDERSEN, B.K. Muscle strength after resistance training is inversely correlated with baseline levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the oldest old. **J Am Geriatr Soc**, v. 52, n. 2, p. 237-241, 2004.

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T.L.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol**, v. 499, n. Pt 3, p. 833-841, 1997.

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.

CABRAL-SANTOS, C.; GEROSA-NETO, J.; INOUE,D.S.; PANISSA, V.L.G.; GOBBO, L.A.; ZAGATTO, A.M., et al. Similar Anti-Inflammatory Acute Responses from Moderate-Intensity Continuous and High-Intensity Intermittent Exercise. **J Sports Sci Med**, v. 14, n. 4, p. 849–856, 2015.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovasc Res**, v. 68, p. 26–36, 2005.

CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr.** v.83 6 suppl, p.1505S–19S, 2006b.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids.** v.75, n.3, p.197–202, 2006a.

CAREY, A.L.; STEINBERG, G.R.; MACAULAY, S.L.; THOMAS, W.G.; HOLMES, A.G.; RAMM, G., et al. Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP Activated Protein Kinase. **Diabetes,** v. 55, n. 10, p. 2688-2697, 2006.

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

CARVALHO, M.H.C., COLAÇO, A.L., FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.50, n.2, 2006.

CAWTHORN, W.P.; HEYD, F.; HEGYI, K.; SETHI, J.K. Tumour necrosis factor-alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. **Cell Death Differ.** v.14, p.1361–1373, 2007.

CAYPHAS, S.; VAN DAMME, J.; VINK, A.; SIMPSON, R.J.; BILLIAU, A.; VAN SNICK, J. Identification of an interleukin HP1-like plasmaytoma growth factor produced by cells in response to viral infection. **J Immunol,** v. 139, p. 2965-2969, 1987.

CESARI, M.; PENNINX, B.W.J.H.; PAHOR, M.; LAURETANI, F.; CORSI, A.M.; WILLIAMS, G.R., et al. Inflammatory Markers and Physical Performance in Older Persons: The InCHIANTI Study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci,** v. 59, n. 3, p. M242-M248, 2004.

CHANG, L.Y.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J.; CRAPO, J.D. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxidedismutase in rat hepatocytes. **J Cell Biol,** v. 107, p. 2169–2179, 1988.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.192-208, 2004.

CHEN, M.F.; CHEN, H.I.; JEN, C.J. Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 12, p. 2173-2179, 2010.

CLAMAN, H.N.; CHAPERON, E.A.; SELNER, J.C. Thymus-marrow immunocompetence. 3. The requirement for living thymus cells. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 127, n. 2, p. 462-466, 1968.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, p.885–891, 2002.

COLBERT, L.H.; VISSER, M.; SIMONSICK, E.M.; TRACY, R.P.; NEWMAN, A.B.; KRITCHEVSKY, S.B., et al. Physical Activity, Exercise, and Inflammatory Markers in Older Adults: Findings from The Health, Aging and Body Composition Study. **J Am Geriatr Soc**, v. 52, n. 7, p. 1098- 1104, 2004.

CONWIT, R.A. Preventing familial ALS: a clinical trial may be feasible but is an efficacy trial warranted?. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 251, n.1–2, p. 1–2, 2006.

CORMIE, P.; SINGH, B.; HAYES, S.; PEAKE, J.M.; GALVÃO, D.A.; TAAFFE, D.R., et al. Acute Inflammatory Response to Low-, Moderate-, and High-Load Resistance Exercise in Women With Breast Cancer-Related Lymphedema. **Integr Cancer Ther**, pii: 1534735415617283, 2015.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860–867, 2002.

CRAPO, J.D.; OURY, T.; RABOUILLE, C.; SLOT, J.W.; CHANG, L.Y. Copper, zinc superoxide-dismutase is primarily a cytosolic protein in human-cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 10405–10409, 1992.

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.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol**, v.25, p.4–7, 2004.

DASGUPTA, B.; CORKILL, M.; KIRKHAM, B.; GIBSON, T.; PANAYI, G. Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 19, n. 1, p. 22-25, 1992.

DENG, H.X.; HENTATI, A.; TAINER, J.A.; et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. **Science**, v. 261, n. 5124, p. 1047–1051, 1993.

DONGES, C.E.; DUFFIELD, R.; DRINKWATER, E.J. Effects of resistance or aerobic exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 2, p. 304-313, 2010.

DORNELES, G.P.; HADDAD, D.O.; FAGUNDES, V.O.; VARGAS, B.K.; KLOECKER, A.; ROMÃO, P.R., et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. **Cytokine**, v. 77, p. 1-9, 2016.

DOS SANTOS, C.; DA SILVA, J.A.F.; BITTENCOURT, G.; MOTA, J.; NAVARRO, F. O efeito do exercício físico agudo e crônico na resposta imunológica de indivíduos portadores do HIV. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**. v.1, n.4, p.01-16, 2007.

DOSNE, A.M.; DUBOR, F.; LUTCHER, F.; PARANT, M.;CHEDID, L. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates plasminogen activator inhibitor (PAI) production by endothelial cells and decrease blood fibrinolytic activity in the rat. **Thromb Res.** v.8, p.115-22, 1988.

DOSSUS, L.; RINALDI, S.; BECKER, S.; et al. Obesity, inflammatory markers, and endometrial cancer risk: a prospective case-control study. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, p. 1007–1019, 2010.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P.G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res**, v. 79, p. 157–165, 2005.

DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I.; PANKOW, J.S.; et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes**, v.52, p.1799–1805, 2003.

ELCHURI, S.; OBERLEY, T.D.; QI, W.B.; et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. **Oncogene**, v. 24, p. 367–380, 2005.

ESTERBAUER H., CHEESEMAN K.H. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTERBAUER, H. Estimation of peroxidative damage: a critical review. **Pathol. Biol**, v. 44, p. 25-28, 1996.

FARINHA, J.B.; STECKLING, F.M.; STEFANELLO, S.T.; CARDOSO, M.S.; NUNES, L.S.; BARCELOS, R.P., et al. Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome. **Sports Med Open**, v. 1, n. 1, p. 3, 2015.

FEBBRAIO, M.A.; HISCOCK, N. SACCHETTI, M.; FISCHER, C.P.; PEDERSEN, B.K. Interleukin-6 Is a Novel Factor Mediating Glucose Homeostasis During Skeletal Muscle Contraction. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1643-1648, 2004.

FESTA, A.; D'AGOSTINO Jr, R.; TRACY, R.P.; HAFFNER, S.M. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes**, v.51, p.1131–1137, 2002.

FISCHER, C.P.; HISCOCK, N.J.; PENKOWA, M.; BASU, S.; VESSBY, B.; KALLNER, A., et al. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 558, n. Pt 2, p. 633-645, 2004.

FISCHER, C.P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 6-33, 2006.

FITA, I.; ROSSMANN, M.G. The active center of catalase. **J Mol Biol**, v. 185, p. 21–37, 1985.

FREITAS, M.P.; STEFANELLO, F.M.; GONZALES, N.G.; HÄFELE, C.A.; ROMBALDI, A.J. Efeitos do exercício físico sobre o sistema imune de mulheres pós-menopausadas: revisão sistemática. **Rev Bras Med Esporte**, v. 22, n. 5, p. 420–425, 2016.

GABAY, C.; SMITH, M.F.; EIDLEN, D.; AREND, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. **J Clin Invest**, v. 99, n. 12, p. 2930-2940, 1997.

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.

GAGLIARDI, S.; COVA, E.; DAVIN, A.; et al. SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiology of Disease**, v. 39, n. 2, p. 198–203, 2010.

GANGULY, K.; DEPNER, M.; FATTMAN, C.; et al. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function. **Physiological Genomics**, v. 37, n. 3, p. 260–267, 2009.

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANSDORP, P.; BAUMANN, H. Interferon β 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84, n. 20, p. 7251-7255, 1987.

GIRAUDET, E.; ARESE, M.; TONIATTI, C.; STRASLY, M.; PRIMO, L.; MANTOVANI, A., et al. IL-6 is an in vitro and in vivo autocrine growth factor for middle T antigen-transformed endothelial cells. **J Immunol**, v. 157, n. 6, p. 2618-2623, 1996.

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.

GOLDHAMMER, E.; TANCHILEVITCH, A.; MAOR, I.; BENIAMINI, Y.; ROSENSCHEIN, U.; SAGIV, M. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. **Int J Cardiol**, v. 100, n. 1, p. 93-99, 2005.

GOMES, F.; TELO, D.F.; SOUZA, H.P.; NICOLAU, J.C.; HALPERN, A.; SERRANO, C.V.JR. Obesidade e Doença Arterial Coronariana: Papel da Inflamação Vascular. **Arq Bras Cardiol**. v.94, n.2, p.273-279, 2010.

GONÇALVES, C.T.R; GONÇALVES, C.G.R.; ALMEIDA, F.M.; et al. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. **Crit Care**, v.16, n.5, p.R199, 2012.

GONDIM, O.S.; CAMARGO, V.T.; GUTIERREZ, F.A.; MARTINS, P.F.; PASSOS, M.E.; MOMESSO, C.M., et al. Benefits of Regular Exercise on Inflammatory and Cardiovascular Risk Markers in Normal Weight, Overweight and Obese Adults. **PLoS One**, v. 10, n. 10 p. e0140596, 2015.

GONGORA, M.C.; LOB, H.E.; LANDMESSER, U.; et al. Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 4, p. 915–926, 2008.

GONZALEZ-GAY, M.A.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; MARTIN, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. **Semin Arthritis Rheum**. v.35, p.8–17, 2005.

GONZALEZ-HERNANDEZ, J.A.; BORNSTEIN, S.R.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; SPATH-SCHWALBE, E.; JIRIKOWSKI, G.; SCHERBAUM, W.A. Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 79, n. 5, p. 1492-1497, 1994.

GRONER, Y.; ELROY-STEIN, O.; AVRAHAM, K.B.; et al. Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 48, n. 5–6, p. 231–40, 1994.

- GURROLA-DÍAZ, C.M.; SÁNCHEZ-ENRIQUEZ, S.; OREGON-ROMERO, E.; GARCÍA-LOPEZ, P.M.; GARZÓN DE LA MORA, P.; BASTIDAS-RAMIREZ, B.E.; GONZÁLEZ-HITA, M.; MUNÓZ-VALLE, J.F. Establishment of a cut-point value of serum TNF-alpha levels in the metabolic syndrome. **J Clin Lab Anal.** v.23, n.1, p.51-6, 2009.
- GHOSH, S., MARY, M.J., KOPP, E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediations of immune responses. **Annual Review Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.
- GUSTAFSON, B.; SMITH, U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. **J Biol Chem.** v.281, p.9507–9516, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**; 4.ed. New York: Oxford UK, 2007.
- HAN, T.S.; SATTAR, N.; WILLIAMS, K.; GONZALEZ-VILLALPANDO, C.; LEAN, M.E.; HAFFNER, S.M. Prospective study of C-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. **Diabetes Care**, v.25, p.2016–2021, 2002.
- HANISCH, A.; DIETERICH, K.D.; DIETZMANN, K.; LUDECKE, K.; BUCHFELDER, M.; FAHLBUSCH, R., et al. Expression of Members of the Interleukin-6 Family of Cytokines and their Receptors in Human Pituitary and Pituitary Adenomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 11, p. 4411-4414, 2000.
- HAYYAN, M.; HASHIM, M.A.; AL NASHEF, I.M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. **Chem Rev**, v. 116, n. 5, p. 3029–3085, 2016.
- HEIKKILA, K.; HARRIS, R.; LOWE, G.; et al. Associations of circulating C-reactive protein and interleukin-6 with cancer risk: findings from two prospective cohorts and a meta-analysis. **Cancer Causes & Control**, v. 20, p. 15–26, 2009.
- HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J**, v. 265, n. 3, p. 621–36, 1990.

HEINRICHS, 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.

HELLSTEN, Y.; FRANDSEN, U.; ORTHENBLAD, N.; SJODIN, B.; RICHTER, E.A. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. **J Physiol**, v. 498, n. Pt 1, p. 239-248, 1997.

HIBI, M.; MURAKAMI, M.; SAITO, M.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. **Cell**, v. 63, n. 3, p. 1149-1157, 1990.

HIRANO, T.; MATSUDA, T.; HOSOI, K.; OKANO, A.; MATSUI, H.; KISHIMOTO, T. Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2). **Immunol Lett**, v. 17, n. 1, p. 41-45, 1988.

HIRANO, T.; TAGA, T.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K.; KASHIWAMURA, S.; SHIMIZU, K., et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 16, p. 5490-5494, 1985.

HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T., et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 73-76, 1986.

HIROSE, L.; NOSAKA, K.; NEWTON, M.; LAVEDER, A.; KANO, M.; PEAKE, J., et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exerc Immunol Rev**, v. 10, p 75-90, 2004.

HISCOCK, N.; CHAN, M.H.S.; BISUCCI, T.; DARBY, I.A.; FEBBRAIO, M.A. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. **FASEB J**, v.18, p. 992-994, 2004.

HO, Y.S.; XIONG, Y.; MA, W.; SPECTOR, A.; HO, D.S. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **J Biol Chem**, v. 279, p. 32804–32812, 2004.

HOWARD, M.; FARRAR, J.; HILFIKER, M.; JOHNSON, B.; TAKATSU, K.; HAMAOKA, T., et al. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. **J Exp Med**, v. 155, n. 3, p. 914-923, 1982.

HUEY, K.A.; MEADOR, B.M. Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and $\alpha\beta$ -crystallin responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 105, n. 6, p. 1830–1836, 2008.

HURST, S.M.; WILKINSON, T.S.; MCLOUGHLIN, R.M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N., et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705-714, 2001.

IMAYAMA, I.; ULRICH, C.M.; ALFANO, C.M.; WANG, C.; XIAO, L.; WENER, M.H., et al. Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese post menopausal women: a randomized controlled trial. **Cancer Res**, v. 72, n. 9, p. 2314-2326, 2012.

IRAHARA, T.; SATO, N.; INOUE, K.; et al. Low-intensity exercise in the acute phase of lipopolysaccharide-induced sepsis improves lipid metabolism and survival in mice by stimulating PGC-1 α expression. **J Trauma Acute Care Surg**, v. 80, n. 6, p. 933-940, 2016.

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.

JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acidreactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med**, v. 9, p. 515-540, 1990.

KADOGLOU, N.P.; PERREA, D.; ILIADIS, F.; ANGELOPOULOU, N.; LIAPIS, C.; ALEVIZOS, M. Exercise reduces resistin and inflammatory cytokines in patients with Type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, p. 719–721, 2007.

KARABULUT, M.; SHERK, V.D.; BEMBEN, D.A.; BEMBEN, M.G. Inflammation marker, damage marker and anabolic hormone responses to resistance training

with vascular restriction in older males. **Clin Physiol Funct Imaging**, v. 33, n. 5, p. 393-399, 2013.

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

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

KAWANO, M.; HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TAGA, T.; HORII, Y.; IWATO, K., et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. **Nature**, v. 332, n. 6159, p. 83-85, 1988.

KELLER, C.; KELLER, P.; MARSHAL, S.; PEDERSEN, B.K. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise--effect of carbohydrate ingestion. **J Physiol**, v. 550, n. Pt 3, p. 927-931, 2003.

KELLER, C.; STEENSBERG, A.; HANSEN, A.K.; FISCHER, C.P.; PLOMGAARD, P.; PEDERSEN, B.K. The effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 99, n. 6, p. 2075-2079, 2005.

KELLER, P.; KELLER, C.; ROBINSON, L.E.; PEDERSEN, B.K. Epinephrine infusion increases adipose interleukin-6 gene expression and systemic levels in humans. **J Appl Physiol**, v. 97, n. 4, p. 1309-1312, 2004.

KELLER, C.; STEENSBERG, A.; PILEGAARD, H.; OSADA, T.; SALTIN, B.; PEDERSEN, B.K., et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2748-2750, 2001.

KELLER, G.A.; WARNER, T.G.; STEIMER, K.S.; HALLEWELL, R.A. Cu, Zn superoxide-dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma-cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 7381–7385, 1991.

KEMP, M.; GO, Y.M.; JONES, D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox system: a perspective on redox system biology. **Free Radic Biol Med**, v. 44, p. 921–937, 2008.

KIM, K.; KIM, I.H.; LEE, K.Y.; RHEE, S.G.; STADTMAN, E.R. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/ Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. **J Biol Chem**, v. 263, p. 4704–4711, 1988.

KINASHI, T.; HARADA, N.; SEVERINSON, E.; TANABE, T.; SIDERAS, P.; KONISHI, M., et al. Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 70-73, 1986.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Research**, v. 8, Suppl 2, S2, 2006.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 1-21, 2005.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood Journal**, v. 74, n. 1, p. 1-10, 1989.

KISHIMOTO, T.; HIRANO, T.; KURITANI, T.; YAMAMURA, Y.; RALPH, P.; GOOD, R.A. Induction of IgG production in human B lymphoblastoid cell lines with normal human T cells. **Nature**, v. 271, n. 5647, p. 756-758, 1978.

KISHIMOTO, T.; ISHIZAKA, K. Regulation of antibody response in vitro. V. Effect of carrier-specific helper cells on generation of hapten-specific memory cells of different immunoglobulin classes. **J Immunol**, v. 111, n. 4, p. 1-9, 1973.

KISHIMOTO, T.; ISHIZAKA, K. Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier-specific helper cells for IgG and IgE antibody response. **J Immunol**, v. 111, n. 4, p. 720-732, 1973b.

KISHIMOTO, T.; ISHIZAKA, K. Regulation of antibody response in vitro. VII. Enhancing soluble factors for IgG and IgE antibody response. **J Immunol**, v. 111, n. 4, 1194-1205c, 1973c.

KISHIMOTO, T.; MIYAKE, T.; NISHIZAWA, Y.; WATANABE, T.; YAMAMURA, Y. Triggering mechanism of B lymphocytes. I. Effect of antiimmunoglobulin and enhancing soluble factor on differentiation and proliferation of B cells. **J Immunol**, v. 115, p. 1179-1184, 1975.

KLEIN-PLATAT, C.; DRAI, J.; OUJAA, M.; SCHLIEDER, J.; SIMON, C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. **Am J Clin Nutr**. v.82, n.6, p.1178-1184, 2005.

KOHUT, M.L.; MCCANN, D.A.; RUSSELL, D.W.; KONOPKA, D.N.; CUNNICK, J.E.; FRANKE, W.D., et al. Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of [beta]-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. **Brain Behav Immun**, v. 20, n. 3, p. 201-209, 2006.

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

KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; MOLLER, K.; MITTENDORFER, B.; PEDERSEN, B.K. Influence of TNF-{alpha} and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. E108-E114, 2006.

KUDO, O.; SABOKBAR, A.; POCOCK, A.; ITONAGA, I.; FUJIKAWA, Y.; ATHANASOU, N.A. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. **Bone**, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2003.

LANA, A.C.; PAULINO, C.A.; GONÇALVES, I.D. Efeitos dos exercícios físicos sobre o edema inflamatório agudo em ratos Wistar. **Ver Bras Med Esporte**. v.14, n.1, p.33-37, 2007.

LANGBERG, H.; OLESEN, J.L.; GEMMER, C.; KJAER, M. Substantial elevation of interleukin-6 concentration in peritendinous tissue, in contrast to muscle, following prolonged exercise in humans. **J Physiol**, v. 542, n. Pt 3, p. 985-990, 2002.

LARSEN, A.I.; AUKRUST, P.; AARSLAND, T.; DICKSTEIN, K. Effect of aerobic exercise training on plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with heart failure. **Am J of Cardiol**, v. 88, n. 7, p. 805-808, 2001.

LEAMAN, D.W.; LEUNG, S.; LI, X.; STARK, G.R. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. **FASEB J**, v. 10, p. 1578–1588, 1996.

LEANDRO, C.; NASCIMENTO, E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DUARTE, J.A.; DE-CASTRO, C.M.M.B. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**. v.2, n.5, p.80-90, 2002.

LEGENDRE, F.; DUDHIA, J.; PUJOL, J.P.; BOGDANOWICZ, P. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 2903-2912, 2003.

LENG, S.X.; MCELHANEY, J.E.; WALSTON, J.D.; XIE, D.; FEDARKO, N.S.; KUCHEL, G.A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 63, n. 8, p. 879-884, 2008.

LEONARD, B.E. Inflammation, depression and dementia: are they connected? **Neurochemical Research**, v. 32, p. 1749–1756, 2007.

LI, Y.B.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide-dismutase. **Nat Genet**, v. 11, p. 376–381, 1995.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, p.868–874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, p.1135–1143, 2002.

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. **J Neuroinflammation**, v.12, p.138, 2015.

LIU, J.; YEO, H.C.; DANIGER, S.J.; AMES, B.N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. **Anal Biochem**, v. 245, n. 2, p. 161-166, 1997.

LONGO, D.L. & FAUCI, A.S. **Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison**. 2^a edição. AMGH Editora. Setembro 2014:140-153.

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

MACINTYRE, D.L.; SORICHTER, S.; MAIR, J.; BERG, A.; MCKENZIE, D.C. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 84, n. 3, p. 180-186, 2001.

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

MACKAY, F.; LOESCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) induced Cell Adhesion to Human Endothelial Cells is under Dominant Control of One TNF Receptor Type, TNF-R55. **J Exp Med**. v.177, n.5, p.1277-86, 1993.

MAHARAJ, A.; SLUSHER, A.L.; ZOURDOS, M.C.; WHITEHURST, M.; FICO, B.G.; HUANG, C.J. Association of calprotectin with leukocyte chemotactic and inflammatory mediators following acute aerobic exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 7, p. 1-5, 2015.

MANDELL, G.L.; RUBIN, W.; HOOK, E.W. The effect of an NADH oxidase inhibitor (hydrocortisone) on polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity. **J Clin Invest**, v. 49, n. 7, p. 1381-1388, 1970.

MARGELI, A.; SKENDERI, K.; TSIRONI, M.; HANTZI, E.; MATALAS, A.L.; VRETTOU, C., et al. Dramatic elevations of interleukin-6 and acute phase

reactants in athletes participating in the ultradistance foot race “spartathlon”: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 7, p. 3914-3918, 2005.

MARKLUND, S.L. Human copper-containing superoxidedismutase of high molecular-weight. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, p. 7634–7638, 1982.

MARKLUND, S.L.; BJELLE, A; ELMQVIST, L.G. Superoxide-dismutase isoenzymes of the synovial-fluid in rheumatoid-arthritis and in reactive arthritides. **Ann Rheum Dis**, v. 45, p. 847–851, 1986.

MARKLUND, S.L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxidedismutase in extracellular fluids. **Clin Chim Acta**, v. 126, p. 41– 51, 1982.

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 Behav Immun**, v. 29, p. 113-123, 2013.

MARTÍNEZ, A.C.; ALVAREZ-MON, M. O sistema imunológico: conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. **Rev Bras Med Esporte**. v.5, n.3, p.120-125, 1999.

MARTÍNEZ, A.C.; PONS, M.M.; GOMILA, A.S.; TUR MARÍ, J.A.; BIESCAS, A.P. Changes in circulating cytokines and markers of muscle damage in elite cyclists during a multi-stage competition. **Clin Physiol Funct Imaging**. v.35, n.5, p.351-8, 2015.

MARTINS, M.S.; FARINHA, J.B.; BENETTI, C.B.; COURTES, A.A.; DUARTE, T.; SILVA, J.C.N., et al. Positive effects of resistance training on inflammatory parameters in men with metabolic syndrome risk factors. **Nutr Hosp**, v. 32, n. 2, p. 792-798, 2015.

McARDLE, William D.; KATCH, Frank I.; KATCH, Victor L. **Fisiologia do Exercício:** nutrição, energia e desempenho humano; 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Traduzido por Taranto, G. 2011. 1061 p.

McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J.; TRIPLETT-McBRIDE, T.; SEBASTIANELLI, W. Effect of resistance exercise on free radical production. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 1998

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.

MENEGUINI R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 28, p. 57-62, 1987.

MESQUIDA, M.; LESZCZYNSKA, A.; LLORENÇ, V.; ADÁN, A. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. **Clin Exp Immunol**, v. 176, n. 3, p. 301-309, 2014.

MIHARA, M.; MORIYA, Y.; KISHIMOTO, T.; OHSUGI, Y. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. **Br J Rheumatol**, v. 34, n. 4, p. 321-325, 1995.

MILANI, P.; GAGLIARDI, S.; COVA, E.; CEREDA, C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. **Neurology Research International**, v. 2011, p. 458427, 2011. doi:10.1155/2011/458427

MILLER, J.F.; MITCHELL, G.F. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. **J Exp Med**, v. 128, n. 4, p. 801-820, 1968.

MILLS, G.C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J Biol Chem**, v. 229, p. 189–197, 1957.

- MOCK, B.A.; NORDAN, R.P.; JUSTICE, M.J.; KOZAK, C.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G., et al. 1989. The murine IL-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. **J Immunol**, v.142, n. 4, p.1372-1376, 1989.
- MONTAGUE, C.T.; PRINS, J.B.; SANDERS, L.; ZHANG, J.; SEWTER, C.P.; DIGBY, J.; BYRNE, C.D.; O'RAHILLY, S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. **Diabetes**. v.47, n.9, p.1384-90, 1998.
- MOORE, K.W.; GARRA, A.; MALEFYT, R.W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, v. 11, n. 1, p. 165-190, 1993.
- MUELLER, S.; RIEDEL, H.D.; STREMMLER, W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ –removing enzyme in human erythrocytes. **Blood**, v. 90, p. 4973–4978, 1997.
- MULLER, F.L.; SONG, W.; LIU, Y.H.; et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 1993–2004, 2006.
- NAITO, Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K., et al. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 155, n. 3, p. 1459-1463, 1988.
- NAWROTH, P.P.; BANK, I.; HANDLEY, D.; CASSIMERIS, J.; CHEES, L.; STERN, D. Tumor Necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. **J Exp Med**. v.163, n.6, p.1363-75, 1986.
- NICKLAS, B.J.; AMBROSIUS, W.; MESSIER, S.P.; MILLER, G.D.; PENNINX, B.W.; LOESER, R.F., et al. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 4, p. 544-551, 2004.
- NOMA, Y.; SIDERAS, P.; NAITO, T.; BERGSTEDT-LINDQUIST, S.; AZUMA, C.; SEVERINSON, E., et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction

factor by a novel strategy using SP6 promoter. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 640-646, 1986.

NORTHOFF, H.; BERG, A. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. **Int J Sports Med**, v. 12, Suppl 1, p. S9-15, 1991.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 8, p. 953-961, 1996.

OBERLEY, L.; SPITZ, D. Nitroblue tetra-zolium. Em: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**, (ed. R.A. Greenwald) p. 217-220. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1985.

OSTROWSKI, K.; HERMANN, C.; BANGASH, A.; SCHJERLING, P.; NIELSEN, J.N.; PEDERSEN, B.K. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **J Physiol**, v. 513, n. Pt 3, p. 889-894, 1998b.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ZACHO, M.; ASP, S.; PEDERSEN, B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **J Physiol**, v. 508, n. Pt 3, p. 949-953, 1998a.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 83, n. 6, p. 512-515, 2000.

PANAGIOTAKOS, D.B.; PITSAVOS, C.; CHRYSOHOOU, C.; KAVOURAS, S.; STEFANADIS, C. The associations between leisure-time physical activity and inflammatory and coagulation markers related to cardiovascular disease: the ATTICA Study. **Prev Med**, v. 40, n. 4, p. 432-437, 2005.

PAPANICOLAOU, D.A.; PETRIDES, J.S.; TSIGOS, C.; BINA, S.; KALOGERAS, K.T.; WILDER, R., et al. Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 271, n. 3 Pt 1, p. E601-E605, 1996.

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.

PARKER, D.C.; WADSWORTH, D.C.; SCHNEIDER, G.B. Activation of murine B lymphocytes by anti-immunoglobulin is an inductive signal leading to immunoglobulin secretion. **J Exp Med**, v. 152, n. 1, p. 138-150, 1980.

PATTWELL, D.M.; JACKSON, M.J. Contraction induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 32, n. 1, p. 14-18, 2004.

PEDERSEN, B.K.; AKERSTRÖM, T.C.; NIELSEN, A.R.; FISCHER, C.P. Role of myokines in exercise and metabolism. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 3, p. 1093-1098, 2007.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-1406, 2008.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMANN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: Regulation, integration and adaption. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K. Muscle as a secretory organ. **Compr Physiol**, v. 3, n. 3, p. 1337-1362, 2013.

PEDERSEN, B.K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 16, Suppl. 1, p. 3–63, 2006.

PEDERSEN, B.K.; STEENSBERG, A.; FISCHER, C.; KELLER, C.; KELLER, P.; PLOMGAARD, P., et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? **J Muscle Res Cell Motil**, v. 24, n. 2-3, p. 113-119, 2003.

PENKOWA, M.; KELLER, C.; KELLER, P.; JAUFFRED, S.; PEDERSEN, B.K. Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. **FASEB J**, v. 17, n. 14, p. 2166-2168, 2003.

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. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.310, p.R934–R942, 2016.

PEREIRA, S. Efeito da desnutrição na resposta imune ao stress. **Revista da Associação Portuguesa dos Nutricionistas**. v.7,p.18-21, 2007.

PERLSTEIN, R.S.; WHITNALL, M.H.; ABRAMS, J.S.; MOUGEY, E.H.; NETA, R. Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 946-952, 1993.

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. **J Appl Physiol**, v.98, p.1154-1162, 2005.

PETERSEN, E.W.; CAREY, A.L.; SACCHETTI, M.; STEINBERG, G.R.; MACAULAY, S.L.; FEBBRAIO, M.A., et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 1, p. E155-E162, 2005.

PFEIFFER R. Untersuchungen über das Choleragift. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v.11, n. 1, p. 393–412, 1892.

PFEILSCHIFTER, J.; KÖDTZ, R.; PFHOL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 90–119, 2002.

PLAYFAIR, J.H.L.; CHAIN, B.M. **Imunologia básica**: guia ilustrado de conceitos fundamentais; 9.ed. Barueri, SP: Manole, Traduzido por Oliveira, S.I. 2013. 112 p.

PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDORFER, B.; ZIERATH, J.R.; PEDERSEN, B.K. Tumor Necrosis Factor- α Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-2945, 2005.

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.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 7, p. 987-997, 1999.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 286, p. 327–334, 2001.

PRETOLANI, M. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. **Clin Exp Allergy**, v. 29, n. 9, p. 1164-1171, 1999.

PUE, C.A.; MORTENSEN, R.F.; MARSH, C.B.; POPE, H.A.; WEWERS, M.D. Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. **J Immunol**, v. 156, n. 4, p. 1594-1600, 1996.

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. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 1, p.113-119, 2010.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, p. 981–990, 2012.

REID, T.J. III; MURTHY, M.R.; SICIGNANO, A.; TANAKA, N.; MUSICK, W.D.; ROSSMANN, M.G. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, p. 4767–4771, 1981.

REILLY, M.P.; LEHRKE, M.; WOLFE, M.L.; ROHATGI, A.; LAZAR, M.A.; RADER, D.J. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. **Circulation**, v. 111, p. 932–939, 2005.

RHEE, S.G.; KANG, S.W.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, v. 52, p. 35–41, 2001.

RHEE, S.G.; YANG, K.S.; KANG, S.W.; WOO, H.A.; CHANG, T.S. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 619–626, 2005.

RIETSCHEL, E.T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci Am**, v.267, p.26–33, 1992.

RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE, T.; SHCADE, F.U.; et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, v.8, p.217-225, 1994.

RODRIGUEZ, J.; FERNÁNDEZ-VERDEJO, R.; PIERRE, N.; PRIEM, F.; FRANCAUX, M. Endurance training attenuates catabolic signals induced by TNF-alpha in muscle of mice. **Med Sci Sports Exerc**. 2015.

ROMANO, M.; SIRONI, M.; TONIATTI, C.; POLENTARUTTI, N.; FRUSCELLA, P.; GHEZZI, P., et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, v. 6, n. 3, p. 315-325, 1997.

RONSEN, O.; HOLM, K.; STAFF, H.; OPSTAD, P.K.; PEDERSEN, B.K.; BAHR, R. No effect of seasonal variation in training load on immuno-endocrine responses to acute exhaustive exercise. **Scand J Med Sci Sports**, v. 11, n. 3, p. 141-148, 2001.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\{\alpha\}$, Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. **J Biol Chem**, v. 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003.

ROWSEY, P.J.; KLUGER, M.J. Corticotropin releasing hormone is involved in exercise-induced elevation in core temperature. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 179-187, 1994.

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. **Arch Toxicol**, v. 80, n. 2, p. 81-87, 2006.

RUJITO, L.; MULATSIH, S.; SOFRO, A.S. Status of Superoxide Dismutase in Transfusion Dependent Thalassaemia. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7 n. 5, p. 194-198, 2015.

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

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.

SCHIMPL, A.; WECKER, E. Studies on the source and action of the T-cell replacing factor (TRF). **Adv Exp Med Biol**, v. 29, n. 0, p. 179-182, 1973.

- SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.C.; DINARELLO, C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v. 75, n. 1, p. 40-47, 1990.
- SCHROEDER, W.A.; SHELTON, J.R.; SHELTON, J.B.; et al. The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. **Arch Biochem Biophys**, v. 214, p. 397-421, 1982.
- SEAH, T.C.; KAPLAN, J.G. Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. **J Biol Chem**, v. 248, p. 2889-2893, 1973.
- SEHGAL, P.B.; ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.; MAY, L.T.; FERGUSON-SMITH, A.; SLATE, D.L., et al. 1986. Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 14, p. 5219-5222, 1986.
- SENTMAN, M.L.; GRANSTROM, M.; JAKOBSON, H.; REAUME, A.; BASU, S.; MARKLUND, S.L. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 281, p. 6904-6909, 2006.
- SHABO, Y.; LOTEM, J.; RUBINSTEIN, M.; REVEL, M.; CLARK, S.C.; WOLF, S.F., et al. The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 2070-2073, 1988.
- SHERN-BREWER, R.; SANTANAM, N.; WETZSTEIN, C.; WHITE-WELKLEY, J.; PARTHASARATHY, S. Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 7, p. 1181-1187, 1998.
- SIEMES, C.; VISSER, L.E.; COEBERGH, J.W.; et al. C-reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 5216-5222, 2006.
- SIMON, A. Therapeutic strategies for clinical blockade of IL-6/gp 130 signaling. **J Clin Invest**, v. 121, n. 19, p. 3375-3383, 2011.

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.

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.

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 390-408, 1988.

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.

SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**. v.346, n.6283, p.425-34, 1990.

STARKIE, R.; OSTROWSKI, S.R.; JAUFFRED, S.; FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **FASEB J**, v. 17, n. 8, p. 884-886, 2003.

STEENE-JOHANNESSEN, J.; KOLLE, E.; ANDERSEN, L.B.; ANDERSEN, S.A. Adiposity, aerobic fitness, muscle fitness, and markers of inflammation in children. **Med Sci Sports Exerc**. v.45, p.714 – 721, 2013.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 2, p. E433–E437, 2003b.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; SACCHETTI, M.; KELLER, C.; OSADA, T.; SCHJERLING, P., et al. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. **J Physiol**, v. 548, n. Pt 2, p. 631-638, 2003a.

STEENSBERG, A.; KELLER, C.; STARKIE, R.L.; OSADA, T.; FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. IL- 6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 6, p. E1272-E1278, 2002.

STEENSBERG, A.; VAN HALL, G.; OSADA, T.; SACCHETTI, M.; SALTIN, B.; KLARLUND, P.B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529, n. Pt 1, p. 237- 242, 2000.

STUPKA, N. et al. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 6, p. 2325-2332, 2000.

SUEMATSU, S.; MATSUSAKA, T.; MATSUDA, T.; OHNO, S.; MIYAZAKI, J.; YAMAMURA, K., et al. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 1, p. 232-235, 1992.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 3-9, 2004.

TAMURA, T.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; MIYaura, C.; TANAKA, S.; YAMADA, Y., et al. Soluble interleukin- 6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 24, p. 11924-11928, 1993.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1227-1236, 2012.

TANFORD, C.; LOVRIEN, R. Dissociation of catalase into subunits. **J Am Chem Soc**, v. 84, p. 1892-1896, 1962.

TERLIKOWSKI, S.C. Tumor necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. **Rocznik Akademii Medycznej w Białymostku**. v.46, p.5-18, 2001.

TILG, H.; TREHU, E.; ATKINS, M.B.; DINARELLO, C.A.; MIER, J.W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 113-118, 1994.

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

TREVISAN, M.; BROWNE, R.; RAM, M.; et al. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. **Am J Epidemiol**, v. 154, p. 348–56, 2001.

TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D.A.; DEFENSOR, R.; MITSIADIS, C.S.; KYROU, I.; CHROUSOS, G.P. Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 1, p. 54-62, 1997.

TSILIDIS, K.K.; BRANCHINI, C.; GUALLAR, E.; HELZLSOUE, K.J.; ERLINGER, T.P.; PLATZ, E.A. C-reactive protein and colorectal cancer risk: a systematic review of prospective studies. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1133-1140, 2008.

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. **Am J Physiol Gastrointest Liver**, v. 290, p. 377-385, 2006.

VAARA, J.P.; VASANKARI, T.; FOGELHOLM, M.; HAKKINEN, K.; SANTTILA, M.; KYROLAINEN, H. Maximal strength muscular endurance and inflammatory biomarkers in Young adult men. **Int J Sports Med.** v.35, n.14, p.1229-34, 2014.

VARELLAL, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Rev Bras Alerg Imunopatol**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VAN DAMME, J.; CAYPHAS, S.; VAN SNICK, J.; CONINGS, R.; PUT, W.; LENAERTS, J.P., et al. Purification and characterization of human fibroblast-

derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). **Eur J Biochem**, v. 168, n. 3, p. 543-550, 1987.

VAN DAMME, J.; VAN BEEUMEN, J.; DECOCK, B.; VAN SNICK, J.; DE LEY, M.; BILLIAU, A. Separation and comparison of two monokines with lymphocyte-activating factor activity: IL-1 beta and hybridoma growth factor (HGF). Identification of leukocyte-derived HGF as IL-6. **J Immunol**, v. 140, n. 5, p. 1534-41, 1988.

VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C.; SCHJERLING, P., et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 7, p. 3005-3010, 2003.

VEAL, E.A.; DAY, A.M.; MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Mol Cell**, v. 26, p. 1-14, 2007.

VINCENT, H.K.; POWERS, S.K.; DEMIREL, H.A.; COOMBES, J.S.; NAITO, H. Exercise training protects against contraction induced lipid peroxidation in the diaphragm. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 79, n. 3, p. 268-273, 1999.

VOUP, A.C.P.; ALFENAS, R.C.G.; COSTA, N.M.B.; MINIM, V.P.R.; STRINGUETA, P.C.; BRESSAN, J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.52, n.3, p.537-549, 2008.

WANG, T.; ROHAN, T.E.; GUNTER, M.J.; et al. A prospective study of inflammation markers and endometrial cancer risk in postmenopausal hormone nonusers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, p. 971-977, 2011.

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

WEISIGER, R.A.; FRIDOVIC, I. Mitochondrial superoxide dismutase – site of synthesis and intramitochondrial localization. **J Biol Chem**, v. 248, p. 4793-4796, 1973.

WILLOUGHBY, D.S.; MCFARLIN, B.; BOIS, C. Interleukin-6 Expression After Repeated Bouts of Eccentric Exercise. **Int J Sports Med**, v. 24, n. 1, p. 15-21, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Recommendations on Physical Activity for Health**. Geneva: World Health Organization, 2010.

XU, G.Y.; YU, H.A.; HONG, J.; STAHL, M.; MCDONAGH, T.; KAY, L.E., et al. Solution structure of recombinant human interleukin-6. **J Mol Biol**, v. 268, n. 2, p. 468-481, 1997.

YASUKAWA, K.; HIRANO, T.; WATANABE, Y.; MURATANI, K.; MATSUDA, T.; NAKAI, S.; KISHIMOTO, T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF/IL-6) gene. **The EMBO Journal**, v.6, n.10, p.2939-2945, 1987.

YEH, S.S.; WU, S.; LEVINE, D.M.; et al. The correlation of cytokine levels with body weight after megestrol acetate treatment in geriatric patients. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 56, p. 48–54, 2001.

YEO, H.C.; HELBOCK, H.J.; CHYU, D.W.; AMES, B.N. Assay of malonaldehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 220, p. 391-396, 1994.

YOSHIZAKI, K.; NISHIMOTO, N.; MIHARA, M.; KISHIMOTO, T. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. **Springer Semin Immunopathol**, v. 20, n. 1-2, p. 247-259, 1998.

YOUNG, R.P.; HOPKINS, R.; BLACK, P.N.; et al. Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and in those with normal lung function. **Thorax**, v. 61 n. 5, p. 394–399, 2006.

ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P.G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1527–1548, 2008.

ZHANG, D.; SUN, M.; SAMOLS, D.; KUSHNER, I. STAT3 Participates in Transcriptional Activation of the C-reactive Protein Gene by Interleukin-6. **J Biol Chem**, v. 271, n. 16, p. 9503-9509, 1996.

ZILBERSTEIN, A.; RUGGIERI, R.; HOM, J.H.; REVEL, M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. **EMBO J**, v. 5, n. 10, p. 2529-2537, 1986.

8. Anexos

8.1. Anexo 1: Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa 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/C57BL/6</i>	
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

A assinatura do Delegado de Pesquisas.

2. Relatório do trabalho de campo

(Tese de Matheus Pintanel Silva de Freitas)

Relatório do trabalho de campo:

Destinei esse espaço para dissertar detalhadamente sobre alguns pontos que chamaram atenção durante o decorrer do trabalho de campo.

Primeiramente, nossa equipe foi muito bem recebida no biotério central, sendo que passamos por um treinamento ministrado pelos auxiliares de bioterismo para utilizar corretamente o laboratório.

Um ponto que aconteceu logo no início da intervenção e merece destaque, refere-se ao fato de que foi decidido realizar o treinamento durante o período de maior inatividade dos animais (durante o dia), pois a logística do biotério impedia que realizássemos a intervenção no período de maior atividade dos animais (noite). Com isso, decidimos realizar o treinamento no período da manhã, começando às 08:30h. Porém, no primeiro dia, notamos que os animais resistiam muito ao início do treinamento, precisando de muitos estímulos para correr, de modo que ficou quase impossível seguir o estudo. O mesmo se repetiu no segundo dia de treinamento. Com isso, chegamos à hipótese que estávamos colocando os animais para treinar no final do seu período ativo (quando eles estavam mais cansados e com sono). Para tentar solucionar esse problema e dar seguimento ao estudo, resolvemos a partir do terceiro dia de treinamento, realizar a intervenção sempre na parte da tarde (às 14:00h), pois daria tempo dos animais repousarem e estarem mais descansados para realizar o treinamento. Como o esperado, os animais se exercitaram melhor, sendo que o horário das 14:00h se manteve até o final do estudo.

No mesmo sentido, logo na primeira sessão de treinamento físico, por medo de machucar os animais, deixamos o choque elétrico a 0,5 mA, porém isso fazia com que os animais ficassem e cima da grade elétrica sem que realizassem a corrida, então, a partir da segunda sessão, aumentamos para 1,5 (como planejado) e isso fez com que os animais corressem mais.

Porém, mesmo assim, tínhamos planejado ir apenas três pesquisadores por dia de intervenção, imaginando que os animais iam correr tranquilamente. Todavia, mesmo com o choque de 1,5 mA, os animais necessitavam de muitos estímulos por parte dos pesquisadores (assopros, toques e tapinhas de leve na

cauda) para correr. Então, notamos que seriam necessários pelo menos cinco pesquisadores a cada dia de treinamento, para que cada um ficasse acompanhando no máximo dois animais. Assim, a partir do terceiro dia de treinamento, objetivávamos ter, ao menos, cinco pesquisadores.

Contudo, muitas vezes não tínhamos auxiliares de pesquisa suficientes para que tivéssemos pelo menos quatro pessoas (que já não era um número ideal). Foi neste momento que ocorreu uma grata surpresa: os auxiliares de bioterismo, que não tem obrigação nenhuma com os projetos que estão sendo realizados no biotério, se disponibilizaram gentilmente para nos ajudar, fincando do início até o final do período de treinamento nos ajudando a monitorar e estimular os camundongos a correr. A equipe de auxiliares de bioterismo foi fantástica e sem eles o trabalho não teria tido a qualidade que conseguimos alcançar.

Além disso, também no início do estudo, na segunda sessão de treinamento, quando estávamos ainda tentando achar a melhor forma de conduzir os treinamentos (como explicado acima), um dos animais do grupo contínuo notou que a baia tinha uma tampa que poderia ser aberta, e que ele poderia sair saltando. A partir desse momento, o animal começou a pular e dar várias cabeçadas na tampa para tentar abri-la. Passaram-se alguns minutos e o animal não parou de ter esse comportamento e outros já queriam começar a imitá-lo. Isso nos obrigou a excluí-lo do estudo, pois as batidas com a cabeça poderiam gerar traumas e influenciar nos parâmetros cerebrais que eram parte dos desfechos, bem como, o animal já estava influenciando outros a fazerem o mesmo gesto, o que prejudicaria o estudo inteiro.

No mesmo sentido, na sessão correspondente ao 11º dia de treinamento, um camundongo do grupo HIIT encostou na grade de choque e se urinou, isso fez com que, mesmo com o choque estando a 1,5 mA, que é amplamente utilizado na literatura, o animal morresse eletrocutado. A partir desse momento, os pesquisadores impediam que qualquer animal levemente úmido encostasse na grade de choque, ficando, o animal, apenas com estímulos físicos para correr.

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, nosso termômetro infravermelho estava medindo a temperatura correta, utilizou-se outros camundongos fêmeas que não participavam do estudo, verificando a concordância dos resultados das medidas retais realizadas com um termômetro convencional, contra os resultados das medidas realizadas pelo termômetro infravermelho apontando para a região anogenital dos mesmos animais.

Felizmente as medidas concordavam entre si. O problema, então, era conseguir ficar alguns poucos segundos com o laser do termômetro infravermelho apontado para a região anogenital dos animais sem que eles se movimentassem. Começamos tentando tapar a cabeça e metade do corpo do animal com um pano limpo e imobilizá-lo contra a superfície plana. Todavia, o animal ficava estressado, fazia força e tentava nos morder, aumentando seu nível de estresse. Como utilizamos o termômetro infravermelho para que os animais não ficassem estressados, essa técnica de medida não iria servir.

Foi então que, levando em conta que sempre que tentávamos retirar os animais da gaiola, eles fugiam cavando na maravalha, resolvemos apenas suspender parcialmente o animal pela cauda, de dentro da gaiola, de modo que eles ainda ficassem com as patas dianteiras e a cabeça em contato com a maravalha. Isso fez com que eles tentassem cavar para se esconder, deixando-os ocupados para que não tentassem nos morder e garantindo que a região anogenital ficasse parada pelos poucos segundos necessários para medir a temperatura corporal.

No entanto, quando fomos medir a temperatura corporal dos animais que pertenciam ao estudo, por um descuido dos auxiliares de pesquisa, três animais do grupo HIIT chegaram ao laboratório para serem eutanasiados e foram mortos sem terem realizado a última medida da temperatura corporal.

Além disso, quando fomos analisar os parâmetros inflamatórios, um animal em cada grupo exercício não gerou soro suficiente para análise e foram caracterizados como perda, totalizando oito animais em cada grupo (contínuo e HIIT). No mesmo sentido, devido ao fato do pequeno volume de tecido cerebral disponível em camundongos C57BL/6, uma subamostra de cinco animais por grupo foi utilizada para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo.

Por fim, como o estudo estava orçado com uma quantidade expressiva de dinheiro e não tivemos nenhum tipo de financiamento, precisamos fazer parcerias para diminuir os custos. Com isso, conseguimos os kits das citocinas inflamatórias com um professor da Universidade Católica de Pelotas, e os kits para medir os parâmetros oxidativos e o LPS com as professoras do curso de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas. Porém, os pesquisadores ainda precisaram gastar uma quantia expressiva com a esteira motorizada para roedores (o valor foi dividido entre quatro pesquisadores –dois doutorandos, um mestrando e o orientador) e com o termômetro infravermelho, sendo dividido entre os dois doutorados.

3. Artigo original

(Tese de Matheus Pintanel Silva de Freitas)

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.

Página de título

Efeitos protetores de diferentes modelos de treinamento físico em camundongos C57BL/6 expostos ao lipopolissacarídeo

Efeito protetor do EF sobre o LPS

Matheus Pintanel Freitas^{1,2}, Francieli Moro Stefanello³, Airton José Rombaldi¹

1- Departamento de Desportos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

2- Departamento de Educação Física, Faculdade Anhanguera de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

3- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

Autor correspondente

Matheus Pintanel Freitas

Rua General Argolo 337, apto 501, CPF: 96015-160, Pelotas, RS, Brasil

matheus.pintanel@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Comparar os efeitos crônicos protetores de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, níveis séricos de citocinas inflamatórias e parâmetros cerebrais de estresse oxidativo em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à indução de inflamação sistêmica por lipopolissacarídeo (LPS).

Métodos: Os animais foram divididos em grupo controle (sedentário) (n=10), exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) (n=10) e exercício contínuo de intensidade moderada (contínuo) (n=10). O treinamento durou 6 semanas e, setenta e duas horas após a última sessão, foi injetado nos animais uma dose de 250 µg/kg de LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli*.

Resultados: O grupo sedentário teve uma queda na temperatura corporal na primeira hora pós LPS, permanecendo baixo nas 12 horas seguintes [$F(3,27)=11,15$, $p=<0,001$], o que não aconteceu nos grupos exercícios. Ademais, o grupo HIIT teve valores superiores do conteúdo tiólico total no hipocampo do que o grupo contínuo [$F(2,12)=4,52$, $p=0,03$]. Porém, os modelos de exercício não exerceram efeitos protetores nos demais parâmetros oxidantes e antioxidantes analisados no córtex cerebral e hipocampo, bem como sobre os níveis séricos de IL-6 e TNF-α.

Conclusão: Este foi o primeiro estudo comprovando que seis semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada e HIIT foram igualmente suficientes para prevenir a queda de temperatura advinda da administração de LPS em camundongos C57BL/6, significando que ambos são eficientes como forma de combater um dos sintomas mais característicos do LPS e, por

consequência, de infecções por bactérias gram-negativas. Adicionalmente, o HIIT foi suficiente para aumentar o conteúdo tiólico total hipocampal.

Palavras-chave: Exercício aeróbico; Treinamento intervalado de alta intensidade; Sistema imune; Inflamação; Lipoglicanos; Estresse oxidativo

1. Introdução

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente em bactérias gram-negativas¹, considerado um fator determinante para o desenvolvimento de diversas condições patológicas, tais como sepse², lesão pulmonar aguda³, insuficiência hepática⁴ e neurodegeneração⁵. Devido a isso, essa toxina tem sido utilizada para avaliar diferentes modalidades terapêuticas contra essas morbilidades, principalmente em modelos animais. Os efeitos deletérios ao organismo se dão, em grande parte, devido a uma resposta pró-inflamatória exacerbada e generalizada⁶⁻⁸, advinda de uma cascata inflamatória ativada pela administração de LPS, tanto em nível sistêmico, quanto em nível tecidual específico⁹.

Por outro lado, o exercício e a atividade física, têm se mostrado como fatores relevantes para a prevenção e tratamento de várias doenças, principalmente aquelas crônico-degenerativas¹⁰. Grande parcela dessas doenças estão associadas à inflamação sistêmica de baixo grau¹¹⁻¹⁷, o que pode explicar em parte o efeito do movimento sobre essas disfunções, pois sabe-se que a atividade física, e principalmente o exercício físico (EF), determinam um conjunto de efeitos agudos e crônicos anti-inflamatórios¹⁸.

Tendo isso em mente, é possível hipotetizar que efeitos crônicos da atividade/EF têm grande chance de influenciar a imunomodulação do organismo, de modo a protegê-lo contra os efeitos deletérios do LPS. Porém, pesquisas sobre a influência do EF na imunidade em humanos baseiam seus estudos em indivíduos saudáveis e com a concentração de marcadores imunológicos normais já na linha base¹⁹.

Nesse sentido, falta verificar a influência do EF sobre organismos submetidos a agentes patogênicos¹⁹, como é o caso do LPS. Porém, até o presente momento, foram encontrados apenas doze estudos que administraram LPS após um período de treinamento físico^{3-5,20-28}, sendo que destes, apenas quatro interviram com EF^{3,20,23,27} e o restante com atividade física^{4,5,21,22,24-26,28}. Além disso, o único modelo de exercício pesquisado foi o contínuo de intensidade leve a moderada, não existindo estudos com outros tipos de exercício, como o intermitente de alta intensidade. Finalmente, nenhum desses estudos com EF utilizou a temperatura corporal como desfecho principal, sendo essa uma das alterações características da resposta imune e indispensável para monitorar a progressão da doença²⁹. No caso de camundongos C57BL/6, há uma alteração marcada no sentido da hipotermia²⁹.

Por fim, levando em conta que o LPS é fator determinante para o desenvolvimento de neuroinflamação e neurodegeneração⁵ e que as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT) compõem o principal sistema de defesa antioxidante que pode proteger as células cerebrais contra o dano oxidativo^{30,31} e são influenciadas pelo exercício físico³², faz-se necessário determinar o comportamento dos parâmetros oxidantes e anti-oxidantes cerebrais em organismos exercitados submetidos ao LPS. Em virtude disso, este estudo objetivou comparar os efeitos crônicos protetores de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, níveis séricos de citocinas inflamatórias e parâmetros cerebrais de estresse oxidativo em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à indução de inflamação sistêmica por LPS.

2. Resultados

Dos 30 animais que começaram o estudo, dois foram excluídos por se recusarem a correr, totalizando um n total de 28 animais para análise final (grupo sedentário: n=10; grupo contínuo: n=9; e grupo HIIT: n=9).

No que se refere à temperatura corporal, pode-se verificar que apenas no grupo sedentário houve uma queda estatisticamente significativa já na primeira hora após a injeção de LPS, permanecendo mais baixa pelas 12 horas posteriores [$F(3,27)=11,15$, $p=<0,001$]. Já os grupos com os diferentes modelos de exercício físico não tiveram mudanças em sua temperatura corporal ao longo do tempo [grupo contínuo: $F(3,24)=2,27$, $p=0,15$; grupo HIIT: $F(3,21)=3,19$, $p=0,12$] (figura 1).

A figura 2 demonstra o efeito 12 horas após a injeção de LPS sobre os parâmetros inflamatórios. Verificou-se que os modelos de exercício não exercearam efeito protetor em nenhum dos biomarcadores inflamatórios em todos os grupos, sendo $F(2,23)=3,14$, $p=0,06$ para o logaritmo da IL-6 e $F(2,23)=2,49$, $p=0,1$ para a elevação cúbica do TNF- α , bem como não houve influência do modelo de exercício físico sobre os marcadores de estresse oxidativo (TBARS e ROS) no córtex cerebral e no hipocampo (figura 3).

Porém, quando observados os resultados referentes aos marcadores antioxidantes, verificou-se que o grupo de treinamento intervalado de alta intensidade teve valores superiores da concentração do conteúdo tiólico total no hipocampo em relação ao grupo contínuo [$F(2,12)=4,52$, $p=0,03$], sem diferenças em relação ao grupo sedentário ($p=0,4$). Em contrapartida, os modelos de exercício físico não influenciaram a atividade da CAT e da SOD, tanto no córtex

cerebral, quanto no hipocampo, bem como nos níveis do conteúdo tiólico total no córtex cerebral (figura 4).

3. Discussão

O principal achado deste estudo foi que seis semanas de treinamento físico, tanto realizando exercício contínuo de intensidade moderada, quanto exercício intermitente de alta intensidade, foi suficiente para prevenir os efeitos deletérios da endotoxina em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, pois não houve modificação na temperatura corporal dos animais exercitados desde a injeção de 250 µg/kg de LPS até 12 horas após. Esse é um dos desfechos clínicos de maior importância, sendo utilizado para monitorar a progressão da doença²⁹, enquanto que o grupo sedentário teve diminuição da temperatura corporal, o que é um sinal característico da progressão dos sintomas advindos da ação do LPS²⁹.

Este resultado é de suma importância, pois foi o primeiro estudo a verificar a eficiência dos modelos de exercício físico (treinamento intervalado de alta intensidade e treinamento contínuo de intensidade moderada), verificando que ambos atuaram de forma semelhante e foram suficientes para prevenir completamente o sintoma de hipotermia do LPS, o que pode representar uma nova possibilidade para fortalecer o sistema imune e prevenir sintomas causados por infecções de bactérias gram-negativas.

Em contrapartida, Rowsey et al.²⁸ realizaram um estudo com ratas fêmeas da linhagem Sprague Dawley que, após oito semanas de atividade física em roda livre para roedores, receberam uma injeção de 50 µg de LPS por kg de peso. Essa linhagem quando submetida ao LPS apresenta uma resposta febril. Os

autores concluíram que o exercício físico aumentou os efeitos pirogênicos do LPS. Uma possível explicação sobre a diferença de resultados entre as pesquisas, é que no estudo de Rowsey et al.²⁸ os ratos voltaram a se exercitar imediatamente após a injeção de LPS e em nosso estudo, os camundongos ficaram em repouso. Como já é sabido, o exercício físico causa um efeito agudo de elevação da temperatura corporal³³, o que, junto com os efeitos pirogênicos do LPS, pode explicar a maior elevação do grupo exercitado quando comparado ao grupo sedentário.

Para tentar desvendar os mecanismos pelos quais o exercício atua em organismos submetidos ao LPS, o presente estudo considerou algumas variáveis inflamatórias e cerebrais. Em referência aos marcadores de inflamação sistêmica, chegou-se à conclusão que os diferentes tipos de exercício não exerceiram influência sobre a IL-6 e TNF- α , indicando que esses biomarcadores não são afetados e o efeito protetor do exercício físico ocorreu através de outros mecanismos.

No entanto, o estudo de Chen, Chen e Jen²⁰ utilizou uma dosagem de LPS muito superior à utilizada no presente estudo, totalizando 5 mg de LPS por quilo de peso corporal e utilizou um protocolo de exercício similar ao realizado pelo grupo contínuo (60 min de corrida em esteira a 60% da $\text{vVO}_{2\text{max}}$, 5 dias/ semana) e obtiveram a diminuição dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α . Porém, os níveis de TNF- α mostraram-se inferiores apenas na primeira e segunda hora após a injeção de LPS, não existindo diferenças entre os grupos na terceira hora. Esse resultado pode indicar que o LPS estimula a produção de TNF- α nas primeiras duas horas, e como no presente estudo seus níveis foram medidos após 12 horas, os valores já poderiam estar normalizados. No que se refere à IL-6, o

estudo de Chen, Chen e Jen²⁰ obteve um resultado favorável ao exercício 24 horas após a aplicação do LPS, porém como a dosagem foi maior, provavelmente proporcionou uma resposta mais pronunciada à IL-6, o que aumentou a sensibilidade para as modificações do exercício serem estatisticamente significativas.

Porém, mesmo com uma dose de 2 mg de LPS por quilo de peso, Peppler et al.⁴ não conseguiram verificar uma diferença significativa entre os níveis séricos de IL-6 e TNF- α . No entanto, a intervenção foi realizada com atividade física em roda livre, e não com exercício físico (como presente estudo e no estudo de Chen, Chen e Jen²⁰), o que limita em parte as comparações mas é um indicativo que, provavelmente, níveis maiores de LPS sejam necessários para modular a concentração sérica desses biomarcadores de tal modo que o movimento consiga influenciá-los.

Sabe-se que o cérebro é vulnerável ao estresse oxidativo, tendo em vista o elevado consumo de oxigênio, o abundante conteúdo lipídico e a relativa escassez de níveis de antioxidantes em comparação com outros órgãos³⁴; bem como, que a administração de LPS desencadeia o aumento dos marcadores de estresse oxidativo no cérebro³⁵⁻³⁷. Neste sentido, o LPS altera os mecanismos antioxidantes do cérebro e a atividade redox mitocondrial, além de induzir uma potente ativação das vias inflamatórias de sinalização em astrócitos e microglia, principalmente através do receptor Toll-like 4 (TLR4)^{38,39}, que promove a liberação de citocinas e quimiocinas, produção de ERO, perda neuronal do hipocampo, comprometimento da aprendizagem, memória e aspectos emocionais do comportamento da doença⁴⁰⁻⁴². Assim, as EROs e, consequentemente, o estresse oxidativo, podem levar a lesão neuronal. Como

consequência, a morte dos neurônios pode liberar moléculas que superativem as células gliais⁴³, podendo diminuir a função cognitiva⁴⁴.

Os achados do presente estudo indicaram que o exercício físico foi suficiente para influenciar apenas o conteúdo tiólico total no hipocampo, sendo que seus níveis estavam maiores no grupo HIIT quando comparado ao contínuo. Tendo em vista que o hipocampo foi identificado como uma área crítica para certas formas de aprendizagem e consolidação da memória⁴⁵, esse achado torna-se relevante, pois os tióis representam a maior parte do conjunto global de antioxidantes em animais sendo responsáveis pelo sequestramento de radicais livres e quelação de íons metálicos danosos⁴⁶, indicando que o HIIT pode proteger mais o hipocampo e a memória dos efeitos deletérios do LPS.

Hipotetiza-se que o HIIT apresentou melhores resultados quando comparado ao treinamento contínuo devido a sua alta intensidade, já que uma sessão intensa de exercício induz à produção exagerada de ERO o que causa um aumento no estresse oxidativo nos tecidos^{47,48}. Porém, na medida em que o exercício produz espécies reativas, as defesas antioxidantes normais do organismo são adequadas ou aumentam na mesma proporção em virtude das adaptações crônicas do treinamento^{32,49,50}.

Importante ressaltar que esse foi o primeiro estudo que pesquisou a influência de diferentes modelos exercício físico sobre parâmetros de estresse oxidativo cerebrais em animais submetidos ao LPS. Apenas três estudos com atividade física consideraram parâmetros cerebrais, sendo que Littlefield et al.⁵, concluíram que a atividade física previu a redução do número de novos neurônios em animais velhos e sedentários submetidos ao LPS. 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, os autores⁵ 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^{24,25} não relataram associação com a prática de atividade física. Eles concluíram que 24 horas após a administração de LPS houve um 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 a diferença entre os estudos é que o movimento influencie de forma direta o hipocampo, pois quando essa estrutura foi avaliada, o estudo de Littlefield et al.⁵ e nossas variáveis hipocampais obtiveram os resultados positivos descritos anteriormente. Porém, quando o córtex foi avaliado, não obteve-se associação, como descrito nos estudos de Martin et al.²⁴ e Martin et al.²⁵, bem como em nossos desfechos corticais. Em adição, recentemente, comprovou-se que a prática regular de exercício físico possui função neuroprotetora, atuando e induzindo o aumento do volume hipocampal em adultos⁵¹.

Como limitações do estudo, destaca-se que não houve medida direta do $VO_{2\max}$ ou um teste de $vVO_{2\max}$, sendo que a intensidade dos modelos de exercício foi baseada em estudos prévios⁵². Além disso, a medida do nível sanguíneo de lactato poderia fornecer uma informação de maior precisão, de modo a melhorar a interpretação do impacto da intensidade de cada modelo.

Conclui-se que seis semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intermitente de alta intensidade foram igualmente suficientes para prevenir a queda de temperatura advinda da administração de LPS em camundongos C57BL/6, significando que ambos são eficientes como forma de combater um dos sintomas mais característicos do LPS. Adicionalmente, o HIIT foi suficiente para aumentar o conteúdo tiólico total no hipocampo.

4. Metodologia

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 adultas (110 dias de idade) da espécie C57BL/6, divididas de forma aleatória entre os grupos de experimentação (10 animais por grupo). Com esse número amostral obteve-se poder estatístico (β) de 80% adotando um erro de tipo 1 (α) de 5% para os parâmetros de estresse oxidativo (pois seriam necessários 2 animais por grupo) e um β de 90% adotando um α de 1% para as citocinas inflamatórias (pois seriam necessários três animais por grupo). O cálculo de tamanho de amostra foi realizado baseado no estudo de Afzalpour et al.⁵³. 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.

4.3 Aspectos éticos

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

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).

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.

A intensidade dos exercícios dos grupos HIIT e contínuo foi baseada no estudo de Schefer e Talan⁵² 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 isogênica⁵⁴, sua compatibilidade genética é muito próxima de 100%, sendo

plausível utilizar os resultados do estudo acima⁵² para predizer a $\text{vVO}_{2\text{max}}$ 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.⁵³, em esteira própria para roedores da 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 respectivamente, e iniciaram seus treinamentos da seguinte forma: nos dias ímpares, realizaram quatro esforços de 30 segundos de duração a uma intensidade correspondente a 100% da $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (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 $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (i.e.: 22 m/min), separados por intervalos de 60 segundos. Todos os intervalos foram realizados de forma ativa a 68% da $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (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.⁵³, em esteira própria para roedores. O treinamento iniciou a uma intensidade de 80% da $\text{vVO}_{2\text{max}}$ (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.

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 anteriormente⁵⁵⁻⁵⁷.

4.5 Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a indução de LPS, através de anestesia profunda e perfusão transcardíaca, sendo coletado o sangue total (utilizado para a separação do soro e posterior análise dos parâmetros inflamatórios) e o cérebro (para análise dos parâmetros de estresse oxidativo).

A figura 5 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 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.

4.7 Medida dos parâmetros de estresse oxidativo

Após a retirada do cérebro, o córtex cerebral e o hipocampo foram separados para análise posterior. Uma parte das estruturas cerebrais foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM e 140 mM KCl pH 7,4. Centrifugou-se os homogenatos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - através do método de Okhawa et al.⁵⁸, sendo os resultados expressos em nmol de TBARS/mg de proteína); do conteúdo tiólico total (através do método de Aksenov & Markesberry⁵⁹, sendo os resultados expressos em nmol de TNB/mg de proteína); da atividade da catalase (CAT - através do método descrito por Aebi⁶⁰, sendo os resultados expressos em U/mg de proteína); da atividade da superóxido dismutase (SOD - utilizando o método descrito Oberley & Spitz⁶¹, sendo os resultados expressos em U/mg de proteína); e dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). A formação de ROS foi determinada de acordo com Ali et al.⁶², com algumas modificações. Nesse ensaio, a oxidação do diacetato de 2,7'-dclorofluoresceína (DCFH-DA) para dclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi mensurada pela detecção de ROS intracelular. A intensidade da fluorescência emitida pelo DCF foi registrada a uma excitação de 525 e 488 nm 60 minutos após a adição de DCFH-DA ao meio. Os níveis de ROS foram expressos em μ mol DCF/mg de proteína.

4.8 Determinação das citocinas inflamatórias

A quantificação das citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) no soro foi determinada por Elisa, utilizando seus kits comerciais (eBIO SCIENCE, San Diego, USA), seguindo instruções do fabricante.

4.9. 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 Bartlet 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 $p < 0,05$.

5. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

6. Referências

- 1- Wang X, Quinn PJ. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, 1st edn. Netherlands: Springer Netherlands; 2010.
- 2- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29:1303–1310.
- 3- 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.
- 4- Peppler WT, Anderson ZG, Sutton CD, Rector RS, Wright DC. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;310:R934–R942.
- 5- 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.
- 6- Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267:26–33.
- 7- Bone RC. Gram-Negative Sepsis: a Dilemma of Modern Medicine. *Clin Microb Rev.* 1993;6(1):57-68.
- 8- Rietschel ET, Kirikae T, Shcade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994;8:217-225.
- 9- Angus DC, Van Der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369:840–851.

- 10- World Health Organization. *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. Geneva: World Health Organization, 2010.
- 11- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868–874.
- 12- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135–1143.
- 13- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25:4–7.
- 14- Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Lean ME, Haffner SM. Prospective study of C-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2002;25:2016–2021.
- 15- Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001;50:2384–2389.
- 16- Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52:1799–1805.
- 17- Festa A, D'agostino Jr R, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2002;51:1131–1137.

- 18- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98:1154-1162.
- 19- Freitas MP, Stefanello FM, Gonzales NG, Häfele CA, Rombaldi AJ. Physical exercise effects on the immune system in postmenopausal women: systematic review. *Rev Bras Med Esporte*. 2016;22(5):420–425.
- 20- Chen MF, Chen HI, Jen CJ. Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(12):2173-2179.
- 21- Huey KA, Meador BM. Contribution of IL-6 to the Hsp72, Hsp25, and α -crystallin responses to inflammation and exercise training in mouse skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2008;105(6):1830–1836.
- 22- 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*. 1995;45:553-560.
- 23- Kato T, Kaneko S, Kimizuka R, Okuda K. Periodontopathic bacterial endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production was inhibited by exercise in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47(2):262-266.
- 24- Martin SA, Pence BD, Greene RM, et al. Effects of voluntary wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. *Brain Behav Immun*. 2013;29:113-123.
- 25- Martin SA, Dantzer R, Kelley KW, Woods JA. Voluntary wheel running does not affect lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in young adult and aged mice. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(1):52-63.

- 26- Peppler WT, Anderson ZG, MacRae LM, MacPherson REK, Wright DC. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. *Adipocyte*. 2017;6(1):1-11.
- 27- 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.
- 28- Rowsey PJ, Metzger BL, Carlson J, Gordon CJ. Effects of chronic exercise conditioning on thermal responses to lipopolysaccharide and turpentine abscess in female rats. *Arch Toxicol*. 2006;80(2):81-87.
- 29- Mei J, Riedel N, Grittner U, Endres M, Banneke S, Emmrich JV. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Scientific Reports*. 2018;8:3526.
- 30- Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res*. 2005;79:157–165.
- 31- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect. Disord*. 2008;111:135–144.
- 32- Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a review. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31(7):987-997.
- 33- Fenn WO. The relation between the work performed and the energy liberated in muscular contraction. *J Physiol*. 1924;58(6):373-395.

- 34- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59:1609–1623.
- 35- Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Yshii LM, et al. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na₊ KATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2015;36(5):1914–1923.
- 36- Swarnkar S, Tyagi E, Agrawal R, Singh MP, Nath C. A comparative study on oxidative stress induced by LPS and rotenone in homogenates of rat brain regions. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;27(2):219–224.
- 37- Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, Morsy SM, Omara EA, Sleem AA. Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. *J Med Food*. 2014;17(5):588–598.
- 38- Jacewicz M, Czapski GA, Katkowska I, Strosznajder RP. Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia Neuropathol*. 2009;47(4):321–328.
- 39- Noble F, Rubira E, Boulanouar M, et al. Acute systemic inflammation induces central mitochondrial damage and mnesic deficit in adult Swiss mice. *Neurosci Lett*. 2007;424(2):106–110.
- 40- Henry CJ, Huang Y, Wynne A, et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation*. 2008;5:15.
- 41- Abraham J, Johnson RW. Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. *Brain Behav Immun*. 2009;23(3):396–401.

- 42- Francois A, Terro F, Quellard N, et al. Impairment of autophagy in the central nervous system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice. *Mol Brain*. 2014;7:56.
- 43- Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2010;16(25):2766–2778.
- 44- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):46–56.
- 45- Morris, RG, Moser EI, Riedel G, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358, 773–786.
- 46- Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox system: a perspective on redox system biology. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:921–937.
- 47- Angeli A, Minetto M, Dovio A, Paccotti P. The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(6):603-612.
- 48- Ascensão A, Magalhães J, Soares J, Oliveira J, Duarte JA. Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*. 2003;22(5):651-678.
- 49- Shern-Brewer R, Santanam N, Wetzstein C, White-Welkley J, Parthasarathy S. Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(7):1181-1187.

- 50- Vincent HK, Powers SK, Demirel HA, Coombes JS, Naito H. Exercise training protects against contraction-induced lipid peroxidation in the diaphragm. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1999;79(3):268-273.
- 51- Feter N, Penny JC, Freitas MP, Rombaldi AJ. Effect of physical exercise on hippocampal volume in adults: Systematic review and meta-analysis. *Sci Sports*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2018.02.011>.
- 52- 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.
- 53- 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.
- 54- 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.
- 55- 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.
- 56- 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.
- 57- Kranjac D, Koster KM, Kahn MS, et al. Peripheral administration of D-cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure. *Behav Brain Res*. 2013;243:38-43.

- 58- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.
- 59- Aksenov MY, Markesberry WR. *Neurosci Lett*. 2001;302:141-145.
- 60- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-126.
- 61- Oberley L, Spitz D. Nitroblue tetra-zolium. in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, (ed. R.A. Greenwald) p. 217–220. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1985.
- 62- Ali SF, Lebel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992;13:637–648.

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

Semana	Dia	Contínuo	HIIT*	
		(tempo, intensidade)	(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 houve um descanso ativo à 68% $\dot{V}V\text{O}_{2\text{max}}$ com 60 s de duração.

Intensidade: percentual da $\dot{V}V\text{O}_{2\text{max}}$; Contínuo: treinamento contínuo de intensidade moderada;

HIIT: treinamento intervalado de alta intensidade; min: minutos; s: segundos.

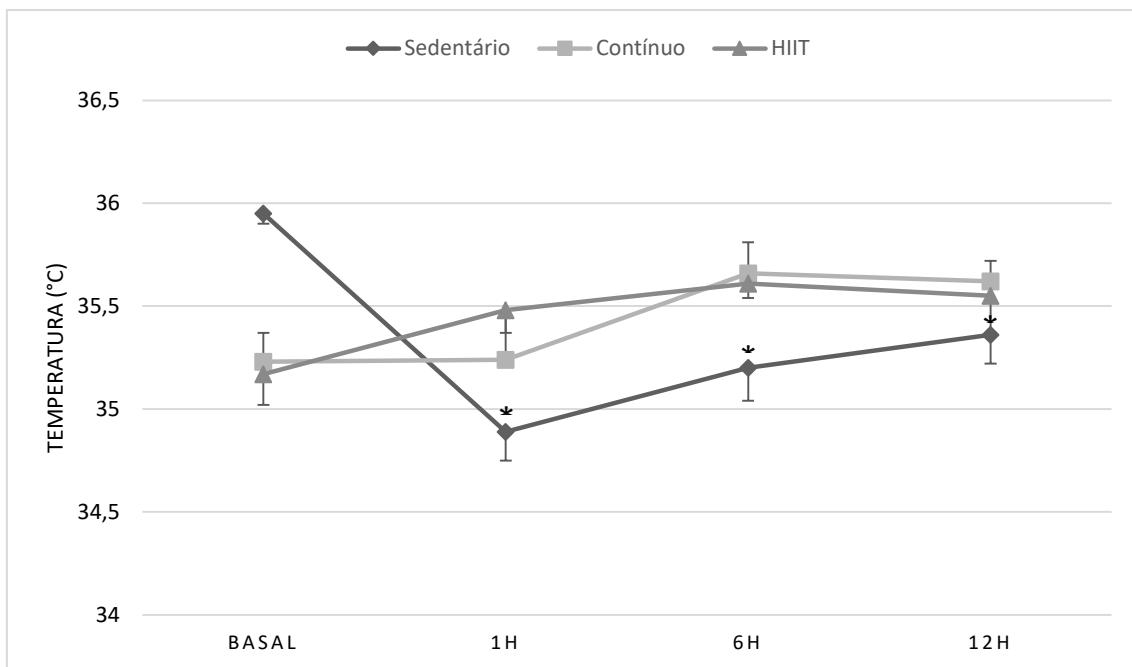


Figura 1. Temperatura corporal no momento pré-injeção de LPS (basal), uma hora (1H), seis horas (6H) e 12 horas (12H) pós-injeção de LPS. * Diferença intragrupo estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à medida basal (valor p referente à correção de Greenhouse-Geisser do modelo da ANOVA de medidas repetidas; $p < 0,001$). Valores expressos em média \pm EP ($n = 6-10$ por grupo).

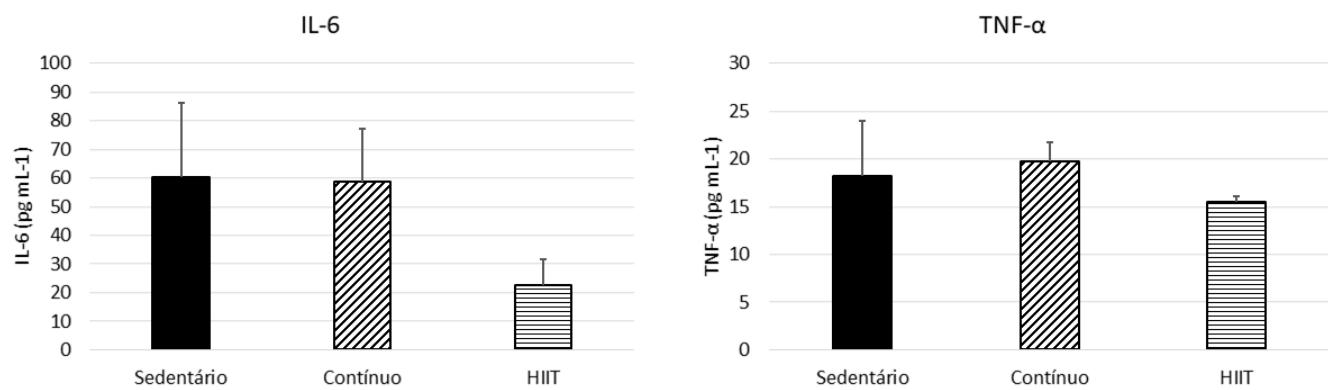


Figura 2. Níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios 12 horas após a injeção de LPS. IL-6 (interleucina-6), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Os valores de IL-6 e TNF- α foram transformados e analisados em logaritmo e elevação cúbica, respectivamente (valores não representados no gráfico). Valores expressos em média \pm EP (n = 8-10 por grupo).

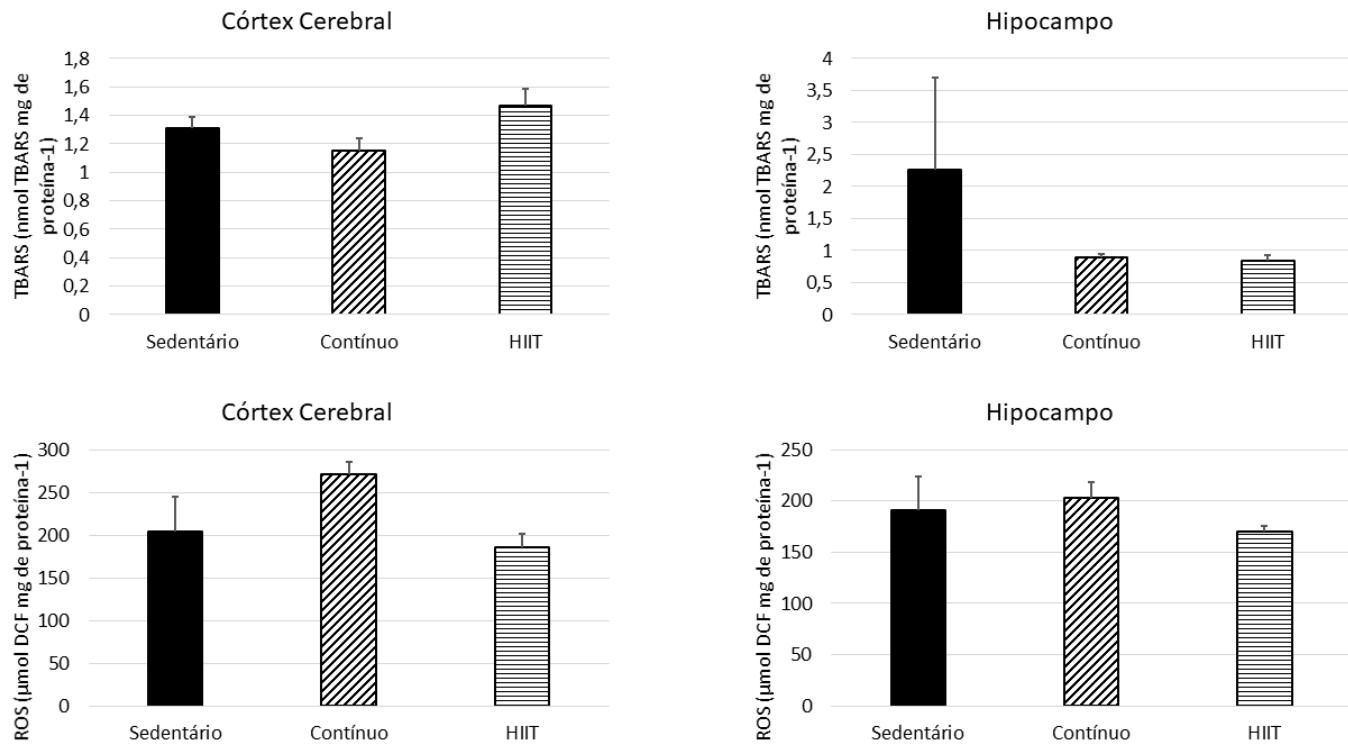


Figura 3. Níveis cerebrais (córtex e hipocampo) de marcadores de estresse oxidativo 12 horas após a injeção de LPS. TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), ROS (espécies reativas de oxigênio). A variável TBARS no hipocampo foi transformada e analisada para sua elevação cúbica (valores não representados no gráfico). Valores expressos em média \pm EP ($n = 5$ por grupo).

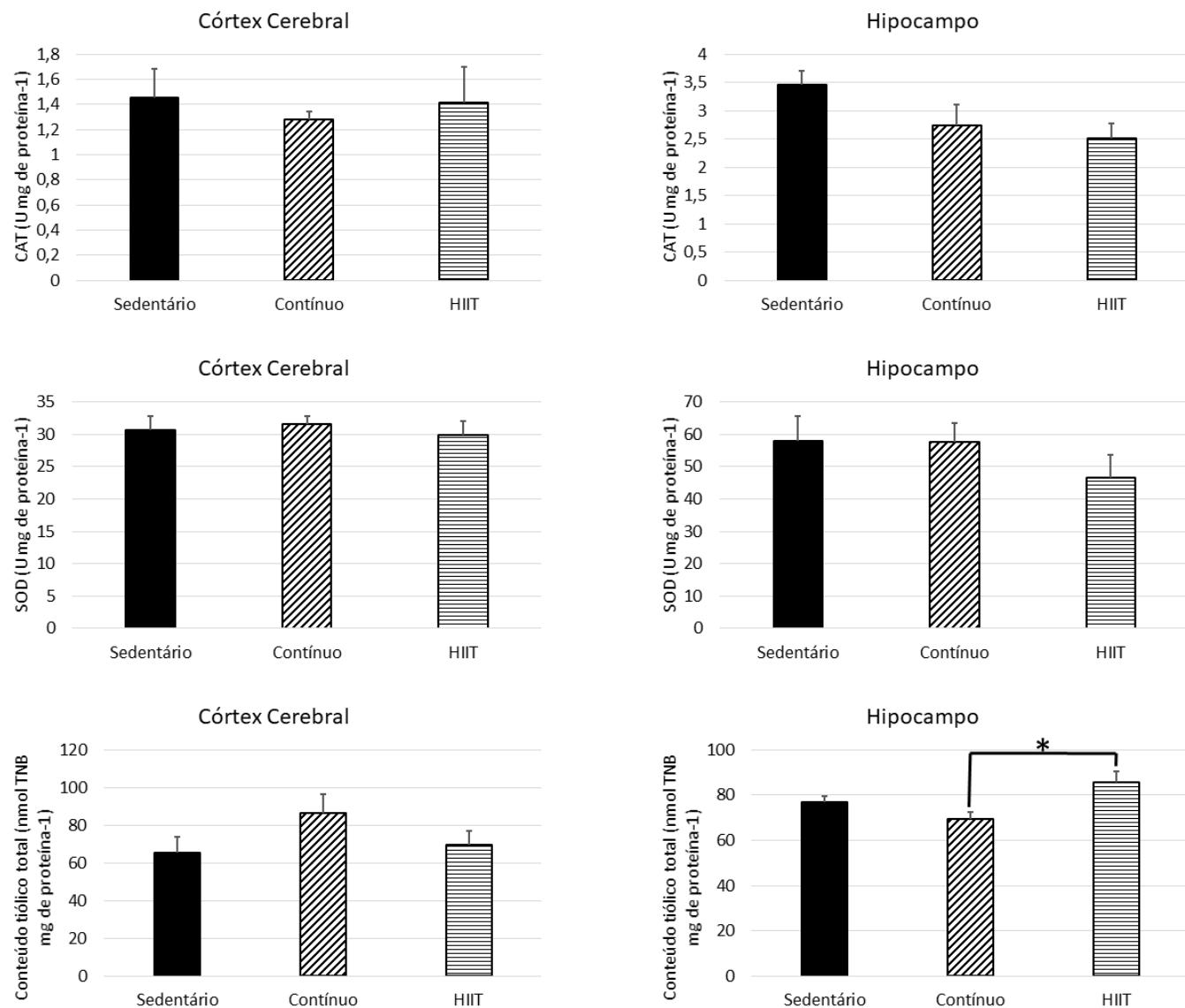


Figura 4. Níveis cerebrais (córtex e hipocampo) de enzimas e substâncias antioxidantes 12 horas após a injeção de LPS. CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase). * Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo contínuo ($p=0,03$). Valores expressos em média \pm EP ($n = 5$ por grupo).

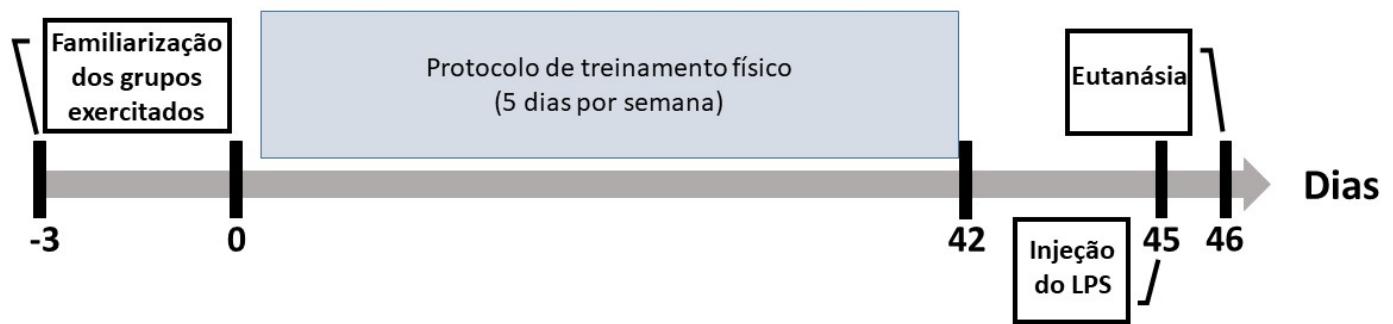


Figura 5. Design experimental.

4. Press-release

(Tese de Matheus Pintanel Silva de Freitas)

Diferentes tipos de exercício previnem sintomas de infecções bacterianas: achados iniciais

Hoje em dia, poucas pessoas desconhecem os efeitos positivos que o Exercício Físico traz para a saúde, pois já está estabelecida sua relação com a prevenção e até tratamento de várias doenças, como o infarto, pressão alta, acidente vascular cerebral, câncer, diabetes, colesterol elevado, obesidade, doenças do coração, osteoporose, doenças neurodegenerativas (como esclerose múltipla e doença de Alzheimer), enfim, todas aquelas doenças chamadas de crônico não transmissíveis. Sabe-se também que a falta de atividade física é responsável por mais mortes no mundo do que o fumo.

Porém, pesquisadores do curso de Doutorado em Educação Física da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) comprovaram que diferentes tipos de exercício físico podem prevenir os sintomas de infecções bacterianas (doenças causadas por bactérias). Antes de seguirmos, é importante que vocês saibam que as bactérias podem ser classificadas em dois tipos: bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. A maior parte das Gram-positivas não causam doenças e algumas, inclusive, são úteis. Em contrapartida, cerca de 95% de todas as bactérias Gram-negativas causam doenças, muito em função de uma substância tóxica que está presente no interior dessas bactérias, chamada de Lipopolissacarídeo, ou, apenas, LPS. O LPS causa grande parte dos sintomas das infecções por bactérias Gram-negativas e pode causar várias doenças, como a sepse, lesão pulmonar aguda, falência do fígado, doença de Alzheimer, Parkinson, entre outras.

Sabendo disso, os pesquisadores da UFPel Matheus Pintanel Freitas, Nicole Gomes Gonzales, Francieli Moro Stefanello, Rosélia Maria Spanevello e Airton José Rombaldi tinham como objetivo verificar se dois modelos de exercício físico poderiam prevenir os efeitos tóxicos do LPS, de modo a prevenir os sintomas de infecções causadas por bactérias Gram-negativas.

Os cientistas fizeram um estudo em que camundongos realizavam dois modelos de exercícios distintos. Um tipo de exercício que alguns animais

realizaram foi o treinamento contínuo de intensidade moderada, ou, como era conhecido, exercício aeróbio. Nesse exercício, o praticante fica um tempo prolongado (geralmente acima de 20 minutos) se exercitando sem parar, que pode ser uma caminhada ou uma corrida leve na esteira. Já o outro tipo de exercício testado se chama treinamento intermitente de alta intensidade (conhecido pela sigla “HIIT”), onde o praticante realiza uma sequência de exercícios em alta intensidade (como uma corrida rápida) em curtos períodos de tempo (pode ser 30 segundos) intercalados com momentos de descanso. Esses dois modelos trazem praticamente os mesmos benefícios para a saúde, porém, o exercício moderado é menos exaustivo e o HIIT dura menos tempo.

No estudo em questão, após seis semanas de exercício, os pesquisadores injetaram o LPS nos animais e verificaram como essa toxina agiria no corpo dos mesmos nas próximas 24 horas. O principal sintoma, no caso dos camundongos, é a queda na temperatura corporal. Supreendentemente, os camundongos que realizaram o exercício contínuo e os outros que realizaram o HIIT não tiveram mudanças na temperatura corporal, enquanto que o grupo de animais que não realizaram exercício tiveram uma redução significante da temperatura corporal, indicando que os dois tipos de exercício físico previnem de igual forma os sintomas do LPS.

Em adição, como essa toxina ataca o cérebro e isso pode causar prejuízos na memória, e aumentar o risco para doenças como o Alzheimer e Parkinson, os pesquisadores verificaram algumas variáveis cerebrais. Perceberam que o HIIT tem uma possibilidade maior de proteger o cérebro, pois gerou um ambiente cerebral mais protetivo do que o grupo que realizou exercício contínuo.

A conclusão do estudo indica que esses exercícios podem prevenir os sintomas de infecções bacterianas. Com a evolução das pesquisas, e futuros estudos comprovando essa relação em humanos, o exercício físico pode se tornar uma grande intervenção, não apenas para prevenir doenças crônico não transmissíveis, mas, também, doenças infecciosas.

5. Anexos

(Tese de Matheus Pintanel Silva de Freitas)

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 journal

- [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 agreement

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.

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>), Nederlands 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 of 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