



Programa de Pós-Graduação em  
**Ciências da Saúde**  
Mestrado e Doutorado - UNISUL

**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**JUDITE FILGUEIRAS RODRIGUES**

**SENSIBILIDADE À ENCEFALOPATIA ASSOCIADA À SEPSE: COMPARAÇÃO  
ENTRE ANIMAIS SEDENTÁRIOS E NÃO SEDENTÁRIOS**

**Tubarão**

**2017**

**JUDITE FILGUEIRAS RODRIGUES**

**SENSIBILIDADE À ENCEFALOPATIA ASSOCIADA À SEPSE: COMPARAÇÃO  
ENTRE ANIMAIS SEDENTÁRIOS E NÃO SEDENTÁRIOS**

**LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Fabricia Petronilho, Dra.

Tubarão  
2017



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO**

Título da Dissertação

Sensibilidade à encefalopatia associada à Sepse: comparação entre animais sedentários e não sedentários

**JUDITE FILGUEIRAS RODRIGUES**  
AUTOR

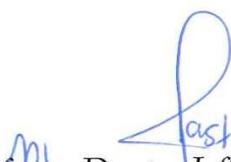
Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 28 de setembro de 2017.

Doutora Fabricia Petronilho (orientador) – neste ato representada pela Doutora Gislane

Tezza Rezin 

Doutora Leandra Celso Constantino (avaliador externo-UFSC) 

Doutora Josiane Somariva Prophiro (avaliador interno) 

  
*Professor Doutor Jefferson Traebert*

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Rodrigues, Judite Filgueiras, 1955-  
R61      Sensibilidade à encefalopatia associada à sepse : comparação  
entre animais sedentários e não sedentários / Judite Filgueiras  
Rodrigues ; -- 2017.  
87 f. il. color. ; 30 cm

Orientadora : Fabricia Petronilho.  
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa  
Catarina, Tubarão, 2017.  
Inclui bibliografias.

1. Septicemia. 2. Estresse oxidativo. 3. Exercício físico –  
Aspectos da saúde. 4. Cérebro - Doenças. I. Petronilho, Fabricia.  
II. Universidade do Sul de Santa Catarina - Mestrado em Ciências  
da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 614.577

*Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.*  
*Clarice Lispector.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus.

Aos meus amores Onofre, Letícia, Daiani, Douglas e Maurício por tudo o que respresentam na minha vida.

À minha orientadora, Fabrícia Petronilho, por ser apoio, confiança e orientação, nos momentos de insegurança trilhados neste percurso.

Na pessoa das acadêmicas pesquisadoras: Amanda, Khyany, Lucinéia e Mariana, agradeço ao Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – Neuroimet da UNISUL, e UNESC – Universidade do extremo Sul de Santa Catarina – Criciúma.

Aos companheiros Carla e Julio pelo acolhimento caloroso durante todo o percurso deste mestrado.

Aos colegas mestrandos Christine, Diego, Janaína, Jane, Joice, e Martins, pelos momentos compartilhados durante o curso.

À Silvane e Franciéli por estarem sempre presentes.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, que oportunizou condições necessárias para a conclusão deste mestrado.

Agradecer com a simplicidade de quem está aqui para aprender com responsabilidade, coragem, humildade e dedicação para adentrar em pesquisas na área da saúde.

Por fim, aos heróis desta pesquisa – os ratos Wistar.

## RESUMO

A sepse é caracterizada por anormalidades fisiológicas decorrentes de um processo infeccioso e inflamatório. Durante a sepse, o sistema nervoso central (SNC) é um dos primeiros sistemas a ser afetado, e isto se manifesta como encefalopatia associada à sepse (EAS). Estudos comprovam a relevância do exercício físico como uma intervenção para melhorar a função cognitiva e saúde do SNC, tendo em vista seus efeitos sobre a neurogênese e neuroplasticidade. Sendo assim, este trabalho objetivou comparar a sensibilidade à encefalopatia séptica sob parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em ratos sedentários e ratos submetidos ao pré-condicionamento físico aeróbio. Ratos Wistar machos adultos foram randomizados nos grupos experimentais sham+Sedentário (S) (n = 7), sham+Treinado (T) (n = 7), Ligação e Perfuração Cecal (CLP)+S (n = 10) e CLP+T (n = 10) e submetidos ao protocolo de treinamento de corrida durante 21 dias. Quarenta e oito horas após o último dia de treinamento, os animais foram submetidos ao modelo de indução de sepse por CLP. Vinte e quatro horas após, os animais sofreram morte indolor assistida por overdose de tiopental seguida por decaptação em guilhotina para a coleta do córtex pré-frontal e dosagem de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, infiltrado de neutrófilos, dano oxidativo a lipídeos e proteínas, além de enzimas antioxidantes SOD e CAT. Observou-se que a sepse aumentou os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, o infiltrado de neutrófilos, bem como o dano aos lipídeos e às proteínas carboniladas, enquanto reduziu os níveis de IL-10, a integridade de grupamentos sulfidrilas e a atividade da SOD e CAT. O condicionamento físico aeróbio preveniu o aumento de TNF- $\alpha$ , reduziu o infiltrado de neutrófilos, o dano aos lipídeos e grupamentos sulfidrilas, além de aumentar a atividade da SOD e CAT. Conclui-se que o pré-condicionamento físico aeróbio exerceu efeitos positivos sobre parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em ratos com sepse polimicrobiana.

Descritores: sepse, disfunção cerebral, estresse oxidativo, sedentarismo, exercício físico.

## ABSTRACT

Sepsis is characterized by physiological abnormalities arising from an infectious and inflammatory response. During sepsis, the central nervous system (CNS) is rapidly affected, resulting in sepsis-associated encephalopathy (SAE). Studies demonstrate the relevance of physical exercise as an intervention to improve the cognitive function and health of the CNS, in view of its effects on neurogenesis and neuroplasticity. Thus, this study aimed at comparing the sensitivity to SAE under neuroinflammatory and neurochemical parameters in sedentary rats and rats submitted to aerobic physical conditioning. Adult male Wistar rats were randomly assigned to the sham+ Sedentary (S) (n = 7), sham+ Trained (T) (n = 7), cecal ligation and perforation (CLP)+S (n = 10) and CLP+T (n = 10) and subjected to treadmill training for 21 days. Twenty-four hours after the last training session, the animals were submitted to sepsis induction by the CLP model. Forty-eight hours later the animals suffered assisted painless death by thiopental overdose followed by guillotine decapitation and the prefrontal cortex was harvested to determine the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, neutrophil infiltrate, oxidative damage to lipids and proteins and antioxidant enzymes SOD and CAT. Sepsis increased the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and neutrophil infiltrate, as well as damage to lipids and carbonylated proteins, while reduced IL-10 levels, the integrity of sulfhydryl groups and the activity of SOD and CAT. Aerobic physical conditioning prevented the increase of TNF- $\alpha$ , reduced neutrophil infiltrate and the damage to lipids and sulfhydryl groups, while increased SOD and CAT activity. In conclusion, aerobic physical conditioning exerted positive effects on neuroinflammatory and neurochemical parameters in the prefrontal cortex of rats with polymicrobial sepsis.

Keywords: sepsis, brain dysfunction, oxidative stress, sedentarism, physical exercise.

## LISTAS

Lista de abreviaturas

ACCP - Escola Americana de Medicina (*American College of Chest Physicians*)

ATP - Adenosina Trifosfato

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BHE - Barreira Hematoencefálica

BSLCR - Barreira Sangue - Líquido Cefalorraquidiano

CAT - Catalase

CS - Comportamento Sedentário

CVOs - Órgãos Circunventriculares (*Circumventricular Organs*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EAS - Encefalopatia Associada à Sepse

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GE - Gasto Energético

GDNF - Fator Neurotrófico Derivado de Células Gliais (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione Reduzida

ILAS - Instituto Latino Americano de Sepse

IL - Interleucina

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

OMS - Organização Mundial de Saúde

MET - Equivalente Metabólico de Tarefa (*Metabolic Equivalent of Task*)

NO - Óxido Nítrico (*nitric oxide*)

NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear Kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

PAMPs - Padrões Moleculares Associados à Patógenos

RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptor*)

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SCCM - Sociedade de Medicina Intensiva (*Society Critical Care Medicine*)

SOD - Superóxido Dismutase

SNC - Sistema Nervoso Central

SUS - Sistema Único de Saúde

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

Lista de quadros

Quadro 1 - Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico no consenso de 1991. .... 15

Quadro 2 - Critérios diagnósticos para sepse no consenso de 2001. .... 16

Lista de figuras

Figura 1 - Vias relacionadas à disfunção cerebral na sepse. .... 20

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	14
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	17
<b>1.2.1 Disfunção cerebral e sepse</b> .....	<b>19</b>
1.2.1.1 Barreira hematoencefálica.....	21
1.2.1. Espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e antioxidantes .....	22
1.3 TREINAMENTO E EXERCÍCIO FÍSICO .....	24
<b>1.3.1 Exercício físico sobre a neuroinflamação e o estresse oxidativo ...</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2 Exercício físico na sepse</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	29
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	29
3.3 ANIMAIS .....	29
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	30
<b>3.4.1 Protocolo de Treinamento Aeróbio</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2 Modelo de indução de sepse</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.3 Desenho Experimental</b> .....	<b>31</b>
3.5 ENSAIOS LABORATORIAIS .....	31
<b>3.5.1 Determinação de citocinas</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.2 Atividade da mieloperoxidase</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.3 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</b> <b>(TBARS)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.4 Avaliação de carbonilação protéica</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.5 Avaliação de integridade de grupamentos sulfidrila</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.6 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5.7 Quantificação de proteínas totais</b> .....	<b>34</b>
3.6 ANÁLISE DE DADOS.....	34
3.7 ASPECTOS ÉTICOS .....	34
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>

4.1 CITOCINAS .....	35
4.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE .....	37
4.3 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO .....	37
4.4 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	40
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	45
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>
ANEXO A – PARECER APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada por anormalidades fisiológicas decorrentes de um processo infeccioso, intrinsecamente relacionadas a uma conseqüente e exacerbada resposta inflamatória sistêmica capaz de ocasionar danos teciduais e manifestações clínicas<sup>1</sup>. Estima-se a ocorrência de aproximadamente 17 milhões de casos de sepse anualmente em todo o mundo, sendo a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTIs) não cardiológicas, com elevadas taxas de letalidade. Essas taxas variam, essencialmente, de acordo com as características socioeconômicas do país<sup>2</sup>.

Sua fisiopatologia envolve a ativação do sistema imunológico, com conseqüente resposta no aumento da expressão de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e espécies reativas. A progressão da resposta inflamatória pode ser associada ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e o déficit de sua degradação por enzimas antioxidantes endógenas<sup>3-5</sup>.

Durante a sepse, o sistema nervoso central (SNC) é um dos primeiros órgãos afetados, e isto se manifesta clinicamente como encefalopatia associada a sepse (EAS), sendo relacionada com o aumento da morbidade e mortalidade<sup>6,7</sup>. Sabe-se que até 70% dos pacientes sépticos podem desenvolver EAS, e esta é associada com a ocorrência de disfunção cognitiva em longo prazo<sup>8</sup>.

Atualmente, é possível prevenir o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, bem como melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos indivíduos já acometidos, por meio de ações para a prevenção dos seus principais fatores de risco<sup>9,10</sup>. Entre essas ações encontra-se a prática de exercício físico aeróbio.

A literatura demonstra que o treinamento físico pode ser um estratégia potencialmente efetiva para neutralizar a inflamação sistêmica<sup>10</sup> e melhorar a função motora e cognitiva em doenças autoimunes, como esclerose múltipla<sup>11</sup>. No que tange a proteção contra o estresse oxidativo, estudos mostram que o treinamento físico aeróbio aumenta a produção de antioxidantes enzimáticos, agindo na manutenção de um balanço redox adequado<sup>12,13,14</sup>.

Em modelo animal de sepse verificou-se que o pré-condicionamento físico aeróbio preveniu o dano oxidativo em lipídios e proteínas e melhorou a atividade antioxidante no músculo esquelético<sup>13</sup>. Entretanto, a possibilidade de que o exercício

físico moderado e regular atue como fator de proteção no SNC não foi investigada até o presente momento.

Assim, estudar os efeitos do exercício em situações fisiopatológicas pode sugerir mecanismos preventivos e elucidar como esses efeitos ocorrem em diferentes regiões do SNC. Sob essa ótica, norteou-se o estudo “Sensibilidade à encefalopatia associada à sepse: comparação entre animais sedentários e não sedentários”, para entender as diferenças entre sedentarismo e não sedentarismo sobre aspectos neuroquímicos e neuroinflamatórios relacionados a EAS, com o objetivo de minimizar os danos neuronais em ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana.

Nesse enfoque, se o pré-condicionamento físico aeróbio exerce um papel importante sobre a diminuição de mediadores inflamatórios, assim como o estresse oxidativo periférico em modelo animal de sepse, hipotetizamos que o exercício físico regular poderá minimizar os danos encefálicos em ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana grave, comparados com ratos em atitude sedentária.

## 1.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A sepse é caracterizada por anormalidades fisiológicas decorrentes de um processo infeccioso, intrinsecamente relacionadas a uma conseqüente e exacerbada resposta inflamatória sistêmica capaz de ocasionar danos teciduais e manifestações clínicas<sup>14-18</sup>.

O termo sepse origina-se do grego *sêpsis*, que significa putrefação. Citado nos poemas de Homero (700 a.C.), foi descrito por Hipócrates como perigoso, odorífero comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo<sup>19</sup>. Como manifestação de diferentes endemias e epidemias, a sepse causou profundo impacto na história da humanidade. Um dos exemplos mais ilustrativos é a epidemia da peste, que dizimou um terço da população europeia no século XIV<sup>2</sup>. Apesar de sua primeira descrição ter sido realizada no século VI, apenas em 1992 foram publicadas as primeiras definições a respeito da doença<sup>18</sup>, pelo *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine*, descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico no consenso de 1992.

<b>Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica</b>	a) temperatura central > 38,3° C ou < 36° C; b) frequência cardíaca > 90bpm; c) frequência respiratória > 20 rpm d) leucócitos totais > 12.000/mm <sup>3</sup> ou < 4.000/mm <sup>3</sup>
<b>Sepse</b>	SIRS secundária à infecção, confirmada ou suspeita
<b>Sepse grave</b>	Sepse associada à disfunção orgânica, hipotensão ou sinais de hipoperfusão. Hipoperfusão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não estão limitadas à hipotensão, hipoxemia, acidose láctica, oligúria e alteração aguda do estado mental.
<b>Choque séptico</b>	Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial em paciente séptico, a despeito de adequada reposição volêmica, com necessidade de vasopressores, na ausência de outras causas de hipotensão.

Fonte: Instituto Latino-Americano de Sepse, 2015<sup>2</sup>.

Essas definições, entretanto, foram alvo de críticas, tanto por sua excessiva sensibilidade, como pela falta de especificidade<sup>20</sup>. Numa tentativa de adequar estas definições, as mesmas sociedades reuniram-se novamente em 2001<sup>14</sup>, quando acrescentaram outros sinais e sintomas comumente encontrados em pacientes sépticos, conforme o Quadro 2.

Quadro 2 - Critérios diagnósticos para sepse no consenso de 2001.

Sepse - Infecção documentada ou suspeita de alguma das variáveis:	
Variáveis	Sinais e sintomas clínicos
Gerais	Febre ou hipotermia; Taquicardia; Taquipneia; Alteração do estado mental; Edema ou balanço hídrico positivo; Hiperglicemia.
Inflamatórias	Leucocitose ou leucopenia; Elevação de procalcitonina ou proteína C reativa.
Hemodinâmicas	Hipotensão arterial; Saturação venosa alterada; Débito cardíaco aumentado.
Disfunção orgânica	Hipoxemia; Redução do débito urinário ou elevação creatinina; Alteração da coagulação ou plaquetopenia; Alteração da função hepática.
Perfusão tecidual	Hiperlactatemia; Diminuição de enchimento capilar ou livedos.

Fonte: Instituto Latino - Americano de Sepse, 2015<sup>2</sup>.

Em 2016 foi publicado o terceiro consenso a respeito da sepse, quando a doença passou a ser definida como a disfunção de órgãos com potencial risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente à infecção<sup>21</sup>. A partir deste momento, extinguiu-se a nomenclatura sepse grave, que identificava a sepse associada à disfunção orgânica, mantendo-se apenas os termos sepse e choque séptico. Associado a isso, recomendou-se diagnosticar a disfunção orgânica por meio do escore quick-SOFA, que é a medida sequencial rápida de falências orgânicas e analisa frequência respiratória, pressão sanguínea sistólica e alterações do estado mental.

Em relação à epidemiologia da doença, a sepse é a causa mais comum de mortalidade em UTIs não coronárias, com taxas de 50-60%<sup>22</sup>. A análise de ocorrência de sepse em uma amostra representativa de todos os hospitais não-federais norte-americanos, entre os anos de 1979 e 2000, elencou a ocorrência de 660.000 casos de sepse no ano de 2000, sendo que a sepse grave foi diagnosticada em 256.000 destes casos. Verificou-se que indivíduos homens e de etnias não brancas

apresentaram maior incidência da doença e que 17,9% dos casos morreram em decorrência da sepse<sup>23</sup>.

Um estudo multicêntrico internacional apontou para diferença importante de letalidade entre o Brasil (67,4%) e outros países do mundo (49,6%). O banco de dados do Instituto Latino-Americano de Sepse - ILAS, com mais de 22 mil pacientes, mostrou uma letalidade de 46%, com diferença significativa de letalidade entre instituições ligadas ao Sistema Único de Saúde - SUS (58,5%) e aquelas ligadas à saúde suplementar (34,5%)<sup>3</sup>. Dados nacionais ainda mostram que os gastos com pacientes em UTIs representam aproximadamente 30 a 35% dos gastos gerais com a área da saúde<sup>17</sup>.

A disfunção orgânica é característica acentuada da sepse; quanto maior o número de órgãos em falência, pior o prognóstico do paciente, onde cada órgão em disfunção representa um acréscimo de 15-20% na mortalidade<sup>25</sup>. Classicamente, pesquisadores focam a atenção na disfunção de múltiplos órgãos periféricos, ficando a disfunção cerebral em segundo plano<sup>26</sup>. No entanto, a disfunção neurológica pode levar à elevação da mortalidade em curto e longo prazo<sup>27</sup>. Por isso, tem se dado atenção à disfunção cerebral na sepse, tanto em sua fase precoce (encefalopatia) com presença de delirium, quanto em sua fase tardia (sequelas cognitivas) e sua contribuição para o aumento de mortalidade, permanência na UTI com maiores gastos e perda da capacidade produtiva<sup>28</sup>.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A fisiopatologia da sepse envolve a interação entre o microrganismo infectante e o hospedeiro. Frente a um microrganismo, as células integrantes do sistema imune (por exemplo, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) iniciarão a resposta imune ao reconhecer, por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptor*), estruturas constitutivas da parede celular deste microrganismo, como ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou lipopolissacarídeos (LPS), de bactérias Gram-negativas (endotoxinas)<sup>29,30</sup>.

Estas estruturas constitutivas são denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e podem ser liberadas durante a replicação do microrganismo e/ou em virtude de sua

morte. Ademais, os receptores PRRs também podem reconhecer outros ligantes derivados de tecidos inflamados, que são proteínas intracelulares ou mediadores liberados por células entrando em apoptose. Estes ligantes são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern molecules*)<sup>31,32</sup>.

Os receptores PRRs mais conhecidos são os *Toll-like* (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*). Estes receptores localizam-se em região transmembrana e possuem domínios extracelulares e citoplasmáticos<sup>33</sup>. Até o momento, a literatura aponta o direto envolvimento de dois receptores TLR com o desenvolvimento da sepse: o TLR-2 e o TLR-4<sup>34</sup>.

Através da ativação dos receptores TLR-4 ou TLR-2 é desencadeada a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias através da ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Inicialmente é liberado o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e após IL-6, os quais favorecem uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos, para finalmente serem liberados os mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 na resolução da inflamação. Os mediadores com perfil pro-inflamatório, por sua vez, são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, gerando assim um ciclo vicioso inflamatório<sup>35</sup>. A liberação exacerbada de mediadores inflamatórios associada ao dano celular causado pela ação espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos ativados podem causar alterações hemodinâmicas, como extravasamento capilar, vasodilatação e redução do tônus do miocárdio, além de alterações na coagulação sanguínea<sup>36,37</sup>.

Durante a sepse ocorre um aumento expressivo de PAMPs e DAMPs circulantes; assim, há elevada interação entre estes padrões e os receptores PRRs. A interação promove a superestimulação do sistema imunológico e, conseqüentemente, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, ou SIRS<sup>31</sup>. A SIRS é caracterizada pela massiva produção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e espécies reativas<sup>38-40</sup>.

Segundo Vincent e Korkut<sup>41</sup>, na sepse ocorre ainda um desequilíbrio entre o consumo e a disponibilidade de oxigênio, podendo levar ao quadro de hipóxia tecidual. Com a finalidade de priorizar a utilização do oxigênio para as áreas mais importantes, como miocárdio e cérebro, ocorrem alterações na microcirculação e o fluxo sanguíneo podendo ser insuficiente em outros tecidos. Ademais, podem ocorrer alterações na

circulação sistêmica, causando vasodilatação e hipotensão, alterações na microcirculação e distúrbios na cascata da coagulação<sup>42,43</sup>. O tempo de duração dessa situação pode levar a importantes alterações celulares e teciduais, desenvolvendo-se a síndrome de disfunção múltipla de órgãos, dentre os órgãos mais afetados estão o fígado, pulmão, rins, coração e o cérebro<sup>44</sup>.

### 1.2.1 Disfunção cerebral e sepse

Durante a sepse, o SNC é um dos primeiros sistemas a ser afetado, e isto se manifesta como EAS ou *delirium* associado a sepse (DAS)<sup>6</sup>. A EAS é uma desordem neurológica aguda, difusa e reversível, quando não há falência de órgãos, hipóxia ou outra causa identificável<sup>45,46</sup>. A prevalência da EAS apresenta ampla variação em virtude da metodologia de detecção empregada, mas estima-se que entre 8% e 70% dos indivíduos internados com sepse em UTIs apresentem esta encefalopatia, inclusive nas fases iniciais da síndrome séptica<sup>5,45</sup>.

A EAS manifesta-se como uma lentificação no processamento cognitivo, *delirium* ou coma<sup>47</sup>. Apesar destes sintomas serem transitórios, evidências indicam a ocorrência de danos cognitivos persistentes em longo prazo, ou seja, as complicações neurológicas decorrentes da sepse podem acarretar em prejuízos funcionais, redução na qualidade de vida e elevada mortalidade<sup>48</sup>.

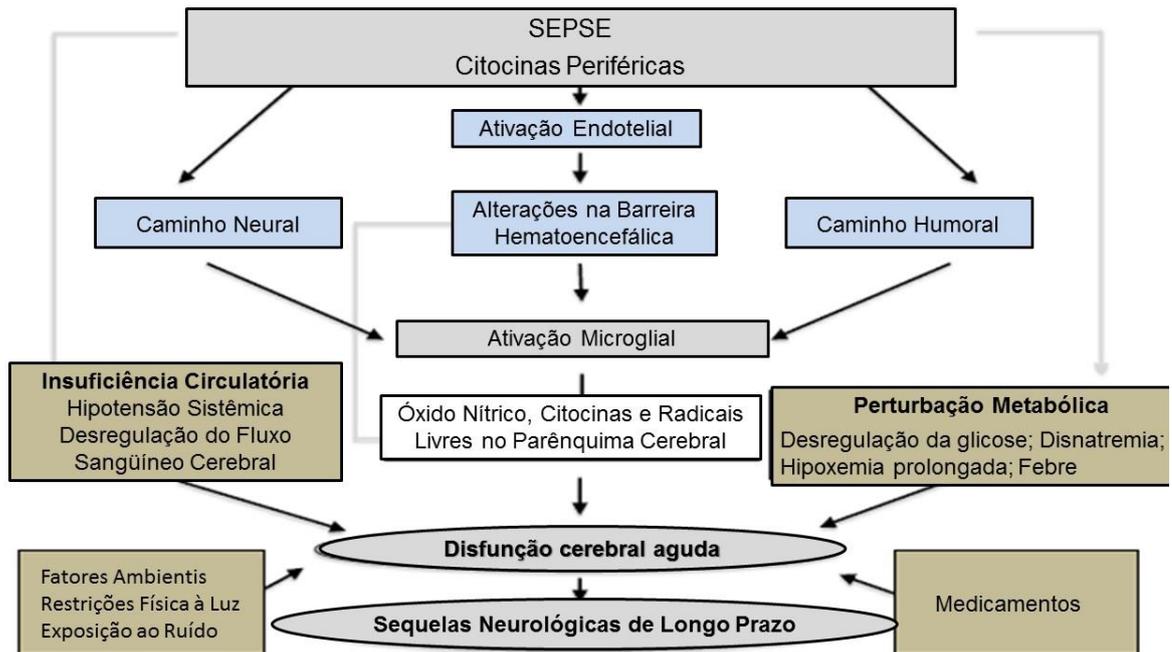
Os mediadores inflamatórios gerados já nas primeiras horas após a infecção na sepse podem prejudicar o funcionamento do SNC por meio de três vias, conforme explicitado na Figura 1:

1) os sinalizadores inflamatórios gerados em nível periférico são reconhecidos por receptores no nervo vago e ativam sinais aferentes, que são retransmitidos ao núcleo do trato solitário no tronco cerebral;

2) estes sinalizadores inflamatórios podem infiltrar-se no encéfalo através do plexo coroide e dos órgãos circumventriculares, que são regiões encefálicas privadas de BHE, reguladoras do sistema nervoso autônomo e neuroendócrino e que expressam componentes do sistema imune;

3) a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias na fase inicial da sepse ativa as células endoteliais periféricas e cerebrais e estimula a liberação de mediadores inflamatórios no SNC, que influenciará a permeabilidade da BHE<sup>7,46</sup>.

Figura 1 - Vias relacionadas à disfunção cerebral na sepse.



Fonte: Adaptado de Sonnevile et al., 2013<sup>7</sup>.

Esses percursos instigam a ocorrência de resposta inflamatória local, que envolverá a ativação de células microgliais, que são células imunes residentes do SNC e, normalmente, permanecem em um estado de vigilância imune. Entretanto, em situações de lesão cerebral ou estímulo imunológico, estas células mudam para o estado ativado<sup>49-51</sup>.

Assim como ocorre periféricamente, ligantes como PAMPs e DAMPs conectam-se aos receptores nas micróglia e há a geração de resposta inflamatória<sup>52,53</sup>. Desta maneira, as micróglia são capazes de sintetizar diversos compostos pró-inflamatórios e potencialmente neurotóxicos, como NO, espécies reativas como superóxido, citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e eicosanoides<sup>52,54-56</sup>. Esta resposta inflamatória é fundamental para a recuperação do SNC; todavia, adquire um caráter nocivo ao prolongar-se, pois gerará danos secundários aos neurônios e exacerbará a ocorrência de lesões estruturais, morte celular e disfunção neurológica<sup>52,57</sup>. Esta produção é, por si só, responsável por retroalimentar as lesões na BHE, causando assim um círculo vicioso de aumento da disfunção cerebral e lesão<sup>7</sup>.

### 1.2.1.1 Barreira hematoencefálica

A BHE consiste em uma complexa estrutura que circunda os microvasos cerebrais e protege o SNC contra a exposição a compostos potencialmente tóxicos<sup>58</sup>. Esta barreira reveste o encéfalo e a medula espinal de mamíferos e pode ser encontrada em praticamente todas as regiões do encéfalo, exceto em locais que regulam o sistema nervoso autônomo e glândulas endócrinas, já que nestas estruturas a difusão de moléculas do sangue por meio da parede do vaso é imprescindível<sup>59</sup>. Estas estruturas com ausência de BHE localizam-se no meio do sistema ventricular, por isso recebem o nome de órgãos circumventriculares (CVOs, do inglês *circumventricular organs*)<sup>60,61</sup>.

A disfunção da BHE é considerada o evento inicial na patogênese de diversas doenças do SNC<sup>62</sup>. Na sepse, este processo pode surgir em decorrência do estímulo em uma das três vias descritas anteriormente e dos produtos inflamatórios gerados. Assim, o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica são dois importantes mediadores na redução da integridade na BHE em indivíduos com sepse<sup>63,64</sup>.

O estresse oxidativo favorece o estado pró-inflamatório devido à capacidade de causar lesão endotelial, estimular a liberação de citocinas e fatores quimiotáticos para atração de neutrófilos, além de prejudicar a função mitocondrial<sup>65</sup> e ocasionar dano oxidativo a moléculas celulares, como lipídeos, proteínas e DNA<sup>66</sup>.

A produção de mediadores inflamatórios – em decorrência da elevação na concentração de espécies reativas, ou em virtude do processo inflamatório – atrai células do sistema imune, como neutrófilos, para o encéfalo após o início da lesão à BHE<sup>67</sup>. Ou seja, durante a evolução do quadro séptico, os neutrófilos podem ser ativados, aderirem-se ao endotélio vascular e migrar para o SNC. Estas células são cruciais para a resposta imune inata, devido à elevada eficiência em degradar bactérias por meio de proteases e espécies reativas<sup>68</sup>.

No entanto, evidências demonstram alterações nas funções dos neutrófilos durante a sepse, implicando em redução no processo de migração destas células ao foco infeccioso e insuficiente resposta antimicrobiana. Também são visualizados acúmulos de neutrófilos em órgãos vitais, envolvidos em dano tecidual e falência de múltiplos órgãos<sup>69,70</sup>. Sabe-se que o NO – e as enzimas que o sintetizam, assim como as espécies reativas formadas a partir dele – influenciam a migração e adesão dos

neutrófilos no endotélio, já que diminuem a expressão de moléculas de adesão necessárias para este processo<sup>71,72</sup>.

A sepse pode causar diversos efeitos deletérios ao córtex pré-frontal, bem como a outras estruturas do SNC que interagem com esta região<sup>73</sup>. O córtex pré-frontal é fundamental para a realização de funções cognitivas e executivas de primeira ordem, as quais envolvem memória de trabalho, comportamento condicionado ao medo, tomada de decisões e atenção<sup>74,75</sup>. Apesar de estar envolvido pela BHE, esta estrutura está em constante comunicação com outras regiões encefálicas, além de ser amplamente requisitada para funções básicas em virtude do grande número de receptores para corticosteroides em suas células<sup>76</sup>, tornando-se susceptível a efeitos deletérios promovidos por processos inflamatórios, de estresse oxidativo e infecciosos<sup>77,78</sup>.

#### 1.2.1.2 Espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e antioxidantes

O termo radical livre é usado para designar qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados<sup>79-82</sup>. Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente, caso cada um dos átomos envolvidos fiquem com um elétron<sup>83</sup>.

Em condições aeróbicas, mais de 90% do oxigênio é convertido em água pela enzima citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons, por meio de um mecanismo de quatro elétrons, sem que haja liberação de espécies reativas. O produto final desta reação é a geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Já o oxigênio restante, menos que 10%, é reduzido por meio de vias sucessivas de um elétron ao radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), seguido por nova redução e recebimento de dois prótons para formar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  não é um radical livre, mas é mais ativo quimicamente que o  $O_2^{\cdot-}$  e possui elevada facilidade para difusão através das membranas celulares, por isso é considerado uma ERO. Na sequência de reações, o  $H_2O_2$  recebe outro elétron e pode torna-se o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) e o ânion hidroxil ( $OH^-$ ). Por fim, o radical hidroxila reage com mais um elétron e próton para formar uma molécula de água<sup>84</sup>.

Além das EROs, existem também aquelas originadas a partir da oxidação do nitrogênio, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre as quais cita-se o NO,

ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ânion nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), cátion nitrônio ( $\text{NO}_2^+$ ) e trióxido dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )<sup>85,86</sup>.

O NO é gerado após a conversão de L-arginina a L-citrulina sob a ação das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Em determinadas circunstâncias, a ativação da enzima NOS induzível (iNOS) nos macrófagos, neutrófilos ativados e astrócitos, por exemplo, estimula a produção constante de NO em quantidades micromolares, o que leva ao dano tecidual<sup>86</sup>.

Em virtude da elevada capacidade de difusão entre tecidos por meio de eritrócitos, o NO pode ser rapidamente removido ao reagir com a hemoglobina e converter-se a nitrato. No entanto, quando o ânion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e o NO são sintetizados em locais muito próximos, ocorrerá a combinação espontânea de ambos para formar  $\text{ONOO}^-$ , sem a dependência enzimática, já que nenhuma enzima consegue catalisar reações em tal velocidade<sup>87</sup>.

A produção contínua de espécies reativas durante os processos metabólicos é contrabalanceada por mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos<sup>88</sup>. Uma ampla definição de antioxidante seria qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz<sup>89</sup>.

As enzimas de defesa antioxidante operam como um sistema coordenado, balanceado, e atuam juntamente com outros antioxidantes ditos não-enzimáticos a fim de proteger o organismo contra a injúria celular causada pelas ERNs e EROs. Este complexo de sistema antioxidante enzimático é constituído pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx)<sup>90</sup>.

O estresse oxidativo, desta maneira, ocorre quando existe um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo. A membrana celular é um dos componentes mais atingidos pelas EROs/ERNs e possui elevada susceptibilidade à peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando na morte celular<sup>91</sup>. Além disso, as proteínas celulares também sofrem reações oxidativas, que levam a alterações nas suas estruturas e funções<sup>92</sup>. Por fim, o dano pode propagar-se até o núcleo celular, danificando o DNA e dificultando os mecanismos de reparação<sup>82,93,94</sup>.

De uma forma geral, todas as células podem sofrer dano oxidativo, porém o cérebro é particularmente suscetível, pois utiliza altas taxas de oxigênio, suas defesas antioxidantes são modestas e as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos polinsaturados, o que predispõe ao dano cerebral<sup>95</sup>.

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na sepse, possuindo relação com a disfunção ao SNC<sup>13</sup>. Estudos em modelos animais mostram que, além de uma produção aumentada de espécies reativas, há também uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes<sup>96,15,97</sup>.

No que se refere especificamente à atividade física, evidências mostram os benefícios ao metabolismo oxidativo em áreas cerebrais de roedores submetidos a exercício de intensidade leve a moderado.

### 1.3 TREINAMENTO E EXERCÍCIO FÍSICO

O termo internacional “Treinamento Físico”, significa o uso propositado e sistemático de exercícios físicos para desenvolver e melhorar as capacidades físicas – definidas como qualidades físicas motoras passíveis de treinamento – e o nível de desempenho de atividades específicas previamente determinadas<sup>98</sup>. Atividade física é qualquer movimento corporal produzido pela musculatura que resulte num gasto de energia acima do nível de repouso. Já o exercício físico é uma forma de atividade física planejada, repetitiva, com orientação profissional, que visa a desenvolver a resistência física e as habilidades motoras, buscando o condicionamento físico<sup>99</sup>.

Durante um treinamento, o corpo ajusta seu funcionamento cardiovascular e respiratório de modo a atender adequadamente às maiores demandas dos músculos ativos. Ocorre também um aumento no volume sanguíneo cerebral, melhora a memória e redução do risco de comprometimento cognitivo<sup>100,101</sup>. Assim, quando executado de forma regular e moderada, o treinamento físico é associado a melhora na resposta imune<sup>102</sup>, na função dos sistemas cardiorrespiratório e vascular, no funcionamento do metabolismo e, se realizado em intensidades e durações variadas, pode melhorar a cognição<sup>103</sup>.

A realização de um programa de treinamento envolvendo exercícios de leve e moderada intensidade regulam a expressão e os níveis de neurotrofinas em diferentes áreas do cérebro de roedores, como o córtex pré-frontal. Também foi

demonstrado que o exercício pode estimular a neurogênese nessas áreas, assim, melhorar a memória espacial e aprendizagem<sup>104,105</sup>.

Estudos em animais comprovam a relevância do exercício físico como uma intervenção comportamental para melhorar a função cognitiva e saúde do SNC, tendo em vista seus efeitos multidimensionais sobre a função cerebral, incluindo neurogênese e neuroplasticidade<sup>104,106,107</sup>.

### **1.3.1 Exercício físico sobre a neuroinflamação e o estresse oxidativo**

O exercício físico aeróbio de intensidade leve a moderada desencadeia respostas regulatórias que retardam, no mínimo parcialmente, o declínio da atividade mitocondrial cerebral e a ocorrência do estresse oxidativo ao prevenir a diminuição das atividades enzimáticas<sup>11,108,109</sup>. Exerce também efeitos protetores no sistema dopaminérgico, elevando a atividade neuronal por meio da regulação de fatores neurotróficos, aumento da neurogênese e diferenciação celular e retardo da morte celular<sup>110</sup>. Desta maneira, o exercício físico aeróbio de intensidade leve a moderada pode ser considerado uma estratégia neuroprotetora.

Quando praticados em intensidades extenuantes, os exercícios podem aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL- 1 $\beta$ , IL-6 e IL-8)<sup>110</sup>. Entretanto, os efeitos positivos do exercício de intensidade leve a moderada têm sido relacionados ao aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias e redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias<sup>111</sup>. Isto parece acontecer devido à capacidade do exercício físico moderado em modular a expressão de receptores tipo *toll-like* (TLRs) em monócitos, tendo em vista que a ativação destes receptores está relacionada a cascatas de sinalização inflamatória<sup>112</sup>.

Em modelo animal de doença neurodegenerativa, observou-se que a realização de exercício leve a moderado durante três semanas normalizou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  cerebral dos animais, o que preveniu a ocorrência de dano cognitivo<sup>113</sup>. Tais respostas podem refletir na redução da ativação microglial, como verificado em estudos que avaliam patologias de cunho neuroinflamatório, como doença de Parkinson, Alzheimer e isquemia cerebral<sup>10</sup>. Desta forma, consecutivos episódios de exercício podem atuar de forma imunoregulatória e reduzir a neuroinflamação<sup>114</sup>.

Além da modulação do perfil inflamatório, os efeitos do exercício podem estar diretamente associados à regulação na síntese do NO e, assim, exercer relação com a diminuição da produção de espécies reativas<sup>115</sup>. Em relação ao SNC, o exercício físico pode aumentar a atividade do sistema antioxidante local e, por conseguinte, regular o dano oxidativo, porém de maneira dependente ao tipo de exercício utilizado<sup>95,116</sup>. Nesse contexto, conforme a frequência, duração e intensidade, o exercício tanto pode aumentar a produção de espécies reativas e levar a danos oxidativos, como também, em intensidades leves e moderadas, melhorar a capacidade de defesa antioxidante do SNC<sup>115</sup>.

Portanto, o exercício físico realizado com intensidade e volume adequado, associado com suficiente tempo de recuperação, promove adaptações em diversos sistemas fisiológicos e está associado com a prevenção de doenças crônicas e alterações neurológicas<sup>117</sup>. No entanto, os efeitos do exercício físico realizados previamente à ocorrência da sepse são pouco elucidados na literatura.

### **1.3.2 Exercício físico na sepse**

A realização de treinamento físico em camundongos, anteriormente à indução de sepse por CLP, promoveu aumento na sobrevivência, protegeu o funcionamento pulmonar e evitou a apoptose celular em diversos órgãos periféricos, em virtude de sua ação moduladora na síntese de citocinas pró- e anti-inflamatórias<sup>118</sup>. Em relação aos efeitos na musculatura esquelética, foi observado que ratos *Wistar* pré-condicionados com exercícios aeróbios e posteriormente submetidos à sepse por CLP apresentaram melhora nos parâmetros de estresse oxidativo e atrofia muscular, sendo estes achados atribuídos à capacidade do exercício físico em estimular os mecanismos endógenos de defesa antioxidante e favorecer um equilíbrio redox<sup>13</sup>. Outros estudos também demonstram a atuação positiva do exercício físico como um fator protetor na redução dos danos periféricos decorrentes da sepse<sup>119,120</sup>.

Os efeitos do exercício físico sobre o SNC em modelos animais de sepse, no entanto, são pouco estudados, tendo em vista que a avaliação do impacto desta doença na gênese da disfunção cerebral também é recente. Atualmente, as informações disponíveis na literatura apontam que o exercício físico promove benefícios e previne a ocorrência de danos cognitivos, conforme descrito nos tópicos

anteriores, mas isto é visualizado em modelos de diferentes doenças que afetam o encéfalo.

Sendo assim, torna-se relevante e justificável a realização desta pesquisa considerando a importância da prática do exercício físico como uma ferramenta para modular a resposta inflamatória e o equilíbrio do sistema imune e redox, que adquire uma consequente função neuromoduladora, bem como a escassez de estudos a respeito de sua aplicabilidade na prevenção de danos ao SNC após a sepse.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a sensibilidade à encefalopatia séptica sob parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em ratos sedentários e ratos submetidos ao pré-condicionamento físico aeróbio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o nível de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana;
- Avaliar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o nível de infiltrado de neutrófilos no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana;
- Avaliar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o dano oxidativo em lipídios no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana;
- Avaliar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o dano oxidativo em proteínas carboniladas e integridade de grupamentos sulfidrilas no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana;
- Avaliar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o nível das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo tem caráter experimental em modelo animal.

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados para as análises bioquímicas foram: ácido tiobarbitúrico, dinitrofenilhidrazina, epinefrina, catalase, hidroperoxido de tert-butila, albumina bovina, tetrametilbenzidina, 1,1,3,3, tetrametoxipropano, brometo de hexadeciltrimetilamonio (Sigma, St. Louis, MO), ácido tricloroacético, ácido fosfórico, peróxido de hidrogênio, glicina, EDTA, (Labsynth, São Paulo, Brazil). Os kits para dosagem de citocinas foram da marca R&D Systems, Inc. Em relação aos equipamentos, as análises de estresse oxidativo foram realizadas em espectrofotômetro Biospectro SP-220 (Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos - UNISUL) enquanto que as determinações de citocinas foram realizadas em leitora de microplacas Spectramax M3 – Molecular Devices (Laboratório de Neurociências – UNESC).

#### 3.3 ANIMAIS

Foram avaliados um total de 34 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* (60 dias, 220-310 g). Os animais foram provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados no mesmo biotério, em caixas de polipropileno de dimensões adequadas, com maravalha, em ambiente climatizado (22 °C±2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas controlado por *timer*, recebendo água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

### 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

#### 3.4.1 Protocolo de Treinamento Aeróbio

O protocolo de treinamento aeróbio ocorreu conforme segue: Todos os animais foram ambientados em uma esteira ergométrica, com nove canais (10m. min<sup>-1</sup>, sem inclinação, 10min. dia<sup>-1</sup>) durante uma semana, com o objetivo de reduzir o estresse no ambiente novo. Os ratos não receberam nenhum estímulo para correr. Após este período, os animais treinados que tiveram uma boa resposta durante a adaptação do treinamento, foram selecionados a um programa de treinamento de corrida com nível constante de intensidade (13 m min<sup>-1</sup>, sem inclinação) durante 5 dias por semana por um período total de 21 dias. Cada treinamento teve duração de 50 min. Os animais que não treinaram foram apenas expostos à esteira nas mesmas condições de treinamento, porém sem a prática do exercício<sup>109</sup>.

#### 3.4.2 Modelo de indução de sepse

Quarenta e oito horas após o fim do protocolo de treinamento aeróbio, foi induzida a sepse intra-abdominal, usando a técnica de Ligação e Perfuração Cecal (CLP). Brevemente, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, perfurado com uma agulha número 14 e gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Como controle foram utilizados animais submetidos a laparotomia, sem ligação ou perfuração cecal, denominados sham. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos foram observados por 12 horas. Todos os animais receberam solução salina (50 ml/kg) via subcutânea (s.c.) imediatamente após o procedimento. Nos tempos 0 e 12 horas após a cirurgia todos os animais receberam antibioticoterapia com ceftriaxona (30 mg/Kg, s.c) e analgesia com dipirona sódica (80 mg/Kg, s.c.) para controle da dor pós operatória<sup>121</sup>. Para minimizar a variabilidade entre os diferentes experimentos, o procedimento CLP foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador.

### 3.4.3 Desenho Experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: sham sedentário (sham+S), sham treinado (sham+T), CLP sedentário (CLP+S) e CLP treinado (CLP+T). Para a realização de análises neuroquímicas, foram inseridos nos grupos experimentais sete animais em cada grupo sham e 10 animais em cada grupo CLP, totalizando 34 animais.

Vinte e quatro horas após a cirurgia os animais sofreram morte indolor assistida por overdose de tiopental (0,5 g/Kg) seguida por decaptação em guilhotina. O cortex pré-frontal foi cuidadosamente dissecado, armazenado em tubos do tipo Eppendorf e mantido sob refrigeração em freezer -80°C até posterior análise. O tempo de 24 horas foi escolhido pois observa-se neste período a alteração na permeabilidade da BHE e ocorrência de dano no córtex pré-frontal após sepse por CLP<sup>122</sup>.

## 3.5 ENSAIOS LABORATORIAIS

### 3.5.1 Determinação de citocinas

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram determinadas pelo ensaio adsorvente ligado a enzima (ELISA) utilizando *kit duo set* (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS contendo triton 0,1% e inibidor de protease (50 mM - Roche AG, Basileia, Suíça) e, em seguida, centrifugadas (13000 rpm a 4 °C durante 20 min). O sobrenadante foi recolhido e realizada a quantificação de proteína pelo *kit* de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, EUA). O ensaio de ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a leitura foi realizada em 450 nm na leitora de microplacas (SPECTRAMAX, Molecular Devices, USA). Os valores foram apresentados em pg/mg proteína.

### 3.5.2 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) é um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. Nesse sentido, a amostra foi homogeneizada (50 mg/ml) em 0.5%

de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugada. A suspensão foi sonicada e alíquota do sobrenadante misturada com solução de 1.6 mM TMB e 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650 nm a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg proteína<sup>123</sup>.

### **3.5.3 Avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Como índice dos efeitos do estresse oxidativo sobre os lipídeos, foi utilizada a formação de TBARS durante uma reação ácida de aquecimento. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em seguida, aquecidas em banho de água fervente a 100 °C durante 30 minutos. TBARS foram determinadas pela absorbância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA)/mg de proteína<sup>124</sup>.

### **3.5.4 Avaliação de carbonilação protéica**

O efeito do estresse oxidativo em proteínas foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina, e a absorbância foi aferida em 370 nm. Os resultados foram expressos em concentração de proteínas carboniladas/mg de proteína<sup>125</sup>.

### **3.5.5 Avaliação de integridade de grupamentos sulfidrilas**

A quantidade de grupamentos tióis totais foi determinada utilizando o 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (2-nitrobenzóico) (DTNB)<sup>126</sup>. Resumidamente, 30 mL de uma amostra foi misturada com 1 ml de PBS / 1 mM EDTA (pH, 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 30 mL de 10 mM de solução DTNB em PBS. As amostras de controle, que não incluem DTNB ou proteína, foram avaliadas simultaneamente. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância de 412 nm, foi mensurada e quantidades de TNB formado (equivalente à quantidade de grupos SH formado) foi

determinado. Os resultados foram expressos como níveis de proteínas sulfidríla por miligrama de proteína.

### **3.5.6 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes**

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão glicina [pH 10,2, contendo 0,75 g de ácido aminoacético (glicina) em 200 mL de água purificada] e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 10 µL de catalase 0,0024g/mL (0,0018 g de catalase em 720 µL de água purificada) com 970 µL de tampão glicina a 32 °C. Após, foi adicionada a quantidade de 17 µL de adrenalina 60 mM (0,006 g de adrenalina em 300 µL de água purificada e 3 µL de HCl). A leitura do reagente branco foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo foi repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houve a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10 µL de catalase 0,0024g/mL, 3 a 7 µL de amostra e 970 µL de tampão glicina a 32 °C. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480 nm. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD/mg de proteína<sup>127</sup>.

A atividade enzimática da catalase foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão catalase [PBS+NaCl (pH 7,0), contendo 8,0086 g de NaCl (136,9 mM), 0,1496 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1 mM) e 0,0383 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,27 mM)] e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão catalase e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com 1 mL de tampão catalase contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mL de tampão catalase e 400 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protegido da luz). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de quartzo, a 240 nm. Foram realizadas mensurações referentes ao decaimento de absorbância nos tempos 0, 30 e 60 segundos. O

processo foi repetido para cada amostra. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína<sup>128</sup>.

### 3.5.7 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry, Rosenbruogh e Randal, baseado na reação de Folin-Ciocalteu, sendo usada para normalização dos resultados nas dosagens neuroquímicas<sup>129</sup>.

## 3.6 ANÁLISE DE DADOS

A análise estatística dos dados e a elaboração de gráficos foram realizadas no programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.0.

Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis foram apresentadas como média±desvio-padrão. Foi realizada a análise de variância de uma via (*one way* - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey para comparação múltipla de valores com distribuição paramétrica. Para todas as análises, foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), da UNESC, sob o número 021/2017-1 (anexo A). A execução deste projeto foi realizada de acordo com os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA-2013.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CITOCINAS

As concentrações de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no córtex pré-frontal de ratos sedentários e treinados submetidos à sepse polimicrobiana estão descritas na Figura 1. Observa-se que a sepse elevou significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de TNF- $\alpha$  (Fig. 1A) nos animais não treinados (grupo CLP+S), comparados ao grupo sham+S, enquanto que o condicionamento físico aeróbio significativamente reverteu esta alteração ( $p < 0,05$ ).

Em relação à citocina IL-6 (Fig. 1B), nota-se que os animais submetidos à sepse (grupos CLP+S e CLP+T) apresentaram valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ), comparados ao grupo sham+S, porém o condicionamento físico aeróbio não exerceu influência significativa neste aspecto.

A respeito da citocina IL-10 (Fig. 1C), os animais com sepse, independentemente do condicionamento físico aeróbio, exibiram concentrações significativamente menores que os ratos do grupo sham+S ( $p < 0,05$ ).

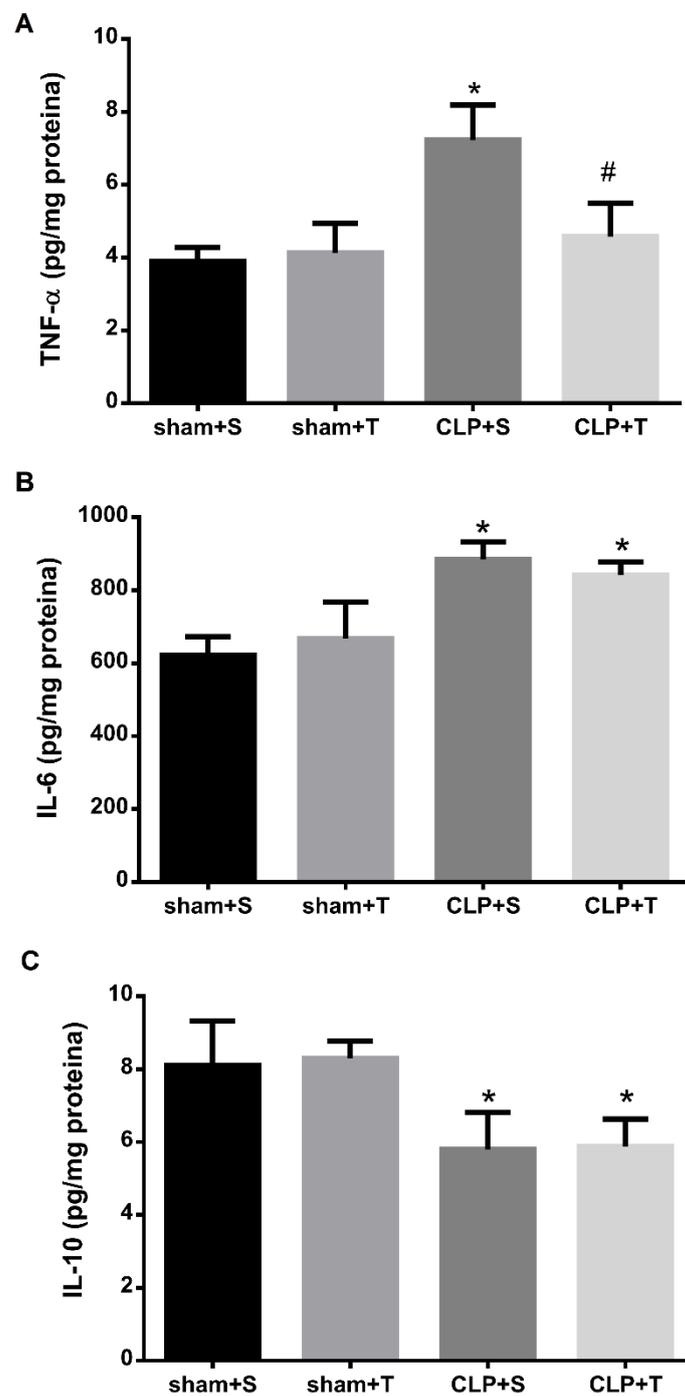


Figura 1 – Determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) no córtex pré-frontal de ratos sedentários e ratos submetidos ao protocolo de condicionamento físico aeróbio. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao sham+S, #  $p < 0,05$  em relação ao CLP+S.

## 4.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A Figura 2 elucida o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre a atividade da mieloperoxidase, como marcador de nível de infiltrado de neutrófilos, no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana. Verifica-se que a sepse aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade desta enzima nos animais sedentários (grupo CLP+S) e treinados (grupo CLP+T), comparados ao grupo sham+S. No entanto, o condicionamento físico aeróbio aplicado aos animais com sepse (grupo CLP+T) foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade da MPO, comparados ao grupo CLP+S.

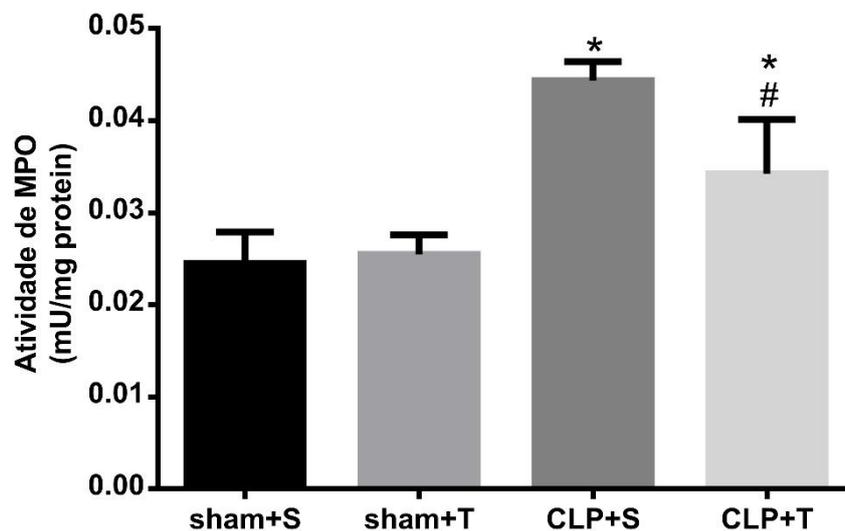


Figura 2 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase no córtex pré-frontal de ratos sedentários e ratos submetidos ao protocolo de condicionamento físico aeróbio. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao sham+S, #  $p < 0,05$  em relação ao CLP+S.

## 4.3 MARCADORES DE DANO OXIDATIVO

A Figura 3 representa efeito do condicionamento físico aeróbio sobre o dano oxidativo em lipídeos, proteínas carboniladas e integridade de grupamentos sulfidrilas no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana. As concentrações de equivalentes de MDA (Fig. 3A), um marcador de formação de TBARS e dano oxidativo a lipídeos, aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em

ambos os grupos com sepse (CLP+S e CLP+T), comparados ao grupo sham+S. Contudo, o condicionamento físico aeróbio foi capaz de reduzir significativamente este parâmetro, comparado ao grupo CLP+S ( $p < 0,05$ ).

As concentrações de proteínas carboniladas (Fig. 3B) se apresentaram significativamente aumentadas no córtex pré-frontal dos animais sedentários e com sepse (grupo CLP+S), comparado ao grupo sham+S ( $p < 0,05$ ). Apesar do condicionamento físico aeróbio ocasionar uma redução nas concentrações de proteínas carboniladas, este efeito não foi estatisticamente significativo, comparado aos demais grupos.

Em relação à integridade dos grupamentos sulfidrilas (Fig. 3C), nota-se que os animais sedentários submetidos à sepse tiveram uma redução no conteúdo de proteínas sulfidrilas, e isto foi significativo quando comparado ao grupo sham+S ( $p < 0,05$ ). Todavia, os animais com sepse e submetidos ao condicionamento físico aeróbio apresentaram valores significativamente superiores ao grupo CLP+S ( $p < 0,05$ ).

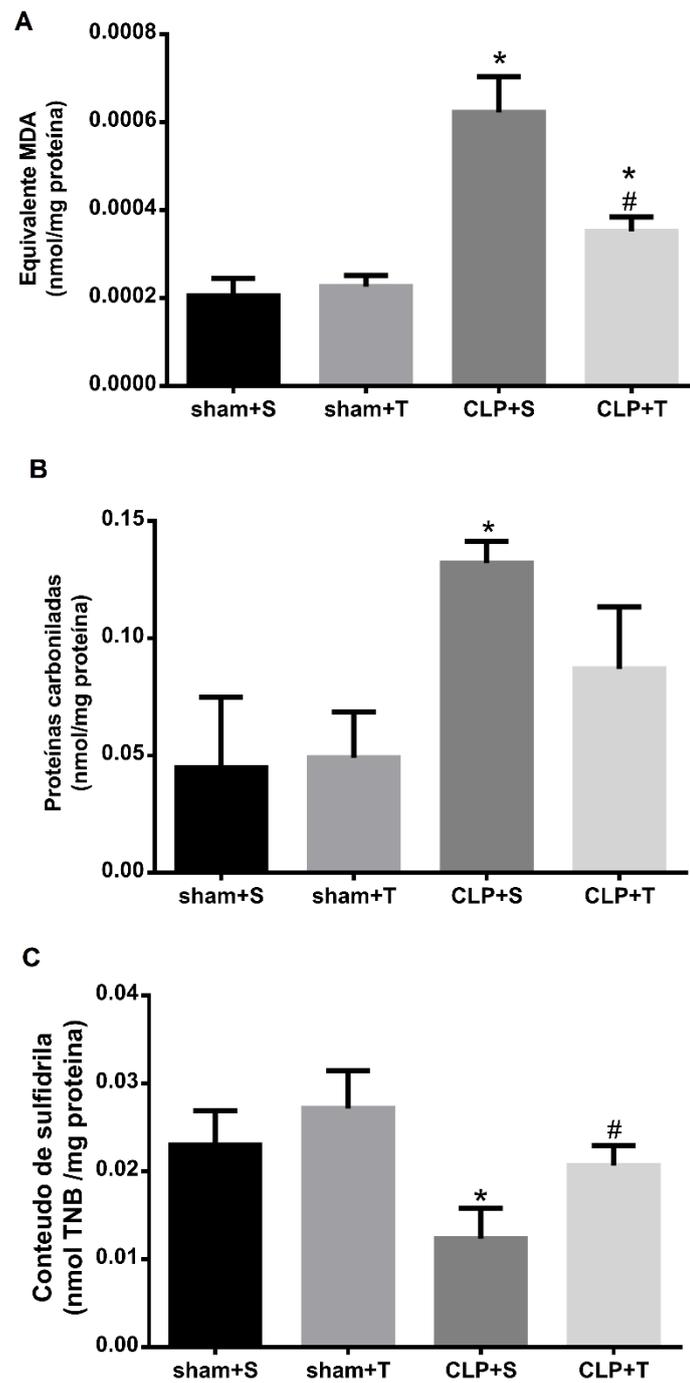


Figura 3 – Determinação de peroxidação lipídica (A), carbonilação proteica (B) e integridade de grupamentos sulfidrilas (C) no córtex pré-frontal de ratos sedentários e ratos submetidos ao protocolo de condicionamento físico aeróbio. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao sham+S, #  $p < 0,05$  em relação ao CLP+S.

#### 4.4 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT estão representadas nas Figuras 4A e B, respectivamente. É possível observar que os animais sedentários submetidos à sepse (grupo CLP+S) apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade da SOD e da CAT, comparados aos animais do grupo sham+S, e o condicionamento físico aeróbio foi capaz de reverter significativamente esta alteração ( $p < 0,05$ ) para as duas enzimas.

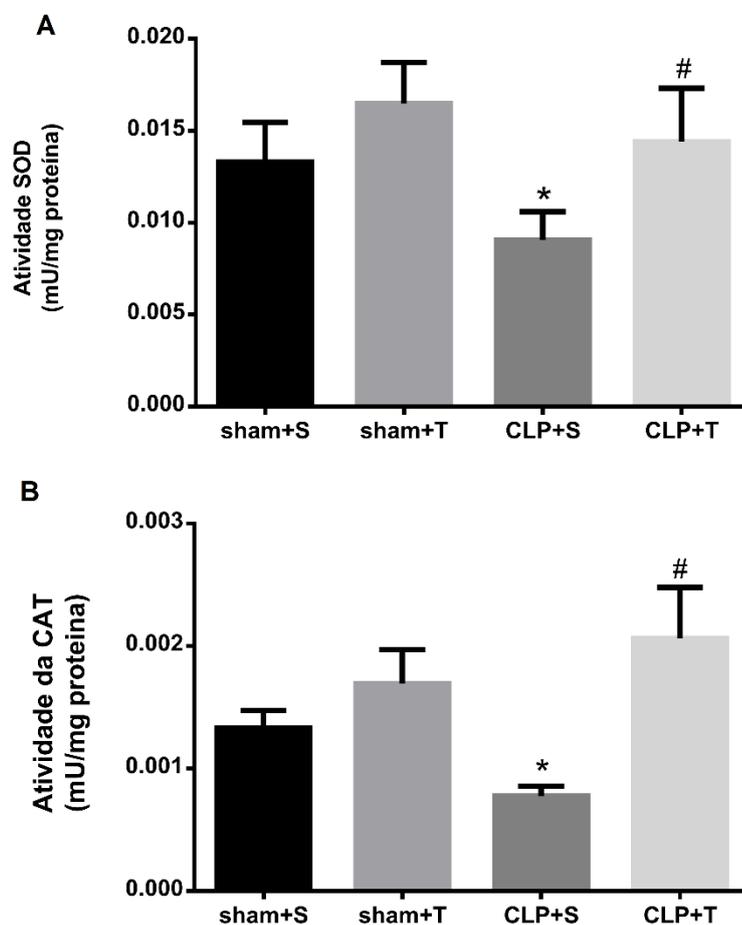


Figura 4 – Quantificação da atividade das enzimas superóxido dismutase (A) e catalase (B) no córtex pré-frontal de ratos sedentários e ratos submetidos ao protocolo de condicionamento físico aeróbio. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão, analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em relação ao sham+S, #  $p < 0,05$  em relação ao CLP+S.

## 5. DISCUSSÃO

A sepse, apesar do crescente avanço no desenvolvimento de condutas terapêuticas, ainda se apresenta como um desafio para a Medicina atual. Sabe-se que indivíduos com sepse podem desenvolver alterações neurológicas e deficiências cognitivas, as quais impactam negativamente a capacidade funcional e qualidade de vida dos sobreviventes, além de causar elevadas taxas de mortalidade durante a internação hospitalar e em longo prazo<sup>48</sup>. O exercício físico, em contrapartida, exerce inúmeros benefícios sobre o SNC, desde neuroproteção, aumento no aprendizado e plasticidade neuronal ao modular a sinalização de fatores de crescimento, estresse oxidativo e metabolismo energético<sup>130</sup>. Apesar de tais benefícios, a avaliação dos efeitos promovidos pelo exercício físico sobre o SNC na sepse é escassa, em especial do ponto de vista preventivo. Neste sentido, o presente estudo objetivou identificar o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre a sensibilidade à encefalopatia associada à sepse em ratos submetidos a um modelo experimental de sepse polimicrobiana.

A disfunção cerebral na sepse ocorre a partir da interação e da sobreposição de diferentes mecanismos relacionados à resposta inflamatória sistêmica<sup>7</sup>. Isto significa que inicialmente há a massiva produção de componentes pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>31</sup>, seguida por uma fase contra-regulatória para reestabelecer a homeostase, referida como a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês *compensatory anti-inflammatory response syndrome*). Durante a CARS são liberadas moléculas inibitórias, como a citocina anti-inflamatória IL-10<sup>30,131</sup>. Apesar de serem separadamente descritas para fins didáticos, as duas fases ocorrem de maneira paralela, podendo o cenário pró-inflamatório predominar sobre o anti-inflamatório por até quatro dias<sup>30,132,133</sup>.

Neste estudo, a indução de sepse promoveu aumento significativo nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, enquanto reduziu as concentrações de IL-10. Estes achados estão de acordo com a literatura, considerando que ambas as citocinas são sintetizadas por macrófagos estimulados por toxinas derivadas de bactérias, como o LPS; possuem ação pró-inflamatória e sinérgica; e são liberadas em tempos similares durante a fase inicial da resposta inflamatória<sup>67,134,135</sup>. A IL-10, todavia, possui papel anti-inflamatório, pois é capaz de reduzir a síntese de citocinas e quimiocinas

inflamatórias, moléculas de adesão e de apresentação de antígenos, além de suprimir a expressão e ativação de receptores para citocinas<sup>136,137</sup>. Tendo em vista que a sepse compõe-se de uma fase pró-inflamatória contra-regulada pela resposta anti-inflamatória, especula-se que as concentrações de IL-10 se mostraram reduzidas por prevalência da fase pró-inflamatória no momento da avaliação.

A realização do protocolo de condicionamento físico aeróbio mostrou-se efetiva em reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  no córtex pré-frontal dos animais com sepse (grupo CLP+T), porém não reduziu as concentrações de IL-6 e não preveniu a redução de IL-10. Em camundongos submetidos a um modelo de doença de Alzheimer, o treinamento aeróbio de natação foi efetivo em reduzir as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6 e aumentar as concentrações de IL-10 no córtex pré-frontal, demonstrando o papel do exercício físico como um modulador da resposta neuroinflamatória<sup>138,139</sup>. Em modelo de lesão traumática cerebral, uma condição que envolve alterações neuroinflamatórias e geração exacerbada de espécies reativas, ratos previamente submetidos ao treinamento de corrida apresentaram redução nas concentrações de TNF- $\alpha$  e aumento dos níveis de IL-10, sem interferência significativa sobre IL-6<sup>140</sup>.

As citocinas regulam diversas respostas inflamatórias, dentre elas a migração de células do sistema imune ao foco infeccioso. Os neutrófilos são as principais células do sistema imune inato e consistem na linha de defesa primária, pois são rapidamente recrutadas ao foco infeccioso ou inflamatório em virtude de suas inúmeras funções antimicrobianas, como fagocitose, citólise pela geração de EROs e liberação de peptídeos e enzimas antimicrobianos<sup>141,142</sup>. A MPO é uma enzima antimicrobiana expressa principalmente pelos neutrófilos - e em menor quantidade por monócitos e macrófagos - durante processos inflamatórios com o objetivo de catalisar a conversão de íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante de extrema toxicidade<sup>143</sup>.

Durante a fase inicial da sepse há um aumento na produção de MPO, como indicativo de aumento na infiltração de neutrófilos no local da lesão. Na pesquisa atual, observou-se que a sepse aumentou significativamente a atividade da MPO no córtex pré-frontal em 24 horas após a indução, corroborando estudos prévios<sup>144-146</sup>. Os animais com sepse e previamente submetidos ao condicionamento físico, no entanto, apresentaram uma redução significativa na atividade da MPO, indicando que o exercício físico reduziu o infiltrado de neutrófilos e, conseqüentemente, a resposta inflamatória, o que confirma achados prévios<sup>140</sup>.

Os neutrófilos, assim como outras células do sistema imune envolvidas no processo inflamatório, também são responsáveis por sintetizar uma massiva quantidade de espécies reativas, inicialmente designadas para eliminar microrganismos. No entanto, a fisiopatologia da sepse envolve o aumento excessivo na produção de EROs e ERNs e a redução na capacidade antioxidante endógena, o que gera, por consequência, um acúmulo de danos oxidativos às células<sup>147</sup>. Nesta pesquisa foi realizada a determinação de danos oxidativos aos lipídeos e proteínas. Os resultados encontrados reforçam as evidências científicas de que a sepse altera a estrutura lipídica e proteica, tanto no SNC<sup>148</sup>, quanto em órgãos periféricos<sup>149,150</sup>, ao aumentar as concentrações de equivalentes de MDA e proteínas carboniladas, bem como reduzir a integridade de grupamentos sulfidrilas.

O exercício físico, *per se*, é responsável por gerar uma quantidade expressiva de espécies reativas e radicais livres; todavia, a prática regular e sistemática de exercícios físicos ocasiona a adaptação do organismo, como a melhora do metabolismo energético e da capacidade antioxidante endógena<sup>151</sup>. Corroborando com a literatura, verificou-se que o condicionamento físico aeróbio aplicado neste modelo experimental foi efetivo em reduzir os danos oxidativos, em especial aos lipídeos e grupamentos sulfidrilas. Achados semelhantes foram visualizados em ratos submetidos ao condicionamento físico prévio à indução de lesão cerebral traumática<sup>152</sup>, epilepsia<sup>153</sup> e de doença de Parkinson<sup>154</sup>.

Além dos danos oxidativos a componentes estruturais das células, em modelo experimental em ratos observa-se também a diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em diferentes estruturas cerebrais a partir de seis horas após a indução de sepse polimicrobiana<sup>146</sup>, e estas alterações se intensificam em 24h no córtex pré-frontal<sup>122,155</sup>. Neste estudo, demonstrou-se que a atividade das enzimas SOD e CAT foram significativamente reduzidas no córtex pré-frontal dos animais com sepse 24 horas após o procedimento cirúrgico, confirmando a ocorrência de estresse oxidativo no modelo experimental utilizado e reafirmando as evidências supracitadas.

A enzima SOD é a primeira linha de defesa frente à espécie reativa e compreende um conjunto de três principais isoformas: a CuZn-SOD (SOD1), presente no citosol celular; a Mn-SOD (SOD2), encontrada na mitocôndria, e a EC-SOD (SOD3), visualizada em elementos extracelulares<sup>156</sup>. Independentemente da isoforma, a função da SOD é promover cataliticamente a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ <sup>157</sup>. A catalase, por sua vez, atua na sequência da SOD, catalisando a decomposição do

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a oxigênio e água<sup>158,159</sup>. Esta enzima pode ser encontrada em maiores concentrações no fígado, rins e eritrócitos, mas também apresenta atividade no SNC<sup>160</sup>. O condicionamento físico aeróbio testado neste estudo mostrou-se efetivo em prevenir a redução na atividade enzimática endógena dos animais sépticos. Tal prevenção foi comprovada em modelos experimentais de doença de Alzheimer<sup>139</sup> e de lesão cerebral traumática<sup>152,161</sup>.

Desta forma, por todos os achados obtidos, encontramos informações que o condicionamento físico aeróbio exerce efeitos positivos sobre marcadores neuroinflamatórios e neuroquímicos no córtex pré-frontal de ratos com sepse polimicrobiana. Estudos futuros poderão melhor determinar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a essa proteção assim como demonstrar o seu efeito sobre as alterações de memória e aprendizado em sobreviventes de sepse.

## 6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que no córtex pre-frontal de ratos submetidos ao condicionamento físico aeróbio e posteriormente a sepse polimicrobiana ocorreu:

- Redução nos níveis de TNF- $\alpha$ ;
- Redução de infiltrado de neutrófilos;
- Diminuição dos níveis de dano em lipídios e um aumento na integridade de proteínas com grupamentos sulfidrilas;
- Aumento da atividade das enzimas antioxidantes endógenas.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas futuras incluem investigar os efeitos deste protocolo de treinamento aeróbio em longo prazo, a partir de 10 dias após a indução de sepse, enfatizando a cognição por meio da avaliação de fatores neurotróficos e testes comportamentais que indiquem as funções de memória, aprendizado e comportamento social.

## REFERÊNCIAS

1. Steckert A, Castro A De. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins, and statins. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(1):83–90.
2. Sepse IL-APE Da. *Sepse: um problema de saúde pública.* 1st ed. Brasília: CFM; 2015. 90 p.
3. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009 Dec;302(21):2323–9.
4. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jan;42(2):153–64.
5. Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock.* 2013;39(7):10–6.
6. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: Does inflammation drive the brain crazy? *Rev Bras Psiquiatr.* 2014;36(3):251–8.
7. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care.* 2013;3(15):1–11.
8. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'igna DM, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock.* 2013;40(1):45–8.
9. Guimarães GV, Ciolac EG. Physical activity: practice this idea. *Am J Cardiovasc Dis.* 2014;4(1):31–3.
10. Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings. *Neurorehabil Neural Repair.*

- 2015;29(1):577–89.
11. Dalgas U, Stenager E, U. D, E. S, Dalgas U, Stenager E. Exercise and disease progression in multiple sclerosis: can exercise slow down the progression of multiple sclerosis? *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(2):81–95.
  12. Smuder a. J, Kavazis a. N, Min K, Powers SK. Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011;111(4):1190–8.
  13. Coelho CW, Jannig PR, Souza AB De, Fronza H, Westphal G a, Petronilho F, et al. Exercise training prevents skeletal muscle damage in an experimental sepsis model. *Clinics*. 2013;68(1):107–14.
  14. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250–6.
  15. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *Br Med J*. 2007;335(7625):879–83.
  16. Brown T, Ghelani-Allen A, Yeung D, Nguyen HB. Comparative effectiveness of physician diagnosis and guideline definitions in identifying sepsis patients in the emergency department. *J Crit Care*. 2015;30(1):71–7.
  17. Tupchong K, Koyfman A, Foran M. Sepsis, severe sepsis, and septic shock: a review of the literature. *African J Emerg Med*. 2015;5(3):127–35.
  18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest J*. 1992;101(6):1644–55.
  19. Angus DC (Pitt), van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840–51.
  20. Vincent J. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med*. 1997;25(2):372–4.

21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–10.
22. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014 Jan;5(1):4–11.
23. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546–54.
24. Silva E, Pedro MDA, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CLDO, Janiszewski M, et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251–60.
25. Warren H. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 1997;336(13):952–3.
26. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(3):858–73.
27. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ.* 2016;i2375.
28. Carvalho R de, Vieira J, Gontijo P, Ribas R. Sepsis, sepsis grave e choque séptico: aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(5):591–3.
29. Paternoster G, Guarracino F. Sepsis after cardiac surgery: from pathophysiology to management. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016;30(3):773–80.
30. László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. Sepsis: from pathophysiology to individualized patient care. *J Immunol Res.* 2015;1–13.
31. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776–87.
32. Yuki K, Muramaki N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2015;15(1):57–69.

33. Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, et al. TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *J Exp Med*. 2008;205(8):1747–54.
34. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2013;43(10):260–3.
35. Manukyan MC, Weil BR, Wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Poynter J a, et al. The phosphoinositide-3 kinase survival signaling mechanism in sepsis. *Shock*. 2010;34(5):442–9.
36. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13–9.
37. Ergin B, Kapucu A, Demirci-Tansel C, Ince C. The renal microcirculation in sepsis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Feb;30(2):169–77.
38. McConnell KW, Coopersmith CM. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. *Presse Med*. 2016;45(4):e93–8.
39. Gao H, Leaver SK, Burke-Gaffney A, Finney SJ. Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin Immunopathol*. 2008;30(1):29–40.
40. Aziz M, Jacob A, Yang W-L, Matsuda A, Wang P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2013;93(3):329–42.
41. Vincent JL, Korkut HA. Defining Sepsis. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):585–90.
42. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci*. 2011;16(January):1986–95.
43. Coletta C, Módis K, Oláh G, Brunyánszki A, Herzig DS, Sherwood ER, et al. Endothelial dysfunction is a potential contributor to multiple organ failure and mortality in aged mice subjected to septic shock: preclinical studies in a murine model of cecal ligation and puncture. *Crit Care*. 2014;18(5):511.
44. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*. 2014;40(4):463–75.
45. Maramattom BV. Sepsis associated encephalopathy. *Neurol Res*. 2007;29(7):643–6.

46. Siami S, Annane D, Sharshar T. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin.* 2008;24(1):67–82.
47. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(1):62–9.
48. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir Med.* 2014;3(1):61–9.
49. Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, et al. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep.* 2014;4(7458):1–8.
50. Ji A, Diao H, Wang X, Yang R, Zhang J, Luo W, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology.* 2012;33(4):780–8.
51. Hjorth E, Freund-Levi Y. Immunomodulation of microglia by docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15(2):134–43.
52. Pettit LK, Varsanyi C, Tadros J, Vassiliou E. Modulating the inflammatory properties of activated microglia with docosahexaenoic acid and aspirin. *Lipids Health Dis.* 2013;12(16):1–14
53. Frenkel D, Trudler D, Farfara D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010;1–12.
54. Handa O, Stephen J, Cepinskas G. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2008;295(4):H1712-1719.
55. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* 2009;77(1):26–34.
56. Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Park Relat Disord.* 2009;15(3 Suppl):S200–4.

57. Zhang W, Hu X, Yang W, Gao Y, Chen J. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. *Stroke*. 2010;41(10):2341–7.
58. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med*. 2016;8(343):343re2.
59. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328–63.
60. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):119–29.
61. Akrouf N, Sharshar T, Annane D. Mechanisms of brain signaling during sepsis. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(4):296–301.
62. Zhou T, Zhao L, Zhan R, He Q, Tong Y, Tian X, et al. Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapsone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(3):419–24.
63. Yeh CT, Kao MC, Chen CH, Huang CJ. Platonin preserves blood-brain barrier integrity in septic rats. *Acta Anaesthesiol Taiwanica*. 2015;53(1):12–5.
64. Yang CH, Kao MC, Shih PC, Li KY, Tsai PS, Huang CJ. Simvastatin attenuates sepsis-induced blood-brain barrier integrity loss. *J Surg Res*. 2015;194(2):591–8.
65. Andrades M, Ritter C, De Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J Surg Res*. 2011;167(2):e307-313.
66. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain-barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584–96.
67. Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous

- system in sepsis. *Intensive Care Med.* 2011;37(4):711–8.
68. Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol.* 2010;185(11):6930–8.
  69. Kovach M a, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(3):321–7.
  70. Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(1):18–24.
  71. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock.* 2008;30(1 Suppl):3–9.
  72. Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock.* 2010;34(1 Suppl):15–21.
  73. Park J, Moghaddam B. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. *Neuroscience.* 2016;1–10.
  74. Abelaira HM, Reus GZ, Ignacio ZM, Dos Santos MAB, de Moura AB, Matos D, et al. Ketamine exhibits different neuroanatomical profile after mammalian target of rapamycin inhibition in the prefrontal cortex: the role of inflammation and oxidative stress. *Mol Neurobiol.* 2017;54(7):5335–46.
  75. Wu X-B, Liang B, Gao Y-J. The increase of intrinsic excitability of layer V pyramidal cells in the prelimbic medial prefrontal cortex of adult mice after peripheral inflammation. *Neurosci Lett.* 2016;611(1):40–5.
  76. Zlatkovic J, Todorovic N, Boskovic M, Pajovic SB, Demajo M, Filipovic D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol Cell Biochem.* 2014;393(1–2):43–57.
  77. Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Exp Neurol.* 2003;184(2):794–804.

78. de Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A, et al. Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2006;26(21):5709–19.
79. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):271–84.
80. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: The role of antioxidant therapy. *Toxicology*. 2003;189(1–2):75–88.
81. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
82. Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17(1):11–21.
83. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312–22.
84. Gülçin I, Beydemir S, Alici HA, Elmastas M, Büyükkuroglu ME. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacol Res*. 2004;49(1):59–66.
85. Adegoke O, Forbes PBC. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: a review. *Anal Chim Acta*. 2015;862(1):1–13.
86. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J Fluoresc*. 2006;16(1):119–39.
87. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315–424.
88. Lima, RS in: David, C.M; Neto HCF. *Sepse: da bancada à beira do leito*. 1st ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2007. 362 p.
89. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci*. 2016;146:163–73.

90. Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med.* 2015;5(4):218–24.
91. Tataranno ML, Perrone S, Buonocore G. Plasma Biomarkers of Oxidative Stress in Neonatal Brain Injury. *Clin Perinatol.* 2015;42(3):529–39.
92. Wang Z, Li S, Cao Y, Tian X, Zeng R, Liao DF, et al. Oxidative Stress and Carbonyl Lesions in Ulcerative Colitis and Associated Colorectal Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9875298.
93. Rhoads DM. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 2006;141(2):357–66.
94. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–17.
95. Radak D, Resanovic I, Isenovic ER. Link between oxidative stress and acute brain ischemia. *Angiology.* 2014;65(8):667–76.
96. Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochem Res.* 2010;35(1):1–12.
97. Silvestre F, Danielski LG, Michels M, Florentino D, Vieira A, Souza L, et al. Effects of organoselenium compounds on early and late brain biochemical alterations in sepsis-survivor rats. *Neurotox Res.* 2014;26(4):382–91.
98. Roschel H, Tricoli V, Ugrinowitsch C. Treinamento físico: considerações práticas e científicas. *Rev Bras Educ Física e Esporte.* 2011;25(1):53–65.
99. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985;100(2):126–31.
100. Garcia PC, Real CC, Ferreira AFB, Alouche SR, Britto LRG, Pires RS. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res. Netherlands;* 2012 May;1456(1):36–48.
101. Ferreira AFB, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LRG. Short-term,

- moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. *Brain Res.* 2011;1425(1):111–22.
102. Haskell WL, Lee I, Pate RR, Powell KE, Blair SN. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(8):1423–34.
  103. Coelho C de F, Pereira AF, Ravagnani FC de P, Michelin E, Corrente JE, Burini RC. Impacto de um programa de intervenção para mudança do estilo de vida sobre indicadores de aptidão física, obesidade e ingestão alimentar de indivíduos adultos. *Rev Bras Atividade Física Saúde.* 2010;15(1):21–7.
  104. Ding Y-H, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res.* 2006 Feb;3(1):15–23.
  105. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005 Sep;25(38):8680–5.
  106. van Praag H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 2009;32(5):283–90.
  107. Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(14):5568–72.
  108. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan;44(2):153–9.
  109. Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Trom CB, Silva LA, et al. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012 Dec;227(1):305–12.
  110. Sloan RP, Shapiro PA, Demeersman RE, McKinley PS, Tracey KJ, Slavov I, et al. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J Appl*

- Physiol. 2007 Sep;103(3):1007–11.
111. Tuon T, Souza PS, Santos MF, Pereira FT, Pedroso GS, Luciano TF, et al. Physical training regulates mitochondrial parameters and neuroinflammatory mechanisms in an experimental model of parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
  112. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010;2.
  113. Intlekofer KA, Cotman CW. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2013 Sep;57(1):47–55.
  114. Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JPA, Vuolo F, Comim CM, et al. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. Vol. 49, *Molecular Neurobiology*. 2014. p. 380–5.
  115. Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis*. 2008 Apr;30(1):121–9.
  116. Pinho RA, Silva LA, Pinho CA, Scheffer DL, Souza CT, Benetti M, et al. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. *Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med*. 2010 Jul;20(4):306–11.
  117. Camiletti-Moiron D, Aparicio VA, Aranda P, Radak Z. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scand J Med Sci Sports*. 2013 Aug;23(4):e202-12.
  118. de Araujo CC, Silva JD, Samary CS, Guimaraes IH, Marques PS, Oliveira GP, et al. Regular and moderate exercise before experimental sepsis reduces the risk of lung and distal organ injury. *J Appl Physiol*. 2012 Apr;112(7):1206–14.
  119. Irahara T, Sato N, Inoue K, Otake K, Ohtsuru S, Koike 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 $\alpha$  expression. *J Trauma Acute Care Surg*. 2016 Jun;80(6):933–40.
  120. Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa B, Seidel C, et al. Physical

- exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. *Crit Care Med.* 2013 Oct;41(10):e246-55.
121. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990;49(2):186–96.
  122. Dal-Pizzol F, Rojas HA, Dos Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol Neurobiol.* 2013;48(1):62–70.
  123. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26(3–4):335–41.
  124. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
  125. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–78.
  126. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 1983;91:49–60.
  127. Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279–312.
  128. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–6.
  129. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
  130. Houdebine L, Gallelli CA, Rastelli M, Sampathkumar NK, Grenier J. Effect of physical exercise on brain and lipid metabolism in mouse models of multiple sclerosis. *Chem Phys Lipids.* 2017;
  131. Lyn-Kew K, Standiford TJ. Immunosuppression in sepsis. *Curr Pharm Des*

- [Internet]. 2008;14(19):1870–81. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2011.1831>
132. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol.* 2006;177(3):1967–74.
  133. Binkowska AM, Michalak G, Slotwiński R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):206–16.
  134. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets — an updated view. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013;2013:1–17. Available from: [papers3://publication/uuid/58BF094B-59D1-4CC3-A3B6-1B2B116F42F8](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111642/)
  135. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* 2005;11(3):RA76-A85.
  136. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003;55(2):241–69.
  137. Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol.* 2001;21(5):427–49.
  138. Souza LC, Jesse CR, Del Fabbro L, de Gomes MG, Goes ATR, Filho CB, et al. Swimming exercise prevents behavioural disturbances induced by an intracerebroventricular injection of amyloid-beta1-42 peptide through modulation of cytokine/NF-kappaB pathway and indoleamine-2,3-dioxygenase in mouse brain. *Behav Brain Res.* 2017;331:1–13.
  139. Souza LC, Filho CB, Goes ATR, Fabbro L Del, de Gomes MG, Savegnago L, et al. Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by beta-amyloid(1-42) peptide. *Neurotox Res.* 2013;24(2):148–63.
  140. Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LFA, Magni DV, Ferreira APO, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against

- toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotox Res.* 2012;21(2):175–84.
141. Ocuin LM, Bamboat ZM, Balachandran VP, Cavnar MJ, Obaid H, Plitas G, et al. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol.* 2011;89(3):423–32.
  142. Mishra HK, Ma J, Walcheck B. Ectodomain shedding by ADAM17: its role in neutrophil recruitment and the impairment of this process during sepsis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:138.
  143. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, et al. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012;37(16):1363–9.
  144. Reis PA, Alexandre PCB, D’Avila JC, Siqueira LD, Antunes B, Estado V, et al. Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction. *Brain Behav Immun.* 2017;60:293–303.
  145. Vieira AA, Michels M, Florentino D, Nascimento DZ, Rezin GT, Leffa DD, et al. Obesity promotes oxidative stress and exacerbates sepsis-induced brain damage. *Curr Neurovasc Res.* 2015;12(2):147–54.
  146. Vieira A, Michels M, Florentino D, Lauriano AA, Danielski LG, Fortunato JJ, et al. Increased on oxidative brain injury in the diabetic rats following sepsis. *Synapse.* 2014;68(9):410–8.
  147. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med.* 2000;26(4):474–6.
  148. Petronilho F, Périco SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* 2012;26(6):904–10.
  149. Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, et al. Alpha-lipoic acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. *Inflammation.* 2015;39(1):357–65.

150. Petronilho F, Giustina A Della, Nascimento DZ, Zarbato GF, Vieira AA, Florentino D, et al. Obesity exacerbates sepsis-induced oxidative damage in organs. *Inflammation*. *Inflammation*; 2016;39(6):2062–71.
151. Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis*. 2011;26(4):291–7.
152. Silva LFA, Hoffmann MS, Gerbatin R da R, Fiorin F da S, Dobrachinski F, Mota BC, et al. Treadmill exercise protects against pentylenetetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(14):1278–87.
153. Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*. 2009;50(4):811–23.
154. da Costa RO, Gadelha-Filho CVJ, da Costa AEM, Feitosa ML, de Araujo DP, de Lucena JD, et al. The treadmill exercise protects against dopaminergic neuron loss and brain oxidative stress in parkinsonian rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2138169.
155. Liu L, Xie K, Chen H, Dong X. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis. *Brain Res*. Elsevier; 2014;1589:78–92.
156. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337–49.
157. Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2015;1850(8):1607–21.
158. Prakash PA, Yogeswaran U, Chen SM. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. *Sensors*. 2009;9(3):1821–44.
159. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Zák A. Human catalase, its polymorphisms,

- regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Czech Republic)*. 2014;60(4):153–67.
160. Bekdeşer B, Özyürek M, Güçlü K, Alkan FÜ, Apak R. Development of a new catalase activity assay for biological samples using optical CUPRAC sensor. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2014;132:485–90.
161. da Silva Fiorin F, de Oliveira Ferreira AP, Ribeiro LR, Silva LFA, de Castro MRT, da Silva LRH, et al. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: a behavioral and neurochemical approach. *J Neurotrauma*. 2016;33(14):1317–30.

**ANEXOS**

## ANEXO A – PARECER APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Sensibilidade à encefalopatia associada à sepse: comparação entre animais sedentários e não sedentários.", registrada com o protocolo nº 021/2017-1, sob a responsabilidade de Ricardo Aurino de Pinho, junto à equipe: Fabricia Petronilho, Renata Tiscoski Nesi, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Helen Rebelo Sorato, Stella Maria Spessatto Brescianini, Hemelin Resende Farias - 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 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 21/03/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	21/03/2017 a 30/11/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	48
Idade/Peso	48dias / 250g a 350g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "Sensitivity to sepsis associated encephalopathy: comparison between sedentary animals and not sedentary."

Protocol number: 021/2017-1

Principal Investigator: Ricardo Aurino de Pinho

Researchers: Fabricia Petronilho, Renata Tiscoski Nesi, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Helen Rebelo Sorato, Stella Maria Spessatto Brescianini, Hemelin Resende Farias.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 21 de março de 2017.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA