



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

REGINA MALDONADO BUSSMANN

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA PREVENÇÃO DAS
ALTERAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

PALHOÇA

2016

B98 Bussmann, Regina Maldonado, 1980-O papel do exercício físico aeróbio na prevenção das alterações do

sistema nervoso central em modelo animal de sepse / Regina Maldonado Bussmann. – 2016.

59 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós- graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Clarissa Martinelli Comim Co-orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins

1. Septicemia. 2. Sistema nervoso - Doenças. 3. Exercícios físicos. 4. Estresse oxidativo. I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Martins, Daniel Fernandes. III. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul

REGINA MALDONADO BUSSMANN

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA PREVENÇÃO DAS
ALTERAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

Esta Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Clarissa Martinelli Comim, Dra.

Co-orientador: Prof^º. Daniel Fernandes Martins

PALHOÇA

2016

REGINA MALDONADO BUSSMANN

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA PREVENÇÃO DAS
ALTERAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM MODELO ANIMAL DE
SEPSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Palhoça, 07/2016

Orientador: Prof^a. Clarissa Martinelli Comim, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Co-orientador: Prof^o. Daniel Fernandes Martins, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Ana Paula Piovezan, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Profa. Patrícia Reis, Dra.
Fundação Osvaldo Cruz

Dedicatória

Dedico esta pesquisa ao meu querido marido André, meus amados filhos Eduardo e Gustavo e minha cachorrinha Aretha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao programa de pós-graduação de mestrado e doutorado em ciências da saúde da Unisul campi Pedra Branca, instituição que me fez redescobrir a paixão pelo meio acadêmico e fissura por novos conhecimentos. Todos os professores que me facilitaram o entendimento completo de processo de pesquisa científica dentro e fora de suas disciplinas.

A todo grupo de pesquisa NEUROPAT que me acolheu e me inseriu em práticas de laboratório, seminários de pesquisa e me fez compreender que o conhecimento não se constrói sozinho. Em especial as ICs' Daphne Palmas, Janini Jaíne e Letícia Custódio que me acompanharam durante a longa escala do protocolo de exercício. Letícia Ventura e Vivian Freiburger pela parceria, apoio, companheirismo e profissionalismo dentro do LANEX. À mestre Andreza Hoepers pelo exemplo de dedicação e fibra profissional (fisioterapeutas sérias e engajadas são raridade). À doutoranda Lilian Fausto por todas as contribuições que destes do início ao fim, dentro e fora do laboratório, valeu a paciência e esforço em ajudar sempre. Amei ter conhecido todos vocês do grupo de pesquisa, cresci muito junto ao grupo, valeu mesmo.

Ao grupo de pesquisa do prof. Daniel que também cooperou exaustivamente para o andamento desta pesquisa. Em especial Fernanda Madeira, Luiz Augusto Belmonte, Aline Siteneski, Amanda Souza, Daniela Ludke. Obrigado pela troca de idéias à beira da esteira e estímulo contínuo. Foi ótimo ter conhecido cada um de vocês.

A secretária do programa Marciele Bugança pela simpatia, disponibilidade e amizade, que bom que tu estava sempre por perto (mesmo em licença-maternidade). E outros colegas da Unisul que também contribuíram para esta conquista: Micheli Ghisleni, Gisele Mezzon, Luciana Rannow, Karol.

Aos meus pais Silvia e Nei pelo carinho e preocupação de sempre. Minha irmã Gabriela e meu cunhado Leonardo pelo suporte e exemplo amo vocês todos. Tio Leo e família pelo incentivo ao crescimento profissional.

A toda família Bussmann pela torcida nesta jornada, em especial ao cunhado Gabriel Simas por participar da formatação deste documento.

À amiga Daniela Acioli Ribeiro pela grande amizade e parceria em estúdio, sempre juntas em tudo, obrigada por aguentar meu estresse, momentos de fragilidade sem você estaria perdida, te adoro!

Ao Professor co-orientador Daniel Fernandes Martins pelo empenho em desenvolver uma fisioterapia baseada em evidência, sempre direcionando e apontando a forma mais adequada de conduzir a pesquisa: seus conhecimentos, paciência e contribuições foram essenciais para este trabalho. Sem o Sr. Não haveria como construir tudo, obrigado, obrigado e obrigado!!!

A Professora Clarissa Martinelli Comim Cassol por tudo: exemplo, inspiração, perseverança, tolerância, crédito, respeito e amizade. Deste todo o apoio necessário e muito mais para esta aprendiz em neurociência se descobrir durante todo o processo de mestrado. Desde o aceite desta orientação teve extrema consideração em me pegar pela mão e me ensinar tudo que sei nas bancadas, no Word, no powerpoint, em sala de aula, com alunos, com colegas e depositou uma confiança enorme em mim e no nosso projeto de pesquisa e hoje dissertação de mestrado. Tive o privilégio de me sentir orientada verdadeiramente o tempo todo presencialmente e também a distância, nunca me desamparaste ou negligenciastes meus posicionamentos. Sorte quem encontra um orientador deste quilate, que tem prazer em dividir e encontrar novos conhecimentos, e repetí-los quantas vezes forem necessários para consolidação e aprendizado. Fostes, é e sempre será uma professora divisora de águas “ em minha vida. Muito obrigada.

Se esqueci alguém desculpe, carrego todos que ajudaram no meu coração!!!!

“If you want to be successful, it’s just this simple. Know what you are doing. Love what you are doing. And believe in what you are doing.” (Will Rogers).

RESUMO (250 a 300 palavras)

Introdução: Sepsé é conceituada como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de infecção, sendo esta comprovada ou não. Mesmo após a alta, os pacientes sobreviventes a sepsé apresentam elevada taxa de mortalidade e comprometimento de algumas funções cognitivas. Estudos demonstram a influência positiva do exercício regular no funcionamento cognitivo cerebral favorecendo angiogênese, neurogênese e sinaptogênese assim como atenuação do prejuízo sobre a memória de longo e curto prazo pela erradicação ou diminuição de peroxidação lipídica em hipocampo e córtex pré-frontal.

Objetivo: Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio na prevenção de alterações no SNC em um modelo animal de sepsé.

Métodos: Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 28 dias, entre 20-25 g. Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio moderado por oito semanas. Aos 88 dias após a indução de sepsé por LPS, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos ($n = 10$): 1) PBS + não exercitado; 2) PBS + exercitado; 3) LPS + não exercitado; 4) LPS + exercitado. Depois de 10 dias os camundongos foram submetidos aos testes de memória e aprendizado. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados sendo o córtex pré-frontal, estriado, hipocampo, cerebelo e córtex removidos e armazenados para análises posteriores de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas e tióis livres.

Resultados: O grupo LPS + exercitado não apresentou comprometimento da memória e do aprendizado e apresentou menores concentrações de MDA no córtex total, hipocampo, estriado e cerebelo; proteínas carboniladas diminuídas em córtex total e hipocampo e aumentadas concentrações de tióis livres em córtex pré-frontal e córtex total, quando comparados com LPS + não exercitados.

Conclusão: A realização do exercício aeróbio moderado preserva a função cognitiva (memória e aprendizado) em insultos sépticos, e a redução do dano oxidativo, parece mediar pelo menos em parte o efeito do exercício físico.

Descritores: sepsé, SNC, exercício físico, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is determined as a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) followed by an infection, evidenced or not. Even after discharge, sepsis survivors have high mortality index and may develop long term cognitive impairment. Articles show that exercise act positively on cognitive behavior considering angiogenesis, neurogenesis and synaptogenesis as well as like attenuation on memory damage by depleted or downregulation of MDA and carbonils in hippocampus and préfrontal cortex.

Objective: The aim of this study was analyse the effects of moderate physical exercise treadmill program on preventions of alterations on CNS in an sepsis animal model.

Methodology: This study use black male mice C57BL/6 (28 days, between 20-25 g). The animals were submitted to moderate physical exercise treadmill program during 8 weeks. Completing 88 days before sepsis induccion by LPS were aleatorally distributed in groups($n = 10$): 1) PBS + not exercitaded; 2) PBS + exercitaded; 3) LPS + not exercitaded; 4) LPS + exercitaded. After 10 days mice did the memory tests and after executed, and having samples of cortex pré-frontal, estriatum, hippocampus, cerebellum and cortex to avaliations based on levels of MDA, carbonils and free-thios.

Results: The LPS + exercitaded didn't show long term cognitive impairment and show smaller MDA concentrations on cortex total, hippocampus, estriatum e cerebellum; downregulated carbonils in cortex total and hippocampus and up-regulated levels of free thiois in cortex pré-frontal e cortex total, when compared to LPS + not exercitaded group.

Conclusions: Beyond performance of this training program was observed that memory and learning were preserved was partially explain for the bioquimics results when compared to not exercised group. We suggest new researches to verify how exercise effects may influence other patterns to better understand the power of this intervention. Sugerem-se novas pesquisas para verificar a atuação do exercício em outras vias e cascatas metabólicas e compreender melhor o alcance desta intervenção.

Key-words: Sepsis , SNC, phisiscal exercise , oxidative stress.

LISTAS

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos químicos

ACCP/SCCM	Colegiado americano de cirurgiões torácicos/Sociedade médica de cuidado Intensivo
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator Neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BPM	Batimentos por minuto
CAT	Catalase Ligadura e punção de ceco
CLP	
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPB	Dinitrofenilidrozina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione-Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSr	Glutathione-Redutase
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO ₂	Hidroxi-peróxido
ICAM-1	Molécula de Adesão Celular 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
ILAS	Instituto Latino Americano da Sepsis
IPM	Inspirações por minuto
LaNEX	Laboratório de Neurociência experimental
LPS	Lipopolissacarídeo
MmHg	Milímetros de mercúrio
NF-κB	Fator Nuclear Kappa Beta
O ₂ ⁻	Superóxido
OH ⁻	Hidroxila
PAM	Pressão Arterial Média
PBS	Tampão fosfato-salino
PMAP	Padrão Molecular Associado a patógenos
PUC/RS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA	Ácido Ribonucleico
SBBcC	Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Desmutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa

TRL2
TRL4
UTI

Receptor tipo Toll 2
Receptor tipo Toll 4
Unidade de Terapia Intensiva

Lista de figuras

Figura 1 - Teste de memória e aprendizado.....	37
Figura 2 - Teste de TBARS.....	39
Figura 3 - Teste de carbonilação de proteínas.....	41
Figura 4 - Tióis Livres.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1.1 Sepsis	19
1.1.1.1 Histórico, etiologia e conceito	19
1.1.1.2 Epidemiologia	21
1.1.1.3 Fisiopatologia	21
1.1.2. Estresse oxidativo.....	25
1.1.3 Exercício físico	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MÉTODOS	32
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	32
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	32
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MODERADO	32
3.4 INDUÇÃO DA SEPSIS	33
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	34
3.5.1 Esquiva Inibitória	34
3.5.2 Habituação ao Campo Aberto	34
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	35
3.6.1 Mensurações de estresse oxidativo.....	35
3.6.1.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	35
3.6.1.2 Medida do dano oxidativo em proteínas	35
3.6.1.3 Atividade de tióis livres	36
3.6.1.4 Dosagem de proteínas	36
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS	37
4.1 MEMÓRIA E APRENDIZADO	37
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A sepse é conceituada como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente de infecção, sendo esta comprovada ou não¹. O número de casos desta doença nos EUA chega a 1.000.000/ano e o número de óbitos a 200.000² / ano e, diferente de outras doenças, ainda não há tratamento efetivo³. Estima-se que de 10 a 30% dos leitos de unidades de terapia intensiva (UTI) dos Estados Unidos sejam ocupados por pacientes com sepse grave².

Segundo o Instituto Latino Americano da Sepse (ILAS) dados nacionais apontam para uma elevada letalidade por sepse em hospitais públicos. O mesmo instituto sugere que 30% dos leitos de UTI do Brasil sejam ocupados por pacientes com sepse grave ou choque séptico e que a letalidade se aproxime de 50%⁴. A primeira análise econômica em UTIs brasileiras apontou elevado custo para o tratamento da sepse⁵. O primeiro estudo longitudinal no Brasil, realizado entre 2002 e 2010, mostrou 12,9% de mortes em UTIs não coronarianas, estão relacionadas à sepse grave e que há maior prevalência no sexo masculino, nos idosos e na primeira infância⁶.

Mesmo após a alta, os pacientes apresentam elevada taxa de mortalidade, comprometimento de algumas funções cognitivas e raramente retomam as rotinas de vida que possuíam antes de adoecer^{7,8}. Transtorno de ansiedade, depressão maior, imunossupressão, déficit de atenção, dificuldade de concentração, estresse-pós-traumático e perda de memória estão entre os sinais e sintomas presentes em estudos com ratos^{9,10,11} e humanos^{7,12} sobreviventes à sepse. O ônus financeiro não se restringe à estadia em UTI¹³, após a alta consultas e reinternações frequentes somam gastos importantes neste tipo de reabilitação¹⁴. Deparando-se com este contexto mórbido algumas formas de intervenções vem sendo propostas^{15,16,17} e descritas na literatura^{18,19,20}.

Tratando-se de um problema de saúde pública no Brasil, a sepse deveria ser reconhecida precocemente pelos profissionais da área da saúde assim como mais considerada no desenvolvimento de políticas públicas⁴. À medida que o comprometimento sistêmico desta doença avança, aumenta a chance de óbito. Assim como no caso de infarto ou acidente vascular cerebral, diagnósticos e tratamentos tardios se tornam ineficazes. Para diminuir as taxas de morbidade e

mortalidade é necessário que, quando diagnosticada a sepse, o tratamento seja iniciado prontamente e de forma coordenada e estruturada^{4,21}

Entre os fatores de risco no surgimento da sepse estão: sexo masculino, extremos de idade², condições que acarretem imunossupressão (contaminação por HIV, transplantes) e algumas co-morbidades como Diabetes Mellitus tipo I e Doença Broncopulmonar obstrutiva crônica^{2,22}.

Como intervenção não-farmacológica de baixo custo o exercício físico regular proporciona e mantém muitos benefícios para o organismo além de reduzir o risco de doenças crônicas e apresentar poucas contra-indicações²³. Estudos demonstram sua influência positiva no funcionamento cognitivo cerebral^{24,25} favorecendo angiogênese, neurogênese e sinaptogênese²⁶ além de possuir ação protetora para doenças degenerativas²⁷ e vários transtornos psiquiátricos²⁸. Neste contexto este estudo tem como foco esclarecer o papel do exercício físico aeróbio moderado antes da indução de sepse em animais, examinando sua influência sobre funções cognitivas no sistema nervoso central (SNC).

1.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1.1 Sepses

1.1.1.1 *Histórico, etiologia e conceito*

Através dos séculos, filósofos e cientistas buscaram compreender como ocorria a transmissão das doenças contagiosas. Culturas da antiguidade refletiam influência religiosa nas práticas sacerdotais, com a finalidade de desmistificar a doença e a morte²⁹.

Filósofos pré-socráticos no século 6 a.C. foram os primeiros a crer na influência do ambiente na saúde das pessoas. Um século depois, Hipócrates correlacionou o aparecimento de sinais e sintomas de determinadas doenças com estado patológico da atmosfera^{29,30}. A partir daí surgiu o termo *pepse* que significa o processo pelo qual a comida é digerida ou a uva fermentada e indica vida e boa saúde. O termo *sepse* deriva do verbo *sepsein* e significa putrefazer, decompor. É ligado ao adoecimento, surgimento de males e morte³⁰.

Existem descrições de casos sépticos desde o início do século, mas somente em 1986 o conceito desta doença foi descrito. Jacobs e Bone (1986) foram os primeiros a padronizar essa nomenclatura, estabelecendo, parâmetros específicos bem definidos. Além de recomendar o abandono de alguns termos (septicemia, choque frio e choque quente) esses autores contribuíram enormemente quando evidenciaram a progressão da gravidade da doença séptica³¹

Porém algumas dúvidas surgiram em como distinguir quadros de resposta inflamatória não relacionados á infecção (situações de lesões estéreis como pancreatite aguda, grandes traumatismos ou queimadura extensas) levando em agosto de 1991 membros de duas sociedades médicas americanas, a *American College of Chest Physician* e a *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) se reunirem em uma conferência-consenso^{32, 33}.

O termo sepse foi proposto como a continuidade da piora inflamatória iniciada pela SRIS, evoluindo para sepse grave e posteriormente para choque séptico. A síndrome trata-se simplesmente de uma reação do organismo hospedeiro a uma infecção a partir da SRIS. Por esta nomenclatura obrigatoriamente enquadra-se no diagnóstico de SRIS alteração de no mínimo 2 dos 4 critérios diagnósticos: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e contagem de leucócitos³³.

A sepse grave ocorre quando há disfunção de pelo menos um órgão isolado dentro dos seis sistemas orgânicos: cardiovascular, respiratório, renal, neurológico, hepático e coagulação. Na continuidade do desequilíbrio da resposta inflamatória ao patógeno, somada à hipotensão após ressuscitação volêmica, se tem a definição de choque séptico³⁴.

Reações mistas foram emitidas pela comunidade médica e pesquisadores quando os novos conceitos vieram à tona. Os objetivos da primeira conferência-consenso eram estabelecer um conceito-padrão e desenvolver parâmetros fidedignos para busca de tratamento.³³

A fim de elaborar uma nova proposta de conceitos em 2001, na cidade de Washington D. C. , se reuniram na segunda conferência-consenso membros de sociedades médicas, e como resultado obteve-se um aumento na lista dos critérios clínicos e diminuição da especificidade na definição, afastando-se, portanto, do objetivo original de esclarecer o diagnóstico. Neste encontro também foi mantido a SIRS como componente do diagnóstico da sepse. Contudo, hoje ainda se adota

tanto em pesquisas como na prática clínica, o conceito elaborado em 1991³⁵. O que foi também proposto nesta conferência de 2001 foi a introdução de uma estrutura conceitual para esclarecer e indicar estadiamento da doença: o PIRO (predisposição, lesão, resposta e disfunção orgânica)³⁶.

1.1.1.2 *Epidemiologia*

A incidência de sepse grave nos EUA é de 300 novos casos ao ano² o custo em hospitalizações é de aproximadamente US\$ 14.6 bilhões/ano e caracteriza um problema de saúde pública neste país². No continente europeu o índice de mortalidade para sepse foi estimado em 36%²¹, no Reino Unido anualmente mais de 36,000 pacientes são vítimas de sepse grave direcionando mais de 50 % dos recursos de cuidado intensivo (aproximadamente 2,5 bilhões de euros) para cuidados com estes pacientes³⁷.

Mundialmente índices de mortalidade são elevados especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil que apresenta alto índice de mortalidade inclusive superior a outros países como Argentina e Índia³⁸.

Esta síndrome em crianças também é causa significativa de morbidade e mortalidade em nível mundial, a sepse também foi maior causa de morte em UTI pediátrica sendo mais incidente em pacientes desnutridos e menores de 12 meses de idade³⁹.

1.1.1.3 *Fisiopatologia*

A resposta imune inata é a primeira reação do hospedeiro contra um patógeno/lesão externa e representa um mecanismo básico de manutenção da homeostase do nosso organismo. Tem por intuito fisiológico combater a agressão restringindo-a em seu foco inicial, evitando sua propagação. Essa reação pró-inflamatória iniciada estimula a produção de anticorpos específicos (resposta imune específica) sendo vital para evitar crescimento de microorganismos⁴⁰. Entretanto se não houver uma ação coordenada entre essas duas reações e juntamente ocorrer desorganização sistêmica, pode-se comprometer fatalmente a homeostase, especialmente no SNC que é um dos primeiros sistemas molestados em pacientes sépticos⁴¹. Especificamente na sepse há uma descontinuidade na interface dessas

duas respostas imunes, gerando uma repercussão em rede designada pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias, que ampliam e desregulam toda ação de defesa do organismo⁴².

Neste momento inicial, identifica-se uma ação fagocítica protagonizada por macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e mais recentemente estudados peptídeos anti-microbianos^{43,44}. O mecanismo bactericida simultaneamente ganha espaço, expressado pela liberação exacerbada de citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e molécula de adesão celular (ICAM-1). Estas por sua vez, direcionam a migração de células imunitárias e ativação leucocitária. Dentro da patogenia da sepse, mais especificamente os receptores tipo toll 2 (TRL2) e tipo toll 4 (TRL4) distinguem patógenos de microorganismos não-nocivos. A expressão deste tipo de receptor é modulada por componentes bacterianos (lipopolissacarídeo, ácido lipoteicóico, peptideoglicanos, fragmentos de parede) conhecidos em conjunto por padrão molecular associado a patógenos (PMAP) e são responsáveis pelo desencadeamento da ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa beta (NF- κ B), seguido de produção de mais citocinas e ativação de linfócitos-T recomeçando a repercussão⁴⁵.

O quadro se direciona para o dano endotelial, apresentando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (levando a hipotensão), edema, consumo aumentado de oxigênio e atividade mitocondrial acelerada com liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Se este processo avança invadindo o organismo, distúrbios regulatórios ficam comprometidos, pois disfunções orgânicas surgem agravando o quadro da doença. Estas disfunções podem ocorrer nos sistemas renal, neurológico, cardiopulmonar, gastrointestinal e na coagulação sanguínea sendo estes geralmente preditivos de choque séptico e óbito⁴¹.

Um dos principais sintomas da sepse é a encefalopatia associada à sepse ou encefalopatia séptica que se caracteriza por um rápido declínio das funções cognitivas, especialmente memória. Estudo envolvendo pacientes de cuidado crítico relatam que estes apresentam déficits cognitivos na alta hospitalar, através de mecanismos neurofisiológicos secundários à lesão encefálica justificado em estudo em animais por participação ativação microglial e apoptose neuronal. Existem alguns fatores que podem colaborar com desenvolvimento da encefalopatia séptica como

por exemplo: geração de citocinas pró-inflamatórias através da atuação de micróglia, alteração na microcirculação cerebral, desequilíbrio de neurotransmissores, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica⁴⁶. Todos eles caracterizando disfunção do SNC. O dano neurológico induzido por esta encefalopatia ainda não foi totalmente esclarecido, entretanto a disfunção da sinalização redox e alteração na produção de ERO podem contribuir tanto para a causa como para o agravamento da doença⁴⁷.

Para manter sua homeostase o SNC conta com a atuação de neurônios, macróglia, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia atuando no interstício enquanto as células constituintes da barreira hemato-encefálica (BHE) controlam entrada e saída molecular acompanhando entrega de nutrientes, eliminação de catabólitos, e restringindo acesso de patógenos, agentes tóxicos, macromoléculas ou substâncias neuroativas para dentro do microambiente encefálico⁴⁶. Esta permeabilidade seletiva confere à BHE uma importante função neuroimune, incluindo para isso tanto a secreção de substâncias ativas (citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico) como o controle na acessibilidade de leucócitos. A BHE intermedia a ligação entre os vasos sanguíneos e o SNC através de uma grande variedade de sinais regulatórios (iônicos e elétricos); essa natureza dinâmica repercute na variação da sua permeabilidade e a faz vulnerável mediante manifestações patológicas. Esta falha no papel protetor exercido pela BHE pode influenciar no curso da sepse expondo e predispondo o SNC a este insulto.⁴¹.

Conforme o critério diagnóstico empregado de 8 a 70% dos casos a gravidade da doença pode se manifestar no SNC caracterizando a encefalopatia associada à sepse ou encefalopatia séptica.⁴⁸ Sendo suas manifestações clínicas mais típicas variando de confusão ou *delírium* ao coma. Dos sobreviventes à encefalopatia séptica até 87% apresentam dano cognitivo a longo prazo. A soma desses dados com o aumento de sua incidência e os altos custos já mencionados reforçam principalmente a preocupação com sua prevenção.

Em casos onde há acompanhamento de médio e longo prazo, muitos pacientes apresentam melhora deste déficit, entretanto uma ou mais capacidades e/ou habilidades cognitivas não são totalmente estabelecidas. Se alguma das funções cognitivas incluindo memória, atenção, velocidade de raciocínio, habilidades espaço-visuais e nível intelectual, forem afetadas, o paciente terá dificuldade em

reestabelecer rotinas de vida diária e também poderá ter sua performance profissional prejudicada⁹, ou seja este paciente e seus familiares terão uma repercussão direta muito grande é preciso que hajam mais estudos para mudar esta realidade que pode persistir descrito por Iwashyna e colaboradores por até 8 anos⁷.

A presença destes sinais e sintomas (perda de concentração, atenção e perda global de função cognitiva) ilustra a severidade do quadro que pode se manifestar sob a forma leve, moderada ou grave. Outros sintomas que também aparecem em sobreviventes de cuidado intensivo são depressão e ansiedade. A prevalência de depressão maior nestes pacientes é de 30% e 47% deles apresentam ansiedade clínica, acompanhadas em ambas de vulnerabilidade imunológica suscetibilizando a constantes reinternações e também ao óbito⁴⁹.

Permeando um pouco mais na neurobiologia do dano oxidativo Barrichelo e colaboradores (2006), em ótica mais celular do dano a longo prazo comprovaram pela CLP (ligação e puntura do ceco) que o estresse oxidativo a curto prazo (6 horas) tem influência direta na sintomatologia a longo prazo⁵⁰.

Ritter e colaboradores (2014) em estudo de coorte (investigando a diferença entre pacientes sépticos e não-sépticos na ocorrência de delirium e mediadores inflamatórios) descreveram que na fisiopatologia da sepse a inflamação tem papel fundamental na disfunção cerebral e dano a longo prazo⁵¹. Já Mina e colaboradores (2014) em caráter mais mecanístico salientaram a sustentação da resposta neuroinflamatória pelo aumento de I1 em seus achados confrontando com a performance no processamento da memória⁵². Steckert verificou repercussão tardia no SNC por 30 dias em modelo animal por CLP justificando-se (dentre outros resultados) pela diminuição da concentração de TBARS em hipocampo prevenindo ou revertendo estresse oxidativo nesta região. E ainda revisando metabolismo mitocondrial identificou vazamento de superóxido devido á diminuição da atividade no complexo 1 da cadeia respiratória também culminando no dano cognitivo⁵³.

Ainda na relação de causa e efeito entre estresse oxidativo e neuroinflamação Biff D e colaboradores demonstraram relação inversa entre mediadores inflamatórios na fase inicial de sepse induzida pela CLP, diminuição de níveis de BDNF acompanhados de piora na desenvoltura na esquiava de múltiplos treinos. Todos esses achados corroboram na tentativa de elucidar como efeitos a curto prazo na fase aguda da sepse (6 hrs em roedores) podem repercutir (se não modificar e

prevenir) no curso da doença e em suas indesejáveis manifestações tardias⁵⁴.

1.1.2 Estresse oxidativo

Conceitualmente estresse oxidativo significa o desequilíbrio entre sistema de defesa antioxidante e formação de espécies pró-oxidantes, chamadas ERO. Estas substâncias por sua vez, são extremamente reativas, capazes de propagar dano a proteínas, lipídios, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)^{55,56}.

Em todos os tecidos humanos há produção dessas espécies podendo ocorrer estresse oxidativo em todos eles. Entretanto o encéfalo apresenta grande suscetibilidade à formação de EROs bem como propagação do dano causado por elas. Morfologicamente o tecido do SNC é estruturado com abundante presença de ácidos-graxos poliinsaturados, defesa antioxidante limitada, alto índice de utilização de oxigênio, regeneração celular lenta e também alta concentração de cobre e ferro em diversas regiões o tornando-o propício ao dano^{56,57}.

Atribui-se, portanto, a sistemas antioxidantes uma função de proteção contra estes possíveis danos gerado pelas seguintes EROs: superóxido (O_2^-), hidroxiperoxila (HO_2), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes agentes reativos são, em sua maioria, provenientes de metabolismo de oxigênio e nitrogênio, ambos verificados em cenário de reações de óxido-redução, ou seja, ou eles provocam ou resultam dessas reações. Em organismos aeróbios, essa homeostase é garantida devido a atuação de enzimas anti-oxidantes como por exemplo: glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), entre outros.^{58,55}

No curso da sepse o estresse oxidativo no SNC ocorre a curto prazo (seis horas) tendo o retorno do equilíbrio das enzimas antioxidantes SOD e CAT de 12-96 horas depois, este dano poderia colaborar no desenvolvimento da gravidade do quadro da doença^{47,50}

A glutathiona é sintetizada a partir de 3 aminoácidos e algumas condições metabólicas estão associadas ha uma diminuição de seus níveis, tal qual aumento na suscetibilidade a infecções⁵⁹. Trata-se do thiol presente em concentração mais alta no citoplasma celular e se mostra muito eficaz exercendo a função de co-fator da

família das enzimas glutathione peroxidases, onde com sua oxidação a dissulfeto da glutathione (GSSG) impede dano e propagação oxidativa⁶⁰.

Bioquímicamente a mensuração da peroxidação lipídica se estima através da quantidade do subproduto malondialdeído ativado por reação ao ácido tiobarbitúrico⁶¹. Sob estas condições de estresse oxidativo o grupo carbonil de proteínas também é muito utilizado na mensuração do dano⁶².

Especificamente na sepse o desafio é compreender dentro do quadro inflamatório da fase mais inicial como discernir a propriedade regulatória destes sistemas, assim como durante inflamação crônica sustentada. No estudo de Karapetsa colaboradores (2013) os níveis de glutathione-reduzida eram mais baixos em pacientes não-sobreviventes à sepse comparado aos sobreviventes e estes pesquisadores sugeriram uma inabilidade do metabolismo destes pacientes em manter os níveis de glutathione ao longo do tempo sendo pelo dano permanente e/ou muito severo ou por déficit de síntese neste sistema enzimático⁶³.

Dentro da fisiopatologia da sepse já é bem descrita a repercussão sistêmica de mediadores pró e anti-inflamatórios mas seu impacto em tecido cerebral ainda não foi totalmente desvendado^{64,65}. Barrichello T e colaboradores (2007) atribuem a ligação entre ativação microglial por estimulação de citocinas ao estresse oxidativo e consequentemente prejuízo cognitivo a longo prazo em ratos submetidos à sepse⁵⁰.

Em modelos animais de sepse, sabe-se que o estresse oxidativo está presente em tecido encefálico 6 horas após a indução⁵⁰ esta alteração permanece por até 30 dias após a indução pela CLP⁵³ Em recente estudo multicêntrico, Lorente e colaboradores (2015) comprovou associação direta entre índice de mortalidade de pacientes que tiveram sepse grave com diminuição de capacidade antioxidante total⁶⁶.

Após análise de tecido neural e hepático foi percebido por Radak e colaboradores (2013) uma diminuição da geração de EROs e também de seus danos. Atribuiu-se ao exercício este aumento na resistência de tecidos e órgãos contra insultos provenientes destes radicais, podendo assim se questionar uma provável modulação pelo metabolismo aeróbio treinado no processo de neutralização dessas espécies conforme será descrito na seção a seguir⁶⁷.

1.1.3 Exercício físico

A prática de exercício físico está intrinsecamente presente no desenvolvimento da raça humana. Através dela que o homem conseguia adquirir alimento para se sustentar e fugir para sobreviver. Em diversas épocas históricas esta ferramenta foi essencial como por exemplo o treinamento de gladiadores na Grécia e Roma antiga. No século XIX ganhou mais espaço na forma de competições em jogos, ginástica, dança e calesenia. A propagação desta modalidade como promotora da saúde no Brasil ocorreu a partir de 1970 e desde então vem cada vez mais sendo praticada e estudada⁶⁸.

Como intervenção não-farmacológica de baixo custo o exercício físico regular proporciona e mantém muitos benefícios pro organismo além de reduzir o risco de doenças crônicas^{69,70}, doenças cardiovasculares⁷¹, metabólicas⁷², obesidade⁷³, osteoporose⁷⁴, câncer⁷⁵, fibromialgia⁷⁶ e dor⁷⁷ e apresentar poquíssimas contra-indicações.

Desde a década de 90 tem-se estudado e comprovado os benefícios do exercício regular na função cerebral frente ao dano oxidativo de algumas doenças⁷⁸. Estudos demonstram sua influência positiva no funcionamento cognitivo cerebral²⁶ favorecendo angiogênese, neurogênese e sinaptogênese²⁶ além de possuir ação protetora para algumas doenças degenerativas²⁷, declínio cognitivo e demência⁶⁹ entre outros transtornos psiquiátricos²⁸

Conforme o tipo de exercício é bem estabelecida sua repercussão direta em sistemas antioxidantes cerebrais endógenos diminuindo o risco de dano oxidativo. Assim como se conhece outras vantagens neurometabólicas de se evitar o sedentarismo o exercício pode causar aumento de resistência contra insultos cerebrais, estímulo à neurogênese e a plasticidade neuronal e contribuição para aprendizagem⁷⁸.

Segundo Caspersen, Powell e Christenson (1985), atividade física é qualquer movimento corporal produzido por musculatura esquelética que resulte em despendio de energia. O exercício físico é uma subcategoria de atividade física caracterizada por ser planejada, estruturada e repetitiva e destinada propositalmente para adquirir ou manter um ou mais componentes de preparo ou aptidão física. O

conceito de preparo físico é atribuído ao conjunto de características relacionadas a habilidade do organismo em desempenhar alguma atividade física⁸⁰

Sabendo da variação fisiológica esperada em humanos na aplicação de protocolos de exercício, de Araújo e colaboradores (2012) enfatizaram o papel dos modelos animais na elaboração de protocolos de exercício devido ao grande controle que se tem do ambiente que eles ficam expostos (fatores externos como: dieta, tempo de manipulação, temperatura e sono) e as diferenças individuais (espécie, sexo e idade)⁸¹. De acordo com Booth, Laye e Spangenburg (2010) para o desenvolvimento de pesquisa em modelos animais é essencial o entendimento de respostas fisiológicas nos diferentes métodos de treinamento. Além da confiabilidade do modelo, a caracterização de parâmetros estimula a prescrição contínua do exercício para intervenções clínica, farmacológica e dietética em fisiologia experimental⁸².

Dos protocolos de exercício físico para animais, a esteira de uso humano adaptada é muito utilizada com a finalidade de investigar adaptações fisiológicas produzidas no exercício. Seu uso extensivo em estudos é devido a efetividade, simplicidade e facilidade em treinar vários animais ao mesmo tempo. Nesse tipo de intervenção o pesquisador pré-determina os parâmetros de duração, frequência, intensidade e volume a serem realizados garantindo fidedignidade ao modelo selecionado Apple e colaboradores e Zhou e colaboradores^{83,84}.

Em recente revisão sistemática, Camiletti-Móiron e colaboradores (2013) investigaram os efeitos do exercício no estresse oxidativo no cérebro e relataram a dificuldade de interpretar seu levantamento de dados devido a alta heterogeneidade dos protocolos de exercício identificados. Mostrando resultados conflitantes e/ou inconclusivos, considerando intensidade e volume, confirmou que estas limitações comprometem a análise distanciando o meio científico de conclusões mais objetivas na tentativa de formatar um modelo mais adequado para aumentar a capacidade antioxidante cerebral⁷⁹. No entanto dentre todos os programas de treinamento incluídos, o exercício físico aeróbio moderado, foi eleito como o mais apropriado para promover esta capacidade. Coelho e colaboradores (2013) concluíram que o exercício aeróbio como pré-condicionante previniu a hipotrofia, a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas e aumentou atividade de SOD em tecido muscular de ratos submetidos a sepse¹⁹.

Viña e Gomes-Cabrera (2013) e Tanaka e colaboradores (2015) atribuem o aumento da produção de EROS pelo exercício (sem evoluir para o estresse oxidativo) ao conceito de que estas espécies atuam como segundo-mensageiro na adaptação de exercício aeróbio o que otimizaria o uso de exercício como terapêutica não-farmacológica^{85,86}.

Finaud, Lac e Filaire (2006) enfatizam que não necessariamente a produção de EROs estimulada pelo exercício físico levaria ao estresse oxidativo⁸⁷. Convergindo com Radak e colaboradores (2007) que interpreta o papel dos efeitos da geração de ROS no início e intermediação no processo de adaptação do exercício⁸⁸. O que justificaria na visão destes autores sua associação com a diminuição de diversas doenças, retardo do processo de envelhecimento bem como atenuação de danos associados a este^{87,88}.

A influência de suplementação antioxidante combinada com o exercício aeróbio vem sendo demonstrada em estudos e dividindo opiniões no meio científico^{89,90,91}. Passos (2015) atribui ao aumento da capacidade adaptativa do retículo endoplasmático em organismos exercitados, efeitos benéficos em alterações de várias cascatas metabólicas: suprimindo inflamação, sinalização de cálcio, resgatando *status* reduzido e diminuindo a expressão de genes pró-apoptóticos⁹².

A corrida como modelo de exercício físico tem sido selecionada como protocolo de primeira escolha em publicações que demonstraram aumento na plasticidade cerebral⁹⁰ e neurogênese¹⁸.

Radak e colaboradores (2013) em extensa revisão interessantemente aborda o tema estresse oxidativo fazendo uma retrospectiva histórica. Saliendo o instinto da sobrevivência humana simbolizado na caça atribui à corrida o papel mediador na evolução do metabolismo aeróbio da espécie humana. Ou seja, através da regularidade da solicitação desta modalidade de atividade física a cada refeição, o *Homo sapiens* exigiria a máxima performance na busca pelo alimento caracterizando assim um organismo exercitado e extremamente preparado. Fazendo um paralelo desta época com estilo de vida moderno temos uma oposição à esta proposta evolução, hoje em dia o dispêndio energético comparado com aquela época é menor. Na capacidade aeróbia a formação regular de EROs centralizaria uma capacidade adaptativa anti-oxidante e maior tolerância contra agentes estressores, ou seja, índices moderados de estresse e/ou dano oxidativo seriam

essenciais na contribuição da homeostase⁹³. Este mesmo autor explica que há a formação e liberação de EROS tanto no efeito agudo do exercício aeróbio quanto no exercício físico aeróbio de alta intensidade e assim como Steinbacher e Eckl (2015) atribui à geração destas espécies a influência de processos celulares que levam a uma aumento na expressão de antioxidantes⁹⁴.

O exercício físico regular promove neuroproteção mais efetiva em déficit de memória associado a isquemia-reperfusão cerebral, já é associado á diminuição de incidência de sepse^{95,96,97}.

Em recente publicação com humanos Jacubowisky e colaboradores (2015) detectaram o efeito reversivo pelo exercício aeróbio moderado em modelo de estresse crônico através de isolamento. Comprovou que a regularidade do exercício elimina o efeito negativo do confinamento em atividade cortical⁹⁸.

Neves e colaboradores (2015) em estudo com animais em modelo de depressão por privação materna atribuiu ao exercício a atenuação de dano a memória de longo e curto prazo pela erradicação ou diminuição de peroxidação lipídica em hipocampo e córtex pré-frontal⁹⁹.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio moderado na prevenção de prejuízos cognitivos em um modelo animal de sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio moderado sobre a memória e aprendizado em animais submetidos à sepse;
- Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico aeróbio moderado sobre o estresse oxidativo em tecido encefálico de animais submetidos a sepse.

3. MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) para o cuidado e o uso de animais de laboratório. A imobilização do animal foi utilizada somente durante os procedimentos necessários, bem como para os tratamentos descritos para os diferentes grupos. Este projeto foi submetido e aprovado (14.027.4.08.IV) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL campus Pedra Branca.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 28 dias de idade provenientes da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS). Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de neurociências experimental (LaNEX) do campus Pedra Branca da Unisul. Os animais permaneceram em caixas com maravalha e receberam ração comercial de alta qualidade. Os animais foram mantidos sob temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controladas (60 a 80%). Foram acondicionados em uma quantidade de 5 animais por caixa em ciclo claro escuro de 12 horas (06h:00min às 18h:00min), alimentação e água foram fornecidos *ad libitum*.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MODERADO

Os experimentos foram conduzidos entre às 11h e 14h, após aclimação dos animais para o laboratório. Ao completarem 28 dias de vida, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos: treinados e não-treinados. Os animais do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de exercício físico de 8 semanas. Antes de realizarem o protocolo, os animais foram habituados durante 5 dias. O protocolo de exercício físico ocorreu em uma esteira de uso humano adaptada para este fim. Durante a ambientação, os animais foram submetidos ao treinamento durante 5 dias a uma intensidade de 10 metros por minuto (m/min) durante 10

minutos. Após a habituação, iniciou-se o protocolo de exercício físico como demonstrado abaixo. Os animais do grupo não treinado foram mantidos em suas caixas durante todo o experimento, não sendo submetidos então ao protocolo de exercício físico aeróbio.

Protocolo de exercício aeróbio moderado.

Semanas	Intensidade	Volume
1	13m/min	15 min
2	“	30 min
3	16m/min	30 min
4	“	45 min
5	19m/min	45 min
6	“	60 min
7	“	75 min
8	“	90 min

Fonte: Elaborada pela autora.

Este protocolo foi adaptado mimetizando um treinamento físico regular incremental baseado no estudo de Speck *et al* (2014) onde os animais realizaram corrida por 5 dias com intervalo de 2 dias sempre no mesmo horário¹⁰⁰. Era caracterizado pelo incremento ou de intensidade ou de volume a cada semana.

3.4 INDUÇÃO DA SEPSE

Após o término do protocolo de exercício físico, os animais foram mantidos no biotério e quando alcançaram 88 dias de vida e foram submetidos à sepse após 24 horas do último dia de treinamento. A técnica consistiu em uma única administração subcutânea de 1µg/kg de Lipopolissacarídeo (LPS 0111:B4 *E. Coli* – Sigma Aldrich, Brasil). O LPS foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) estéril. Os animais do grupo controle (PBS) receberam apenas PBS.¹⁰¹

Após a indução, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos ($n = 10$): 1) PBS + não exercitado; 2) PBS + exercitado; 3) LPS + não exercitado; 4) LPS

+ exercitado. Eles retornaram para caixa no biotério, nela permanecendo até o décimo dia após a indução de sepse. Após os 10 dias de indução de sepse, os camundongos foram submetidos aos testes de Memória de Habituação (Teste de habituação em campo aberto) e Memória Aversiva (Teste de esQUIVA inibitória). Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados sendo o córtex pré-frontal, estriado, hipocampo, cerebelo e córtex removidos e armazenados no freezer (-80°C) para análises posteriores de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 EsQUIVA inibitória

Para avaliação de memória aversiva foi realizado o teste de esQUIVA inibitória consistindo em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1cm. Uma plataforma com 7cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e mensurado o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Caso o animal não saia da plataforma após três minutos será removido desta e anotado tal comportamento. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo levado para descer (latência), porém não é administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste serão de 24 horas para memória de longa duração¹⁰².

3.5.2 Habituação ao campo aberto

Para a avaliação de memória de habituação foi realizado o teste de habituação em campo aberto desenvolvido em uma câmara de campo aberto medindo 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 40 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados de iguais dimensões marcados por linhas pretas. Na sessão de treino,

os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas são denominadas de cruzamentos e significam a atividade motora. O número de elevações são denominadas de levantamentos e significam a atividade exploratória ambos foram avaliados em teste e em treino¹⁰³.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Mensurações de Estresse Oxidativo

3.6.1.1. *Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

Como índice de peroxidação lipídica foi medido a concentração de TBARS tecidual encefálico durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito por Wayne e Daniel¹⁰⁴. As amostras obtidas foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,067%, fervidas por 15 minutos, e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm com auxílio do espectrofotômetro tendo como unidade de medida nmol/mg proteína.

3.6.2 *Medida do dano oxidativo em proteínas*

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito por Drapper e Hadley (1990)¹⁰⁵. Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas em adição de ácido tricloroacético 20% e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). O conteúdo dos grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm com auxílio do espectrofotômetro.

3.6.3 Atividade de Tióis Livres

As amostras foram precipitadas com TCA a 10%, centrifugado, e o sobrenadante foi adicionada a DTNB (5,599 -ditiobis-2-nitrobenzóico - 1,7 M) e

Tampão Tris-HCl (30 mM, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético ácido-3 mM de EDTA, pH 8,9). Os resultados foram expressos em Tiol ($\epsilon = 1.4156104 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) em nmol / mg de proteína¹⁰⁶.

3.6.2.4 Dosagem de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (1951)¹⁰⁷ e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

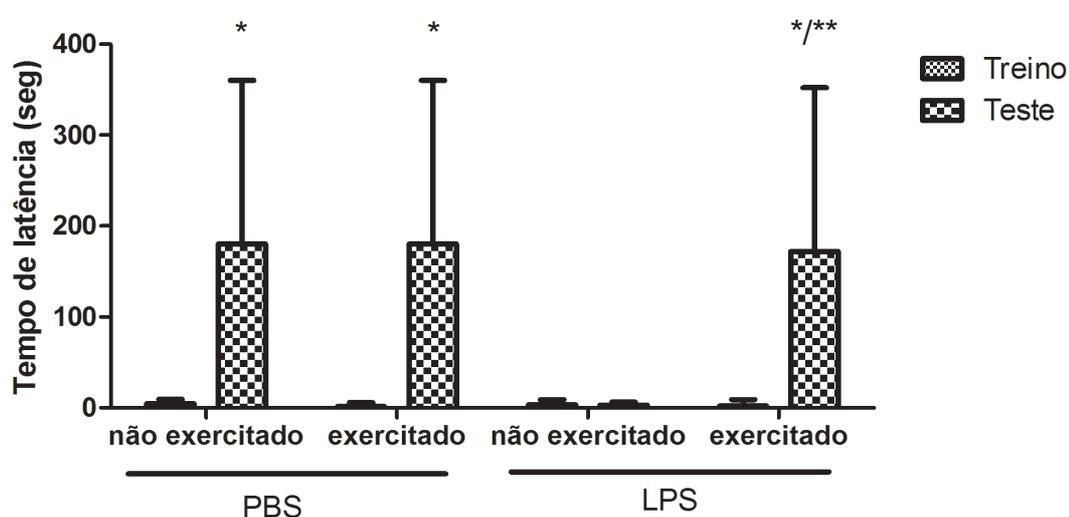
Após a coleta dos dados foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para caracterização dos dados. Como os dados foram paramétricos, os resultados foram apresentados como a média e desvio-padrão. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando o valor de p foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Memória e aprendizado

A Figura 1 demonstra os dados obtidos após os testes de esquila inibitória, para avaliar memória aversiva (painel A) habituação ao campo aberto. Na figura 1B se observa o comportamento de memória de habituação em animais submetidos ou não a sepse após um protocolo incremental de exercício aeróbio.

A)



B)

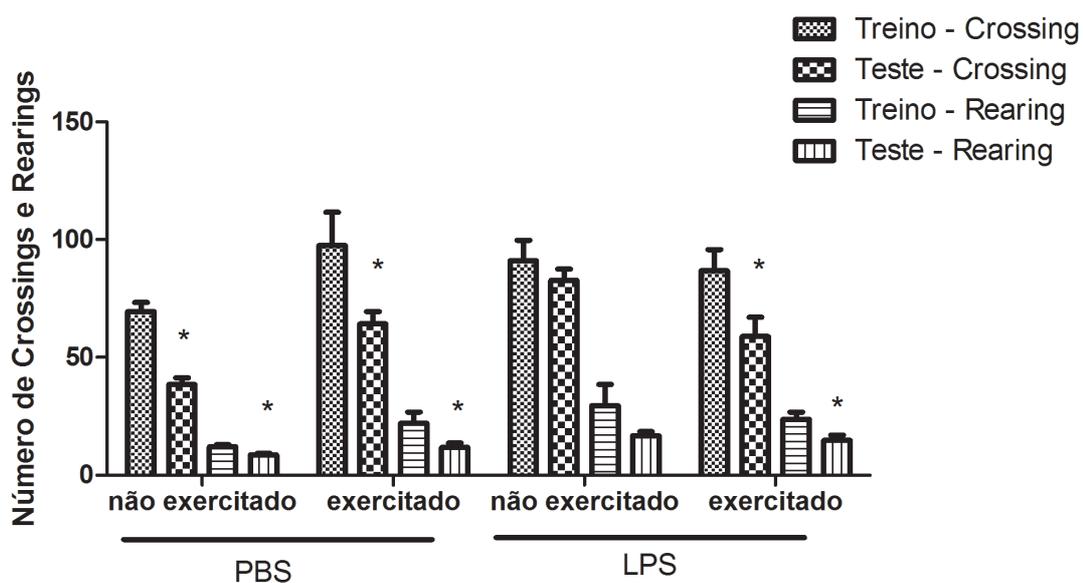


Figura 1. Teste de memória e aprendizado através dos testes de esquiva inibitória (1A) e habituação ao campo aberto (1B). Dados expressos em mediana e desvio interquartil (1A) e média e erro da média (1B). * $p < 0.05$ vs treino.

Pode-se observar na Figura 1A que os animais que não realizaram o protocolo de exercício físico aeróbio e foram submetidos a sepse não apresentaram um aumento significativo no tempo de latência na sessão teste, não havendo diferença estatisticamente significativa entre treino e teste, ou seja, houve prejuízo cognitivo neste grupo. Entretanto, nos animais submetidos ao protocolo em estudo e submetidos a sepse, pode-se observar que houve diferença no tempo de latência entre treino e teste, não havendo mais comprometimento cognitivo, ou seja, o protocolo de exercício físico aeróbio foi capaz de prevenir o comprometimento da memória aversiva nestes animais. A Figura 1B, demonstra os dados obtidos no teste de habituação ao campo aberto. Pode-se observar que houve diferença estatística nos animais não-exercitados do grupo PBS no teste em comparação ao treino. No grupo LPS dos animais exercitados, houve diferença estatística comparando-se o número de levantamentos no teste em relação ao treino, ou seja, no grupo onde houve indução da sepse o protocolo de exercício aeróbio utilizado possibilitou nestes animais uma proteção contra o dano em memória de habituação. Ficou clara a familiarização destes animais com a arena de campo aberto demonstrando que a intervenção aplicada teve um efeito benéfico contra comprometimento deste tipo de memória.

Não houve diferença estatística entre treino e teste tanto no número de cruzamentos como no número de levantamentos nos animais não-exercitados submetidos a sepse por LPS. Este resultado indica que este grupo apresentou dano e teve prejuízo neste tipo de memória pois aquele ambiente não fora reconhecido. Este comportamento indica que estes animais não aprenderam, pois percorreram e encararam a arena como se não a tivessem explorado anteriormente, caso contrario haveria diferença no teste em relação ao treino.

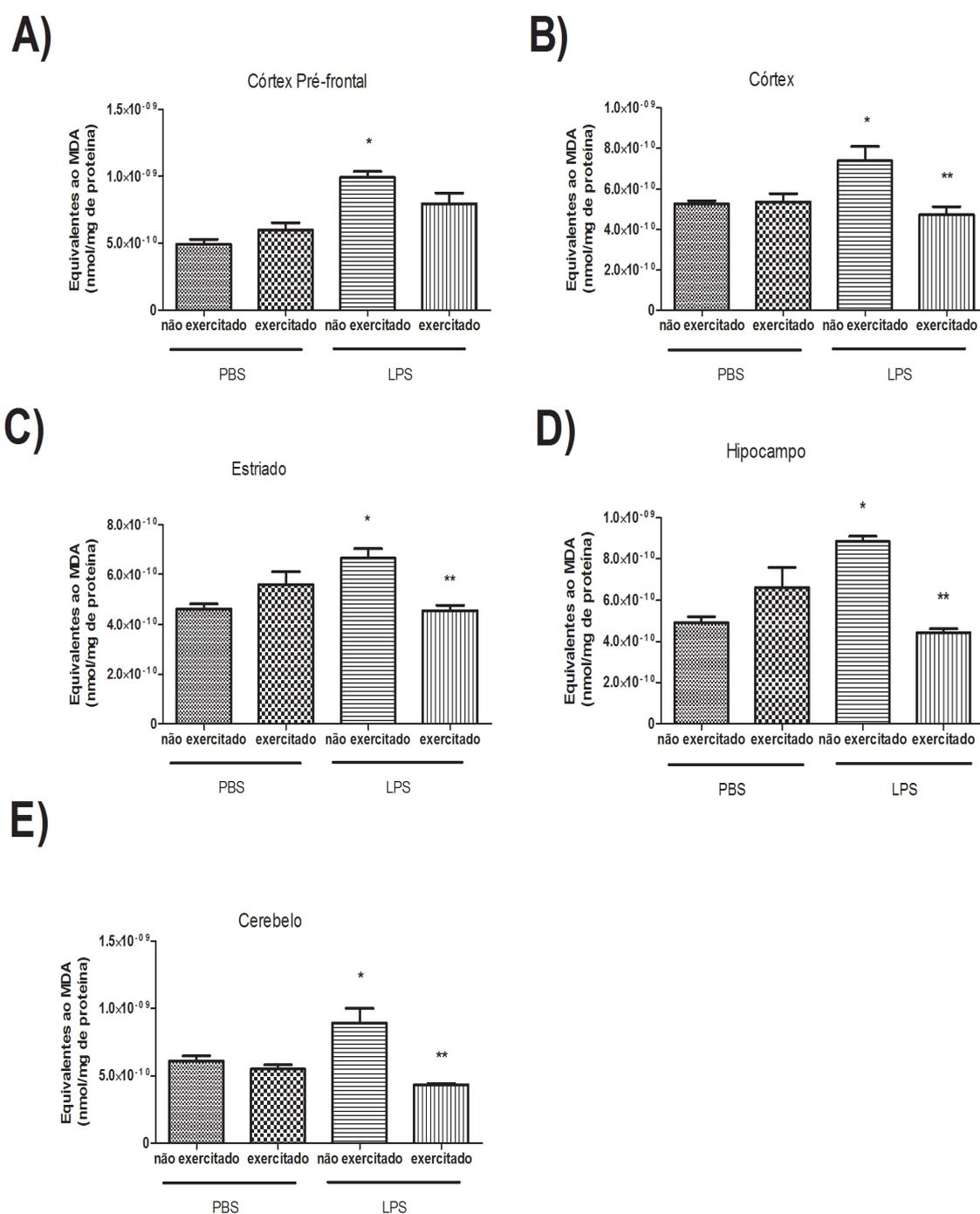


Figura 2. Teste de TBARS mensurados em nmol/kg de proteína em CórTEX Pré-frontal (A), CórTEX (B), Estriado (C), Hipocampo (D) e Cerebelo (E) respectivamente. Dados expressos em média e erro da média. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo PBS não exercitado. ** $p < 0,05$ quando comparado com o grupo LPS não exercitado

A Figura 2 A mostra que no córtex pré-frontal os animais do grupo não-exercitado LPS apresentaram uma concentração maior de MDA quando

comparados ao grupo PBS não-exercitado. Comprovando que a indução da sepsé gera peroxidação lipídica nesta área do SNC. Nas figuras 2B-E é observado a mesma reação em tecido encefálico destas áreas, ou seja o aumento da concentração de MDA indica aumento das EROS caracterizando a ocorrência de peroxidação lipídica em córtex, estriado, hipocampo e cerebelo nos animais não-exercitados LPS. Os grupos de animais exercitados LPS das figuras 2B, 2C, 2D e 2E apresentaram diferença estatística quando comparados aos animais não-exercitados destas mesmas áreas (respectivamente: Córtex, estriado, hipocampo e cerebelo). A concentração de MDA nos animais exercitados destes grupos demonstra que o protocolo de exercício aeróbio utilizado influenciou diretamente na diminuição da sua formação. Houve portanto um efeito positivo do exercício contra o dano oxidativo em todas as áreas do SNC analisados com exceção do córtex pré-frontal.

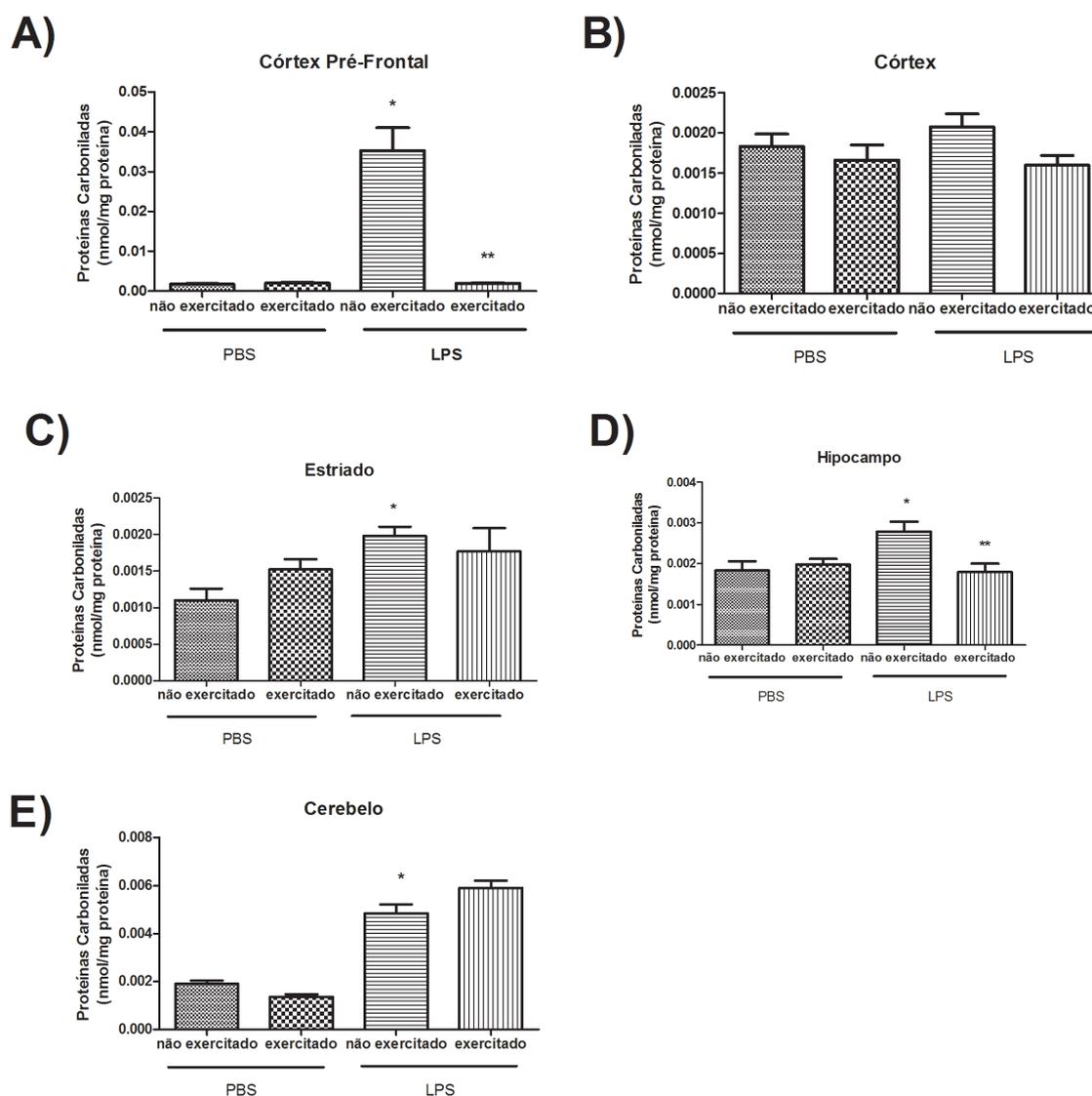


Figura 3: Teste de Carbonilação de proteínas representadas pela concentração de Proteínas Carboniladas em nmol/mg de proteína em Córtex Pré-frontal (A), Córtex (B), Estriado (C), Hipocampo (D) e Cerebelo (E) respectivamente. Dados expressos em média e erro da média. * $p < 0,05$.

As figuras 3A, 3C, 3D e 3E mostram que no córtex Pré-frontal, Estriado, Hipocampo e Cerebelo os grupos não-exercitados LPS apresentaram maior concentração de proteínas carboniladas quando comparado ao grupo PBS não-exercitado demonstrando que em tecido neural de animais não-exercitados submetidos á sepse por esta técnica apresentam carbonilação de proteínas. Nas figuras 3 A e 3D se observa nos animais LPS exercitados quando comparados ao grupo não exercitado uma menor concentração de proteínas carboniladas.

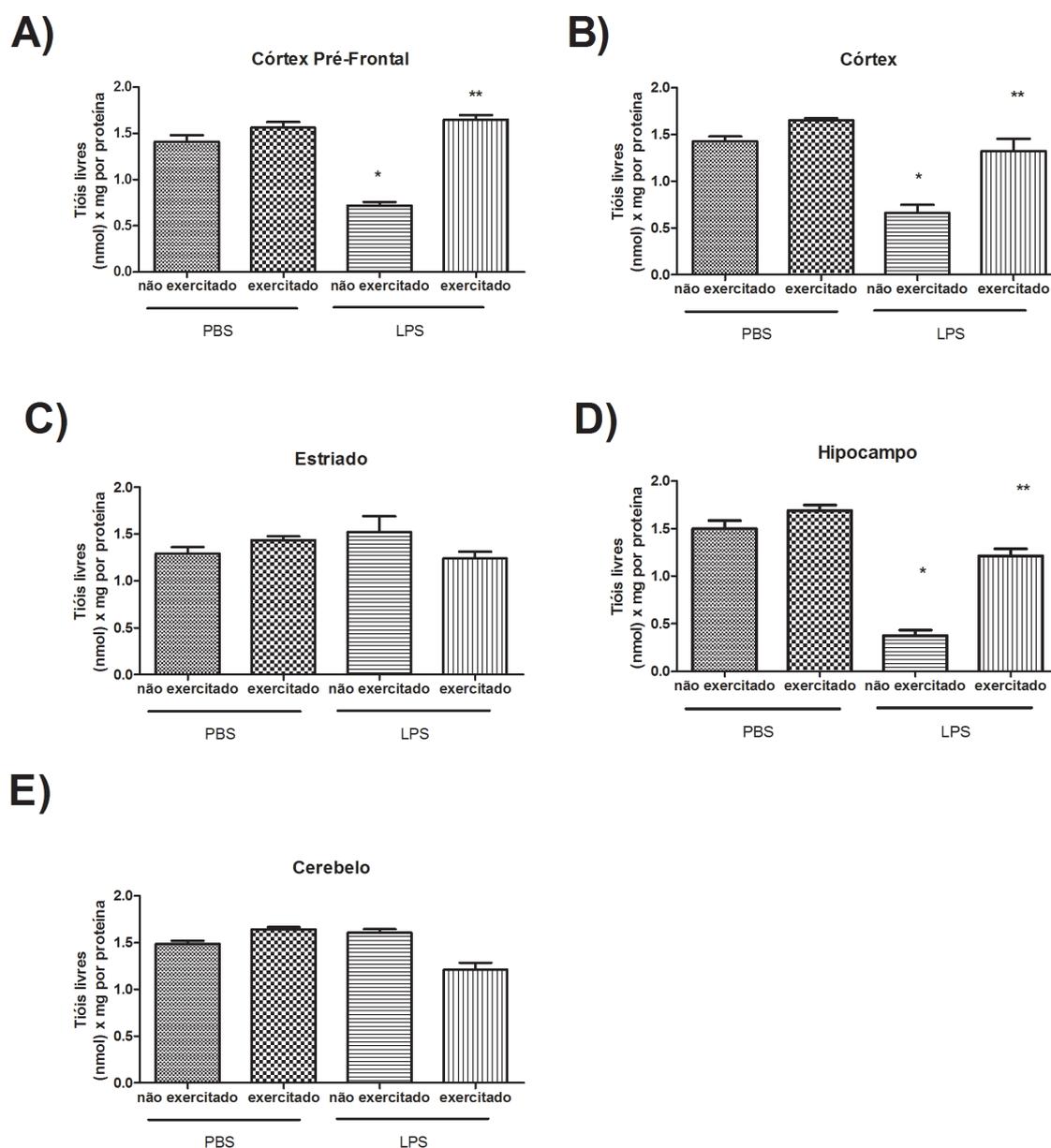


Figura 4: Tíois livres expressados em nmol/mg de proteína. Dados expressos em média e erro da média. * $p < 0,05$ LPS não exercitado vs PBS não exercitado. ** $p < 0,05$ LPS exercitado vs LPS não exercitado.

As figuras 4 A e B mostram que houve aumento estatisticamente significativo da atividade antioxidante quando comparado animais não-exercitados vs exercitados do grupo LPS, ou seja, o exercício físico teve um efeito positivo nestas estruturas analisadas. E quando se compara o grupo de animais não-exercitados LPS vs animais não-exercitados PBS tanto de córtex pré-frontal e córtex fica nítida a diminuição estatisticamente significativa de tíois livres.

5. DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos da sepse sobre a memória e estresse oxidativo no tecido encefálico em animais submetidos previamente a um protocolo de exercício físico aeróbio moderado de oito semanas. Foi verificado que os animais exercitados e submetidos à sepse não apresentaram comprometimento da memória e do aprendizado e, após as análises bioquímicas, apresentaram menores concentrações de MDA no córtex total, hipocampo, estriado e cerebelo; proteínas carboniladas diminuídas em córtex total e hipocampo e aumentadas concentrações de tióis livres em córtex pré-frontal e córtex total, quando comparados com animais não exercitados submetidos à sepse.

O dano cognitivo, incluindo prejuízo na atenção, memória e funções cognitivas são a maior causa de disfunções tardias na sepse¹⁰⁷. Translacionalmente, foi verificado que pacientes sobreviventes à sepse, a longo prazo, apresentam sintomas neurológicos como: depressão maior, ansiedade, dificuldade de concentração e déficits de atenção, além de prejuízo na memória e aprendizado^{7,108}. Em um modelo animal de sepse por CLP foi mostrado que o comprometimento da memória e do aprendizado persistem por até 30 dias após a submissão de sepse, mesmo após a remissão do processo infeccioso e inflamatório⁹. Semmler e colaboradores (2007) utilizou o modelo de LPS e verificou comprometimento cognitivo em até 90 dias após a indução¹⁰⁹.

Neste contexto, está bem estabelecido na literatura que o estresse oxidativo é uma das principais causas do comprometimento da memória⁵⁰. No processo da sepse, Barichello e colaboradores (2007) demonstraram que a administração n-acetilcisteína e deferoxamina em animais submetidos a sepse por CLP reduziu significativamente o comprometimento da cognição, 10 dias após a indução da sepse. Além disso, o mesmo estudo também constatou uma diminuição do dano oxidativo e aumento das defesas antioxidantes em tecido encefálico 24h após a indução. O estresse oxidativo também faz parte do espectro do envolvimento do encéfalo no processo da sepse. Tem sido demonstrado dano pelo estresse oxidativo em 24 horas, 10 dias e até 30 dias após a indução por CLP^{50,11,53}. Isso tem sido observado por Liu e colaboradores (2014) que submeteram animais ao CLP e encontraram um aumento de MDA, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e redução de enzimas antioxidantes como SOD e CAT no soro e hipocampo¹¹⁰.

No presente estudo observou-se que animais submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio moderado durante oito semanas e submetidos a sepse por LPS, não apresentaram comprometimento da memória e presença de estresse oxidativo após 10 dias da indução da sepse. Outros estudos, utilizando diferentes intervenções a fim de intervir no estresse oxidativo também obtiveram resultados interessantes. Liu e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento com a inalação de hidrogênio foi capaz de reduzir o dano oxidativo (MDA) e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, bem como aumentar as enzimas antioxidantes em hipocampo¹¹⁰. Tem sido descrito na literatura o papel de alguns antioxidantes como acetil-cisteína, algumas vitaminas e estatinas^{89,90,91}. Convergiendo com Ritter et al., 2004 que verificou em órgãos periféricos uma redução do dano oxidativo após o tratamento com antioxidantes clássicos em um modelo animal de CLP¹¹¹. Estudos desta natureza validam os modelos animais de sepse mostrando que potenciais tratamentos podem diminuir ou reverter os danos bioquímicos gerados.

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que não houve proteção ao dano em todas as áreas encefálicas consideradas. Considerando TBARS somente em córtex pré-frontal não houve diminuição de MDA, considerando-se diminuição de proteínas carboniladas não ocorreu em estriado, córtex pré-frontal e cerebelo. E nas áreas hipocampo, estriado e cerebelo os níveis de tióis livres não aumentaram.

Antigamente era relacionado ao cerebelo somente a função de regulação da coordenação motora, mas hoje há consenso que esta estrutura encefálica não se restringe em atuar somente na construção do movimento, mas pelas conexões com córtex cerebral também participa de funções cognitivas, emocionais, espaciais, linguagem e memória de trabalho^{112,113}. Analisando o impacto do exercício regular na morfologia de células Purkinje cerebelares, Huang e colaboradores 2012 verificaram uma melhora na performance motora e aumento da arborização dentrítica cerebelar¹¹⁴.

Assim, no presente estudo se observou que a sepse induzida pelo LPS prejudicou a memória e paralelamente se encontrou aumentado dano a lipídios e proteínas no cerebelo dos animais. No entanto, este dano oxidativo foi menor (MDA) no cerebelo dos animais que foram submetidos ao protocolo de exercício físico.

A partir desta divergência de achados em algumas áreas podemos refletir se os animais exercitados não obtiveram nenhum grau de resistência nesta áreas

contra o insulto séptico, pois mesmo a mensuração ter sido feita de forma isolada sabe-se que tanto a velocidade de difusão quanto a reatividade em tecido encefálico é grande neste microambiente e somando-se a isso a repercussão metabólica da glutatona livre. Será que o protocolo de exercício utilizado através da otimização da interação neuronal em rede é que repercutiu em função encefálica e performance cognitiva? Qual outro processo não considerado por nós explicaria o resultado esperado do comportamento? Essas reflexões sugerem novos estudos com mensurações de outros testes para ser avaliada a real dimensão da contribuição do exercício aeróbio moderado no papel protetor destes danos, como por exemplo testes verificando imuno-histoquímica, neuroimagens entre outros.

Neste sentido, tem sido demonstrado em humanos e roedores que o exercício físico regular proporciona e mantém benefícios para o organismo, além de reduzir o risco de doenças cardiovasculares⁶⁹, metabólicas⁷⁰, obesidade⁷¹, osteoporose⁷³, câncer⁷². Também tem sido observado aumento de resistência contra insultos encefálicos, estimulação da neurogênese, plasticidade neuronal, e contribuição para aprendizado e memória¹⁶. Os resultados do presente estudos corroboram com a literatura, por evidenciar que animais submetidos a um protocolo de exercício físico incremental apresentam menores danos oxidativos em estruturas encefálicas responsáveis pelo processamento da memória e aprendizado, como o hipocampo e o córtex¹⁶.

Na literatura, encontra-se efeitos benéficos do exercício físico frente a hipotrofia muscular, peroxidação lipídica e dano à proteína em tecido muscular de animais submetidos a sepse por CLP¹⁷. Entende-se que os efeitos biológicos produzidos pelo exercício físico são mediados por diversos mecanismos neurobiológicos⁷⁵ que depende fundamentalmente de contrações do músculo esquelético. A contração muscular *per se* aumenta o gasto calórico bem como a produção de EROs e conseqüentemente leva à ativação de mecanismos endógenos antioxidantes que neutralizam o excesso de EROs impedindo a sua ação. Essa reação é o indício da adaptação induzida pelo exercício protagonizada pelas EROs⁶⁶. No presente estudo demonstrou-se que o exercício físico restabeleceu a memória e aprendizado e paralelamente observou-se que reduziu o dano oxidativo em estruturas encefálicas responsáveis pelas funções comportamentais analisadas.

Está bem estabelecido na literatura que durante o exercício físico ocorre um processo de adaptação que envolve a ativação do sistema antioxidante, o qual reduz

a produção e ação dessas espécies, que por sua vez influenciam fatores de transcrição genética e síntese protéica. Desta forma, a produção de EROs por meio do exercício físico de intensidade baixa ou moderada leva a adaptação celular.

O que ocorre neste processo hormético se resume em grande parte ao pré-condicionamento mitocondrial pelo exercício. Indivíduos exercitados apresentam hipertrofia mitocondrial e aumento do número de mitocôndrias em tecido muscular. Nesses organismos a reação anti-oxidante é proporcional ao resultado do desequilíbrio redox, a neutralização das espécies reativas é, portanto, realizada de forma mais eficaz. Em contra-partida, quando indivíduos sedentários realizam exercício físico agudamente produzem prejuízos em células, tecidos e sistemas, pois quando não há treinamento gradual a ação detoxificante do organismo é menos efetiva¹¹⁵

A resposta orgânica bioquímica induzida pelo exercício físico é então (ao menos em parte) determinada por enzimas antioxidantes⁹². Estes sistemas intrínsecos têm sido mensurados em diversos estudos como indicadores de dano oxidativo. A expressão da SOD se comporta como dose dependente, ou seja, quanto maior a intensidade do exercício físico maior sua concentração em tecido muscular¹⁷. Geralmente acompanhada da Mn SOD, e finalmente a atividade da glutathione redutase que também aumenta após exercício aeróbio diferente da CuZn SOD que apresenta modestas variações durante o exercício. As concentrações da CAT flutuam apresentando reação por vezes inconsistente. A condição do exercício físico aeróbio, portanto é decisiva para pró-atividade destes sistemas a ponto de sua prática prevenir o estresse oxidativo até mesmo em situações patológicas²⁷.

Apesar de não ter sido avaliado neste estudo, já está bem estabelecido que a realização de exercício regular aumenta as concentrações de BDNF encefálicas. Neste sentido, é atribuído a este fator neurotrófico o papel de mediar os efeitos do exercício físico na cognição em nível molecular, principalmente no encéfalo adulto onde ocorre o fenômeno chamado de neurogênese hipocampal adulta em que estes novos neurônios são altamente responsivos ao exercício físico^{116,117}. Além disso, recentes estudos têm demonstrado direta relação do BDNF com estresse oxidativo onde encontrou-se que concentrações aumentadas de BDNF estão relacionados com a redução do dano oxidativo e aumento das enzimas antioxidantes¹¹⁸. Assim, sugere-se que os efeitos do exercício físico observados no presente estudo possam ter sido mediados pelo aumento de BDNF induzido pelo protocolo de exercício físico

realizado. No entanto, como não foi realizada a dosagem de BDNF nas estruturas encefálicas analisadas, sugere-se para futuros estudos a mensuração desta neurotrofina afim de caracterizar outro mecanismo neurobiológico do presente protocolo.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal compreender o papel do exercício físico aeróbio moderado considerando parâmetros indicadores de dano oxidativo e testes comportamentais em um modelo animal de sepse induzido por LPS. Através da realização do protocolo de exercício a memória e o aprendizado foram preservados sendo parcialmente justificados pelos resultados de análises bioquímicas quando comparados aos animais não-exercitados. Talvez a explicação da preservação das habilidades comportamentais pela proteção contra o dano cognitivo a longo prazo não se restrinja somente aos efeitos do estresse oxidativo verificados no tecido encefálico.

Sugere-se a partir desses resultados a realização de novos estudos utilizando o mesmo protocolo, mas avaliando outros parâmetros como por exemplo: inflamatórios, neurogênicos, sinaptogênicos, angiogênicos, imunohistoquímicos, morfológicos e concentrações de SOD e CAT. Com a finalidade de expandir o conhecimento acerca das influências do exercício sobre o SNC, verificando a ação isolada e/ou conjunta dessas outras vias e cascatas acredita-se que se possa compreender melhor a proteção contra o dano cognitivo a longo prazo em estudo experimental de sepse.

REFERÊNCIAS

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, 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* 1992; 101: 1644–1655.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303–10.
3. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al., Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Disease*. 2015 May;15(5):581-614.
4. Instituto latino Americano de sepse [homepage da internet] COSTS [acessado em 23 de junho de 2014]. Disponível em: <http://www.ilas.org.br>
5. Sogayar AM, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CM, Lobo SM, et al., Costs Study Group - Latin American Sepsis Institute A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(5):425-34.
6. Taniguchi LU, Bierrenbach AL, Toscano CM, Schettino GP, Azevedo LC. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Crit Care*. 2014 Nov 5;18(6):608
7. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010 Oct 27;304(16):1787-94.
8. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir Med*. 2015 Jan;3(1):61-9.
9. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivor rats. *Crit Care Med*. 2010 May;38(5):1276-83.
10. Tuon L, Comim CM, Antunes MM, Constantino LS, Machado RA, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Care Med*. 2008 Dec;33(12):2165-7.

11. Comim CM, Constantino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-pizzol F. Aversive memory in sepsis survivors rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2011 Feb;118(2):213-7.
12. Batle C.E., Davies G, Evans PA Long term health related quality of life in survivors of sepsis in south west wales: an epidemiological study. *Plos one* 2014
13. Adhikari NK, Fowler RA, Bahgwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010 Oct 16;376 (9749):1339-46.
14. Lee H, Doig CJ, Ghali WA, et al. Detailed cost analysis of care for survivors of severe sepsis. *Crit Care Med*. 2004;32:981–985.
15. Segers J, Hermans G, Bruyninckx F, Meyfroidt G, Langer D, Gosselink R. Feasibility of neuromuscular electrical stimulation in critically ill patients. *J Crit Care*. 2014 Dec;29(6):1082-8.
16. Cameron S, Ball I, Cepinskas G, Choong K, Doherty TJ, Ellis CG, Martin CM, Mele TS, Sharpe M, Shoemaker JK, Fraser DD. Early mobilization in the critical care unit a review of adult and pediatric literature. *J Crit Care*. 2015 Aug;30(4):664-72.
17. Parry SM e Putschucheari ZA 2015 The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment.
18. Klaus F, Amrein I. Running in laboratory and wild rodents: differences in context sensitivity and plasticity of hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res*. 2012 Feb 14;227(2):363-70.
19. Coelho CW, Jannig PR, Souza AB, Fronza H Jr, Westphal GA, Petronilho F, Constantino L, Dal-Pizzol F, Ferreira GK, Streck EE, Silva E. Exercise training prevents skeletal muscle damage in an experimental sepsis model. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Jan;68(1):107-14.
20. Souza-Dantas VC, Póvoa P, Bozza F, Soares M, Salluh J. Preventive strategies and potential therapeutic interventions for delirium in sepsis. 2016 Jun 3:1-13.
21. Vincent JL, Marshall JC. *Surviving Sepsis: a guide to a guidelines*. *Critical Care* 2008; 12 (3): 162.
22. Banta JE, Joshi KP, Beeson L, Nguyen HB. Patient and hospital characteristics associated with inpatient severe sepsis mortality in California, 2005-2010. *Crit Care Med*. 2012 Nov;40(11):2960-6.

23. Pedersen BK, Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:6
24. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006 Mar 14;174(6):801-9.
25. Sachdeva A, Kumar K, Anand KS. Non Pharmacological Cognitive Enhancers – Current Perspectives. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(7):01-06
26. Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Golduroz RF. Physical exercises modulates peripheral levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2013;56:10-5.
27. Kaur J, Garnawat D, Bhatia MS, Sachdev M. Rehabilitation in Alzheimer's disease. *Delhi Psychiatry J*. 2013;16:166-70.
28. Jayakody K, Gunadasa S, Hosker C. Exercise for anxiety disorders: systematic review. *Br J Sports Med*. 2014;48:187–96.
29. Karamanou M, Panaiayiotakopolus G, Tsoucalas G, Kousoulis AA, Androutsos G. From miasmas to germs: a historical approach to theories of infectious disease transmission. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnóstica clínica e terapia delle patologie infettive* .2012 Mar; 20(1): 58-62.
30. Magno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *The journal of infectious diseases*. 1991 may;163(5):937-45.
31. Jacobs ER e Bone RC. Clinical indicators in sepsis and septic adult respiratory distress syndrome. *the medical clinics of north america*. 1986 jul;70(4):921-32.
32. Sibbald WJ, Marschall J, Cristou N, Girotti M, Mcomarck D, Rostein O, et al. "sepsis "clarify of existing terminology...or more confusion ? *Critical care medicine*. 1991 aug;19(8):996-8.
33. 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* 1992 Jun; 101 (6): 1644-55.
34. Vincent JL, Opal SM, Marschall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions :time for a change. *Lancet*. 2013 Mar 2; 381 (9868):774-5.

35. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):20-6.
36. Marshall JC. The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model: toward a staging system for acute illness. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):27.
37. Daniels R, Nutbeam T, McNamara G, Galvin C The Sepsis Six and the Surviving Sepsis Campaign Resuscitation Bundle: a prospective observational cohort study. *EMJ* 2012 28:507–12.
38. Porto JP, Mantese OC, Arantes A, Freitas C, Gontijo Filho PP, Ribas RM. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Jul-Aug;45(4):475-9.
39. Einloft PR1, Garcia PC, Piva JP, Bruno F, Kipper DJ, Fiori RM A sixteen-year epidemiological profile of a pediatric intensive care unit, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2002 Dec;36(6):728-33
40. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.
41. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? *Rev Bras Psiquiatr*. 2014 Sep;36(3):251-8.
42. Schulte W1, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;165974:1-16
43. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front Immunol*. 2015 Aug 20;6:404.
44. Xie GH, Chen QX, Cheng BL, Fang XM. Defensins and sepsis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:180109.
45. Hoffmann JA. The immune response of drosophila. *Nature*. 2003Nov 6: 426 (6962) :33-8.
46. Barichello T, Generoso JS, Milioli G, Elias SG, Teixeira AL. Pathophysiology of bacterial infection of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behavioral changes. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2012 Nov;35:081-087.
47. Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in the septic brain. *Curr Neurovasc Res*. 2009 Aug;6(3):194-203.

48. Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, Schein RM, Wilson MF, Sheagren JN, Hinshaw LB. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med*. 1990 Aug;18(8):801-6
49. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res*. 2010 Apr;17(3):279-86.
50. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Jun;40(6):831-7.
51. Ritter C, Tomasi CD, Dal-Pizzol F, Pinto BB, Dyson A, de Miranda AS, Comim CM, Soares M, Teixeira AL, Quevedo J, Singer M. Inflammation biomarkers and delirium in critically ill patients. *Crit Care*. 2014 May 23;18(3):R106.
52. Mina F, Comim CM, Dominguni D, Cassol-Jr OJ, Dall Igna DM, Ferreira GK, Silva MC, Galant LS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. I1- β involvement in cognitive impairment after sepsis. *Mol Neurobiol*. 2014 Apr;49(2):1069-76.
53. Steckert AV, Comim CM, Mina F, Mendonça BP, Dominguni D, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Vieira JS, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. *Synapse*. 2013 Nov;67(11):786-93.
54. Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, Comim CM, Quevedo J, Kapczinski F, Dal-Pizzol F. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock*. 2013 Jul;40(1):45-8.
55. Ferreira ALA e Matsubara LS Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo *Rev ass Med Brasil* 1997;43(1): 61-8.
56. Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, Mann GE, Radi R, Roberts LJ 2nd, Vina J, Davies KJ Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med*. 2015 Jan;78:233-5.
57. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journ of Neuro*. 2006;97:1634-1658.

58. Barbosa FB, De Medeiros MHG e Augusto O. Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and Knockout animals? *Quim. Nova* 2008 vol 29, no 6, 1352-1360.
59. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(9-10):916–921.
60. Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, Foyer CH. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal*. 2010;431(2):169–178.
61. Wayne W, Daniel CL. *Cross Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*, 2013.
62. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*. 1990;186:421-431.
63. Karapetsa M, Pitsika M, Goutzourelas N, Stagos D, Tousia Becker A, Zakyntinos E. Oxidative status in ICU patients with septic shock. *Food Chem Toxicol*. 2013 Nov;61:106-11.
64. Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochem Res*. 2010 Jan;35(1):1-12.
65. 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 May;39 Suppl 1:10-6.
66. Lorente L, Martín MM, López-Gallardo E, Blanquer J, Solé-Violán J, Labarta L, Díaz C, Jiménez A, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Decrease of oxidative phosphorylation system function in severe septic patients. *J Crit Care*. 2015 Jun 10.
67. Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:90-107.
68. Pitanga FLG. Epidemiologia, atividade física e saúde. *Rev. Bras. Ciên. e Mov*. 2002;10(3).
69. Sindi S, Calov E, Fokkens J, Ngandu T, Soininen H, Tuomilehto J, Kivipelto M. The CAIDE Dementia Risk Score App: The development of an evidence-based mobile application to predict the risk of dementia. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2015 Jul 2;1(3):328-33.
70. Perez-Terzic CM. Exercise in cardiovascular diseases. *PM R*. 2012;4(11):867-73.

71. Davis B, Moriguchi T, Sumpio B. Optimizing Cardiovascular Benefits of Exercise: A Review of Rodent Models. *Int J Angiol.* 2013;22(1):13-22.
72. Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56(4):465-72.
73. Levine JP. Identification, diagnosis, and prevention of osteoporosis. *Am J Manag Care.* 2011;17(6):170-176.
74. Focht BC, Clinton SK, Devor ST, Garver MJ, Lucas AR, Thomas-Ahner JM, et al. Resistance exercise interventions during and following cancer treatment: a systematic review. *J Support Oncol.* 2013;11(2):45-60.
75. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;174(6):801-809.
76. Newcomb LW, Koltyn KF, Morgan WP, Cook DB. Influence of preferred versus prescribed exercise on pain in fibromyalgia. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;43(6):1106-13.
77. Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Dos Santos UD, Speckhann B, Gadotti VM, et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain.* 2010;11(12):1384-93
78. Camiletti-Moirón 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.
79. Klaus F, Amrein I. Running in laboratory and wild rodents: differences in context sensitivity and plasticity of hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2012 Feb 14;227(2):363-70.
80. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985 Mar-Apr;100(2):126-31.
81. de Araujo GG, Papoti M, Dos Reis IG, de Mello MA, Gobatto CA. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2012 Mar;112(3):839-52
82. Booth FW, Laye MJ, Spangenburg EE Gold standards for scientists who are conducting animal-based exercise studies. *J Appl Physiol (1985).* 2010 Jan;108(1):219-21.

83. Apple FS, Billadello JJ. Expression of creatine kinase M and B mRNAs in treadmill trained rat skeletal muscle. *Life Sci.* 1994;55(8):585-92.
84. Zhou Q, Dohm GL. Treadmill running increases phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 30;236(3):647-50.
85. Vina J, Gomez-Cabrera MC. Free radicals and physical exercise. *Free Radic Res.* 2014 Jan;48(1):1-2.
86. Tanaka LY, Bechara LR, dos Santos AM, Jordão CP, de Sousa LG, Bartholomeu T, Ventura LI, Laurindo FR, Ramires PR. Exercise improves endothelial function: a local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide.* 2015 Feb 15;45:7-14.
87. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. Inadequate exercise as a risk factor for sepsis mortality. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58
88. Radak. Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW e Goto S. Exercise oxidative stress and hormesis. *ageing Research Reviews.* 2007,5,1-9.
89. Gomez-cabrera MC, Salvador-Pascual Andrea, Cabo H, Ferrando B, Viña J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise: Does antioxidant supplementattion blunt the benefits of exercise training? *Free radical biology and medicine.* 2015, 86, 37-46.
90. Macedo RC, Vieira A, Marin DP, Otton R. Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test--a placebo-controlled, double blind study. *Chem Biol Interact.* 2015 Feb 5;227:89-95.
91. Cogley JN, McHardy H, Morton JP, Nikolaidis MG, Close GL. Influence of vitamin C and vitamin E on redox signaling: Implications for exercise adaptations. *Free Radic Biol Med.* 2015 Jul;84:65-76.
92. Passos E, Ascensão A, Martins MJ, Magalhães J. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metabolism.* 2015 Jul;64(7):780-92.
93. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013 Out;18:1-39.

94. Stenbacher P e Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 2015,5,356-377.
95. Gomes FG, Gomes Da Silva S, Cavalheiro EA, Arida RM. Beneficial influence of physical exercise following status epilepticus in the immature brain of rats. 2014 Aug 22;274:69-81.
96. Schimidt HL, Vieira A, Altermann C, Martins A, Sosa P, Santos FW, Mello-Carpes PB, Izquierdo I, Carpes FP Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. *Neurobiol Learn Mem.* 2014 Oct;114:242-50.
97. Williams PT. Dose-response relationship between exercise and respiratory disease mortality. *Med Sci Sports Exerc.* 2014 Apr;46(4):711-7.
98. Jacubowski A, Abeln V, Vogt T, Yi B, Choukèr A, Fomina E, Strüder HK, Schneider S. The impact of long-term confinement and exercise on central and peripheral stress markers. *Physiol Behav.* 2015 Dec 1;152(Pt A):106-11.
99. Neves BH, Menezes J, Souza MA, Mello-Carpes PB. Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. *Physiol Behav.* 2015 Dec 1;152(Pt A):99-105.
100. Speck AE, Tromm CB, Pozzi BG, Paganini CS, Tuon T, Silveira PC, Aguiar AS Jr, Pinho RA. The dose-dependent antioxidant effects of physical exercise in the hippocampus of mice. *Neurochem Res.* 2014 Aug;39(8):1496-501.
101. Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, Coogan AN. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun.* 2015 Jan;43:98-109.
102. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):635-6.
103. Vianna MR1, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000 Sep-Oct;7(5):333-40.
104. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 1994;79:583-593.

105. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of lowdensity
Methods Enzymol. 1994;233:425-41.
106. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with
the Folin phenol reagent. J BiolChem. 1951;193:265-75.
107. Whitnall L, McMillan TM, Murray GD, Teasdale GM. Disability in young people
and adults after head injury: 5-7 year follow up of a prospective cohort study. J
Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006 May;77(5):640-5.
108. P.P. Pandharipande, T.D. Girard, J.C. Jackson, et al. Long-term cognitive
impairment after critical illness. N Engl J Med, 369 (14) (2013), pp. 1306–1316).
109. Semmler A1, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T,
Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical
cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. Exp Neurol.
2007 Apr;204(2):733-40. Epub 2007 Jan 13.
110. L. Liu, K. Xie, H. Chen, et al. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury
in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation,
oxidative stress and neuronal apoptosis Brain Res, 1589 (2014), pp. 78–92.
111. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol
F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against
oxidative stress and improves survival in sepsis. Crit Care Med. 2004
Feb;32(2):342-9.
112. Schmammann JD. An emerging concept: the cerebellar contribution to higher
function. Arch Neurol. 1991;48:1178–87.
113. Stoodley CJ, Schmammann JD. Functional topography in the human
cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. NeuroImage.
2009;44:489–501.
114. Tung-Yi Huang, Lung-Sheng Lin, Keng-Chi Cho, Shean-Jen Chen, Yu-Min
Kuo, Lung Yu, Fong-Sen Wu, Jih-Ing Chuang, Hsiun-ing Chen, Chauying J. Jen
Chronic treadmill exercise in rats delicately alters the Purkinje cell structure to
improve motor performance and toxin resistance in the cerebellum Journal of
Applied Physiology Published 15 September 2012 Vol. 113 no. 6, 889-895
115. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of
skeletal muscle adaptation. Cell Metab. 2013 Feb 5;17(2):162-84.

116. Berchtold NC, Kesslak JP, Cotman CW. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. *J Neurosci Res.* 2002 Jun 1;68(5):511-21.
117. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 2007 Sep;30(9):464-72.