

EFEITO PROTETOR DE DIFERENTES MODELOS DE TREINAMENTO FÍSICO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS AO LIPOPOLISSACARÍDEO

FABIANA OLIVEIRA DOS SANTOS¹; MATHEUS PINTANEL FREITAS²; NICOLE GOMES GONZALES³; NATAN FETER⁴; AIRTON JOSÉ ROMBALDI⁵

¹*Universidade Federal de Pelotas – fabisul4@gmail.com*

²*Faculdade Anhanguera de Pelotas – matheus.pintanel@hotmail.com*

³*Faculdade Anhanguera de Pelotas – nicolegomesgonzales@yahoo.com.br*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – natanfeter@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – ajrombaldi@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente em bactérias gram-negativas (WANG; QUINN, 2010), considerado um fator determinante para o desenvolvimento de diversas condições patológicas (ANGUS et al., 2001; LITTLEFIELD et al., 2015) muito em função de uma resposta pró-inflamatória exacerbada e generalizada (RIETSCHEL et al., 1994).

Por outro lado, o exercício e a atividade física, têm se mostrado como fatores relevantes para a prevenção e tratamento de várias doenças, principalmente aquelas crônico-degenerativas (WHO, 2010). Grande parcela dessas doenças estão associadas à inflamação sistêmica de baixo grau (DANDONA et al., 2004), o que pode explicar em parte o efeito do movimento sobre essas disfunções, pois sabe-se que a atividade física, e principalmente o exercício físico (EF), determinam um conjunto de efeitos agudos e crônicos anti-inflamatórios (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Tendo isso em mente, é possível hipotetizar que efeitos crônicos da atividade/EF têm grande chance de influenciar a imunomodulação do organismo, de modo a protegê-lo contra os efeitos deletérios do LPS. Porém, até o presente momento, foram encontrados apenas doze estudos que administraram LPS após um período de treinamento físico, sendo que destes, apenas quatro interviram com EF (GONÇALVES et al., 2012; CHEN et al., 2010; KATO et al., 2006; RAMOS et al., 2010) e o restante com atividade física. Além disso, o único modelo de exercício pesquisado foi o contínuo de intensidade leve a moderada, não existindo estudos com outros tipos de exercício, como o intermitente de alta intensidade. Finalmente, nenhum desses estudos com EF utilizou a temperatura corporal como desfecho principal, sendo essa uma das alterações características da resposta imune e indispensável para monitorar a progressão da doença (MEI et al., 2018). No caso de camundongos C57BL/6, há uma alteração marcada no sentido da hipotermia (MEI et al., 2018).

Em virtude disso, este estudo objetivou comparar os efeitos crônicos protetores de diferentes modelos de exercício físico sobre a temperatura corporal, em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à indução de inflamação sistêmica por LPS.

2. METODOLOGIA

Trata-se de estudo experimental de modelo pré-clínico, onde foram utilizados 30 camundongos fêmeas adultas (110 dias de idade) da espécie C57BL/6, divididas de forma aleatória entre os grupos de experimentação (10 animais por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas e mantidos em condições experimentais controladas com água e comida “ad libitum”,

distribuídos em gaiolas contendo quatro animais cada e com o ciclo claro/escuro de 12 h.

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

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: controle (sedentário) (n=10), exercício intermitente de alta intensidade (HIIT) (n=10) e exercício contínuo de intensidade moderada (contínuo) (n=10). O treinamento ocorreu durante cinco dias na semana, por seis semanas consecutivas.

A intensidade dos exercícios foi baseada no estudo de Schefer e Talan (1996) em que camundongos C57BL/6 chegaram à exaustão à velocidade de 25 m/min, sendo essa a velocidade correspondente ao consumo máximo de oxigênio ($vVO_{2\max}$). Devido ao fato que essa linhagem é considerada isogênica (SEONG et al., 2004), sua compatibilidade genética é muito próxima de 100%, sendo plausível utilizar os resultados do estudo acima (SCHEFER; TALAN, 1996) para predizer a $vVO_{2\max}$ de outros camundongos C57BL/6.

Com isso, os animais do grupo HIIT se exercitaram em esteira própria para roedores onde nos dias ímpares, realizaram quatro esforços de 30 segundos de duração a uma intensidade correspondente a 100% da $vVO_{2\max}$ (i.e.: 25 m/min), separados por intervalos de 60 segundos. Alternadamente, nos dias pares, os animais se exercitaram realizando três esforços de três minutos a uma intensidade correspondente a 90% da $vVO_{2\max}$ (i.e.: 22 m/min), separados por intervalos de 60 segundos. Todos os intervalos foram realizados de forma ativa a 68% da $vVO_{2\max}$ (i.e.: 17 m/min) em ambas intensidades.

Os camundongos do grupo contínuo iniciaram a uma intensidade de 80% da $vVO_{2\max}$ (i.e.: 20 m/min) com duração de 20 minutos ininterruptos. O princípio da sobrecarga foi exercido pelo aumento na duração e do número de esforços nos grupos contínuo e HIIT, respectivamente. O grupo sedentário também foi exposto a manipulação e ao equipamento em que ocorreu o treinamento, porém sem realizar o exercício.

Setenta e duas horas após a última sessão de treinamento físico, foi administrada uma injeção intraperitoneal de LPS proveniente da bactéria *Escherichia coli* (055:B5) obtida pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O LPS foi dissolvido em soro fisiológico sendo utilizada a dosagem de 250 µg/kg. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a indução de LPS, através de anestesia profunda e perfusão transcardíaca,

Verificou-se a temperatura corporal dos animais no momento prévio à administração do LPS e em três momentos posteriores à administração (uma, seis e 12 horas após) através de um termômetro infravermelho modelo FR1DZ1 da marca G-Tech.

Utilizou-se o software estatístico STATA 12.0 para análise dos dados. Inicialmente utilizou-se o teste de Shapiro-wilk para verificar a distribuição das variáveis. A temperatura corporal foi analisada de modo intra-grupo por uma ANOVA de medidas repetidas, seguindo o *post-hoc* Tukey HSD e utilizando o valor *p* da correção de Greenhouse-Geisser. As variáveis foram expressas em média \pm erro padrão (EP). Os resultados foram considerados significativos para *p* < 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

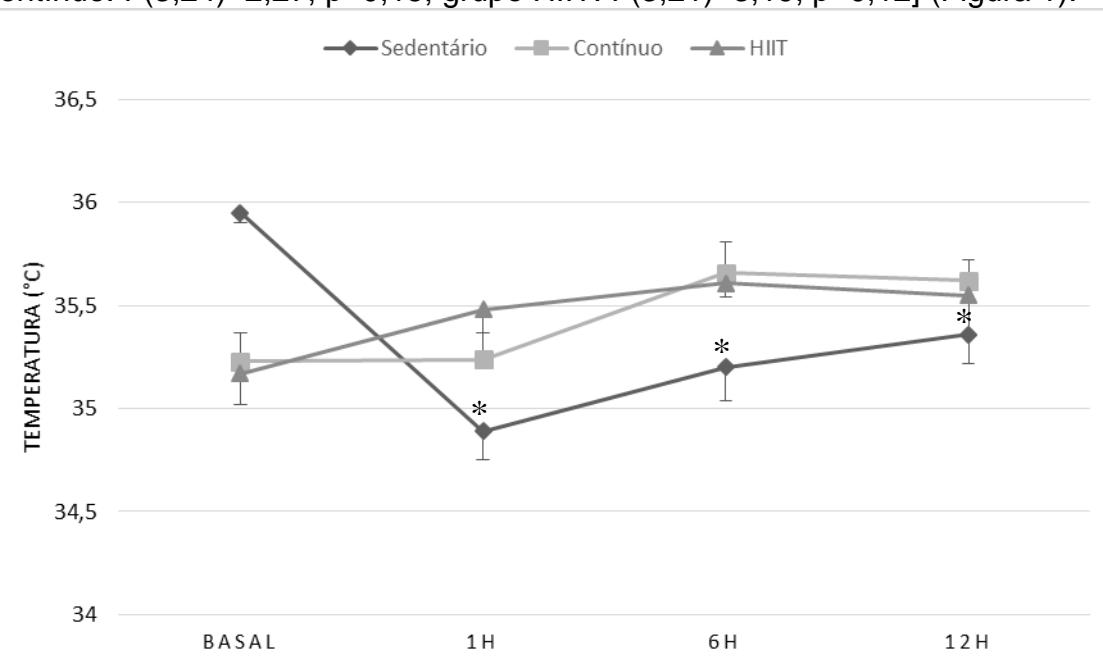


Figura 1. Temperatura corporal no momento pré-injeção de LPS (basal), uma hora (1H), seis horas (6H) e 12 horas (12H) pós-injeção de LPS. * Diferença intragrupo estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação à medida basal (valor p referente à correção de Greenhouse-Geisser do modelo da ANOVA de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

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

Em contrapartida, Rowsey et al. (2006) realizaram um estudo com ratas fêmeas da linhagem Sprague Dawley que, após oito semanas de atividade física em roda livre para roedores, receberam uma injeção de 50 μ g de LPS por kg de peso. Essa linhagem quando submetida ao LPS apresenta uma resposta febril. Os autores concluíram que o exercício físico aumentou os efeitos pirogênicos do LPS. Uma possível explicação sobre a diferença de resultados entre as pesquisas, é que no estudo de Rowsey et al. (2006) os ratos voltaram a se exercitar imediatamente após a injeção de LPS e em nosso estudo, os camundongos ficaram em repouso. Como já é sabido, o exercício físico causa um efeito agudo de elevação da temperatura corporal (FENN, 1924), o que, junto com os efeitos pirogênicos do LPS, pode explicar a maior elevação do grupo exercitado quando comparado ao grupo sedentário.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que seis semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento intermitente de alta intensidade foram igualmente suficientes para prevenir a queda de temperatura advinda da administração de LPS em camundongos C57BL/6, significando que ambos são eficientes como forma de combater um dos sintomas mais característicos do LPS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Wang X, Quinn PJ. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, 1st edn. Netherlands: Springer Netherlands; 2010.
- 2- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303–1310.
- 3- Gonçalves CTR, Gonçalves CGR, Almeida FM, et al. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care*. 2012;16(5):R199.
- 4- Peppler WT, Anderson ZG, Sutton CD, Rector RS, Wright DC. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310:R934–R942.
- 5- Littlefield AM, Setti SE, Priester C, Kohman RA. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. *J Neuroinflammation*. 2015;12:138.
- 8- Rietschel ET, Kirikae T, Shcade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994;8:217-225.
- 10- World Health Organization. *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. Geneva: World Health Organization, 2010.
- 13- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25:4–7.
- 18- Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005;98:1154-1162.
- 20- Chen MF, Chen HI, Jen CJ. Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(12):2173-2179.
- 23- Kato T, Kaneko S, Kimizuka R, Okuda K. Periodontopathic bacterial endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production was inhibited by exercise in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47(2):262-266.
- 27- Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(1):113-119.
- 28- Rowsey PJ, Metzger BL, Carlson J, Gordon CJ. Effects of chronic exercise conditioning on thermal responses to lipopolysaccharide and turpentine abscess in female rats. *Arch Toxicol*. 2006;80(2):81-87.
- 29- Mei J, Riedel N, Grittner U, Endres M, Banneke S, Emmrich JV. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Scientific Reports*. 2018;8:3526.
- 33- Fenn WO. The relation between the work performed and the energy liberated in muscular contraction. *J Physiol*. 1924;58(6):373-395.
- 52- Schefer V, Talan MI. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp Gerontol*. 1996;31(3):387-392.
- 54- Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends in Genetics*. 2004;20(2):59-62.