

Eduardo Alves da Silva

**INFLUÊNCIA DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO
EM CAMUNDONGOS FÊMEA COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

São Paulo

2019

Eduardo Alves da Silva

**INFLUÊNCIA DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO
EM CAMUNDONGOS FÊMEA COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Mario Arida

Co-orientadores:

Profa. Dra. Beatriz Monteiro Longo

Dr. Jansen Fernandes

São Paulo

2019

Alves da Silva, Eduardo

Influência de um programa de exercício físico resistido em camundongos fêmea com doença de Alzheimer / Eduardo Alves da Silva. - São Paulo, 2018.

Xiii, 54f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Neurologia/Neurociências.

Título em inglês: Influence of a resistance exercise program on female mice with Alzheimer's disease.

1. Exercício resistido. 2. Doença de Alzheimer. 3. Camundongo transgênico. 4. Placa amiloide. 5. Memória.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA E NEUROCIÊNCIAS

Chefe do Departamento de Fisiologia da UNIFESP:

Prof. Dra. Eliane Beraldi Ribeiro. Departamento de Fisiologia da UNIFESP.

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Neurologia e Neurociências:

Profa. Dra. Célia Tengan - UNIFESP

EDUARDO ALVES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO
RESISTIDO EM CAMUNDONGOS FÊMEA COM DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Banca examinadora:

Profa. Dra. Hanna Karen Moreira Antunes

Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva

Prof. Dr. Victor Alexandre Ferreira Tarini

Suplentes:

Profa. Dra. Juliana Carlota Kramer Soares

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Mário Arida;
À memória de meus pais, Sidnei Alves da Silva e Ivone de Souza Silva;
À minha amada companheira, Melissa Fernanda da Costa.
À meu filho Jhonatan.

Dedico a vocês este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Ricardo Mario Arida que sempre esteve acessível durante a produção desse trabalho. A quem tenho muita admiração por sua conduta ética e profissionalismo exemplar.

A meus co-orientadores Profa. Dra. Beatriz Monteiro Longo e Dr. Jansem Fernandes por seu essencial apoio para elaboração dessa obra.

À Deus o criador do universo e de tudo que nele há. Aquele que permitiu minha existência. Minha humilde e sincera adoração!

À meu pai Sidnei Alves da Silva que me ensinou a ser persistente diante das dificuldades que a vida impõe.

À minha mãe que esqueceu si para cuidar de mim e me mostrar o que é amar incondicionalmente.

À minha querida esposa Melissa, por seu amor e apoio durante esta jornada com tantos desafios.

Aos amigos que em diversos momentos me apoiaram: Alexandre Aparecido de Almeida, Diego Vannucci Campos e Glauber Menezes Lopim que em diversos momentos me apoiaram e compartilharam conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Aluno bolsista da CAPES.

Agradeço ao auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Aumento de força	34
FIGURA 2: Atividade exploratória e comportamento do tipo-ansioso	35
FIGURA 3: Efeitos do treinamento resistido sobre a memória de longo prazo	37
FIGURA 4: Análise quantitativa de βA	38
FIGURA 5: Marcação de βA	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Protocolo de treinamento resistido	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DA: Doença de Alzheimer

FAD: *Doença de Alzheimer Familiar (Familial Alzheimer's Disease)*

DSM-V: *Diagnóstico and Statistical Manual of Mental Disorders* – 5º edição

APP: Proteína precursora amilóide

kDa: kilodalton

βA: Proteína beta-amilóide

MCI: Comprometimento neurocognitivo leve

GSK3β: Enzima glicogênio sintase quinase

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

AVD: Atividades de vida diária

IL-6: Interleucina-6

TrkB: Tirosina Kinase B (*receptor*)

BDNF: Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain derived neurotrófic factor*)

IGF-1: Fator de crescimento insulínico

IGF-1R: Receptor do fator de crescimento insulínico

2xTg-AD: Camundongos duplo-transgênicos

APPSWE/PS1DE9: camundongos fêmeas duplo-transgênicos (2xTg-AD) para a mutação APPSWE/PS1dE9

PSEN1: presenilina 1

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

CEDEME: Centro de desenvolvimento de modelos experimentais para medicina e biologia

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

MRI: Ressonância magnética estrutural e funcional

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Fisiopatologia da doença de Alzheimer	16
1.2 Exercício físico no envelhecimento	18
1.3 Exercício físico aeróbio na demência e DA.....	20
1.4 Exercício físico resistido na demência e DA	21
1.5 Mecanismos neurobiológicos do exercício resistido na DA.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1 Sujeitos experimentais.....	25
3.2 Protocolo de treinamento com exercício resistido	25
3.3 Teste de campo aberto	27
3.4 Teste de labirinto em cruz elevado	27
3.5 Teste de reconhecimento de objetos	28
3.6 Perfusão e fixação dos encéfalos	29
3.7 Técnica de Imunohistoquímica	30
3.8 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. ANEXOS.....	54

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente funções relacionadas à memória e cognição. A prevalência da doença é maior em mulheres do que em homens. As principais regiões comprometidas na DA são o hipocampo e o córtex pré-frontal, devido à deposição de placas beta-amilóide (β A) e de emaranhados neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada. Considerando os déficits cognitivos e a ausência de um tratamento eficaz para a DA, a atividade física tem emergido como uma alternativa de tratamento complementar para prevenir ou retardar a progressão da doença. Apesar de vários estudos com humanos e animais mostrarem que o exercício aeróbio promove importantes alterações no cérebro, o impacto do exercício físico resistido na DA não está bem esclarecido.

Objetivo: Verificar as alterações comportamentais e morfológicas induzidas pelo exercício físico resistido em camundongos fêmea transgênicos para a DA. **Material e Métodos:** Foram utilizados camundongos fêmea APPSWE/PS1dE9, modelo amiloidogênico e seus respectivos selvagens Alzheimer negativos, distribuídos em 4 grupos: Naive/Controle e DA/Controle (sem treinamento) e Naive/Exercício e DA/Exercício (submetidos a protocolo de treinamento resistido - escalada em escada com uso de pesos) por quatro semanas. A atividade locomotora e exploratória foi analisada pelo teste de campo aberto. O comportamento do tipo ansioso foi realizado pelo teste de labirinto em cruz elevado. A memória de longo prazo (LTM) foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos. A visualização da deposição de placas β A no córtex e hipocampo foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica. **Resultados:** O treinamento físico resistido aumentou progressivamente a força ($p < 0,01$) e a atividade locomotora ($p = 0,01$) nos grupos Naive/Exercício e DA/Exercício. Não houve diferença no comportamento do tipo ansioso entre os grupos. O prejuízo cognitivo (LTM) observado nos animais com Alzheimer foi revertido pelo programa de exercício físico resistido ($p < 0,01$). Uma redução significativa de placas β A foi observada no córtex motor ($p = 0,003$) e no hipocampo dorsal ($p = 0,028$) dos animais com DA/exercício. **Conclusões:** O programa de treinamento de resistido foi capaz de melhorar o desempenho cognitivo e de diminuir o número de placas β A no hipocampo e no córtex de camundongos com DA.

Palavras-chave: Exercício resistido; doença de Alzheimer; camundongos transgênicos; placa amilóide.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease that primarily affects functions related to memory and cognition. The prevalence of the disease is higher in women than in men. The major brain regions affected during the course of AD are the hippocampus and the prefrontal cortex due to the deposition of beta-amyloid plaques (β A) and neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated Tau protein. Considering cognitive deficits and the absence of an effective treatment for AD, physical activity has emerged as an alternative of complementary treatment to prevent or delay the progression of the disease. Although several studies with humans and animals show that aerobic exercise promotes important changes in the brain, the impact of resistive physical exercise on AD is not well understood. **Objective:** To verify the behavioral and morphological changes induced by physical resistance exercise in transgenic female mice for AD. **Methodology:** Female mice APPSWE/PS1dE9, amyloidogenic model and their respective wild Alzheimer negative, were distributed into 4 groups: Naive/Control and DA/Control (without training) and Naive/Exercise and DA/Exercise (submitted to resistance training protocol - climbing on ladder with weights) for four weeks. Locomotor and exploratory activity was analyzed by the open field test. The anxious type behavior was performed by the high cross maze test. Long-term memory (LTM) was evaluated by the object recognition test. The visualization of the deposition of β A plaques in the cortex and hippocampus was performed by the immunohistochemistry technique. **Results:** Resisted physical training progressively increased strength ($p < 0.01$) and locomotor activity ($p = 0.01$) in Naive/Exercise and AD/Exercise groups. There was no difference in anxiety type behavior between the groups. The cognitive impairment (LTM) observed in Alzheimer's animals was reversed by the resisted physical exercise program ($p < 0.01$). A significant reduction of β A plaques was observed in the motor cortex ($p = 0.003$) and in the dorsal hippocampus ($p = 0.028$) of animals with AD / exercise. **Conclusions:** The resistance training program was able to improve cognitive performance and to decrease the number of β A plaques in the hippocampus and in the cortex of mice with AD.

KEYWORDS: Resistance exercise; Alzheimer disease; transgenic mice; amyloid plaques.

1. INTRODUÇÃO

A população mundial de idosos compreende quase 900 milhões de pessoas das quais 70% vivem em países de baixa e média renda. Atualmente são 47 milhões de pessoas no mundo vivendo com demência. A taxa de mortalidade entre pessoas mais velhas está reduzindo e a expectativa de vida aumentando a partir dos 60 anos de idade em todo o mundo. Estima-se que a prevalência de pessoas vivendo com demência em 2030 será de 74 milhões e em 2050 de 131 milhões de casos. (Prince et al., 2016a). O custo mundial estimado de gastos com a demência em 2016 foi de 818 bilhões de dólares (Prince et al., 2016a).

A doença de Alzheimer (DA) é a maior causa de demência, representando 60 a 80% dos casos (Alzheimer Association, 2009). A DA pode ser hereditária, conhecida como *Familial Alzheimer's Disease* (FAD), ou de início precoce, acometendo de 5 a 15% dos pacientes com idade entre 40 a 50 anos. Outra forma conhecida da doença, a de início tardio, é a mais frequente em indivíduos com idade acima de 60 anos, a qual o principal fator de risco é a idade (Alzheimer's Association, 2010).

Em um estudo no Reino Unido mostrou uma prevalência da DA de 16,4% para homens e 29,6% mulheres entre 70 e 79 anos, aumentando para 48,8% e 75,0% para 90 anos ou mais (Bartelt, 2012). Uma revisão sistemática conduzida por Prince et al. (2015) mostrou uma maior prevalência da DA para mulheres 64 a 75% em diversas regiões do mundo.

A principal característica clínica da DA é a perda progressiva de memória episódica, memória primária e memória processual que pode inicialmente estar ou não associada a outro déficit cognitivo, como dificuldade na comunicação e linguagem e alterações comportamentais, como irritabilidade, depressão, distúrbios do sono, agitação, agressividade, compulsão alimentar ou anorexia (Shinosaki, Nishikawa e Takeda, 2000). O paciente pode apresentar redução da função executiva que compreende habilidades integradas que permitem ao indivíduo traçar planos, metas e resolver conflitos, sendo que essas alterações conduzem o indivíduo a uma perda gradativa da independência para execução das atividades da vida diária como trabalhar, interagir socialmente e cuidar de si mesmo (Prince et al., 2016b).

As alterações cognitivas e comportamentais envolvidas na doença tornam os pacientes cada vez mais frágeis e dependentes, necessitando de assistência familiar e de cuidadores em período integral. Com a evolução do quadro, estes indivíduos podem ficar acamados ou necessitar de hospitalização, gerando elevados custos para a família e serviços de saúde (Lopez, 2011).

O diagnóstico da doença ocorre mediante avaliação clínica e aplicação de testes neuropsicológicos específicos com escalas que fornecem indicações funcionais do estado cognitivo do paciente, além de exames de sangue e imagem. Desta forma, a doença é classificada como Alzheimer “possível” ou “provável” e a confirmação do diagnóstico de Alzheimer “definitivo” só poderá ser realizada após análise histopatológica no tecido cerebral *post mortem* (APA, 2013). Clinicamente os critérios para classificação mais utilizados são os que se encontram no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* – 5ª edição (DSM-V, 2014). Após a detecção da doença, a expectativa de vida do paciente varia de 10 a 15 anos (Abreu et al., 2005).

1.1 Fisiopatologia da doença de Alzheimer

Na DA os neurônios gradativamente deixam de funcionar adequadamente e morrem, perdendo conseqüentemente conexão com outros neurônios. Esse fenômeno é evidenciado primeiro em regiões específicas do cérebro como hipocampo, amígdala e córtex entorrinal que estão diretamente envolvidos com o processo de memória e evolui promovendo processo degenerativo no neocórtex de associação, atingindo áreas de associação motora e sensorial envolvidas no raciocínio, linguagem e funções executivas (Shinosaki et al., 2000; Duyckaerts et al., 2009; Zec e Burkett, 2008).

Os aspectos estruturais e comportamentais comuns na doença ocorrem em consequência das diversas alterações moleculares envolvidas na complexa fisiopatologia da DA. Uma dessas alterações é a formação de peptídeos amilóides tóxicos que ocorrem pela quebra alterada de uma proteína de membrana denominada proteína precursora amiloide (APP) (Gralle e Ferreira, 2007) que forma um fragmento com menor peso molecular de aproximadamente 4kDa contendo entre 40 ou 42 aminoácidos (β A 40-42), que se agrega facilmente e resulta na oligomerização e

formação de placas senis extracelulares que podem explicar a degeneração que ocorre gradualmente na doença (Glennner, 1984; Braak et al., 1999, Dubois et al, 2010).

O acúmulo desses peptídeos no meio extracelular formam as chamadas placas senis, ou placas beta-amilóide, que são caracterizadas por aglomerados extracelulares com formato esférico e compostos por βA , astrócitos e micróglia (Dickson, 1997). Essa é a hipótese da cascata amilóide que tem predominado nas pesquisas nos últimos vinte anos (Karran et al., 2011).

Estudos mostraram que as placas senis podem induzir a ativação da micróglia que resulta na liberação de mediadores inflamatórios, promovendo morte neuronal (Datwani et al., 2009). Estudos mostram uma redução no número de sinapses e redução do volume hipocampal em pacientes com comprometimento cognitivo leve (MCI) em consequência do aumento extracelular do peptídeo beta-amilóide, promovendo alterações significativas em testes comportamentais (Scheff et al., 2006; Scheff et al., 2007).

Outra importante alteração molecular é a da proteína Tau, que em condições normais é responsável pela estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto dos neurônios. Essa proteína quando hiperfosforilada promove a desestabilização dos microtúbulos, prejudicando assim a circulação de nutrientes e neurotransmissores do soma ao axônio do neurônio. Além disso, a proteína Tau hiperfosforilada se agrega formando os emaranhados neurofibrilares intracelulares que são neurotóxicos (Mattson, 2004; Jack et al., 2010; Jack et al., 2013). A hipótese é de que o aumento extracelular do peptídeo βA -42 promova a hiperfosforilação da Tau, através da ativação exacerbada da enzima glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β), que se desliga dos microtúbulos e se agrega, formando filamentos helicoidais intracelulares neurotóxicos (Pérez et al., 2002; Braak et al., 1994).

Macroscopicamente, na DA há uma atrofia bilateral do lobo temporal mesial, representada pela redução do volume hipocampal, do cíngulo posterior, da amígdala e do córtex entorrinal, além de acentuada atrofia cortical com aparente alargamento dos sulcos nos lobos frontais, temporais e parietais (Braak e Braak, 1991; Kosik, 1992; Frisoni et al, 2010; Jack et al., 2010; Jack et al., 2013; Lee et al., 2014; Chai, 2007).

No tratamento farmacológico da DA são usados inibidores de acetilcolinesterase (donepezil, rivastigmina, galantamina) e antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (memantina), além de drogas para controle de aspectos comportamentais e psíquicos como os antidepressivos, neurolépticos e ansiolíticos (Palmer et al., 2011).

A DA é uma patologia neurodegenerativa e progressiva que apresenta elevada taxa de mortalidade. Trata-se de um grave problema de saúde pública com elevado impacto social e econômico (Winblad et al., 2016). Não existe um tratamento efetivo para a doença, portanto a utilização de programas de exercício físico pode funcionar como alternativa para melhora da qualidade de vida e dos déficits cognitivos observados na doença (Mayer et al., 2011; Coelho et al., 2013; Hernandez et al., 2010; Vital et al., 2010; Lautenschlager et al. 2008, 2009; Steele et al., 2017; Volpi et al., 2004).

1.2 Exercício físico e envelhecimento

Estudos classificam a inatividade física como um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (Kohl et al., 2012). Idosos diminuem a prática da atividade física, porém o nível de atividade física dos homens tem sido mais alto do que das mulheres (Sun, Norman e While, 2013). Com o avanço da idade, a força muscular reduz progressivamente a partir da quinta década de vida em consequência da diminuição de massa muscular (Janssen et al., 1985) e entre 1,0 a 1,5% ao ano a partir dos 60 anos de idade (Vandervoort e McComas, 1985). Esse processo de redução da força muscular é chamado de sarcopenia (Evans, 1995) e reflete a diminuição de fibras musculares do tipo I e II que ocorre em homens e mulheres (Lexell, 2000; Kallman e Tobin, 1990; Rantanen et al., 1998; Frontera et al., 2000). No entanto, o exercício resistido em homens e mulheres mais velhos, mesmo com mais de 90 anos, promovem hipertrofia muscular nas diversas fibras e a prática por maior tempo pode reduzir a sarcopenia, além disso produz modificações no sistema nervoso (Lexell, 2000).

Estudos clínicos mostram que a prática de exercício físico regular em homens ou mulheres pode reduzir o declínio cognitivo e prevenir as demências em idosos,

além de melhorar as funções cognitivas (Erickson et al., 2011). Outros estudos verificaram que níveis mais elevados de exercício físico estão relacionados à um aumento no volume da substância cinzenta e melhor integridade da substância branca, além de diminuição da atrofia cerebral com consequente diminuição do risco de comprometimento cognitivo e demência em idosos (Erickson et al., 2012; Smith et al., 2014). Essas alterações proporcionadas pelo exercício promovem melhora no funcionamento do sistema nervoso central como redução da depressão (Mammen e Faulkner, 2013), da ansiedade (DeBoer et al., 2012) e melhora no estado de atenção e compreensão da leitura, melhora da memória e do raciocínio, além de proporcionar uma sensação subjetiva de bem-estar nos indivíduos durante e após a prática (Hillman et al., 2008; Erickson et al., 2011).

Estudos com animais idosos mostram que o exercício físico melhora a aprendizagem e memória, diminui a ansiedade, promove plasticidade cerebral como o aumento da proliferação celular, aumento da taxa de angiogênese e do volume hipocampal (Pietrelli et al., 2012; Siette et al., 2013), aumenta a expressão de diversas proteínas de sinalização celular (AKT, mTOR, ERK, CREB e p38) e aumento da expressão de fatores de crescimento (NGF) (Cardoso et al., 2017; Terry, Kutiyawalla e Pillai, 2011).

Os efeitos do exercício físico em animais idosos estão diretamente associados a mecanismos capazes de modular a atividade de neurotransmissores e fatores neurotróficos (Jolitha, Subramanian e Asha, 2008). Por exemplo, o estudo de Marosi et al., (2012) mostrou que um programa de exercício físico melhorou as funções de atenção e memória em ratas idosas, aumentou a expressão de BDNF e ativação das vias PKA, AKT, CREB e MAPK e os níveis de proteínas de ancoragem de neurotransmissores (sinapsina e sinaptofisina). Outros estudos com animais idosos, alterações vasculares, como aumento da expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) na região hipocampal e aumento significativo na densidade de microvasos foram observados após programa de exercício físico (El, Burns e Swerdlow, 2014; Murugesan et al., 2012; Ding et al., 2006). Esses dados sugerem que o exercício físico pode prevenir ou retardar o declínio cognitivo e motor induzido pelo envelhecimento, promovendo mudanças na plasticidade e estrutura sináptica no córtex e hipocampo de ratos idosos (Li et al., 2017; Arnold et al., 2017).

1.3 Exercício físico aeróbio na demência e DA

Em pacientes com DA, já é bem estabelecido a importância do exercício físico aeróbio na melhora ou estabilização dos diferentes sintomas da doença, tais como as disfunções cognitivas, motoras, emocionais e metabólicas (Coelho et al., 2013; Hernandez et al., 2010; Vital et al., 2010; Lautenschlager et al. 2008). Um estudo longitudinal que acompanhou 1740 idosos sem prejuízo cognitivo verificou que os indivíduos que se exercitaram três ou mais vezes por semana durante 6 anos apresentaram melhor desempenho em um instrumento de triagem da habilidade cognitiva baseado em escalas, com menor risco para demência (Larson et al., 2006).

Programas de exercício aeróbio em pacientes com DA induzem a melhora da resistência muscular, da flexibilidade, das atividades de vida diária e reduz declínio funcional (Lautenschlager et al., 2009; Stella et al., 2011; Canonici et al., 2012). Uma intervenção com exercício combinado com treinamento cognitivo promoveu melhora neuropsicológica verificada por escalas específicas que medem a função executiva e memória verbal, além de significativa alteração da conectividade entre regiões do cérebro em indivíduos idosos com MCI (Klados et al., 2016). Outro estudo utilizando um programa de treinamento aeróbico observou um aumento significativo no volume do hipocampo em mulheres mais velhas com provável MCI (Ten Brinke, 2015).

Estudos com modelos animais para a DA têm sido utilizados para entender os mecanismos pelo qual o exercício físico melhora os sintomas da doença. Programas de exercício físico aeróbio com animais transgênicos para a DA, mostram uma melhora da aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris e uma diminuição na deposição de placas β A no córtex e hipocampo, mediado pela diminuição dos fragmentos proteolíticos da APP (Adlard et al., 2005; Moore et al., 2016). Além disso, uma melhora da atividade locomotora e exploratória, com reduções significativas da proteína tau hiperfosforilada na medula espinhal e hipocampo têm sido observados após exercício físico (Ohia-Nwoko, Montazari e Eriksen, 2014; Bayod et al., 2011; Carro et al., 2005). Outros estudos mostram que a atividade voluntária em roda de corrida melhora a resposta imune, pela redução de TNF- α e outros mediadores inflamatórios, com concomitante diminuição de placas amilóides no córtex e hipocampo (Nichol et al., 2008; Parachikova, Nichol e Cotman, 2008).

1.4 Exercício físico resistido na demência e DA

O exercício físico resistido, popularmente conhecido como musculação, exercício com pesos ou de força, é caracterizado pela realização de contrações musculares contra alguma forma de resistência que podem ser pesos, elásticos ou a própria massa do corpo (ACSM, 2009). O exercício resistido é constantemente utilizado por pessoas com e sem doenças crônicas. O exercício resistido tem sido altamente recomendado para a população adulta e idosa (Feigenbaum, 1999; Haskell, 2007), contribuindo na prevenção e tratamento coadjuvante de várias doenças do sistema nervoso (Cassilhas, 2010; Singh, 1997; Singh, 2005). Este tipo de exercício provoca aumento da força, da hipertrofia muscular, da densidade óssea, da flexibilidade e da coordenação motora, melhorando as atividades da vida diária (Little e Phillips, 2009; Kelley, 2000; Morganti et al, 1995; Kohrt et al., 2004; Cassilhas et al., 2010; Kim et al., 2011; Da Silva et al., 2011). Um programa de treinamento resistido com duração de 6 meses aumentou significativamente a força, a massa muscular e a sensação de bem estar em idosos. Além disso, essa modalidade promoveu melhoras significativas das funções cognitivas (Steele et al., 2017; Volpi et al., 2004). Esse tipo de exercício é aplicável em indivíduos idosos com demência e pode representar um modelo para prevenir e reabilitar problemas relacionados à marcha nesta população (Schwenk, 2014). Com o avanço da idade, a perda muscular pode resultar em redução das atividades de vida diária, dependência para execução de tarefas e maior fragilidade. Entretanto, de acordo com os trabalhos acima descritos o exercício resistido pode melhorar esse prognóstico.

Poucas investigações têm sido realizadas com o exercício resistido na DA. Estudos em humanos mostram que a prática de exercício físico resistido reduz o risco de declínio cognitivo (Sofi et al., 2011; Ngandu et al., 2015) e demência (Hamer e Chida, 2009; Barnes e Yaffe, 2011) em idosos. Nos estágios iniciais da DA o treinamento resistido melhora a agilidade, a força de membros inferiores, o equilíbrio (Garuffi et al. 2013), reduz a agitação e aumenta a mobilidade em pacientes com deficiência cognitiva (Aman e Thomas, 2009). Em estágios mais graves da DA, o treinamento resistido aumenta a força muscular (Kuiack et al., 2004; Thomas e Hageman, 2003), a velocidade da marcha (Hageman e Thomas, 2002), a flexibilidade

de membros superiores e inferiores, a agilidade e equilíbrio dinâmico, capacidade de executar atividades de vida diária (Santana-Sosa et al, 2008) e melhora o humor e o declínio cognitivo (Arkin, 2003).

1.5 Mecanismos neurobiológicos do exercício resistido na DA

O exercício resistido e cognitivo pode prevenir ou retardar a demência na vida adulta. Estudo em humanos mostrou através de ressonância magnética estrutural e funcional (MRI) que o exercício resistido em idosos conservou ou aumentou a espessura cortical do cíngulo posterior e melhorou a cognição global (Suo et al., 2016). Outro estudo com indivíduos idosos, mostrou que após 12 semanas utilizando um programa de exercício resistido, o desempenho muscular melhorou e os níveis basais da interleucina (IL) 6 reduziram significativamente (Forti et al., 2014). Em idosos, o exercício resistido reduziu significativamente os níveis de homocisteína sérica (Vincent et al., 2003). O aumento dos níveis de homocisteína está associado ao desempenho cognitivo prejudicado, inclusive na DA (Schafer et al., 2005). Em um estudo prospectivo de dois anos, o funcionamento neuropsicológico foi prejudicado pela homocisteína elevada em idosos cognitivamente intactos, incluindo lesões cerebrais de matéria branca (Garcia et al. 2004; Kruman et al., 2000).

Estudos em animais têm mostrado os mecanismos pelos quais o exercício resistido pode influenciar positivamente a plasticidade cerebral. Cassilhas e colaboradores (2012) observaram uma melhora na memória de ratos e uma taxa aumentada da expressão do IGF-1, sendo esse um fator de crescimento envolvido em processos como a diferenciação e sobrevivência celular. O mesmo grupo de pesquisadores comparou exercício aeróbio e resistido na expressão de proteínas relacionadas com plasticidade cerebral. Foi demonstrado que o exercício resistido aumentou a expressão do IGF-1 e de seu receptor IGF-1R no hipocampo, enquanto o grupo submetido ao exercício aeróbio apresentou aumento nos níveis hipocampais de BDNF e de seu receptor TrkB. Além disso, houve aumento na expressão de proteínas pré-sinápticas (Sinapsina 1 e Sinaptofisina), melhora da aprendizagem e memória espacial, indicando que ambas as modalidades de exercício ativam vias de sinalização intracelular relacionadas com sobrevivência, proliferação neuronal e plasticidade sináptica (Borst et al., 2001; Cassilhas et al., 2013). Estudo realizado em

nosso laboratório mostrou que o treinamento com exercício resistido aumentou a proliferação celular e a expressão de proteínas anti-apoptóticas na região hipocampal de ratos (Novaes Gomes et al, 2014). Trabalho mais recente de nosso grupo de pesquisadores observou que uma única sessão de exercício de força melhorou a consolidação da memória e aumentou a expressão de proteínas pré e pós-sinápticas sem alterações nos níveis de IGF-1 no hipocampo de ratos Wistar (Fernandes et al. 2016).

Entretanto, os mecanismos dos efeitos benéficos do exercício resistido na DA não estão esclarecidos. O único estudo experimental que utilizou o exercício resistido no modelo de DA em animais machos, observou aumento de IGF-1 e redução do estresse oxidativo e do peptídeo beta-amilóide (Özbeyli et al. 2017).

Apesar de vários estudos com humanos e animais mostrarem que o exercício aeróbio promove importantes alterações no cérebro, o impacto do exercício físico resistido na DA não está bem esclarecido. Considerando as poucas informações neste assunto, a proposta desse estudo foi verificar o efeito do exercício físico resistido em camundongos fêmeas com doença de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O propósito deste estudo foi verificar as alterações comportamentais e histológicas induzidas pelo exercício físico resistido em camundongos fêmea transgênicos para a DA (mutação APPSWE/PS1DE9).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o nível de ansiedade utilizando o teste de labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o comportamento exploratório e mobilidade através do teste de campo aberto;
- Avaliar a memória utilizando o teste de reconhecimento de objetos;
- Verificar a quantidade de placas beta-amilóide (6E10) no córtex e hipocampo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados oitenta camundongos fêmeas duplo-transgênicos (2xTg-AD) para a mutação APPSWE/PS1dE9, e seus respectivos controles negativos para a dupla mutação (obtidos das mesmas ninhadas dos positivos), fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde foram previamente genotipados e mantidos até alcançarem a idade de 6 a 8 meses, sendo divididos em grupo Alzheimer com exercício (DA/Exercício n= 20), grupo Alzheimer sem exercício (DA/Controle n= 20), grupo controle com exercício (Naive/Exercício n= 20) e grupo controle sem exercício (Naive/Controle n= 20). A construção genética utilizada é a inserção dos genes APP (precursor da proteína amilóide) humana e PSEN1 (presenilina 1) humana por meio do promotor Prn (Prion protein gene complex). Os dois transgenes são inseridos em um locus único. Os animais foram mantidos no biotério de camundongos da Biofísica 03 (ECB, UNIFESP-SP) com controle de temperatura e em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, iniciando-se a fase clara às 06h30min horas. Água e comida foram fornecidas ad libitum. Todos os procedimentos descritos abaixo seguiram as normas estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Para realização do experimento os animais foram retirados do biotério e conduzidos para o laboratório de Neurofisiologia (5º andar ECB), onde foram deixados para habituação durante uma hora antes do início dos experimentos. Ao final do experimento de cada dia os animais foram devolvidos ao biotério da Biofísica.

3.2 Protocolo de treinamento com exercício resistido

Os animais do grupo exercício foram submetidos a um protocolo bem estabelecido por Yarasheski et al., 1990 e adaptado por Duncan et al., 1998; Hornberger, 2004. Inicialmente, os camundongos foram submetidos à familiarização ao aparato de escalada, composto por uma escada de 80 cm altura X 13 cm largura inclinada a 80° e distância de 1 cm entre os degraus. No topo da escada havia um abrigo que serviu para descanso do animal durante o treino. A familiarização consistiu

de três dias, com três tentativas a cada dia. Inicialmente, o animal foi colocado no abrigo (topo da escada) por 60 segundos e em seguida foram efetuadas as tentativas. Na primeira tentativa o animal foi colocado na parte proximal da escada, a aproximadamente 15 cm de altura até a porta do abrigo. Na segunda tentativa o animal foi posicionado na metade da escada, a aproximadamente 35 cm de altura até a porta da câmara. Na terceira tentativa o animal foi colocado no início da escada, a aproximadamente 80 cm de altura até a porta da câmara (adaptado de Cassilhas et al., 2012). Após o período de adaptação os animais dos grupos exercício foram submetidos a um teste de carga máxima. O parâmetro inicial para estipular a carga foi o peso corporal dos animais. Em seguida definiu-se a sobrecarga para cada série, composta de duas escaladas, sendo a primeira sobrecarga de 75% da massa corporal, a segunda com 90% e a terceira com 100%. A partir dos 100% de sobrecarga foi adicionada carga extra de 2 gramas a cada subida até que o animal não conseguisse escalar todo o aparato, sendo a sobrecarga anterior a essa sua carga máxima. Após definida a carga máxima de cada animal individualmente esses foram submetidos ao treinamento descrito abaixo. Na primeira sessão de treino os animais que não conseguiram subir o aparato foram excluídos do experimento. Os animais do grupo exercício foram submetidos ao exercício resistido progressivo, 5 sessões por semana durante 4 semanas. Cada sessão de treinamento foi constituída de oito séries de escalada na escada com sobrecarga progressiva fixada a cauda do animal (fixação com argola Coast lock Snap Swivel e fita Scotch 23 - Scotch 3M). Cada série foi composta de aproximadamente 8 movimentos de escalada (repetições). Nas duas primeiras séries, a sobrecarga foi de 50% da massa corporal total do animal. Depois, a sobrecarga foi aumentada conforme as séries, sendo para a terceira e quarta 75%, quinta e sexta 90% e sétima e oitava 100% da massa corporal total do animal. Um intervalo de repouso de 60 segundos foi dado entre cada série. A sessão de treinamento de cada animal durou entre 20-30 minutos. Novo teste de carga máxima foi aplicado no início de cada semana para determinar a nova sobrecarga para as sessões de cada animal individualmente.

Tabela 1: Protocolo de treinamento resistido durante 4 semanas

Semana	Escaladas (Séries)na escada	Sobrecarga em cada escalada (% baseada na carga máxima)	Intervalo (segundos no abrigo)
1 a 4	1º	50	60
	2º	50	60
	3º	75	60
	4º	75	60
	5º	90	60
	6º	90	60
	7º	100	60
	8º	100	60

3.3 Teste de campo aberto

Para avaliação da atividade locomotora e exploratória do animal foi utilizada uma arena circular (raio de 80 cm) cercada por paredes de 50 cm de altura, dividida com linhas pretas situadas no piso do aparato, contendo 19 quadrantes. Cada animal foi colocado individualmente na arena, onde permaneceu por 10 minutos, durante os quais, seu comportamento foi gravado e posteriormente analisados os seguintes parâmetros: distância total percorrida durante o teste, medida através do número de cruzamentos que o animal realizou nas linhas divisórias contidas no piso para avaliar a locomoção; distância percorrida nos diferentes compartimentos do campo aberto: centro e periferia, além do tempo gasto em cada um desses compartimentos (Salehi-Sadaghiani et al., 2012). Um cruzamento foi considerado somente quando o animal encontrou-se em um quadrante com as quatro patas. Após cada animal concluir a tarefa a arena foi limpa com álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

3.4 Teste de labirinto em cruz elevado

Para avaliar o comportamento do tipo-ansioso, foi utilizado o labirinto em cruz elevado (Grayson et al., 2015; Pellow et al., 1986)., que consiste em um aparato com

dois braços abertos (aversivos ao animal) perpendiculares a dois braços fechados, de mesmo tamanho, e cercados por paredes de 40 cm de altura. Cada braço é dividido em três segmentos cada (16 x 12 cm) havendo um segmento central comum aos quatro braços. O labirinto foi elevado a 60 cm do chão. Cada animal foi colocado individualmente no compartimento central, voltado para um dos braços abertos. O comportamento dos animais foi filmado para posterior análise. Durante a sessão, que teve duração de 5 minutos, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados; número total de entradas (braços abertos + braços fechados); e o tempo nos braços abertos e fechados. A partir desses dados calculamos o índice de ansiedade ($\text{Índice de ansiedade} = 1 - \frac{[\text{Tempo no braço aberto} / \text{duração do teste}] + [\text{Entradas nos braços abertos} / \text{número total de entradas}]}{2}$) (Cohen et al., 2013). Após cada animal concluir a tarefa a arena foi limpa com álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

3.5 Teste de reconhecimento de objetos

Neste teste os animais foram colocados em uma arena (semelhante ao campo aberto), a fim de avaliar a preferência por um novo objeto, onde a memória à longo prazo (LTM) pode ser testada. O teste foi realizado como descrito por Ennaceur e Delacour (1988) com algumas modificações. Foram utilizados objetos de plástico. O treino consiste em sessões de 5 minutos onde os animais foram autorizados a explorar dois objetos idênticos (fase de amostra), localizados a 10 cm de distância das paredes, durante 5 minutos. Após o animal concluir a tarefa foi inserido de volta a sua caixa de moradia e a arena foi limpa com álcool 70% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos. Durante as etapas do teste, os objetos são fixados com uma fita adesiva no chão, assim os animais não os movimentam. Nenhum dos objetos usados nos experimentos evocou uma preferência inata nos animais.

Para avaliar a memória de longo prazo (LTM), os animais foram testados nas mesmas condições 24 horas após a fase inicial. As posições dos objetos no teste foram mantidas, porém foi inserido um novo objeto no dia do teste.

Todos os animais foram colocados na arena sempre voltados para a mesma

parede em todas as sessões (De Bruin et al., 2011). A exploração dos objetos foi contabilizada com auxílio de cronômetros manuais e foi considerada somente quando o animal cheirasse um objeto a uma distância menor que 2 cm ou tocasse o objeto com o focinho. Sentar-se, apoiar-se ou andar ao redor dos objetos não foi considerado comportamento exploratório (Mello-Carpes e Izquierdo, 2013).

Os resultados são expressos como o percentual de tempo de exploração de cada objeto durante o treino ou o teste. O índice de discriminação foi calculado como o tempo explorando o novo objeto considerando o tempo total através da seguinte equação: $(\text{tempo explorando o objeto novo} - \text{tempo explorando o objeto familiar}) / (\text{tempo explorando o objeto novo} + \text{tempo explorando o objeto familiar}) * 100$.

3.6 Perfusão e fixação dos encéfalos

No final da quarta semana de treinamento, os animais treinados e não treinados foram eutanasiados por overdose de anestésico e 6 animais de cada grupo foram fixados por perfusão transcardíaca. Método para perfusão: Foi aplicada em associação uma injeção de Fentanil 0,5mg/kg com Tiopental 30mg/kg para evitar sofrimento do animal. Foi efetuado teste antecipado para ver se ocorria precipitação da administração combinada de fentanil e tiopental. Após o anestésico abolir totalmente os reflexos dos animais foi feita uma incisão na região abdominal se estendendo até a região torácica para ter acesso ao coração. Neste momento o coração do animal ainda estava batendo para uma melhor fixação do cérebro. Com auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão foi realizada uma punção no ventrículo esquerdo para iniciar a infusão de PBS, (0,01M), de modo que esta solução removeu o sangue dos vasos do animal e preparou o tecido para receber o paraformaldeído a 4% (PFA), além disso, paralelamente a punção do ventrículo esquerdo foi feito também uma incisão no átrio direito para que a solução circulante possa sair. Após a infusão de PBS (cerca de 100 mL), se iniciou a infusão de PFA (cerca de 100 mL) para finalizar a fixação. Finalizada esta etapa, o animal foi decapitado e com auxílio de uma espátula removemos o cérebro e o posicionamos em um tubo falcon de 10 mL contendo PFA por cerca de 48 horas. Em seguida, substituímos a solução de PFA por uma solução hipertônica de sacarose (30%) para crioproteção. As amostras ficaram nesta solução por cerca de 4 dias ou até que o

nível do cérebro baixou. Posteriormente, as amostras foram congeladas em gelo seco e destinadas a corte em criostato (- 20 °C), onde obtivemos fatias do encéfalo (30um) que foram imersas em placa de 24 poços contendo solução anti-congelante e armazenadas a 20 °C até o processamento por imunofluorescência e imunohistoquímica.

Ao final dos experimentos, as carcaças foram colocadas em sacolas brancas caracterizadas como infectante e destinadas à incineração.

3.7 Técnica de Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica que permite a visualização de antígenos desejados por meio da ligação de antígenos e anticorpos. A técnica utiliza um anticorpo primário, o qual se liga ao antígeno de interesse, um anticorpo secundário que reage contra os antígenos do animal o qual foi produzido o anticorpo primário, e um meio revelador escolhido intitulado diaminobenzidina (DAB). A imunohistoquímica teve como objetivo a visualização da deposição de placas β A nas regiões do córtex e hipocampo entre o grupo DA/Controle e o grupo DA/Exercício com a finalidade de observar se o exercício resistido modificou o padrão de deposição de placas; e para isto, após lavagens os cortes foram incubados em solução bloqueio para inativar a peroxidase, seguido de incubação overnight em anticorpo primário; no dia seguinte incubou-se por duas horas em anticorpo secundário, seguido por incubação em complexo avidina-biotina (Kit ABC) por uma hora e meia para amplificação do sinal e posterior revelação; após esta etapa os cortes foram lavados com acetato por cinco vezes de 5 minutos e em seguida foram revelados por diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram, então, montados em lâminas gelatinadas e após o período de secagem, as lâminas foram desidratadas em bateria de álcool (a 70%, 90% e 100%) e xilol. As lâminas já desidratadas foram cobertas com lamínulas para proteção e fechadas com Entellan. Após período de secagem, as lâminas foram limpas com xilol e disponibilizadas para observação no microscópio.

A análise e quantificação dos cortes foram realizadas com o auxílio de um microscópio Nikon Eclipse 80i com uma câmera de vídeo de alta resolução CCD integrada a um computador instalado com o *software Stereo Investigator* (MicroBrightField, Williston, VT, EUA – versão 9).

A quantificação das placas beta-amilóide foi realizada por contagem manual, sendo analisados de 5 a 6 cortes de hipocampo e córtex por animal (hemisfério direito e esquerdo).

3.8 Análise estatística

Após a confirmação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, a análise dos dados foi realizada utilizando-se o teste T de Student e a MANOVA (seguida pelo *post hoc* de Bonferroni), quando apropriado.

A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada para determinar diferenças estatisticamente significantes. O software utilizado para análise dos dados foi o GraphPad Prism® (versão 5.0).

4. RESULTADOS

4.1. Força Muscular

A MANOVA de medidas repetidas revelou um aumento progressivo na força muscular dos animais submetidos ao treinamento resistido ($F_{(3, 66)} = 285,2; p < 0,01$).

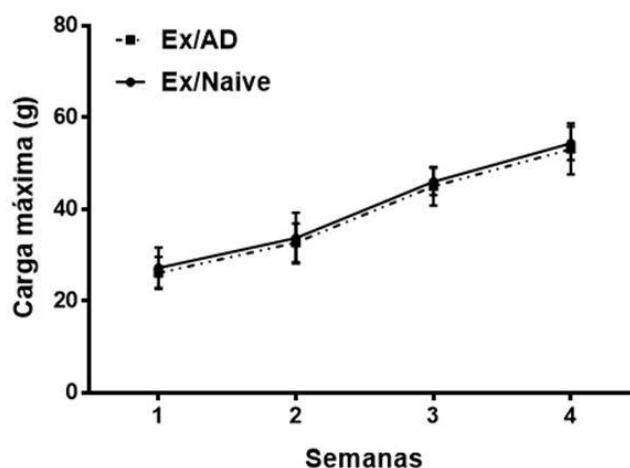


Figura 1: Evolução da carga máxima (em gramas) ao longo das quatro semanas de treinamento. A MANOVA de medidas repetidas mostrou um aumento progressivo na carga máxima suportada pelos animais de ambos os grupos treinados ($F_{(3, 66)} = 285,2; p < 0,001$). Os dados estão apresentados como média $\pm$ DP.

4.2. Atividade Locomotora e Exploratória

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais foi utilizado o teste de campo aberto. O tempo de exploração no centro [Figura 2A; Efeito do grupo: ($F(1, 25) = 1,861; p = 0,18$); Efeito do genótipo: ($F(1, 25) = 0,1268; p = 0,72$); Interação grupo x genótipo: ($F(1, 25) = 0,3339; p = 0,56$)] e na periferia [Figura 2B; Efeito do grupo: ($F(1, 25) = 1,723; p = 0,20$); Efeito do genótipo: ($F(1, 25) = 0,09791; p = 0,75$); Interação grupo x genótipo: ($F(1, 25) = 0,3618; p = 0,55$)] da arena não foi afetado nem pelo exercício nem pelo genótipo. A MANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do grupo ($F(1, 25) = 6,336; p = 0,01$) sobre a atividade locomotora total, indicando que o treinamento resistido aumenta a ambulação dos animais de maneira independente do genótipo (Figura 2C), isto é, animais dos grupos Naive/Exercício e DA/Exercício apresentaram um aumento da ambulação em relação aos grupos Naive/Controle e DA/Controle.

4.3. Comportamento do Tipo-Ansioso

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado com o intuito de avaliar os efeitos do treinamento resistido sobre o comportamento do tipo-ansioso nos grupos experimentais investigados. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas na taxa de entrada no braço aberto/braço fechado [Figura 2D; Efeito do grupo: ($F(1, 25) = 0,002416$; $p = 0,96$); Efeito do genótipo: ($F(1, 25) = 0,5436$; $p = 0,46$); Interação grupo x genótipo: ($F(1, 25) = 0,009840$; $p = 0,92$)], na taxa de permanência no braço aberto/braço fechado [Figura 2E; Efeito do grupo: ($F(1, 25) = 0,01488$; $p = 0,90$); Efeito do genótipo: ($F(1, 25) = 1,948$; $p = 0,17$); Interação grupo x genótipo: ($F(1, 25) = 0,2549$; $p = 0,61$)] e no índice de ansiedade [Figura 2F; Efeito do grupo: ($F(1, 25) = 0,3194$; $p = 0,57$); Efeito do genótipo: ($F(1, 25) = 1,218$; $p = 0,28$); Interação grupo x genótipo: ($F(1, 25) = 0,01988$; $p = 0,88$)].

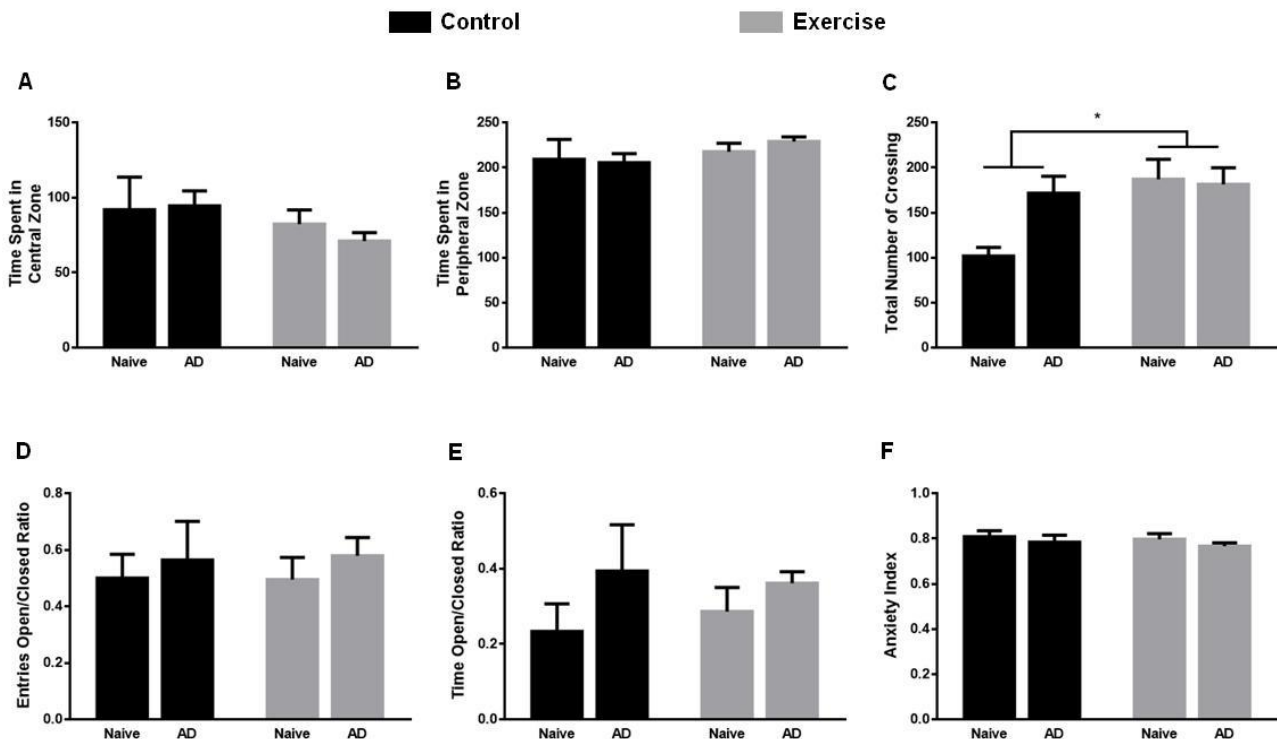


Figure 2: Efeitos do treinamento resistido sobre a atividade exploratória e comportamento do tipo-ansioso de camundongos com Alzheimer (APP/PS1) e seus respectivos Alzheimer negativo. A) Tempo gasto na exploração do centro da arena do campo aberto. B) Tempo gasto na exploração da periferia

da arena do campo aberto. C) Número total de quadrantes percorridos no campo aberto. D) Taxa de entrada no braço aberto/braço fechado. E) Taxa de permanência no braço aberto/braço fechado. F) Índice de ansiedade. * Efeito do grupo na MANOVA de duas vias ($F_{(1, 25)} = 6,336$; $p = 0,01$). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

4.4. Memória de Longo Prazo

A memória de longo prazo dos animais foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos. No dia do treino da tarefa, o tempo de exploração entre os objetos A e B foi similar no mesmo grupo (Figura 3B). Ao testar os animais 24h mais tarde, foi possível observar um efeito do grupo ($F(3, 25) = 7,882$; $p < 0,01$), do objeto ($F(1, 25) = 14,36$; $p < 0,01$) e uma interação entre grupo e objeto ($F(3, 25) = 7,309$; $p < 0,01$). Com exceção do grupo CTL/DA, todos os grupos exploraram preferencialmente o objeto novo (Figura 3C). No que concerne ao índice de discriminação, a MANOVA de duas vias demonstrou que houve um efeito do grupo ($F(1, 25) = 4,535$; $p = 0,04$), genótipo ($F(1, 25) = 6,436$; $p = 0,01$) e interação entre grupo e genótipo ($F(1, 25) = 9,040$; $p < 0,01$). A análise *post hoc* de Bonferroni mostrou que o prejuízo no índice de discriminação observado nos animais com Alzheimer (CTL/Naive) foi revertido pela prática regular de exercícios resistidos (Naive/Exercício e DA/Exercício) $p (< 0,01)$ (Figura 3D).

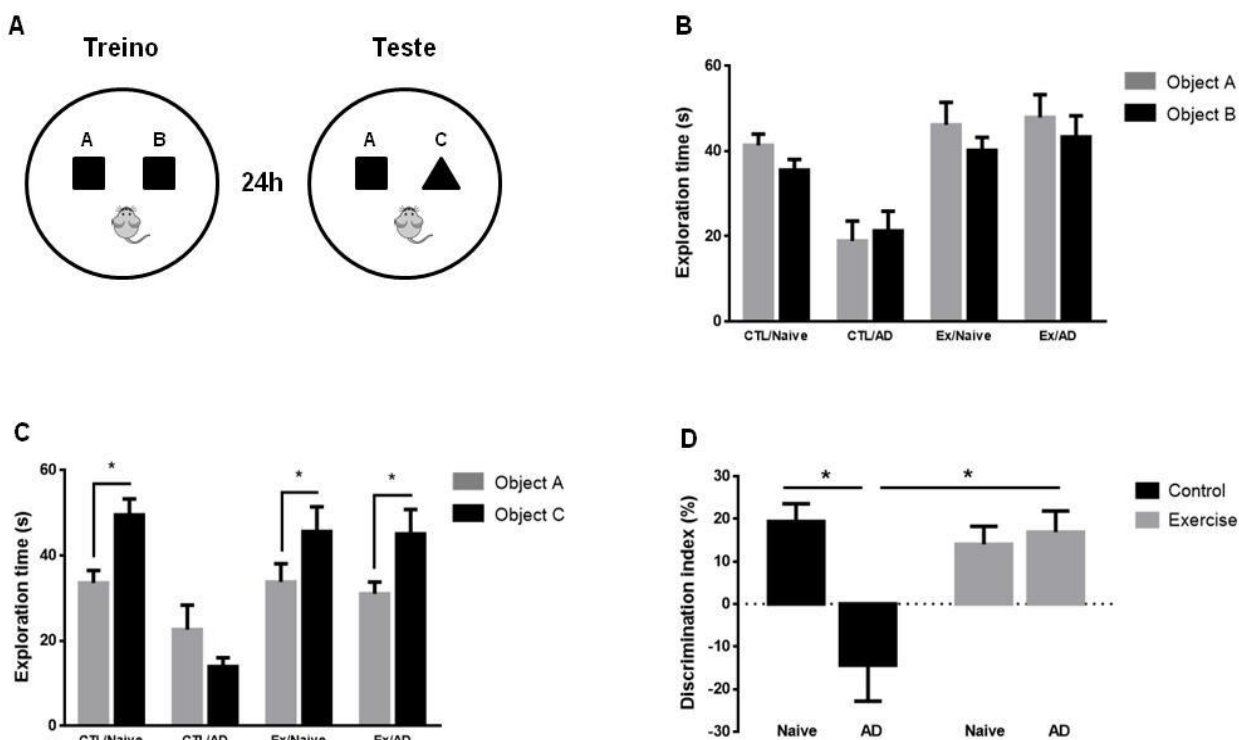


Figure 3: Efeitos do treinamento resistido sobre a memória de longo prazo de camundongos com Alzheimer (APP/PS1) e seus respectivos Alzheimer negativo. A) esquema representando o dia do treino e o dia do teste da tarefa de reconhecimento de objetos. B) Tempo gasto na exploração dos objetos no treino da tarefa. C) Tempo gasto na exploração do objeto familiar (A) e novo (C) no teste. Índice de discriminação. * $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média $\pm$ DP.

4.5. Análise histológica

A análise histológica foi utilizada para visualização da deposição de placas βA nas regiões do córtex e hipocampo entre o grupo DA/Controle e DA/Exercício. Análise quantitativa do hipocampo dorsal dos animais do grupo DA/Exercício (Figura 4A e 8B), apontou uma redução significativa de placas βA ($t(8)=2,666$; $p=0,028$) em comparação aos animais do grupo AD/Controle (Figura 5A).

Quando analisado quantitativamente o córtex motor, os animais do grupo AD/Exercício (Figura 4B e 5D) apontaram uma diminuição de placas βA ($t(8)=4,166$; $p=0,003$) em comparação com o grupo AD/Controle (Figura 5C).

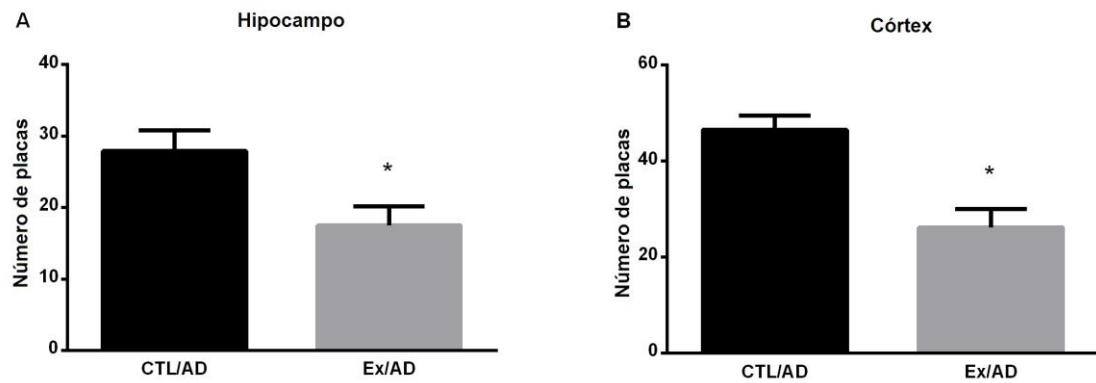


Figure 4: A) Análise quantitativa de βA na região hipocampal. B) Análise quantitativa de βA na região cortical. Animais de 7 a 9 meses (*ANOVA, $p = 0,02$; Mann Whitney, $p = 0,03$).

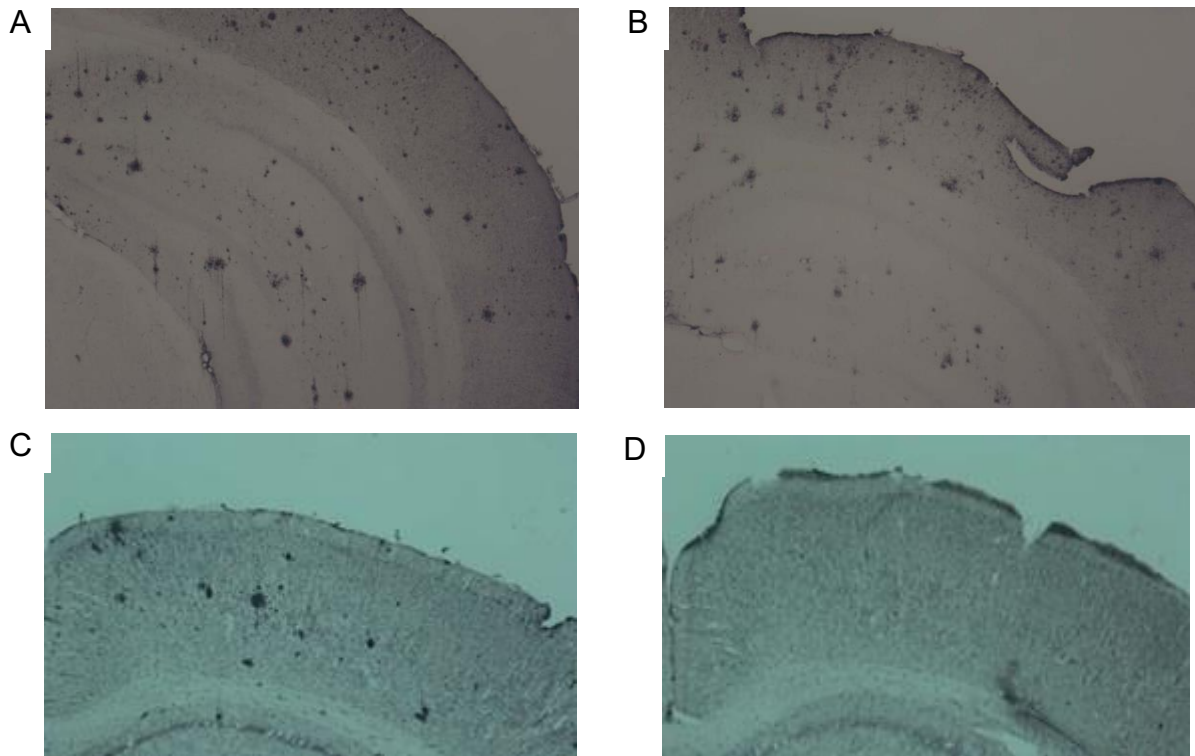


Figure 5: A) Marcação de βA na região hipocampal do grupo DA/Controle; B) Marcação de βA na região hipocampal do grupo AD/Exercício. C) Marcação de βA na região cortical do grupo DA/Controle. D) Marcação de βA na região cortical do grupo DA/Exercício. Animais de 7 a 9 meses. (*ANOVA, $p = 0,02$; Mann Whitney, $p = 0,03$).

5. DISCUSSÃO

A linhagem de camundongos transgênicos APP/PS1 está entre os modelos de Alzheimer mais bem caracterizados. Nesta linhagem, a estratégia para atingir níveis elevados de β A baseia-se na superexpressão do gene APP humano com a mutação Sueca (APP^{swe}) em combinação com o gene mutante da presenilina-1 (Radde et al., 2006). O background genético estável (Radde et al., 2006) e o início precoce das mudanças patológicas tornaram este modelo bastante popular na última década. Nos camundongos APP/PS1, as alterações fisiopatológicas relacionadas à toxicidade mediada pela β A desenvolvem-se ao longo do envelhecimento e caracterizam-se pela gliose intensiva (Yan et al., 2009; Jardanhazi-Kurutz et al., 2011), a presença de botões sinápticos distróficos (Mitew et al., 2013), atrofia cerebral (Delatour et al., 2006) e prejuízos cognitivos. Por conta destas e de outras características, o uso desse modelo tem se tornado uma importante ferramenta para estudo dos possíveis mecanismos subjacentes à fisiopatogênese da doença de Alzheimer, bem como para a identificação e busca de novos tratamentos para esta enfermidade (Garcia-Alloza et al., 2006). Diante disso, o presente trabalho teve o objetivo de investigar os efeitos do treinamento resistido sobre o prejuízo cognitivo e sobre a deposição de placas β A em camundongos fêmeas transgênicos APP/PS1. Somado a isso, avaliamos também o impacto desse tipo de exercício sobre a atividade locomotora e o comportamento do tipo-ansioso nesses animais.

Os resultados do nosso estudo mostraram que houve um aumento progressivo na força dos animais submetidos às quatro semanas de treinamento resistido. Assim como em humanos, essa é uma resposta esperada em roedores submetidos a esse tipo de treinamento (Duncan et al., 1998; Hornberger and Farrar, 2004; Matheny et al., 2009). Por exemplo, ratos e camundongos submetidos ao mesmo aparato de treinamento por oito (Hornberger and Farrar, 2004) e dezesseis (Matheny et al., 2009) semanas aumentaram progressivamente a capacidade máxima de carregar peso enquanto subiam a escada. Portanto, nossos achados indicam que o protocolo de treinamento usado em nosso experimento foi efetivo em gerar a adaptação fisiológica mais comum deste tipo de treinamento.

O teste de campo aberto foi realizado com o intuito de verificar atividade locomotora e garantir que possíveis alterações desta variável pudessem afetar a interpretação dos dados do teste de reconhecimento de objetos. De acordo com Wilson e colaboradores (1976) esse é um dos testes mais comuns para monitorar a atividade motora geral e o comportamento exploratório de roedores. O comportamento normal em camundongos é procurar a proteção da periferia, permanecendo mais tempo nesta região, em vez da vulnerabilidade do centro da arena. Animais expostos a drogas e outras abordagens com ação ansiolítica tendem a passar mais tempo no centro da arena do que na periferia. Aqueles que apresentam algum tipo de prejuízo motor percorrem distâncias horizontais mais baixas (Wilson et al., 1976).

Nossos dados demonstram que o tempo de permanência nas diferentes regiões arena não foi afetado nem pelo exercício nem pelo genótipo do animal. No entanto, observamos que o exercício resistido aumentou a atividade locomotora de ambos os grupos que se exercitaram. Embora não tenham estudos investigando o papel do exercício resistido sobre a atividade locomotora de roedores, trabalhos prévios realizados com exercício de natureza aeróbia observaram um aumento na atividade locomotora de camundongos após um período de treinamento (Ohia-nwoko et al., 2014). Por exemplo, Ohia-nwoko e colaboradores (2014) observaram que doze semanas de exercício em esteira ergométrica aumentou a atividade locomotora de outro modelo para a doença de Alzheimer, os camundongos transgênicos P301S Tau.

No teste de labirinto em cruz elevado o animal explora os dois braços, porém a tendência é que ele permaneça mais tempo nos braços fechados. Neste paradigma, considera-se o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados para calcular o índice de ansiedade, onde, quanto maior o nível de ansiedade, menor será o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos (Handley and Mithani, 1984; Pellow et al., 1986; Pellow and File, 1986). Em nosso estudo, nenhum dos parâmetros analisados no teste de labirinto em cruz elevado diferiu entre os grupos, indicando que nem o exercício e nem o genótipo afetaram o nível de ansiedade. Desta maneira, podemos garantir que os dados referentes ao teste de memória, discutidos abaixo, não foram influenciados por diferenças no nível de ansiedade dos animais.

O teste de reconhecimento de objetos é um paradigma amplamente utilizado para estudar aprendizado e memória não-espacial em roedores, e que não requer nenhum tipo de reforço, baseando-se apenas no comportamento exploratório espontâneo dos animais (Winters et al., 2008). A memória de reconhecimento de objetos em animais é, até certo grau, semelhante à identificação de faces ou reconstrução de cenas pelos humanos (Cohen and Stackman, 2015). Déficits cognitivos neste paradigma já foram identificados em uma ampla gama de modelos experimentais para doenças que afetam o cérebro, incluindo camundongos APP/PS1 (Grayson et al., 2015). Em nosso trabalho, o prejuízo de memória observado nos camundongos APP/PS1 foi revertido pelas quatro semanas de treinamento resistido. Esse achado está de acordo com o único estudo prévio que investigou os efeitos do exercício resistido em um modelo animal da doença de Alzheimer (Özbeyli et al., 2017). Nesse estudo, os autores induziram a doença de Alzheimer em ratos através da administração crônica de D-galactose e os submeteram a seis semanas de treinamento resistido (3x/sem). Assim como no presente trabalho, os pesquisadores observaram que o prejuízo na memória de reconhecimento de objetos foi revertido pela prática deste tipo de exercício.

Embora este seja o segundo trabalho demonstrando que o treinamento resistido tem a capacidade de reverter o déficit cognitivo em modelos de Alzheimer, diversos estudos têm observado que a prática de exercício aeróbio também melhora o processamento de novas memórias em animais com esta doença (Ke et al., 2011; Liu et al., 2011; Erion et al., 2014). Além do benefício também reportado sobre a potenciação de longa duração (*Long-term Potentiation*) (Liu et al., 2011), o exercício aeróbio regular foi capaz de diminuir o acúmulo de placas β A e dos níveis de Tau hiperfosforilada, bem como de reduzir a neuroinflamação e a morte neuronal em diferentes modelos da DA (García-Mesa et al., 2011; Liu et al., 2011; Moore et al., 2016).

Em nosso trabalho encontramos uma redução significativa de placas β A no hipocampo dorsal e no córtex motor do grupo Alzheimer que se exercitou em comparação com o grupo Alzheimer sedentário, indicando que o exercício resistido foi eficaz para reduzir a progressão da doença. Em camundongos APP/PS1, a deposição de beta-amiloide inicia-se por voltados seis meses de idade e torna-se mais evidente

aos 9 meses (Jankowsky et al., 2004). Em paralelo a essa produção ocorre gliose grave, com início aos 6 meses e principalmente ao redor das placas (Kamphuis et al., 2012). Diversos estudos utilizando exercício aeróbico em modelos experimentais para DA mostraram redução das placas beta-amilóide após treinamento (Liu et al., 2013; Kang et al., 2013; Bo et al., 2014). O único estudo experimental que utilizou o exercício resistido em modelo de DA também encontrou uma redução significativa na produção de placa beta-amilóide (Özbeyli et al. 2017). Esses resultados indicam que, assim como o exercício aeróbico, o exercício resistido também foi eficaz para reduzir a progressão da doença e melhorar o desempenho cognitivo em camundongos fêmeas APP/PS1.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o programa de treinamento resistido em animais fêmeas com DA foi capaz de:

- Promover aumento progressivo na força muscular dos animais submetidos ao treinamento resistido;
- Aumentou a atividade locomotora total em ambos os grupos treinados, indicando que o treinamento resistido aumenta a ambulação dos animais de maneira independente do genótipo;
- Reverter significativamente o prejuízo na memória de longo prazo nos animais DA treinados;
- Reduzir significativamente a quantidade de placas β A no hipocampo dorsal e no córtex motor dos animais com DA que treinaram.

Os resultados observados neste estudo sugere que um programa de exercícios resistidos pode ser indicado como uma ferramenta coadjuvante para o tratamento da DA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu ID, Florenza OV, Barros HL. Alzheimer Disease: correlation between memory and autonomy. *Rev Psiqu Clin.* 2005;32(3):131-136.

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005 Apr 27;25(17):4217-21.

Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* V. 5, p. 234–270, 2009.

Alzheimer's Association. 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2010 Mar;6(2):158-94.

Aman E, Thomas DR. Supervised exercise to reduce agitation in severely cognitively impaired persons. *J Am Med Dir Assoc.* 2009 May;10(4):271-6.

American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2009 Mar;41(3):687-708.

APA. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV) 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

Arkin SM. Student-led exercise sessions yield significant fitness gains for Alzheimer's patients. *Am J Alzheimer's Dis Other Dement.* 2003 May-Jun;18(3):159-70.

Arnold JC, Cantu MA, Kasanga EA, Nejtek VA, Papa EV, Bugnariu N, Salvatore MF. Aging-related limit of exercise efficacy on motor decline. *PLoS One.* 2017 Nov 27;12(11):e0188538. doi: 10.1371/journal.pone.0188538. eCollection 2017.

Barnes, D. E., and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819–828.

Bartelt G (2012) *Auswertung von RAI-Daten im Auftrag der Schweizerischen Alzheimervereinigung. Technischer Bericht.* St Gallen, Q-Sys AG.

Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol (1985).* 2011 Nov;111(5):1380-90.

Borst SE, De Hoyos DV, Garzarella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, Pollock ML. Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Apr;33(4):648-53.

Braak E., Braak H. and Mandelkow E. M. (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 87, 554–567.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82: 239–259.

Braak, E.; Griffing, K.; Arai, K.; Bohl, J.; Bratzke, H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since Izheimer? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 249, Suppl. 2, p.14-22, 1999.

Canonici AP, Andrade LP, Gobbi S, Santos-Galduroz RF, Gobbi LT, Stella F. Functional dependence and caregiver burden in Alzheimer's disease: a controlled trial on the benefits of motor intervention. *Psychogeriatrics*. 2012 Sep;12(3):186-92.

Cardoso FDS, França EF, Serra FT, Victorino AB, de Almeida AA, Fernandes J, Cabral FR, Venancio DP, Arida RM, Gomes da Silva S. Aerobic exercise reduces hippocampal ERK and p38 activation and improves memory of middle-aged rats. *Hippocampus*. 2017 Aug;27(8):899-905.

Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10884-93.

Cassilhas RC, Antunes HK, Tufik S, de Mello MT. Mood, anxiety, and serum IGF-1 in elderly men given 24 weeks of high resistance exercise. *Percept MotSkills*. 2010 Feb;110(1):265-76.

Cassilhas RC, Lee KS, Venâncio DP, Oliveira MG, Tufik S, de Mello MT. Resistance exercise improves hippocampus-dependent memory *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1215-20.

Cassilhas, Ricardo Cardoso et al Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. *Motriz: rev. educ. fis.*, Mar 2013, vol.19, no.1, p.178-184.

Chai CK. The genetics of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias* 2007;22(1):37-41.

Coelho, F. G. M.; Andrade, L. P.; Pedroso, R. V.; Santos-Galduroz, R. F.; Gobbi, S.; Costa, J. L. R.; Gobbi, L. T. B. Multimodal exercise intervention improves frontal cognitive functions and gait in Alzheimer's disease: A controlled trial. *Geriatrics and Gerontology International*, v. 13, p. 198-203, 2013.

Cohen, H. Matar ,M.A., Joseph,Z. Animal models of posttraumatic stress disorder, *Curr. Protoc. Neurosci*. 64 (2013) 9.45.1–9.45.18.

Cohen, S. J., and Stackman, R. W. Jr. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.* 285, 105–117.

da Silva CD, Impellizzeri FM, Natali AJ, de Lima JR, Bara-Filho MG, Silami-Garçia E, Marins JC. Exercise intensity and technical demands of small-sided games in young Brazilian soccer players: effect of number of players, maturation, and reliability. *J Strength Cond Res.* 2011 Oct;25(10):2746-51.

Datwani A, McConnell MJ, Kanold PO, Micheva KD, Busse B, Shamloo M, Smith SJ, Shatz CJ. Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity. *Neuron.* 2009 Nov 25;64(4):463-70.

DeBoer, L.B., Powers, M.B., Utschig, A.C., Otto, M.W., Smits, J.A., 2012. Exploring exercise as an avenue for the treatment of anxiety disorders. *Expert Rev. Neurother.* 12, 1011–1022.

Delatour, B., Guegan, M., Volk, A., & Dhenain, M. (2006). In vivo MRI and histological evaluation of brain atrophy in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27, 835–847.

Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res.* 2006 Feb;3(1):15-23.

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997 Apr;56(4):321-39. Review.

DSM-V. Manual diagnóstico e estatístico de transtorno - DSM-5 / American Psychiatric Association. Porto Alegre: Artmed, 2014. 948 p.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, *et al*: Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. *Lancet Neurol* 9: 1118-1127, 2010.

Duncan, N.D., Williams, D.A., Lynch, G.S., 1998. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 77, 372–378.

Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2009 Jul;118(1):5-36.

E L, Burns JM, Swerdlow RH. Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiol Aging.* 2014 Nov;35(11):2574-2583. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.033.

Ennaceur, A.; Meliani, K. Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. 1992. *Psychopharm* 109, 321-30.

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):3017-22. doi: 10.1073/pnas.1015950108. Epub 2011 Jan 31.

Erickson KI, Weinstein AM, Lopez OL. Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2012 Nov;43(8):615-21.

Evans WJ. What is sarcopenia? *J Gerontol Med Sci* 1995;50A:5–8.

Fernandes, J., Soares, J. C. K., do Amaral Baliego, L. G. Z., & Arida, R. M. (2016). A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus. *Hippocampus*, 26(8), 1096-1103.

Fordyce, D. E.; Wehner, J. M. Physical activity enhances spatial learning performance with in associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res.*, 619: 111-119, 1993.

Forti LN, Njemini R, Beyer I, Eelbode E, Meeusen R, Mets T, Bautmans I. Strength training reduces circulating interleukin-6 but not brain-derived neurotrophic factor in community-dwelling elderly individuals. *Age (Dordr)*. 2014;36(5).

Frisoni GB, Fox NC, Jack CR Jr, Scheltens P, Thompson PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6: 67–77.

Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, Fiatarone MA, Evans WJ, and Roubenoff R. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol* 88: 1321-1326, 2000.

Garcia A, Haron Y, Pulman K, Hua L, Freedman M. Increases in homocysteine are related to worsening of stroop scores in healthy elderly persons: a prospective follow-up study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004 Dec;59(12):1323-7.

Garcia-Alloza, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006) *Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease*. *Neurobiology of Disease* 24 (2006) 516–524.

Garuffi, M.; Costa, J. L. R.; Hernández, S. S. S.; Vital, T. M.; Stein, A. M.; Santos, J. G.; Stella, F. Effects of resistance training on the performance of activities of daily living in patients with Alzheimer's disease *Geriatrics and Gerontology International*, v.13, p. 322-328, 2013.

Glennner, G.; Wong. C. G. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 120, No. 3, p. 885-890, 1984.

Gralle M, Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol*. 2007 May;82(1):11-32.

Grayson, B, Leger, M, Piercy D, L. Adamson, M. Harte, & J.C. Neill. Assessment of diseaserelated cognitive impairments using the ovel object recognition (NOR) task in rodents. *Behavioural Brain Research*, 285 (2015) 176-193.

Hageman PA, Thomas VS. Gait performance in dementia: the effects of a 6-week resistance training program in an adult day-care setting. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2002 Apr;17(4):329-34.

Hamer, M., and Chida, Y. (2009). Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol. Med.* 39, 3–11.

Handley, S. L., Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.

Herholz K, Buskies W, Rist M, Pawlik G, Hollmann W, Heiss WD. Regional cerebral blood flow in man at rest and during exercise. *J Neurol* 1987; 234:9.

Hernandez, S.S.S.; Coelho, F.G.M.; Gobbi, S.; Stella, F. Effects of physical activity on cognitive functions, balance and risk of fall in elderly with Alzheimer's dementia. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. v. 14, n.1, p. 68-74, 2010.

Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Reviews/Neuroscience*. Volume 9, January, 2008.

Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004 Feb;29(1):16-31.

Jack, C.R. Jr.; et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurology*, v. 9, n. 1, p. 119-128, 2010.

Jack, C.R. Jr; et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: anupdated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurology*, v. 12, p. 207-216, 2013.

Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV. Enviromental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 25, 5217-5224, 2005.

Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Jul;89(1):81-8. Erratum in: *J Appl Physiol* (1985). 2014 May 15;116(10):1342.

Jardanhazi-Kurutz, D., Kummer, M. P., Terwel, D., Vogel, K., Thiele, A., & Heneka, M. T. (2011). Distinct adrenergic system changes and neuroinflammation in response to induced locus ceruleus degeneration in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* 176, 396–407.

Johnson, R. A.; Mitchell, G. S. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat brain. *Brain Research*, 983: 108-114, 2003.

Jolitha AB, Subramanyam MV, Asha Devi S. Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology*. 2009 Feb;10(1):53-63.

Kallman DA, Plato CC, and Tobin JD. The role of muscle loss in the age-related decline of grip strength: cross-sectional and longitudinal perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 45: M82-M88, 1990.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Aug 19;10(9):698-712.

Kelley GA, Kelley KS. Progressive resistance exercise and resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension* 2000; 35:838-43.

Kim E, Dear A, Ferguson SL, Seo D, Bembien MG. Effects of 4 weeks of traditional resistance training vs. superslow strength training on early phase adaptations in strength, flexibility, and aerobic capacity in college-aged women. *J Strength Cond Res*. 2011 Nov;25(11):3006-13.

Klados MA, Styliadis C, Frantzidis CA, Paraskevopoulos E, Bamidis PD. Beta-Band Functional Connectivity is Reorganized in Mild Cognitive Impairment after Combined Computerized Physical and Cognitive Training. *Front Neurosci*. 2016 Feb 29;10:55.

Kohl HW 3rd, Satinsky SB, Whitfield GP, Evenson KR. All health is local: state and local planning for physical activity promotion. *J Public Health Manag Pract*. 2013 May-Jun;19(3 Suppl 1):S17-22.

Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR; physical activity and bone health. American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc*. 2004 Nov;36(11):1985-96.

Kosik K. S. (1992) Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* 256, 780–778.

Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci*. 2000 Sep 15;20(18):6920-6.

Kuiack, Stephanie L.; Campbell, Wayne W.; Evans, William J. A structured resistive training program improves muscle strength and power in elderly persons with dementia. *Activities, Adaptation & Aging*, v. 28, n. 1, p. 35-47, 2004.

Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med*. 2006 Jan 17;144(2):73-81.

Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, Greenop KR, Almeida OP. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA*. 2009 Jan 21;301(3):276.

Lautenschlager, N. T.; Cox, K. L.; Flicker, L.; Foster, J. K.; VanBockxmeer, F. M.; Xiao, J.; Greenop, K. R.; Almeida, O. P. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: A Randomized Trial. *Journal of the American Medical Association*, v.300, n.9, p.1027-1037, 2008.

Lee, H., Kirkby, L., Brott, B. K., Adelson, J. D., Cheng, S., Feller, M. B., Shatz, C. J. (2014). Synapse elimination and learning rules coregulated by MHC class I H2-Db. *Nature*, v. 509, n. 7499, p. 195, 2014.

Lexell J. Strength training and muscle hypertrophy in older men and women. *Top Geriatr Rehabil* 2000;15:41–46.

Li Y, Zhao L, Gu B, Cai J, Lv Y, Yu L. Aerobic exercise regulates Rho/cofilin pathways to rescue synaptic loss in aged rats. *PLoS One*. 2017 Feb 2;12(2):e0171491. doi: 10.1371/journal.pone.0171491. eCollection 2017. Little JP, Phillips SM. Resistance exercise and nutrition to counteract muscle wasting. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:817-828.

Liu, H. L. et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res*, v. 218, n. 2, p. 308-14, 2011.

Lopez OL. The growing burden of Alzheimer's disease. *Am J Manag Care*. 2011 Nov;17 Suppl 13:S339-45.

Mammen, G., Faulkner, G., 2013. Physical activity and the prevention of depression: a systematic review of prospective studies. *Am. J. Prev. Med.* 45, 649–657.

Marosi K, Felszeghy K, Mehra RD, Radák Z, Nyakas C. Are the neuroprotective effects of estradiol and physical exercise comparable during ageing in female rats? *Biogerontology*. 2012 Aug;13(4):413-27.

Matheny RW, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Feb;234(2):164-70. Mattson, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, v. 430, p. 631-639, 2004.

Mayer F, Scharhag-Rosenberger F, Carlsohn A, Cassel M, Müller S, Scharhag J. The intensity and effects of strength training in the elderly. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(21):359–64.

Mitew, S., Kirkcaldie, M. T., Dickson, T. C., & Vickers, J. C. (2013). Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiol Aging* 34, 2341–2351.

Moore KM, Girens RE, Larson SK, Jones MR, Restivo JL, Holtzman DM, Cirrito JR, Yuede CM, Zimmerman SD, Timson BF. A spectrum of exercise training reduces soluble A β in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2016 Jan;85:218-24.

Morganti CM, Nelson ME, Fiatarone MA, Dallal GE, Economos CD, Crawford BM, Evans WJ. Strength improvements with 1 yr of progressive resistance training in older women. *Med. Sci. Sports Exerc* 1995;27:906-912.

Murugesan N, Demarest TG, Madri JA, Pachter JS. Brain regional angiogenic potential at the neurovascular unit during normal aging. *Neurobiol Aging.* 2012 May;33(5):1004.e1-16. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.022.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 1995; 373(6510):109.

Neeper, A. S.; Gómez-Pinilla, F.; Choi, J.; Cotman, C. W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.*, 726: 49-56, 1996.

Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälahti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., et al. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet* 385, 2255–2263.

Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation.* 2008 Apr9;5:13.

Novaes Gomes FG, Fernandes J, Vanucci CD, Cassilhas RC, Viana GM, D'Almeida V, et al. The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;22(50):106-17.

Ohia-Nwoko O, Montazari S, Lau YS, Eriksen JL. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice *Mol Neurodegener.* 2014 Nov 28;9:54.

Özbeyli D, Sarı G, Özkan N, Karademir B, Yüksel M, Çilingir Kaya ÖT, Kasımay, Çakır Ö. Protective effects of different exercise modalities in an Alzheimer's disease-like model. *Behav Brain Res*. 2017 Jun 15;328:159-177.

Palmer K., Lupo F., Perri R., Salamone G., Fadda L., Caltagirone C., Musicco M., Cravello L. Predicting Diseases Progression in Alzheimer's Disease: The Role of Neuropsychiatric Syndromes on Functional and Cognitive Decline. *J Alzheimer's Dis*. 2011;24(1):35-45.

Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *NeurobiolDis*. 2008 Apr;30(1):121-9.
Pellow, S. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: A exploratory model of anxiety in rodents valid? *Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology*, 8, 557-565.

Pellow, S.; File, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 24, n. 3, p. 525-9, 1986.

Pérez M., Hernandez F., Gomez-Ramos A., Smith M., Perry G. and Avila J. (2002a) Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur. J. Biochem*. 269, 1484–1489.

Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goñi R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*. 2012 Jan 27;202:252-66.

Prince M., Bryce R., Albanese EB, Wimoc AD, Ribeiroa WE, Cleusa PF. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9 (2015) 63–75.

Prince M., Bryce R., Albanese EB, Wimoc AD, Ribeiroa WE, Cleusa PF. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9 (2016a) 63–75.

Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., & Karagiannidou, M. (2016). World Alzheimer report 2016b: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future.

Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., et al. (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7, 940–946.

Rantanen T, Masaki K, Foley D, Izmirlian G, White L, and Guralnik JM. Grip strength changes over 27 yr in Japanese-American men. *J Appl Physiol* 85: 2047-2053, 1998.

Santana-Sosa E, Barriopedro MI, López-Mojares LM, Pérez M, Lucia A. Exercise training is beneficial for Alzheimer's patients. *Int J Sports Med*. 2008 Oct;29(10):845-50.

Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Gharedaghi MH, Zandieh A, Heydarpour P, Yousefzadeh-Fard Y, Dehpour AR. NMDA receptor involvement in antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;223(3):345-55.

Schafer JH, Glass TA, Bolla KI, Mintz M, Jedlicka AE, Schwartz BS. Homocysteine and cognitive function in a population-based study of older adults. *J Am Geriatr Soc*. 2005 Mar;53(3):381-8.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 May 1;68(18):1501-8.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Oct;27(10):1372-84.

Schwenk M, Zieschang T, Englert S, Grewal G, Najafi B, Hauer K. Improvements in gait characteristics after intensive resistance and functional training in people with dementia: a randomised controlled trial. *BMC Geriatr*. 2014 Jun 12;14:73.

Shinosaki K, Nishikawa T, Takeda M. Neurobiological basis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer type. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2000;54(6):611-20.

Siette J, Westbrook RF, Cotman C, Sidhu K, Zhu W, Sachdev P, Valenzuela MJ. Age-specific effects of voluntary exercise on memory and the older brain. *Biol Psychiatry*. 2013 Mar 1;73(5):435-42.

Singh NA; Clements KM; Fiatarone MA. A randomized controlled trial of progressive resistance training in depressed elders. *The Journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 1997 Jan;52(1):M27-M35.

Singh NA; Stavrinou TM; Scarbek Y; Galambos G; Liber C; Fiatarone Singh MA. A randomized controlled trial of high versus low intensity weight training versus general practitioner care for clinical depression in older adults. *The journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 2005 Jun;60(6):768-76.

Smith JC, Nielson KA, Woodard JL, Seidenberg M, Durgerian S, Hazlett KE, Figueroa CM, Kandah CC, Kay CD, Matthews MA, Rao SM. Physical activity reduces hippocampal atrophy in elders at genetic risk for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2014 Apr 23;6:61.

Sofi, F., Valecchi, D., Bacci, D., Abbate, R., Gensini, G. F., Casini, A., et al. (2011). Physical activity and risk of cognitive decline: a meta analysis of prospective studies. *J. Intern. Med.* 269, 107–117.

Steele J, Raubold K, Kemmler W, Fisher J, Gentil P, Giessing J. The Effects of 6 Months of Progressive High Effort Resistance Training Methods upon Strength, Body Composition, Function, and Wellbeing of Elderly Adults. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2541090.

Stella F, Canonici AP, Gobbi S, Galduroz RF, Cação Jde C, Gobbi LT. Attenuation of neuropsychiatric symptoms and caregiver burden in Alzheimer's disease by motor intervention: a controlled trial. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(8):1353-60.

Sun F, Norman IJ, While AE. Physical activity in older people: a systematic review. *BMC Public Health.* 2013 May 6;13:449.

Suo C, Singh MF, Gates N, Wen W, Sachdev P, Brodaty H, Saigal N, Wilson GC, Meiklejohn J, Singh N, Baune BT, Baker M, Foroughi N, Wang Y, Mavros Y, Lampit A, Leung I, Valenzuela MJ. Therapeutically relevant structural and functional mechanisms triggered by physical and cognitive exercise. *Mol Psychiatry.* 2016 Nov;21(11):1633-1642.

Ten Brinke LF, Bolandzadeh N, Nagamatsu LS, Hsu CL, Davis JC, Miran-Khan K, Liu-Ambrose T. Aerobic exercise increases hippocampal volume in older women with probable mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. *Br J Sports Med.* 2015 Feb;49(4):248-54.

Terry AV Jr, Kutianawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav.* 2011 Feb 1;102(2):149-57.

Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, Klunk WE, Weiner MW, Zetterberg H, Galasko D, Praticò D, Griffin S, Schenk D, Siemers E. The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006 Jan-Mar;20(1):6-15.

Thomas VS, Hageman PA. Can neuromuscular strength and function in people with dementia be rehabilitated using resistance-exercise training? Results from a preliminary intervention study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003 Aug;58(8):746-51.

Van Praag H.; kempermann G.; gage F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2: 266-270.

Vandervoort AA, McComas AJ. Contractile changes in opposing muscles of the human ankle joint with aging. *J Appl Physiol* (1985). 1986 Jul;61(1):361-7.

Vincent KR, Braith RW, Bottiglieri T, Vincent HK, Lowenthal DT. Homocysteine and lipoprotein levels following resistance training in older adults. *Prev Cardiol.* 2003 Fall;6(4):197-203.

Vissing, J.; Andresen, M.; Diemer, N. H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16: 729-736, 1996.

Vital, T.M.; Hernandez, S.S.S; Gobbi, S.; Costa, J.L.R.; Stella, F. Atividade física sistematizada e sintomas de depressão na demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v.59, n.1, p.58-64, 2010.

Volpi E, Nazemi R, Fujita S. Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(4):405-410.

Wilson RC, Vacek T, Lanier DL, Dewsbury DA. Open-field behavior in muroid rodents. *Behav Biol*. 1976 Aug;17(4):495-506.

Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol*. 2016;15(5):455-532.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Jul;32(5):1055-70.

Yan, P., Bero, A. W., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hu, X., Wang, Y., et al. (2009). Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J Neurosci* 29, 10706–10714.

Yarasheski, K.E., Lemon, P.W., Gilloteaux, J., 1990. Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *J. Appl. Physiol.* 69, 434–437.

Zec RF, Burkett NR. Non-pharmacological and pharmacological treatment of the cognitive and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *NeuroRehabilitation*. 2008;23(5):425-38.

8. ANEXOS



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 04 de novembro de 2016
CEUA N 9155190516

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Eduardo Alves Da Silva

Depto/Disc: Fisiologia

Pesquisadores associados: Profa. Dra. Beatriz Monteiro (universidade Federal De São Paulo); Matheus Libarino Santos (universidade Estadual De Santa Cruz); Christiane Gimenes (universidade Federal De São Paulo); Débora Hashiguchi (universidade Federal De São Paulo); Prof. Dr. Ricardo Mario Arida (orientador)

Título do projeto: "EFEITO DE UM PROGRAMA DE TREINAMENTO RESISTIDO EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente funções relacionadas à cognição, memória e emoção. As principais regiões comprometidas na DA são o córtex pré-frontal e o hipocampo, devido a deposição de placas beta-amilóide, pelo acúmulo do peptídeo beta-amilóide e emaranhados neurofibrilares da proteína Tau. Considerando os déficits cognitivos e a ausência de um tratamento eficaz para a DA, a atividade física tem emergido como uma alternativa de tratamento complementar para prevenir ou retardar a progressão da doença. Apesar de vários estudos experimentais mostrarem que o exercício aeróbico promove importantes alterações no cérebro, evidências sobre o efeito do exercício resistido no sistema nervoso central e na DA ainda é escassa. A hipótese do trabalho é que um programa de exercício físico resistido pode interferir na formação das placas amilóides e reduzir a inflamação no córtex e no hipocampo de animais transgênicos para a DA. Neste sentido, o presente trabalho visa analisar a progressão da formação de placas amilóides e os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no córtex e hipocampo de camundongos transgênicos para a DA submetidos ao exercício físico resistido.

ANIMAIS

Serão utilizados:

28 camundongos transgênicos Alzheimer negativo, fêmeas, 20 gramas, 6 a 8 semanas

28 camundongos transgênicos duplo-transgênicos (2xTg-AD) para a mutação APP^{swe}/PS1^{dE9}, fêmeas, 20gramas, 6 a 8 semanas

Procedência: Biotério CEDEME

Manutenção: Os animais serão então mantidos no biotério de camundongos da Biofísica 03 (ECB, UNIFESP-SP).

Cronograma do estudo, início previsto para: Janeiro/2017 com término previsto para: Dezembro/2018

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 04/11/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente à CEUA até a conclusão do protocolo.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo