



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



RAFAEL DOS SANTOS BRÍCOLA

A ação anti-inflamatória da interleucina-10 em resposta ao treinamento físico reduz a progressão da doença de Alzheimer em modelo experimental

Rafael Dos Santos Brícola

**A ação anti-inflamatória da interleucina-10 em
resposta ao treinamento físico reduz a progressão
da doença de Alzheimer em modelo experimental**

The anti-inflammatory action of interleukin-10 in response to physical training
reduces the Alzheimer's disease progression in an experimental model

*Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas
como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do
título de Mestre em
Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo*

Orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO(A) ALUNO RAFAEL
DOS SANTOS BRÍCOLA E ORIENTADA PELO PROF. DR.
EDUARDO ROCHETE ROPELLE.

Limeira – 2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

B739a Brícola, Rafael dos Santos, 1998-
A ação anti-inflamatória da interleucina-10 em resposta ao treinamento físico reduz a progressão da doença de Alzheimer em modelo experimental / Rafael dos Santos Brícola. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Doença de Alzheimer. 2. Interleucina-10. 3. Exercícios físicos. 4. Inflamação. 5. Envelhecimento. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The anti-inflammatory action of interleukin-10 in response to physical training reduces the Alzheimer's disease progression in an experimental model

Palavras-chave em inglês:

Alzheimer Disease

Interleukin-10

Exercise

Inflammation

Aging

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Eduardo Rochete Ropelle [Orientador]

Bruno de Melo Carvalho

Igor Luchini Baptista

Data de defesa: 08-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: 0000-0002-8982-1096

- Currículo Lattes do autor: 0983054005251145



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



**A Ação Anti-inflamatória da Interleucina-10 em
Resposta ao Treinamento Físico Reduz a Progressão
da Doença de Alzheimer em Modelo Experimental.**

Autor: Rafael dos Santos Brícola

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle, Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp – Limeira.

Prof. Dr. Igor Luchinni Batista
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp – Limeira.

Prof. Dr. Bruno de Melo Carvalho
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE)

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Agradecimentos

Durante os três anos de desenvolvimento do projeto, os dois primeiros deles foram em meio a uma pandemia que desafiou o mundo todo a se adaptar a uma nova realidade, por isso devo destacá-lo. Foi um período que impôs ainda mais dificuldades para o avanço deste projeto e também um período desgastante e impiedoso, que acabou coincidindo com a partida da minha amada madrinha Adriana Leme Nunes, minha maior inspiração de força e luta, que me apoiava em tudo, incondicionalmente. Por isso, meus agradecimentos iniciais são especialmente à você Adriana, que tanto representa para mim e infelizmente não posso desfrutar deste momento com você fisicamente, mas que estará sempre em meu coração.

Agradeço também, de maneira especial, meus pais “Melinho” e Maria, referências de humildade, respeito, disciplina e trabalho duro. Vocês são meu alicerce, a pedra angular que me sustenta e permite buscar meus sonhos e objetivos. A vocês, toda minha gratidão, admiração e amor. Aos meus irmãos, João Paulo e Lucas, também expresso minha gratidão, respeito e companheirismo nesta jornada, vocês são motivação e inspiração para o seu caçula. Vocês, minha família, são minha fonte de coragem, alegria, humildade e motivação para ser cada dia melhor.

Ressalto também, minha gratidão ao meu padrinho Fábio e “meu irmão mais novo” Pedro, que são parte da Adriana que permanece entre nós, me apoiando, incentivando e dividindo os fardos que a vida nos impõe.

Sou grato também a todos os familiares e amigos que sempre me motivam a evoluir, persistir e acreditar que sou capaz. Deixo um obrigado especial ao meu orientador Eduardo Ropelle, que desde 2017 me abriu as portas para a ciência. Aos amigos e colegas de laboratório também fica minha sincera gratidão por todo o período de aprendizado, convívio, alegrias e diversão, principalmente a Renata, Barbara, Matheus, Carlos e Diego, que me acompanharam desde o início dessa jornada de mestrado e contribuíram muito para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos demais professores responsáveis pelo LaBMEx, à FCA – UNICAMP por toda estrutura disponibilizada e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que financiou todo o desenvolvimento deste projeto (2020/03142-4).

Por fim, agradeço meu Deus, por todas estas graças alcançadas em minha vida.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que resulta em comprometimento cognitivo dos pacientes acometidos ao longo do tempo. A etiologia da doença é multifatorial, tendo alguns contribuintes bem estabelecidos, dentre eles o aumento da expressão gênica da proteína precursora de Amilóide (*app*) e o aumento da expressão gênica de presenilina-1 (*ps1*) que contribuem diretamente para o acúmulo de proteínas beta amiloides (AB). As proteínas beta-amiloide são neuro-tóxicas e se acumulam, cronologicamente, e formam placas senis no tecido neural, sendo estes, aglomerados proteicos altamente tóxicos. Postula-se que a inflamação crônica possa contribuir para o acúmulo de beta-amilóide e a formação de placas senis no hipocampo e no córtex ao longo do tempo. Por outro lado, estudos demonstraram que o exercício físico é capaz de melhorar as respostas sinápticas no hipocampo, reduzindo marcadores inflamatórios, o acúmulo de β A, bem como a formação de placas senis e melhorando as respostas cognitivas. No presente estudo, através de análises *in silico* observamos que humanos com DA possuem elevados níveis de marcadores inflamatórios no córtex pré-frontal e relatamos que o treinamento físico aeróbio provocou uma potente resposta anti-inflamatória, reduziu a ativação microglial e a deposição de proteínas beta amiloide no hipocampo de camundongos APP^{swe}/PS1 Δ E9 (APP/PS1⁺) e preveniu o declínio cognitivo no modelo de camundongo da DA. Também observamos que camundongos *wild type* e APP/PS1⁺ possuem alta expressão de IL10 no tecido hipocampal após uma sessão de exercício físico. Além disso, o tratamento intranasal com IL10 recombinante (IL10r) em camundongos *wild type* foi capaz de ativar sua via de sinalização. Somado a isto, camundongos APP/PS1⁺ que receberam IL10r intranasal apresentaram melhora cognitiva. Assim, concluímos que a atividade anti inflamatória de IL10 está vinculada aos benefícios cognitivos promovidos pelo treinamento físico em indivíduos pré-dispostos a Doença de Alzheimer.

Palavras chave: Doença de Alzheimer; Interleucina-10; Exercícios físicos; Inflamação; Envelhecimento.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that results in cognitive impairment of affected patients over time. The etiology of disease is multifactorial, with some well-established contributors, including increased gene expression of Amyloid precursor protein (app) and presenilin-1 (ps1), which directly contribute to the accumulation of beta amyloid proteins (β A). Beta-amyloid proteins are neurotoxic and accumulate chronologically and form senile plaques in neural tissue. It is postulated that chronic inflammation may contribute to the accumulation of beta-amyloid and the formation of senile plaques in the hippocampus and cortex over time. On the other hand, studies have shown that physical exercise is able to improve synaptic responses in the hippocampus, reducing inflammatory markers, β A accumulation and the formation of senile plaques and improving cognitive responses. Here, in silico analysis, we observed that humans with AD have high levels of inflammatory markers in the hippocampus and we report that aerobic physical training promoted a potent anti-inflammatory response, reduced microglial activation and the deposition of beta amyloid proteins in the hippocampus of mice APP^{swe}/PS1 Δ E9 (APP/PS1⁺) and prevented cognitive decline in the mouse model of AD. We also observed that wild type and APP/PS1⁺ mice have high expression of IL10 in the hippocampal tissue after a physical exercise session. Furthermore, intranasal treatment with recombinant IL10 (IL10r) in wild-type mice was able to activate the pSTAT3 signaling pathway. Added to this, APP/PS1⁺ mice that received intranasal rIL10 showed cognitive improvement. Thus, we conclude that the anti-inflammatory activity of IL10 is linked to the cognitive benefits promoted by physical training in individuals predisposed to Alzheimer's disease.

Key Words: Alzheimer Disease; Interleukin-10; Exercise; Inflammation; Aging

Sumário

Introdução	9
1.1. A doença de Alzheimer	10
1.2. Inflamação e a Doença de Alzheimer.....	12
1.3. Efeito anti-inflamatório do exercício: O papel da IL10.	14
2. Hipótese	16
3. Justificativa	16
4. Objetivos.....	16
4.1. Objetivo geral	16
4.2. Objetivos específicos.....	16
5. Materiais e Métodos.....	17
5.1. Animais	17
5.2. Protocolo de treinamento físico.....	17
5.3. Protocolo de Exercício Físico Agudo.....	17
5.4. Tratamento IL-10 intranasal.....	18
5.5. Testes Cognitivos	18
5.5.1. Teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM).....	18
5.5.2. Teste de medo condicionado ao contexto.....	19
5.5.3. Teste de Reconhecimento de Novos Objetos.....	20
5.6. Reagentes e Anticorpos	21
5.7. Procedimentos de Extração	21
5.8. Análise proteica por Western blotting.....	22
5.9. RT-q PCR.....	22
5.10. Imunofluorescência e Imunohistoquímica.....	23
5.11. Análise de transcriptoma.....	24
5.12. Análise estatística.....	24
6. Resultados e Discussão	25
7. Conclusões	34
8. Referências bibliográficas	36

1. Introdução

A doença de Alzheimer é caracterizada como uma doença neuro-degenerativa progressiva que cursa em comprometimento cognitivo de seus pacientes, incluindo, alterações comportamentais perda de memória, perda da capacidade de aprendizagem, dificuldades motoras e demência, possuindo estreita relação com a cronologia de envelhecimento humano. Estima-se que, atualmente no Brasil exista 1,2 milhão de portadores da doença de Alzheimer¹. A expectativa de vida de um paciente com esta doença é de aproximadamente 8 a 10 anos, a partir do diagnóstico. A farmacoterapia empregada ainda é incapaz de prevenir ou impedir o avanço da doença, possuindo a capacidade apenas de retardar a sua progressão¹.

É sabido que a clivagem desregulada da Proteína Precursora de Amiloide (PPA) culmina na liberação da proteína beta-amiloide (AB), uma proteína insolúvel incapaz de ser metabolizada pelo organismo humano e que passa a se acumular em diversos tecidos, em particular no hipocampo, dando origem as placas senis inter-neuronais, que são caracterizadas por alta toxicidade ao cérebro e são resultado de agregados proteicos de BA e neurônios em fase degenerativa, que interferem na comunicação e neurotransmissão das células do SNC².

A formação de emaranhados neurofibrilares nas regiões do córtex e principalmente do hipocampo, também são responsáveis pelo desenvolvimento da doença³. Nas fases iniciais, ocorre a redução ou perda de sinalização e comunicação neuronal resultante da hiper fosforilação da proteína Tau em células hipocampais⁴. Após a fosforilação da proteína Tau, filamentos da mesma, passam a se acumular e formam os emaranhados neuro fibrilares pareados ao citoesqueleto, que por sua vez, acabam interferindo na interação neuronal e acometendo o desempenho sináptico, resultando em morte celular e finalmente perda da função tecidual⁵.

Por outro lado, múltiplos estudos de meta-análises demonstram que a atividade física e exercícios físicos regulares são capazes de prevenir^{6,7}, retardar a progressão e até mesmo melhorar a função cognitiva de pacientes da doença de Alzheimer⁸⁻¹⁰. Contudo, os efeitos do exercício físico sobre o processo amiloidogênico ainda é pouco conhecido.

1.1. A doença de Alzheimer

No início do século XX, em 1907, o psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer realizou o primeiro diagnóstico da doença ou “mal” de Alzheimer¹¹. Desde então, iniciou-se uma intensa busca para o entendimento da etiologia e também para o tratamento desta doença. Contudo, devido à alta complexidade, tanto a fisiopatologia como medicamentos para o tratamento dessa doença são ainda insuficientemente descritos na literatura. Postula-se que a doença seja desencadeada por múltiplos fatores, sendo genéticos e também, fatores ambientais apresentam grande influência no desencadeamento da Doença.².

As placas amiloide são oriundas do acúmulo extracelular da proteína beta amiloide no parênquima cerebral e também nos vasos sanguíneos cerebrais¹². Estudos recentes mostram que, inicialmente, as proteínas beta-amilóide acumuladas formam oligômeros, os quais são considerados os responsáveis pelo prejuízo sináptico, sugerindo que esta situação seja responsável pela destruição das funções cerebrais^{2,13,14}, com destaque para a região do hipocampo. Como resultado, no decorrer do tempo, o acúmulo de beta-amilóide culmina em maior formação de oligômeros, que passam a formar as placas senis¹³.

Em condições normais a proteína precursora de amiloide sofre a ação de clivagem da proteína α -secretase, a qual gera fragmentos de amiloide menores e solúveis ao meio extracelular, sendo metabolizados posteriormente pelo organismo. Entretanto, indivíduos portadores da doença de Alzheimer, apresentam importante diferença no decorrer deste processo. A alteração da clivagem da proteína APP pelas proteínas β -secretase ou γ -secretase gera fragmentos de amiloide maiores e insolúveis chamados de proteínas beta-amiloide, principalmente pela ação da γ -secretase. A gênese desta alteração conformacional de α -secretase para β e γ secretase que contribui para o surgimento das AB permanece incerto, porém, recentemente estudos sobre fatores exógenos e ambientais como maus hábitos alimentares, tabagismo e sedentarismo, que estão relacionados a disfunções metabólicas e ao aumento do perfil inflamatório estão sendo cada vez mais reforçadas. Observou-se recentemente que proteínas como Glicogênio Sintase Kinase 3 (GSK3) e Presenilina 1 (PSEN1/PS1) estimulam a má clivagem de APP e contribuem para formação de AB^{15,16}. Por sua vez, tais proteínas encontram-se com maior expressão em indivíduos com o estilo de vida supracitado, estabelecendo assim, forte relação com a propensão ao desenvolvimento da DA.

Ainda, a formação de fragmentos maiores e insolúveis de beta-amiloide resulta na ligação desses fragmentos a oligômeros solúveis que geram a formação de placas amiloides que, ao longo do tempo, se juntam a emaranhados de neurônios em fase degenerativa, sendo altamente insolúveis e extremamente neuro tóxicos as quais posteriormente vão se acumulando ao longo do tempo, formando as placas amilóides^{2,13}.

É sabido que a formação dos oligômeros de beta-amiloide é resultante de atividades de células neuronais e de astrócitos¹³. Quando acumulados, os oligômeros de amiloide promovem danos neuronais pois são capazes de promover hiper fosforilação da proteína Tau, modificando sua isoforma, ocasionando danos estruturais à célula neural, o que gera o acometimento de processos mitocondriais e sinápticos além de danos oxidativos ao neurônio¹⁷. A proteína Tau é responsável por realizar funções que asseguram a estrutura dos neurônios devido a sua atuação nos microtúbulos neuronais^{17,18}. A manutenção das características estruturais dessas células é fundamental para que ocorra comunicação neuronal e até mesmo transporte de nutrientes de maneira adequada^{17,18}.

Durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer, a proteína Tau encontra-se hiper fosforilada e assim, passa a ter sua isoforma modificada. Essa alteração faz com que Tau se dissocie dos neuro túbulos e seja liberada no meio celular, a qual passa a se acumular nas paredes do citoesqueleto, dando origem a formação de fibrilas e posteriormente aos emaranhados neuro fibrilares. Deste modo, a dissociação de Tau dos microtúbulos culmina em desestabilização nas funções neuronais e seu acúmulo em emaranhados neuro fibrilares também se torna neuro tóxico danificando as organelas celulares, a partir daí, o organismo passa a sinalizar o recrutamento de proteínas inflamatórias e apoptóticas, tendo por fim, aumento da ativação inflamatória, acometimento dos sistemas neuronais, comprometimento sináptico e em última instância a morte celular¹³.

FIGURA 1

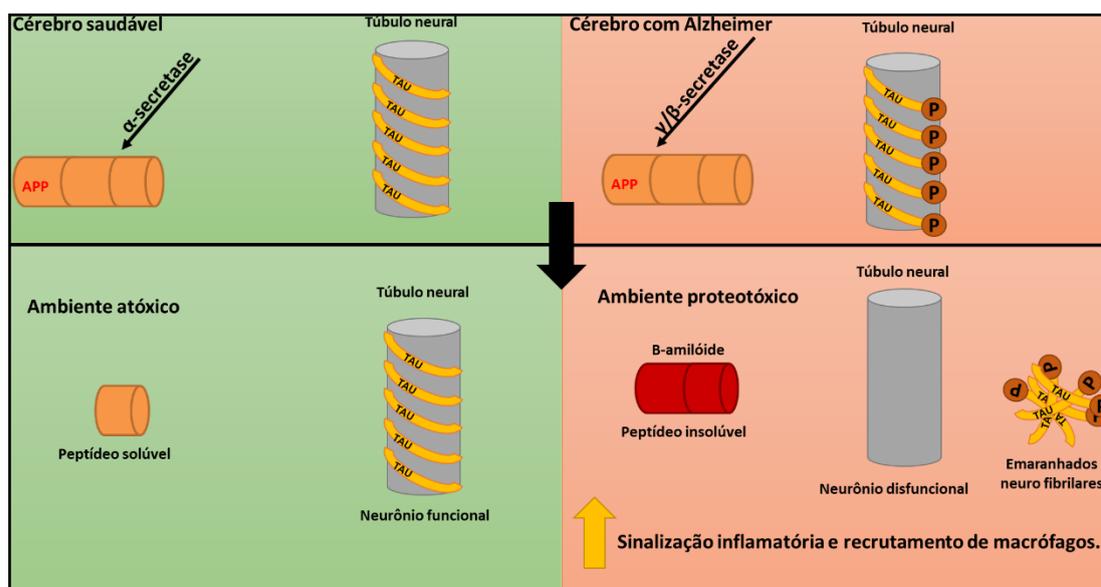


Figura 1 – Ilustração do mecanismo molecular que resulta nos emaranhados neuro-fibrilares e acúmulo de proteínas beta amilóide.

1.2. Inflamação e a Doença de Alzheimer

A presença da ativação crônica do perfil inflamatório, característica inerente de doenças como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão também é observada durante a progressão da Doença de Alzheimer¹⁴.

A literatura vem apresentando diversos resultados que correlacionam a Doença de Alzheimer as demais doenças supracitadas, bem como uma maior propensão de indivíduos portadores destas doenças em desenvolver a Doença de Alzheimer ao longo da vida¹⁴.

Este fato ocorre por duas vertentes principais que contribuem para que a Doença de Alzheimer seja desencadeada e desenvolvida nestes indivíduos. Primeiramente, pessoas que possuem hábitos sedentários e dietas hipercalóricas geralmente apresentam determinadas características maléficas ao organismo, como o aumento da adiposidade corporal, aumento de triglicérides e colesterolís circulantes, resistência a sinalização da insulina e o conseqüente aumento de glicose sanguínea. Por sua vez, já é bem estabelecido na literatura que estes quadros clínicos são acompanhados de ativação crônica de mecanismos pró-inflamatórios danosos ao organismo^{14,19}.

Deste modo, alguns estudos recentes mostraram que a presença do perfil inflamado e resistência à insulina, como a redução da fosforilação de GSK3, por exemplo, é capaz de contribuir para a hiper fosforilação da proteína TAU e com o aumento da clivagem da proteína precursora de amilóide por β -secretase e γ -secretase, originando as proteínas beta amilóide e emaranhados neuro fibrilares de filamentos da proteína TAU. Alguns

pesquisadores ao relacionarem o aumento da inflamação com a DA, consideram a Doença de Alzheimer como Diabetes Mellitus tipo 3²⁰. O perfil inflamado no tecido neural resulta no recrutamento de macrófagos específicos da região cerebral que são chamados de micróglia. As micróglia estimulam a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias e ativação de inflamassomos. A liberação destes agentes pró-inflamatórios resultam no desencadeamento de uma série de reações que podem não ser os responsáveis por desencadarem a DA diretamente, mas desempenham um papel funcional em seu desenvolvimento e progressão²¹.

A presença de beta amiloide é tóxica ao meio neural e sinaliza as microglia, que são responsáveis pelo monitoramento homeostático dos neurônios. Com a sinalização de toxicidade, as micróglia auxiliam na depuração e remoção das proteínas beta amiloides no SNC. Entretanto, quando permanecem ativadas de maneira crônica, as micróglia começam se sobrecarregar e passam a perder sua capacidade de auxílio na remoção da proteínas beta amiloide, assim, com esta disfuncionalidade microglial no SNC, as proteínas passam a se aglomerar ainda mais, avançando a formação de aglomerados de proteicos e placas senis²².

Associado a isto, recentes estudos genéticos mostraram a relação do desenvolvimento da DA com a expressão de determinados alelos associados diretamente e/ou exclusivamente com genes expressos pelas micróglia. A redução de expressão de determinados genes em decorrência de sua má funcionalidade em resposta a ativação crônica contra as proteínas beta amiloide, mostra-se determinante na redução de promotores e estimuladores de vias relacionadas a fagocitose, autofagia e função lisossomal, contribuindo para que ocorra o aumento da liberação de citocinas inflamatórias, gerando uma inflamação cíclica e danosa as micróglia, contribuindo para sua disfuncionalidade no combate a DA²³.

Ainda no contexto relacionado a neuro-inflamação, macrófagos oriundos da medula óssea podem ser recrutados para auxiliar no combate as proteínas beta amiloide. Estudos identificaram determinadas variações genéticas no receptor de macrófagos TREM2 que pode aumentar o risco de desenvolvimento da DA. O aumento da expressão deste gene relaciona-se com o aumento de outros genes inflamatórios presentes em micróglia relacionadas a doenças degenerativas²¹, entretanto o mecanismo exato com que TREM2 se relaciona com a DA ainda é desconhecido.

Além dos fatores que influenciam a atividade das micróglia citados a cima, também ocorrem estímulos de liberação de citocinas como IL1 β , TNF α e IL6 que também se

apresentam como fatores chave na relação entre inflamação e a DA ²⁴⁻²⁸. Estudos observaram que estas citocinas estão aumentadas no tecido cerebral de indivíduos acometidos pela DA ²⁹⁻³¹. O aumento da secreção de IL1 β estimula a proteína precursora de amiloide e um possível aumento na sua clivagem por β -secretase ou γ -secretase, sendo contribuinte para a formação das placas senis. Ainda, a proteína beta amiloide promove a ativação de inflamassomas como NLRP3, que estimula ainda mais a liberação de IL1 β , instaurando assim um sistema de retroalimentação para a formação de proteínas beta amiloide e o consequente acúmulo de placas senis^{32,33}.

Já as citocinas IL6 e TNF α também são liberadas pelas micróglia e estimulam a produção da proteína precursora de amiloide bem como sua clivagem por β -secretase e γ -secretase e a consequente produção de proteínas beta amiloide. Associado a esta característica, estas duas citocinas inflamatórias estimulam o surgimento de astrócitos reativos que são danosos ao meio neural e promovem a morte celular nestes tecidos³⁴.

1.3. Efeito anti-inflamatório do exercício: O papel da IL10.

Sob outra perspectiva, a literatura apresenta evidências robustas de que determinados estímulos não farmacológicos são capazes de modular positivamente o perfil inflamatório de indivíduos. Dentre estes, o exercício físico apresenta-se como um dos principais agentes não farmacológicos capazes de atenuar o perfil inflamatório crônico em diversos tecidos humanos. Neste sentido, estudos recentes observaram que tanto em camundongos quanto em humanos, o treinamento físico promove a neurogênese, melhora de respostas sinápticas e capacidade cognitiva^{35,36}. No entanto, os mecanismos específicos que promovem estas adaptações positivas no sistema nervoso central permanecem desconhecidas. Entendê-las e buscar sua aplicação no combate e prevenção à Doença de Alzheimer mostram-se como potenciais alvos para o tratamento e prevenção desta doença.

A contração muscular durante o exercício físico promove a liberação de miocinas que estimulam as repostas de reparo do estresse muscular, produção hepática de glicose e ativação lipolítica para obtenção de energia, dentre outras funções³⁷. Para reduzir o perfil inflamado após o exercício físico, a miocina Interleucina-10 (IL10), que possui características anti-inflamatórias, é secretada pelo tecido muscular. A secreção de IL-10 sinaliza os receptores de IL10 (IL10R) que fosforilam as proteínas Janus Kinase 1 e Transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (JAK1 e STAT3). A sinalização de pSTAT3 resulta na redução da expressão de genes inflamatórios como TNF α e IL1 β , que estão relacionados ao ciclo vicioso estimulante a produção de APP e sua clivagem

aberrante. Assim, possivelmente, após a secreção de IL-10 pelo exercício físico seguido da inibição de citocinas inflamatórias, ocorre a redução da transcrição gênica de APP e suas proteínas *downstream* que participam de sua clivagem inadequada e permitem a gênese de proteínas beta amiloide.

Além destas funções que auxiliam no combate a inflamação e possivelmente podem inibir a presença do ciclo vicioso de estímulo da APP, a ativação do receptor de interleucina-10 também sinaliza o aumento da expressão e atividade proteica de P13K e AKT, que são capazes de diminuir a ativação de genes inflamatórios e apoptóticos e estimular a sobrevivência celular (FIGURA 2).

FIGURA 2

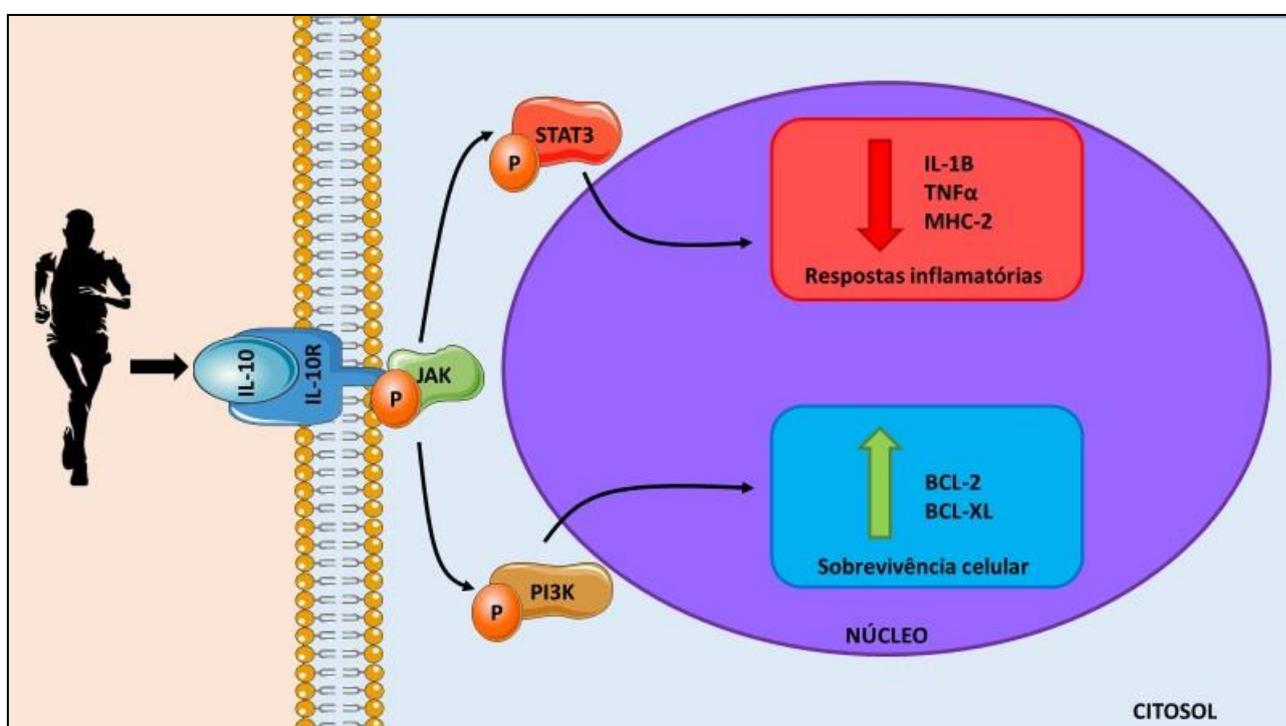


Figura 2 “Sinalização anti-inflamatória de IL-10” – A cascata anti-inflamatória após o exercício físico é fornecida pela sinalização de IL-10R.

Com base nas informações acima, a interleucina-10 merece destaque nesta discussão, visto que é altamente responsiva ao exercício físico e possui importante ação anti-inflamatória, principalmente em tecidos periféricos^{37,38}. Esses efeitos periféricos que regulam a inflamação e contribuem para a homeostase sistêmica são um potente alvo de pesquisas para elucidar o papel do treinamento físico no sistema nervoso central. Considerando que a atividade anti-inflamatória da IL10 pode regular o perfil inflamado em indivíduos com DA, a atividade física pode, conseqüentemente, contribuir para a

de puração do conteúdo de beta-amilóide no cérebro e pode fornecer um alvo terapêutico acessível para prevenção e combate à Doença de Alzheimer.

2. Hipótese

Mediante o exposto, aventamos a hipótese de que a atividade da interleucina-10 em resposta ao treinamento físico pode contribuir para a redução da inflamação na Doença de Alzheimer e, conseqüentemente, pode ser um potente agente preventivo e regulador da progressão da doença.

3. Justificativa

Este estudo tem o potencial de demonstrar como o treinamento físico e a interleucina-10 podem regular os processos inflamatórios na Doença de Alzheimer e prevenir sua progressão. Além disso, os resultados podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos subjacentes aos benefícios do exercício físico não apenas na prevenção da doença de Alzheimer, mas também podem se estender a outras doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento geral. Nesse sentido, o entendimento dos efeitos do exercício físico sobre as respostas anti-inflamatórias e sua relação com os mecanismos celulares relacionados à doença de Alzheimer são de grande interesse científico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral:

Avaliar o conteúdo de β A em regiões cerebrais do modelo de camundongo APP/PS1 pré-disposto a Doença de Alzheimer seguindo um protocolo de treinamento físico, bem como monitorar as adaptações ao perfil inflamatório prevalente na doença em resposta a IL-10.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o perfil inflamatório de indivíduos humanos acometidos pela DA através de análises *in Silico*.

Determinar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre parâmetros, comportamentais, cognitivos e capacidade de aprendizagem em camundongos APP/PS1.

Avaliar o conteúdo de beta-amiloide no córtex e hipocampo de camundongos APP/PS1 após um protocolo de treinamento aeróbio.

Realizar a avaliação da ativação microglial no hipocampo e córtex de camundongos APP/PS1.

Avaliar a expressão de IL-10 em resposta ao exercício e ao tratamento com IL-10r intranasal

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com 2 meses de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) para o grupo controle *wild type*, para os grupos controle APP/PS1⁺ e treinados APP/PS1⁺, foram utilizados camundongos C57BL/6J APP/PS1⁺ provenientes do Biotério do Centro De Desenvolvimento De Modelos Experimentais Para Biologia E Medicina - UNIFESP. Os animais foram previamente pesados e alocados em gaiolas com cinco animais cada, expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com temperatura entre 20°C e 22°C, onde receberam água e ração padrão para roedores (da marca Nuvilab) *ad libitum*. O protocolo número 5668-1/2020 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA).

Para redução do viés comportamental dos animais relacionado a sua manipulação e exposição ao ambiente de treino, os grupos *wild type* e controle APP/PS1⁺ passaram pelas mesmas manipulações relacionadas a transporte das gaiolas à sala de treinamento, incluindo a realização do período de adaptação ao ergômetro e foram alocados nas esteiras desligadas pelo mesmo tempo (60 minutos) que o grupo exercitado realizou a sessão de treino.

5.2. Protocolo de treinamento físico.

Para o protocolo de treinamento, os camundongos do grupo Treinado foram submetidos a quatro semanas de treinamento em esteira ergométrica, exercitados em intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato, conforme proposto por Ferreira e colaboradores³⁹. Previamente, os grupos foram adaptados ao ergômetro, visando minimizar o possível estresse induzido pelo equipamento, incluindo os grupos controle e APP/PS1⁺.

5.3. Protocolo de exercício físico agudo.

Todos os animais que foram submetidos à uma sessão única de exercício físico foram previamente adaptados ao ergômetro e a sessão constitui-se de 10 minutos de aquecimento com velocidade de 5m/min e posteriormente tiveram o aumento de 3m/min na velocidade a cada 3 minutos, até a exaustão, que foi detectada após o terceiro toque do animal ao final da esteira. Para este experimento que buscou avaliar a expressão aguda da

proteína IL-10, a extração tecidual dos animais exercitados foi realizada 4 horas após a exaustão.

5.4. Tratamento IL-10 intranasal.

Para o tratamento IL-10r intranasal, os animais foram adaptados à manipulação por 5 dias seguidos. Após o período de adaptação, os animais foram tratados com IL-10 recombinante (*Sino Biological Inc.*) por 7 dias consecutivos com dosagem de 0,5 ug por dia na via nasal dos animais, conforme descrito por Wang e colaboradores⁴⁰.

5.5. Testes Cognitivos

5.5.1. Teste do Labirinto Aquático de Morris (MWM)

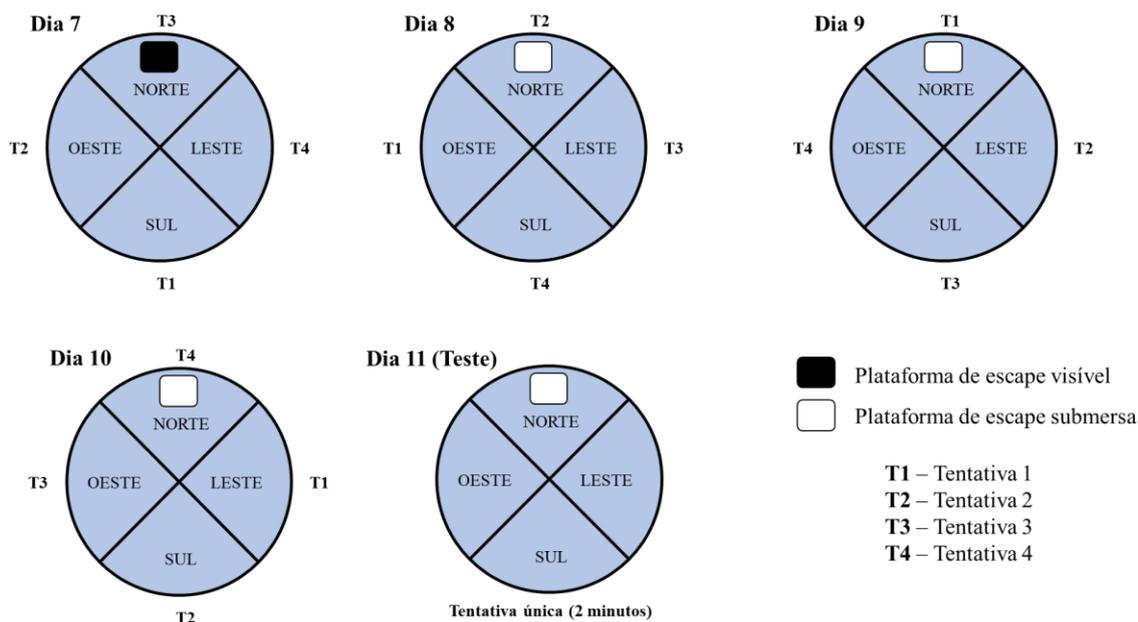
O Teste de Labirinto Aquático de Morris avalia a capacidade do animal em adquirir memória espacial, através da mensuração da latência para que o animal localize uma plataforma submersa em um tanque com água opaca⁴¹.

O protocolo do MWM foi adaptado de estudos anteriores^{42,43} e foram realizados durante o ciclo claro. Foram utilizados uma piscina circular (diâmetro: 2m, profundidade da água: 70 cm, temperatura da água 25 ± 1 ° C e uma plataforma de escape circular (diâmetro: 15 cm). Inicialmente, os animais foram adaptados ao meio líquido durante quatro dias, sendo inseridos ao tanque com água cobrindo a metade de seu corpo nos dois primeiros dias, no terceiro e quarto dia, o volume de água foi aumentado de maneira gradativa com duração de 5 a 10 minutos para cada dia de adaptação.

Durante os cinco dias do teste, os animais realizaram quatro tentativas por dia (máximo de 60s cada) começando em todos os quadrantes (ou seja, sul, oeste, norte e leste) com a cabeça voltada para a parede do tanque. A água foi mantida incolor no primeiro dia do teste e foi escurecida por adição de corante (cor preta) nos dias seguintes. A plataforma de escape foi colocada no centro do quadrante norte e mantida 5 cm acima do nível de água no primeiro dia e 5 cm abaixo nos dias seguintes. O tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma foi registrado (tempo de escape de latência). Quando os animais não encontraram a plataforma, foram gentilmente colocados sobre ela, permanecendo por 15s (para que notem a existência da área de escape).

Para o teste de retenção de memória, a plataforma de escape foi retirada e os animais realizaram tentativa única com duração de 2 minutos, iniciando no quadrante Sul e sendo mensurado o tempo em que cada um permaneceu no quadrante Norte. O protocolo de realização do MWM está ilustrado na figura a seguir:

Dias			
1 - 4	5 - 6	7 - 10	11
Adaptação ao meio aquático	Descanso	MWM	MWM-Teste de Retenção de memória

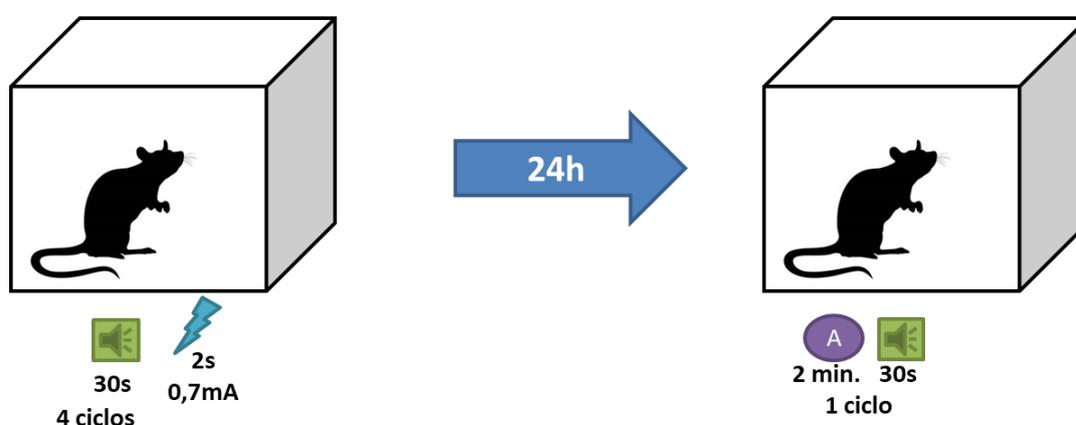


5.5.2. Teste de medo condicionado ao contexto.

O teste de medo condicionado ao contexto foi conduzido como descrito previamente por Corcoran e colaboradores (2002)⁴⁴, usando câmaras alocadas em caixas que atenuam o som (390 x 470 x 320 mm) (INSIGHT, Ribeirão Preto - SP). Cada câmara é equipada com luzes (infravermelhas e visíveis), caixas de som e o chão da câmara consiste em uma grade de aço inoxidável conectada a um gerador de choque. Um computador com o software específico do equipamento (INSIGHT) controla os estímulos (som e choque). Uma câmera conectada ao sistema de vídeo automático foi usada para detectar e gravar os movimentos e comportamento de *freezing*. No primeiro dia (sessão de condicionamento), os camundongos foram adaptados a câmara de teste por 2 minutos seguidos de uma apresentação de um áudio por 30 segundos (5kHz de frequência; 80dB, estímulo condicionado (CS)), co-terminando com um choque nos pés durante os últimos 2 segundos (0.7mA; estímulo não condicionado (US)). Os animais receberam quatro pares de CS-US com um intervalo de 2 minutos entre os testes. O último teste de CS-US

foi seguido de um período de 2 minutos de descanso antes dos animais retornarem para suas gaiolas. O tempo total de duração da sessão de condicionamento ao medo dura 12 minutos. No segundo dia do teste, os animais foram expostos as câmaras novamente sob o mesmo contexto, porém sem a frequência elétrica e a resposta de *freezing* foi monitorada. O medo foi mensurado pelo tempo que os animais permaneceram no comportamento de *freezing*, caracterizado por uma postura agachada e ausência de quaisquer movimentos visíveis com exceção do movimento respiratório.

Medo Condicionado ao Contexto CFC

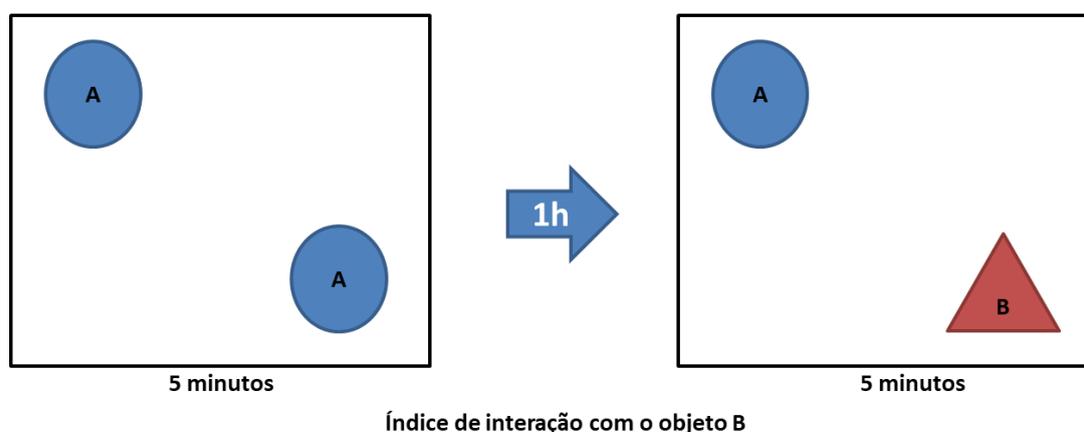


Tempo de Freezing após o estímulo contextual (sonoro)

5.5.3. Teste de Reconhecimento de Novos Objetos

Este teste será realizado em uma caixa quadrangular, medindo 30x30x45cm. Dois objetos (A e A) serão fixados à caixa com fita adesiva, sendo observado o tempo de exploração de cada objeto, ou seja, quando os animais cheiram ou tocam o objeto com o nariz ou com as patas dianteiras. No primeiro teste, durante 5 minutos, será registrado o tempo de exploração a cada objeto. O teste será repetido novamente, após 1 hora, sendo substituído um dos objetos (A e B). As posições dos objetos (familiar e novo) serão randomizadas e a caixa será limpa entre um teste e outro com álcool 90%^{54,55}. Ao final, será realizada a razão de discriminação estabelecida pela proporção entre o tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar, sendo apresentadas as respectivas porcentagens^{56,57}.

Reconhecimento de Novos Objetos (NOR)



5.6 Reagentes e Anticorpos

Os reagentes e os aparelhos utilizados para o gel Sódio Dodecil Sulfato (SDSPAGE) são provenientes da Bio-Rad (Richmond, CA). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditiotreitól (DTT) são provenientes da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2 μ m) usada é proveniente da empresa Biorad. Foram utilizados os anticorpos anti-IL-10 (sc-365858), que foi proveniente da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), e anti-pSTAT3 (9131S), anti-pTAU (39357S) anti- α -Tubulin (#2144S) da empresa Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts).

5.7 Procedimentos de Extração

Foram extraídas amostras do hipocampo dos animais, que foram posteriormente homogeneizadas em tampão de extração (contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris - pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, reagentes da marca Sigma-Aldrich). Após os experimentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical. O homogenato foi centrifugado a 12.000 RPM por 20 minutos. Foi determinada a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra, utilizando o método de Bradford. Em seguida, foi acrescido o tampão de Laemmli a cada uma das amostras, que foram fervidas por 5 minutos e armazenadas a -80° C para as análises de Western blotting.

5.8 Análise proteica por Western blotting

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli⁴⁵ contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean®). Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular Cell com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad por aproximadamente 2 horas, a 120 volts, como descrito por Towbin et al 1979⁴⁶. No tampão, foi acrescido 0,1% de SDS para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%, reagentes da marca Sigma Aldrich). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas à 4° C overnight com 10uL dos respectivos anticorpos primários (IL-10, pSTAT3, α -Tubulin – *Santa Cruz Biotechnology*) com diluição de 1:500. As membranas foram posteriormente incubadas de anticorpo secundário em concentração 1:1000 e, posteriormente incubadas com 2 mL de solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada com o uso de autorradiografias e/ou fotodocumentador Genesys. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

5.9 RT-q PCR

O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol (Invitogen, Grand Island, NY, EUA). Uma quantidade de 3 μ g de RNA total foi usada como modelo para a síntese de cDNA usando kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As qPCRs foram realizadas usando 200 ng de cDNA e 0,3 μ M de iniciadores das proteínas marcadoras da atividade mitocondrial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Os parâmetros de ciclagem foram: 10 min a 95 ° C, seguidos de quarenta ciclos de 15s a 95 ° C, 60s a 60 ° C. O conteúdo relativo de mRNA foi determinado após normalização com β 2M usando o método $\Delta\Delta$ Ct. Cada conjunto de iniciadores foi concebido para reconhecer regiões únicas de sequências dos genes *il-10*, *gapdh*, *il-1 β* , *tnfa*, *app*, *il-6* e *psen*.

Gene	Sequencia	Temperatura	TEMPO DE ANNEALING
IL1B F	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	60° C	1'
IL1B R	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	60° C	1'
TNFA F	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	60° C	1'
TNFA R	GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG	60° C	1'
IL10 F	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	60° C	1'
IL10 R	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC	60° C	1'
IL6 F	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	60° C	1'
IL6 R	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC	60° C	1'
GAPDH F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	60° C	1'
GAPDH R	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCCAG	60° C	1'
APP F	TCCGTGTGATCTACGAGCGCAT	60° C	1'
APP R	GCCAAGACATCGTCGGAGTAGT	60° C	1'
PSEN F	GAGACTGGAACACAACCATAGCC	60° C	1'
PSEN R	AGAACACGAGCCCCGAAGGTGAT	60° C	1'

Tabela da sequência de *primers* dos genes alvos da técnica de RT-qPCR

5.10 Imunofluorescência e Imuno- histoquímica

Os tecidos cerebrais dos animais foram armazenados em solução de paraformoldeído 4% por 24 horas e posteriormente foram estocados em solução de glicose 30%. Após, foram realizados cortes coronais da região do hipocampo e córtex, e foram depositados em lâminas histológicas silanizadas e armazenadas a 4°C. Para imunofluorescência, os cortes foram incubados em solução de bloqueio (1 x PBS com 5% BSA) seguido de incubação noturna com anticorpo primário anti Iba-1 (1:100) (Anti-Iba-1 conjugado (E404W) (AF488) (20825S), a 4 °C. Após as lavagens com PBS, as seções foram montadas com DAPI (#H-1200 Vector Laboratories; Burlingame, CA, EUA) para coloração de ácido nucleico em azul. Os cortes do hipocampo e cortex foram examinados em microscópio confocal (Leica TCS SP5 II). Três a quatro imagens por grupo foram contadas às cegas usando o software Image J 1.48v para ambas as análises.

Para imuno-histoquímica, os cortes histológicos das amostras foram hidratados, lavados em PBS (0,1M, pH 7,4), incubados com solução bloqueadora (para bloqueio da peroxidase endógena: solução de H₂O₂ 3% em metanol por 10 minutos; bloqueio de interação proteína-proteína: BSA a 3% em PBS) e na sequência, incubados *overnight* a 4° C com anticorpos primários, Anti-Amyloid β Antibody (clone W0-2) (Sigma-Aldrich) diluídos 1:100 em solução de BSA 1% em PBS. Após lavagem com PBS, os cortes foram expostos ao anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1h 30min, reveladas utilizando-se diaminobenzidina (Sigma) como cromógeno e contra-coradas pela hematoxilina por 5 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Os cortes foram

desidratados em soluções seriadas de álcoois 70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II e 100% III, e banhos de Xilol I, II e III, posteriormente as lâminas foram montadas com Permount.

As lâminas foram analisadas em microscópio fotônico convencional Leica DM2500, as imagens foram adquiridas por câmera Leica DMC2900, acoplada ao microscópio e por software de análise de imagem Qwin versão 3.1.

5.11 Análise de transcriptoma

Transcritos obtidos a partir do córtex pré-frontal de humanos saudáveis e acometidos pela doença de Alzheimer foram analisados por diferentes ferramentas de bioinformática. Para isso foi utilizada a base de dados da plataforma www.genenetwork.org, a identificação da base de dados é: Dataset: HBTRC-MLPFC_0611. Foram utilizados os seguintes programas para análise: Genenetwork, Gene E Morpheus e Prism GraphPad.

5.12 Análise estatística

Os dados foram analisados através do teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Bonferroni), quando apropriado, para comparação dos grupos experimentais. A significância estatística adotada é de $p < 0,05$. O processamento e análise dos dados foi feita com o auxílio do software computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6. Resultados e Discussão

Durante discussões sobre a temática proposta pelo projeto, observamos que recentes achados da literatura evidenciam que em situações inflamatórias, características proteotóxicas são geradas pela inflamação⁴⁷⁻⁴⁹. Em situações de estresse inflamatório crônico, ocorre uma sobrecarga em diversos mecanismos de manutenção da homeostase e culmina na contribuição para o desenvolvimento e progressão da Doença de Alzheimer, como supracitado.

Nesse contexto, nos propusemos a avaliar o perfil de genes inflamatórios no sistema nervoso central durante o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Para tal, algumas análises *in silico* foram executadas. Realizamos análises de transcritos do córtex pré-frontal de humanos saudáveis e acometidos pela Doença de Alzheimer, disponibilizados na plataforma pública genenetwork.com (Dataset: HBTRC-MLPFC_0611). De maneira interessante, encontramos elevada expressão de 91 genes relacionados ao processo inflamatório nos pacientes com a doença de Alzheimer (n=100) quando comparados aos indivíduos saudáveis (n=100), conforme demonstrado no gráfico de heatmap (Fig. 3.A). Também foi observado um aumento na expressão gênica de citocinas (IL1B e TNF) e quimiocinas inflamatórias (CXCL1 e CXCL2) nos pacientes acometidos pela DA (Fig.3B e C). Outro achado bastante interessante, foi o aumento de marcadores da atividade pró-inflamatória das micróglia TREM2 e CST7 no córtex pré-frontal de humanos acometidos pela Doença de Alzheimer (n=382), quando comparado ao respectivo grupo controle saudável (n=165) (Fig. 3. D).

FIGURA 3

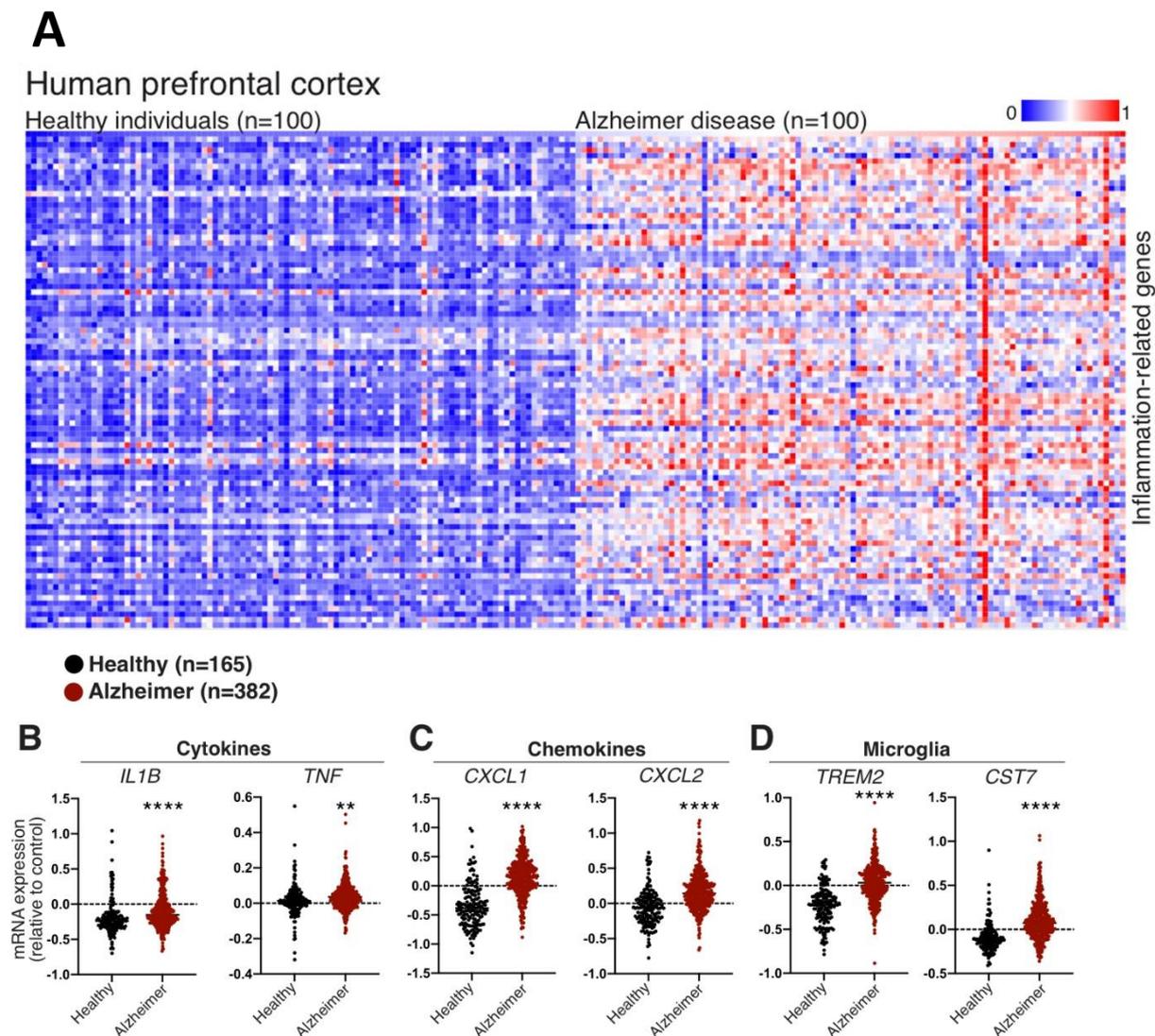


Figura 3. Análise de transcritos do córtex pré-frontal de pacientes com a doença de Alzheimer. Dados de transcritos do córtex pré frontal de seres humanos saudáveis e com doença de Alzheimer foram obtidos através da plataforma genenetwork (Dataset: HBTRC-MLPFC_0611). **A.** *Heat Map* de marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis e acometidos pela DA (n=100x100). **B** – Expressão de citocinas inflamatórias (*il1b* e *tnf*). **C.** Expressão de quimiocinas inflamatórias (*cxcl1* e *cxcl2*) **D.** Expressão de marcadores inflamatórios microgliciais (*trem2* e *cst7*). **B – D.** (n=165x382). Teste t-student. **p<0.01 vs. grupo saudável; ****p<0,0001 vs. Grupo saudável.

Mediante a estes achados e refletindo sobre novas perspectivas referentes aos efeitos do exercício físico prevenindo e combatendo a progressão da Doença de Alzheimer, avançamos nossa pesquisa para análises *in vivo*. Um grupo de camundongos C57BL/6J APP/PS1⁺ que possui pré-disposição ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer, devido a duas alterações genéticas que fazem esta linhagem expressar as proteínas precursora de amilóide (APP) e Presenilin-1 (PS1), foi submetido a um protocolo de treinamento físico aeróbio de 5 sessões de treinamento de 60 minutos durante 4 semanas a 60% de seu VO₂máx.

Os animais APP/PS1⁺ treinados apresentaram aumento da performance física, maior tempo em atividade até atingir a fadiga, bem como maior distância percorrida (Fig. 4A). Não houve diferença no peso corporal entre os grupos (Fig. 4B), entretanto, foi observado aumento significativo dos depósitos de gorduras viscerais nas porções epididimal e retroperitoneal nos animais APP/PS1⁺ controle, quando comparados ao grupo WT. O grupo treinado não apresentou diferença significativa nos depósitos de gordura quando comparado aos demais grupos (Fig.4B).

Ao acessar o conteúdo de proteínas beta amiloide na região hipocampal dos animais, observamos que o exercício físico foi capaz atenuar a formação de placas amiloides quando comparados ao grupo sedentário (Fig.4C e 4E). O conteúdo de beta amiloide também foi reduzido no córtex dos animais treinados, como representados na figura 4D. Somado a estes achados, observamos redução no conteúdo de fosforilação da proteína TAU no grupo treinado quando comparamos ao grupo APP/PS1⁺ controle (Fig. 4F-G). Como esperado, o grupo *wild type* não apresentou marcação de agregados beta amiloide.

Após observar molecularmente que o exercício físico atenuou o acúmulo de proteínas beta amiloide e reduziu a fosforilação da proteína TAU, concluímos que o treinamento físico foi de fato capaz de reduzir a progressão da doença e estas alterações moleculares se transpuseram a alterações fenotípicas destes animais através das análises cognitivas realizadas.

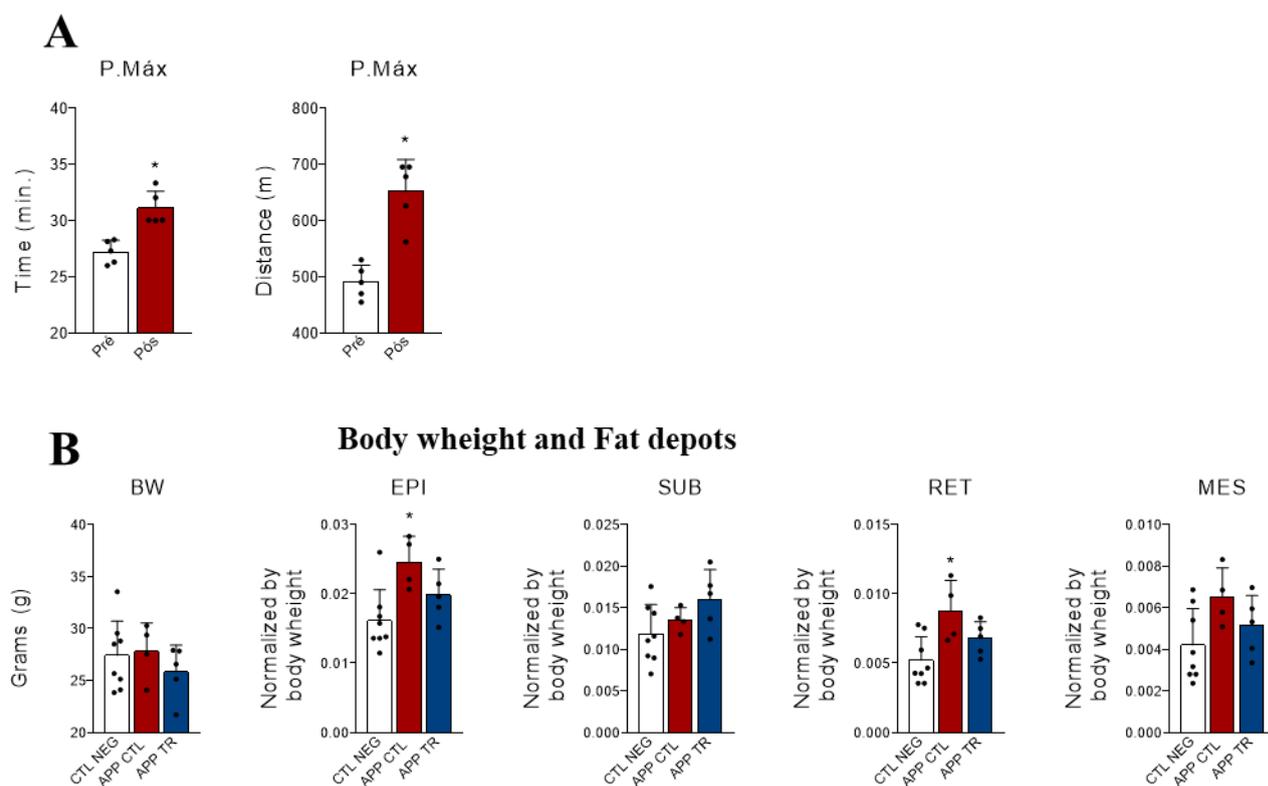
No teste de labirinto aquático de Moris (MWM) que avalia a memória de aprendizagem, dos animais e está intimamente relacionada com a função hipocampal, observamos melhora significativa no grupo submetido ao treinamento físico quando comparado ao grupo APP/PS1⁺ sedentário (Fig 4H).

No teste de medo condicionado ao contexto (CFC) que avalia a memória contextual e espacial dos animais, observamos um resultado que vai ao encontro do observado no teste MWM. Os animais APP/PS1⁺ sedentários apresentaram pior desempenho quando comparados aos demais grupos (Fig 4I) demonstrando a capacidade do exercício físico em aprimorar a memória contextual e espacial durante o desenvolvimento da doença.

Além disso, foi realizado o teste que avalia a memória relacionada a novos objetos nos confirmou significativamente que os animais treinados tiveram melhor desempenho do que os animais sedentários (Fig 4J). Associado a isto, os animais APP/PS1⁺ sedentários tiveram piora cognitiva quando comparados ao grupo *wild type*.

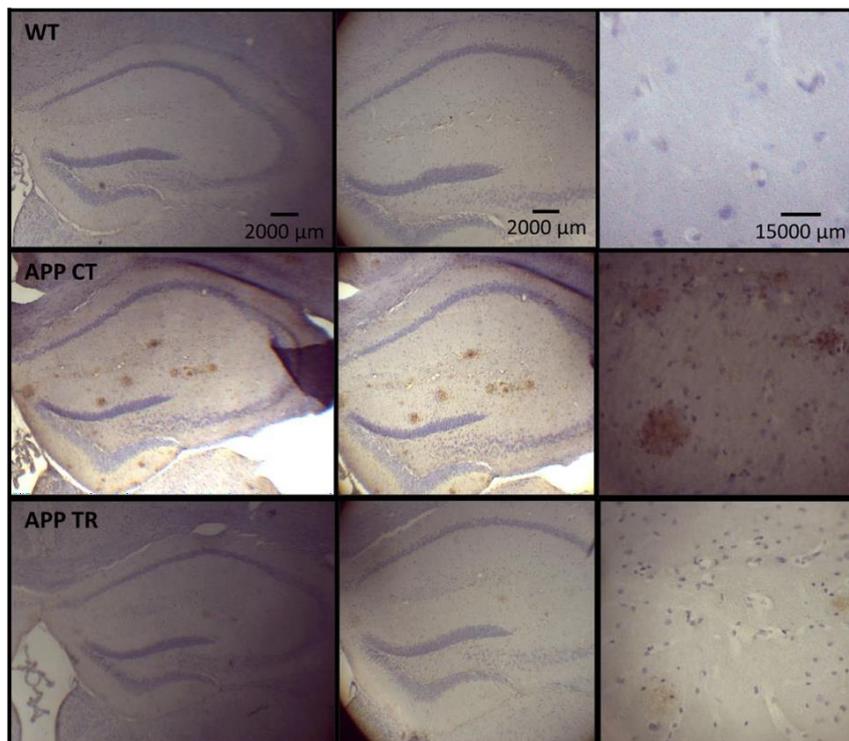
Estes resultados evidenciaram que de fato o treinamento físico é capaz de reduzir a progressão da Doença de Alzheimer dos níveis moleculares reduzindo o acúmulo da proteína beta amiloide no tecido hipocampal dos animais pré-dispostos a doença, até níveis fisiológicos, onde a capacidade cognitiva dos animais treinados foi preservada dos déficits observados nos animais sedentários.

FIGURA 4



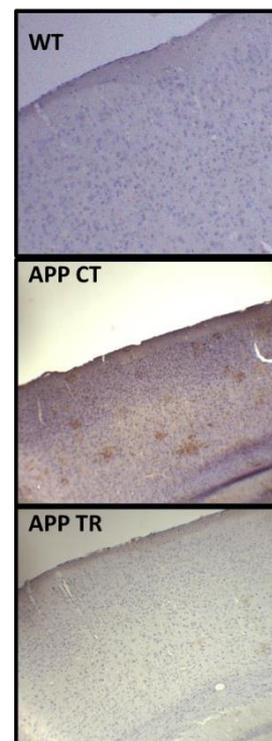
C

Hippocampus

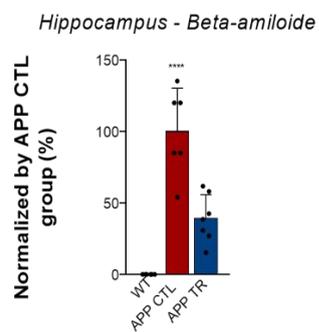


D

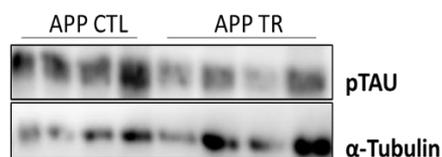
Cortex



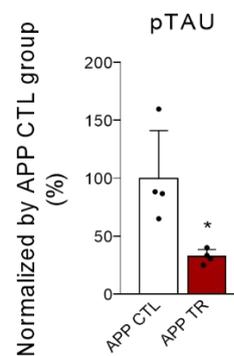
E



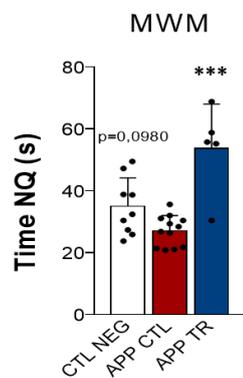
F



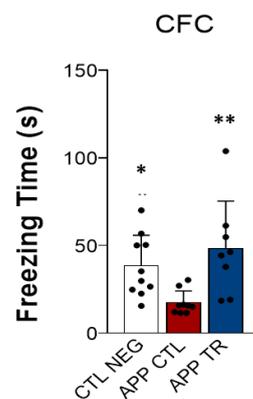
G



H



I



J

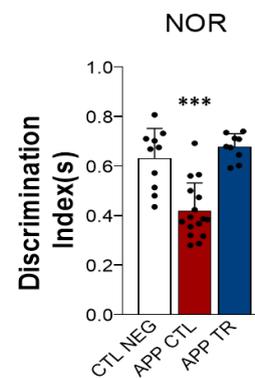


Figura 4. O treinamento físico melhora a performance física, reduz o acúmulo de beta amiloide e melhora as respostas cognitivas de camundongos APP/PS1+. **A.** Teste de potência máxima pré e pós treinamento físico (n=5x5). **B.** Peso corporal e peso dos depósitos de gorduras epididimal, subcutânea, retroperitoneal e mesentérica (n=8x4x5). **C.** Imuno-histoquímica da proteína beta amiloide no hipocampo. **D.** Representação Imuno-histoquímica da proteína beta amiloide no Córtex. **E.** Western Blotting pTAU (n=4x4). **F.** Quantificação proteica pTAU (n=4x4). **G.** Quantificação imuno-histoquímica no hipocampo. **H.** Teste Labirinto Aquático de Morris (MWM)(n=9x11x5). **I.** Teste de medo condicionado ao contexto (CFC) (n=10x9x8). **J.** Teste de reconhecimento de novos objetos (NOR) (n=10x16x9). **A, F e G.** Teste t-student *p<0,05. **B-E** Teste One-Way ANOVA; *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005; ****p<0,00005 vs grupo APP CTL.

Ao observar os achados referentes a redução do conteúdo de beta amiloide e melhora cognitiva, nos debruçamos na literatura e observamos que alguns estudos sugerem que a redução de marcadores inflamatórios em resposta ao exercício físico seja decorrente da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina-10 (IL10), em decorrência da contração muscular^{50,37}. Os níveis aumentados de IL10 exercem função supressora na expressão de genes relacionados à inflamação. Recentemente nosso grupo de pesquisa, colaborou com um estudo que demonstrou que camundongos *knockout* do gene da *il10* apresentam aumento de alguns marcadores inflamatórios e severas anormalidades na morfologia e na atividade mitocondrial⁵⁰. Neste cenário, nos interessamos pela ideia de que a melhora cognitiva e combate do exercício físico a doença de Alzheimer de fato se relacione com o aumento do conteúdo da resposta anti-inflamatória induzida pelo aumento da IL10 no hipocampo em resposta ao exercício físico.

Embora diversos estudos tenham demonstrado aumento do conteúdo de IL10 no sangue e em tecidos periféricos, o efeito do exercício físico sobre a expressão de IL10 no hipocampo ainda é incerto. Para avaliar a capacidade do exercício físico em aumentar o conteúdo de IL10 no hipocampo, camundongos jovens e saudáveis foram submetidos a uma única sessão de exercício físico aeróbio e as amostras de hipocampo foram obtidas 4 horas após o término do exercício. De maneira robusta, o exercício físico agudo aumentou tanto o conteúdo proteico (Fig. 5 A e B), como a expressão gênica (Fig. 5C) de IL10 no hipocampo. Cabe reforçar que esse experimento foi realizado em camundongos controles *wild type*.

Além disso, também tratamos camundongos C57BL/6J com IL-10r intranasal e observamos que o tratamento foi capaz de aumentar a fosforilação da proteína STAT3 no tecido hipocampal de forma tempo dependente, que neste estado, sinaliza diversas regulações que são responsáveis por atenuar a expressão de genes relacionados ao perfil inflamatório (Fig 5D).

As análises obtidas reforçaram ainda mais nossa ideia e a magnitude desses resultados nos instigou a investigar se a atividade anti-inflamatória da IL10, de fato é capaz de atenuar a progressão da neuroinflamação no modelo da DA.

FIGURA 5

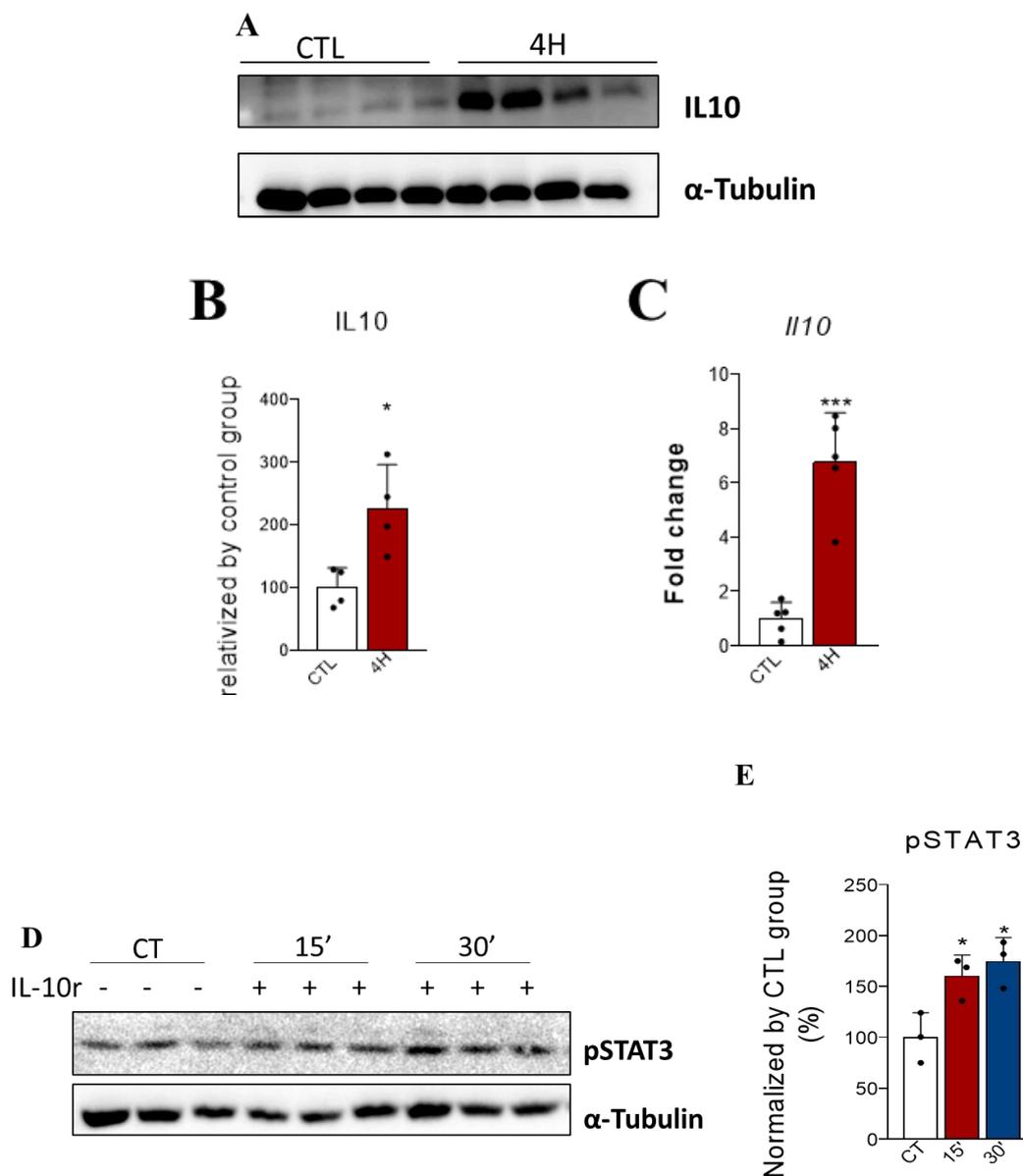


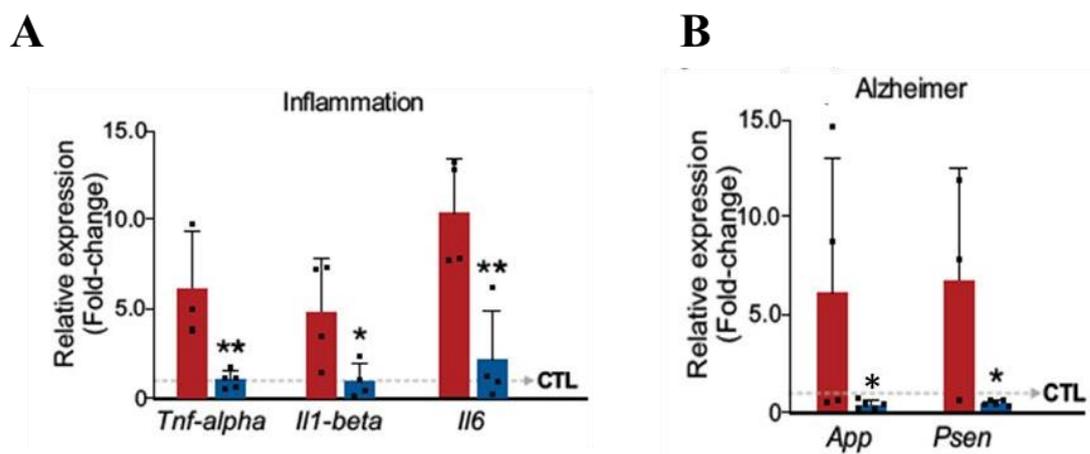
Figura 5. O exercício físico agudo aumenta a expressão de IL-10 no hipocampo de camundongos WT e APP/PS1+ enquanto a aplicação aguda de IL-10 intranasal estimula a fosforilação de STAT3. **A.** Conteúdo proteico de IL-10 no hipocampo 4h após sessão exaustiva de exercício físico em camundongos WT. **B.** Quantificação das bandas de IL-10 4h após exercício físico (n=4x4). **C.** Quantificação da expressão gênica de *Il-10* no hipocampo 4h após exercício físico (n=5x5). **D.** Fosforilação de STAT3 em resposta a IL-10r em camundongos C57BL6/J. **E.** Quantificação da análise WB da figura D. **B e C.** - Teste *t-student* *p<0.05 vs. grupo CTL; ***p<0,001 vs. grupo CTL. **E.** Teste One-Way ANOVA; *p<0.05 vs APP/PS1.

Baseados nestes recentes estudos supracitados e alicerçados pelos resultados obtidos na figura 3, realizamos análises para investigar a expressão gênica de marcadores inflamatórios nos animais APP/PS1 sedentários e treinados (Fig. 6). Reforçando nossa ideia de que o exercício físico é um potente agente redutor no perfil inflamatório, os genes *Tnf-alpha*, *Il1-beta* e *Il-6* estavam aumentados nos animais APP/PS1 CTL quando comparado aos demais grupos, enquanto isso, os animais treinados não apresentaram aumento nestes marcadores inflamatórios (Fig.6A). Para conclusão das informações sobre o perfil inflamatório, avaliamos também, a expressão dos genes marcadores da Doença de Alzheimer *App* e *Psen* onde observamos que os animais sedentários também apresentaram aumento significativo no gene e *App* no hipocampo (Fig.6B).

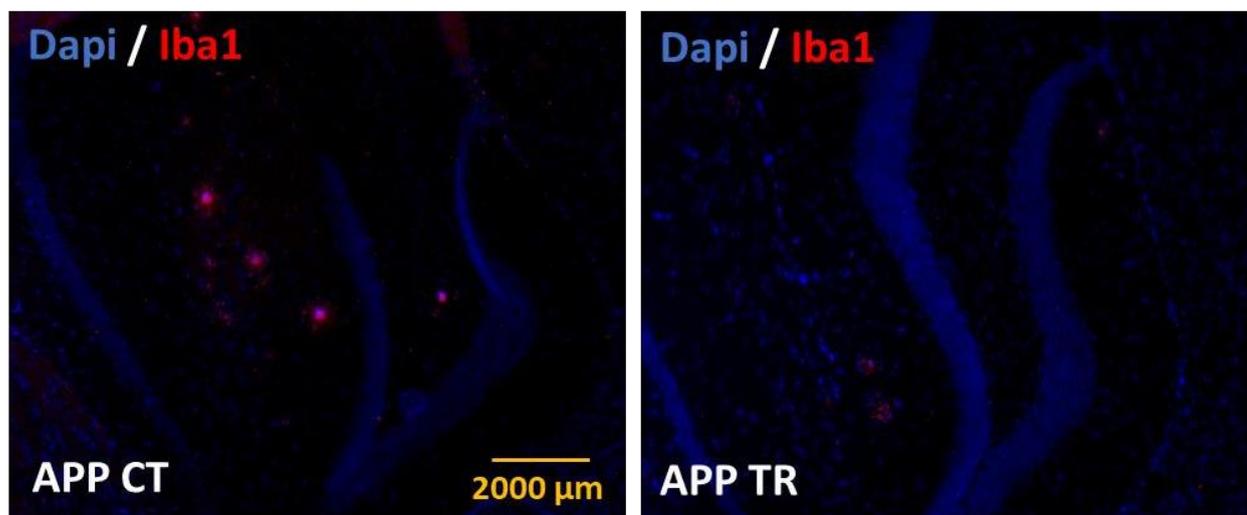
Reforçando estas evidencias obtidas nos ensaios de expressão gênica, analisamos também o conteúdo de Iba1, proteína marcadora da atividade de micróglia, que são células do sistema imune do SNC recrutadas para combater situações estressoras como no caso da inflamação (Fig. 6C e D). O resultado obtido teve localização de marcação de Iba1 condizente com o perfil observado pelas marcações de beta amiloide na figura 4C. A contagem deste marcador evidenciou maior expressão de Iba1 e a consequente maior ativação microglial nos animais APP/PS1⁺ sedentários. Observamos também que a região cortical possui maior ativação de microglia nos animais APP/PS1⁺ sedentários do que nos treinados (Resultados não mostrados).

Tomados em conjunto, observamos nas figuras 4 e 6 que o treinamento físico foi capaz de reduzir marcadores inflamatórios e diminuir a atividade microglial no hipocampo em modelo pré clínico da DA.

Figura 6



C



D

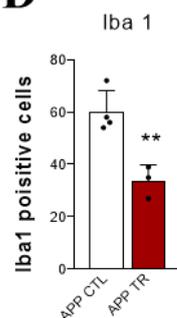


Figura 6: O exercício físico atenua a expressão de genes marcadores da inflamação e DA – A. Marcadores inflamatórios em camundongos APP/PS1 após 4 semanas de treinamento aeróbio **B.** Marcadores da DA em camundongos APP/PS1 após 4 semanas de treinamento aeróbio. **C. e D.** Imunofluorescência de Iba1 no tecido hipocampal de camundongos APP/PS1. **A e B.** Teste One-Way ANOVA; * $p < 0.05$ vs APP/PS1. ** $p < 0,01$ vs APP/PS1 **C e D.** Teste *t-student* ** $p < 0,005$.

No ano de 1995, Zuany-Amorin e colaboradores⁵¹ mostraram que o tratamento com IL-10 recombinante (IL-10r) intranasal, foi capaz de reduzir marcadores inflamatórios em camundongos. Assim, utilizamos esta premissa para desenhar nosso experimento subsequente que consistiu na avaliação do tratamento com IL-10r intranasal em animais APP/PS1⁺ para observar se de fato a proteína interleucina-10 é capaz de estimular a melhora cognitiva através de sua ação anti-inflamatória em indivíduos acometidos pela DA.

Até o momento, foram realizados apenas análises de testes comportamentais nos animais tratados com IL-10r intranasal (INS). O grupo de animais APP/PS1⁺ INS apresentou melhora na função cognitiva avaliada pelo teste NOR (Figura 7A). Neste

experimento, pudemos observar que os animais APP/PS1⁺ controle tiveram piora cognitiva quando comparado com o grupo *wild type*, enquanto os animais APP/PS1⁺ tratados com IL-10r intranasal por sete dias apresentaram resultados positivos sobre a qualidade de memória. Ainda, o grupo de animais APP/PS1⁺ treinados e apresentados anteriormente tiveram melhora cognitiva quando comparado aos animais APP/PS1⁺ controle (novamente) e quando comparados de maneira isolada, também apresentaram aumento significativo quando comparado ao grupo tratado com IL-10 intranasal de sete dias, reforçando a sugestão de que o treinamento físico realizado de maneira constante pode, de fato, exercer função protetora contra a DA.

O resultado da figura 7, somado ao tratamento agudo de IL10r que estimulou a fosforilação de STAT3 no hipocampo de camundongos *wild type* (Fig. 5D) levanta a hipótese de que a liberação de IL10 promovida pelo exercício físico é de fato, responsável pela diminuição da inflamação instaurada na DA.

FIGURA 7

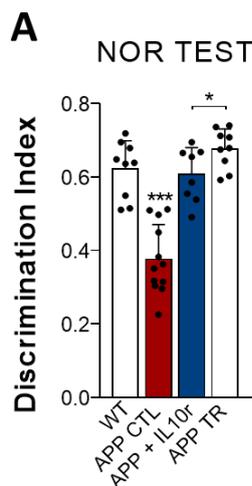


Figura 7: Respostas cognitivas com tratamento de IL-10r intranasal após sete dias. Teste One-Way ANOVA; *** $p < 0.001$ vs APP/PS1⁺. * $p < 0,05$ vs APP/PS1⁺ + IL10r X APP/PS1⁺ TR.

7. Conclusões

De acordo com os resultados encontrados, expusemos através de análises *in silico* que seres humanos portadores da DA possuem elevados níveis de marcadores inflamatórios no sistema nervoso central. Em contrapartida, concluímos que o treinamento físico é capaz de melhorar as repostas cognitivas de camundongos pré-dispostos ao desenvolvimento da DA. Somado a isto, concluímos também, que o

protocolo de treinamento físico aeróbio é capaz de atenuar a expressão de genes inflamatórios presentes na Doença de Alzheimer, bem como reduzir a ativação de micróglia no tecido hipocampal. Além disso, a proteína interleucina-10 mostrou-se responsiva ao exercício físico e atuante na ativação de vias de combate à inflamação, como a pSTAT3, apresentando-se como possível protagonista no combate à inflamação no hipocampo. No tratamento de animais pré-dispostos à DA com IL10 recombinante por sete dias, pudemos observar melhora na resposta cognitiva que se assemelha às respostas promovidas pelo treinamento físico, motivando-nos a expandir investigações sobre o tratamento crônico com IL10r na progressão da DA. Temos consciência de que o estudo ainda possui lacunas a serem preenchidas, entretanto demonstra grande potencial para elucidar os mecanismos inflamatórios presentes na Doença de Alzheimer, bem como, caracterizar o treinamento físico e a ação da IL-10 como promissores fatores de prevenção e combate à progressão da doença.

8. Referências bibliográficas

1. ABRAZ. O que é Alzheimer. <http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer/> (2020).
2. Hardy, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J. Neurochem. Neurochem.* 1129–1134 (2009) doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x.
3. Ramirez-Bermudez, J. Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. *Arch. Med. Res.* **43**, 595–599 (2012).
4. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **76**, 27–50 (2014).
5. Fargo, K. Alzheimer's Association Report: 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **10**, (2014).
6. Santos-lozano, A. *et al.* Physical Activity and Alzheimer Disease: A Protective Association. *Mayo Clin. Proc.* **91**, 999–1020 (2016).
7. Beckett, M. W., Arden, C. I. & Rotondi, M. A. A meta-analysis of prospective studies on the role of physical activity and the prevention of Alzheimer's disease in older adults. 1–7 (2015) doi:10.1186/s12877-015-0007-2.
8. Jia, R., Liang, J., Xu, Y. & Wang, Y. Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. 1–14 (2019).
9. Du, Z. *et al.* Physical activity can improve cognition in patients with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. 1593–1603 (2018).
10. Groot, C., Hooghiemstra, A. M., Raijmakers, P. G. H. M. & Berckel, B. N. M. Van. The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: A meta-analysis of randomized control trials. **25**, 13–23 (2016).
11. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und Psych. Medizin* **64**, 146–8 (1907).
12. Anand, R., Dip, K. & Ali, A. Neuropharmacology Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *NP* **76**, 27–50 (2014).
13. Prà, I. D. *et al.* Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the “Infectious” A β and Tau Drivers of Alzheimer's Disease? (2015) doi:10.1177/1073858414529828.
14. Galimberti, D., Ghezzi, L. & Scarpini, E. Journal of the Neurological Sciences Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **333**, 50–54 (2013).

15. Ploia, C. *et al.* Role of glycogen synthase kinase-3 β in APP hyperphosphorylation induced by NMDA stimulation in cortical neurons. *Pharmaceuticals* **3**, 42–58 (2010).
16. Kelleher, R. J. & Shen, J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 629–631 (2017).
17. Kurz, A. & Pernecky, R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **35**, 373–379 (2011).
18. Kumar, A. & Dogra, S. Neuropathology and therapeutic management of Alzheimer's disease - An update. *Drugs of the Future* (2008) doi:10.1358/dof.2008.033.05.1192677.
19. Ekelund, U. *et al.* Does physical activity attenuate, or even eliminate, the detrimental association of sitting time with mortality? A harmonised meta-analysis of data from more than 1 million men and women. *Lancet* **388**, 1302–1310 (2016).
20. Nguyen, T. T., Ta, Q. T. H., Nguyen, T. K. O., Nguyen, T. T. D. & Giau, V. Van. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–16 (2020).
21. Keren-Shaul, H. *et al.* A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**, 1276-1290.e17 (2017).
22. Leng, F. & Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 157–172 (2021).
23. Nott, A. *et al.* Brain cell type-specific enhancer-promoter interactome maps and disease - risk association. *Science (80-.)*. **366**, 1134–1139 (2019).
24. Del Bo, R., Angeretti, N., Lucca, E., De Simoni, M. G. & Forloni, G. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and β -amyloid production in cultures. *Neurosci. Lett.* **188**, 70–74 (1995).
25. Hanisch, U.-K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155 (2002).
26. Heneka, M. T. *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**, 674–678 (2013).
27. Heneka, M. T., Golenbock, D. T. & Latz, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* **16**, 229–236 (2015).
28. Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K. & Banik, N. L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* **87**, 10–20 (2012).
29. Liu, X. & Quan, N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Front. Neurol.* **9**, 1–11 (2018).

30. Chen, C.-H. *et al.* Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 77–90 (2012).
31. Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C. & Maccioni, R. B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* **295**, 245–257 (2004).
32. Goldgaber, D. *et al.* Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7606–7610 (1989).
33. Yates, S. L. *et al.* Amyloid β and Amylin Fibrils Induce Increases in Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production by THP-1 Cells and Murine Microglia. *J. Neurochem.* **74**, 1017–1025 (2000).
34. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
35. Erickson, K. I. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3017–3022 (2011).
36. Lourenco, M. V. *et al.* Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat. Med.* **25**, 165–175 (2019).
37. Ropelle, E. R. *et al.* IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* **8**, 31–32 (2010).
38. Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S. & Saraiva, M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–10 (2016).
39. Ferreira, J. C. B. *et al.* MAXIMAL LACTATE STEADY STATE IN RUNNING MICE: EFFECT OF EXERCISE TRAINING. 760–765 (2007) doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.
40. Wang, S. Bin *et al.* Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. *BMC Immunol.* **15**, 1–8 (2014).
41. Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P. & O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681–683 (1982).
42. Li, R. *et al.* Chrysin ameliorates diabetes-associated cognitive deficits in Wistar rats. *Neurol. Sci.* **35**, 1527–1532 (2014).
43. Diegues, J. C. *et al.* Spatial memory in sedentary and trained diabetic rats: MOLECULAR mechanisms. *Hippocampus* **24**, 703–711 (2014).

44. Corcoran, K. A., Lu, Y., Scott Turner, R. & Maren, S. Overexpression of hAPP_{swe} impairs rewarded alternation and contextual fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Learn. Mem.* **9**, 243–252 (2002).
45. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **227**, 680–685 (1970).
46. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *J. Biol. Chem.* **276**, 4350–4354 (1979).
47. Cantó, C. *et al.* The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* **15**, 838–47 (2012).
48. Kumar, A. *et al.* JNK pathway signaling: A novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med. Chem.* **7**, 2065–2086 (2015).
49. Kinney, J. W. *et al.* Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **4**, 575–590 (2018).
50. de-Lima-Júnior, J. C. *et al.* Abnormal brown adipose tissue mitochondrial structure and function in IL10 deficiency. *EBioMedicine* **39**, 436–447 (2019).
51. Zuany-Amorim, C. *et al.* Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J. Clin. Invest.* **95**, 2644–2651 (1995).