

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

KELLEN UGIONI SIMON

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS COM
DOENÇA DE ALZHEIMER**

CRICIÚMA, NOVEMBRO 2019

KELLEN UGIONI SIMON

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS COM
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof. ^a Dr^a. Flávia Karine Rigo
Coorientador: Prof. ^a Dr. Alexandre Pastoris Müller

CRICIÚMA, NOVEMBRO 2019

KELLEN UGIONI SIMON

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE SOB
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM SORO DE IDOSOS COM
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado pela Banca Examinadora para
obtenção do Grau de Bacharel, no Curso
de Farmácia da Universidade do Extremo
Sul Catarinense, UNESC.

Criciúma, 25 de novembro de 2019.

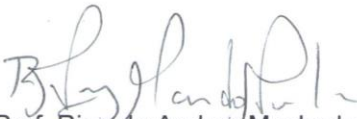
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^a. Flávia Karine Rigo (UNESC)



Banca Examinadora: Prof^a. Meline Oliveira dos Santos Morais (UNESC)



Banca Examinadora: Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila (UNESC)

Ao meu pai, que mesmo estando longe me ajudou a trilhar esse caminho. Eterno em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Amarildo (*im memorian*) e Adriana e minhas **irmãs Diana** (de sangue e brigas, mas também muito amor e carinho) e **Flávia** (irmã de outra família, de coração) por todo o incentivo durante os anos de faculdade. **Ao meu noivo** pela compreensão e apoio em todos os fins de semana dedicado aos estudos e também aos meus grandes amigos da faculdade, que permitiram que essa caminhada fosse mais alegre.

A minha avó Angelina, que mesmo com câncer me apoiou e me perguntou por 4 meses, desde o início do semestre se o meu TCC estava pronto. **A toda a minha família**, que mesmo em momentos que quis desistir estavam comigo e não deixaram isso acontecer. **E também a minha afilhada**, que depois de uns percursos complicados da minha vida me surgiu como um presente, veio para mostrar que tudo nessa vida é válido, e que mesmo as pequenas coisas são importantes

A todos os funcionários da instituição de ensino UNESC por todo apoio e por proporcionaram um ambiente propício para o desenvolvimento do meu trabalho de conclusão de curso. Em especial à coordenação do curso de Farmácia que desde o início me deu apoio, incentivo e auxílio frente a qualquer adversidade que me surgisse.

A todos os professores, por todo o conhecimento passado, por conselhos e ajudas durante todos esses anos de graduação e para a elaboração do meu TCC. Quero agradecer o meu professor orientador do Projeto de TCC e coorientador, **Alexandre**, por me acolher em seu laboratório de pesquisa, pelos ensinamentos que me foram passados, pelo empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa. E agradecer também a **professora orientadora** por me acolher na finalização desse projeto, pelo empenho dedicado.

A minha amiga de turno de laboratório **Bárbara**, por aturar os meus xiliques, crises de pânico e ansiedade e não me dar na cara! E me levado para o bar, para desestressar e chorar as mágoas. A minha recém e muito querida amiga **Cecília**, por todo suporte, apoio emocional e que escutou todos os meus desabafos (minutos de áudios no Whatsapp).

E para finalizar quero agradecer as minhas crises de pânico e ansiedade por não me deixarem dormir mais que 4 horas diárias.

**“Nada se perde, tudo muda de dono” -
tardia reflexão de Lavoisier ao descobrir que
lhe haviam roubado a carteira.”**

Mario Quintana

**TRABALHO DE ACORDO COM AS
NORMAS DA REVISTA INOVA SAÚDE**

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER

EFFECTS OF LOW INTENSITY PHYSICAL EXERCISE IN OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN ELDERLY WITH ALZHEIMER'S DISEASE

Kellen Ugioni Simon¹, Flávia Karine Rigo², Alexandre Pastoris Müller³.

1 Acadêmico do Curso de Graduação em Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma

2 Docente do Curso de Graduação em Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma

3 Docente do Curso de Graduação em Educação Física, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

Endereço para correspondência:

Kellen Ugioni Simon

Universidade do Extremo Sul Catarinense, Curso de Graduação em Farmácia

Av. Universitária, 1105 – Universitário, Criciúma/SC

CEP: 88806-000

Telefone: (48) 3431-2500

E-mail: kelly_simon@hotmail.com

RESUMO

A demência é um termo geral utilizados para designar perda de memória e algumas outras funções cognitivas capazes de interferir no cotidiano de seu portador. A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada histopatologicamente, pelo aumento da perda sináptica e morte neuronal nas regiões cerebrais responsáveis pelas diversas funções cognitivas, como o córtex, o hipocampo entre outras partes do cérebro. Pesquisas vem demonstrando influência de atividades de lazer e físicas na redução da perda cognitiva durante o envelhecimento. Estas ocorrem através de estímulo da neurogênese e da sinaptogênese produzida por fatores neurotróficos, que teriam sua produção aumentada durante a prática regular dos exercícios e a possível ampliação da reserva cognitiva, ocorrendo particularmente em idosos com manutenção de atividades com maior estímulo cognitivo por longo período. A prática diária de exercício tem sido apontada como intervenção não medicamentosa apresentando vastos benefícios sobre sistemas fisiológicos que exibem deterioração funcional e estrutural com o decurso do envelhecimento. Em vista disso, este trabalho visou investigar se o programa de exercício físico pode ter contribuído para a mudança nos parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com Alzheimer. Para isto, foram selecionados 6 pacientes com o diagnóstico de DA que participaram de um programa de exercícios de hidroginástica de intensidade leve com duração de 60 minutos, duas vezes na semana, por um período de 3 meses. As análises bioquímicas foram realizadas a partir de amostras de soros coletadas de pacientes antes e após a intervenção. Os resultados demonstraram uma diminuição no nível de carbonilação de proteínas, sugerindo uma ação protetiva do exercício físico no dano oxidativo nas proteínas celulares. Observou-se também uma diminuição nas espécies reativas por DCFH, assim como uma diminuição significativa na atividade da catalase. A partir disso, pode-se observar benefícios do exercício físico na redução do estresse oxidativo em pacientes com doença Alzheimer.

Palavras-chave: Alzheimer, estresse oxidativo, exercício físico, cérebro.

ABSTRACT

Dementia is a general term used to denote memory loss and some other cognitive functions that may interfere with the wearer's daily life. Alzheimer's disease is histopathologically characterized by increased synaptic loss and neuronal death in the brain regions responsible for various cognitive functions such as the cortex, hippocampus and other parts of the brain. Research demonstrates an influence of leisure and physical activities on the reduction of cognitive loss and that these occur by stimulating neurogenesis and synaptogenesis produced by neurotrophic factors, which would have their production increased during the regular exercise practice and the possible expansion of cognitive reserve, that would occur particularly in the elderly with maintenance of activities with greater cognitive stimulation for a long period. Daily exercise practice has been identified as a non-drug intervention with vast benefits over physiological systems that exhibit functional and structural deterioration with aging. Therefore, this study aimed to investigate whether the exercise program may have contributed to the change in oxidative stress parameters in Alzheimer's patients. For this, 6 patients with AD diagnosis were selected, who were willing to participate in the 60-minute water aerobics program twice a week for a period of 3 months. The analysis was performed on the blood collected before and after the intervention, and afterwards biochemical tests were performed with the patients' serum. The results showed a significant decrease in protein carbonylation, suggesting a protective action of physical exercise on oxidative damage to cellular proteins. There was also a decrease in reactive species by DCFH and as well as a significant decrease in catalase activity. From this, one can observe the benefits of physical exercise in reducing oxidative stress in patients with Alzheimer's, which may help in delaying the progression of the disease.

Keywords: Alzheimers disease; oxidative stress; physical exercise; brain.

INTRODUÇÃO

A demência é um termo geral utilizado para designar perda de memória e outras funções cognitivas suficientes para interferir no cotidiano de seu portador. A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada histopatologicamente pela perda sináptica e morte neuronal em regiões cerebrais responsáveis pelas diversas funções cognitivas, como o córtex e o hipocampo. Possui causas idiopáticas, entretanto são pautadas em hipóteses provenientes de inúmeras evidências que demonstram que fatores de risco como genética, sexo, idade, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e hiperlipidemia, estão diretamente envolvidos na gênese da doença ^{2; 40}.

Com base em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), aproximadamente 1,5 milhões de indivíduos apresentam DA, com uma incidência em torno de 100 mil novos casos por ano. O Instituto estima que, em 2050, 30% da população brasileira será acometida por Alzheimer o que significa 65 milhões de portadores. Mundialmente, a estimativa é que cerca de 35,6 milhões pessoas tenham a doença ⁶.

Alguns estudos demonstraram que foram encontrados em cérebros de indivíduos diagnosticados com a doença, uma abundância de placas β -amiloide e emaranhados neurofibrilares. As placas são formadas pelo depósito de fragmentos de peptídeos β -amiloide, acumulados nas fendas sinápticas. Enquanto, os emaranhados são fibras provenientes de outra proteína, conhecida por Tau uma proteína associada aos microtúbulos. Quando ocorre hiperfosforilação da proteína Tau ela se dissocia dos microtúbulos e se agrega sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis e estes nos emaranhados neurofibrilares. A hiperfosforilação da Tau favorece a formação de agregados, resultando em perda ou declínio no transporte axonal ou dendrítico nos neurônios^{26; 29; 32; 43; 58}.

As placas senis são depósitos extracelulares esféricos, de agregados insolúveis da proteína β -amiloide, localizadas, inicialmente, no sistema límbico. Essas placas são oriundas da clivagem incorreta da proteína precursora amiloide (APP), gerando fragmentos peptídicos neurotóxicos, que se agregam levando à formação de placas insolúveis, que alteram a função sináptica neuronal alterando sua capacidade de destruição de sua membrana fosfolipídica e bainha de mielina^{33; 48}. Os emaranhados

neurofibrilares são feixes de filamentos insolúveis e resistentes à eliminação, localizados no citoplasma perinuclear. Além disto, são compostos por proteínas Tau modificadas estruturalmente e apresentam-se em estado hiperfosforilado, garantindo uma agregação e estabilização de microtúbulos, responsáveis por transportar informações e nutrientes, facilitando a morte neuronal ^{8; 32}.

A DA tem relação com o processo de envelhecimento normal e elevada liberação de radicais livres no cérebro, no envelhecimento normal, as mitocôndrias naturalmente liberam radicais livres, por serem altamente reativos, podendo danificar a membrana do neurônio celular do seu DNA³⁸.

O estresse oxidativo é um desbalanço entre agentes oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo com dano potencial. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN). Os principais exemplos ERO do tipo radicalares são hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂^{•-}), peroxila (ROO[•]) e alcoxila (RO[•]); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso²⁴.

No organismo, estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas, entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA ^{65, 66}. A produção de ERO está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons ⁶⁷.

Espécies reativas podem ser produzidas a partir de fontes endógenas e exógenas. Potenciais fontes endógenas incluem as mitocôndrias, a via metabólica do citocromo P450, peroxissomos, e ativação de células inflamatórias⁶². Essa produção excessiva de radicais livres causa danos aos sistemas de membranas neuronais, acarretando uma peroxidação de lipídeos e uma oxidação das proteínas de membrana. Uma das principais fontes de espécies reativas é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde

durante a transferência de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória, formas de oxigênio parcialmente reduzidas podem ser geradas²⁴.

A célula conta com uma produção molecular de agentes antioxidantes para a manutenção da homeostasia oxidativa, que fazem parte do sistema de defesa podendo ser produzidos pela própria célula, obtidos pela dieta ou ainda através de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT ou, GPx, etc.), que atuam na produção ou eliminação das ERO. A participação do estresse oxidativo no processo de envelhecimento também já é bem conhecida. Uma das teorias mais aceitas está baseada no fato de que danos celulares causados por ERO são cumulativos e deletérios ao longo do tempo. Sugerindo, portanto que a longevidade pode ser dependente não apenas de fatores intrínsecos, como hereditariedade, mas também de fatores externos, como a dieta e a prática de exercícios físicos^{15; 30}.

O envelhecimento precoce pode ser explicado pelo excesso de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). A alta atividade da SOD leva um aumento de H₂O₂ que excede a capacidade metabólica de enzimas como a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), que são responsáveis pela degradação do mesmo. Isso poderia levar o envelhecimento acelerado trazendo consigo o aparecimento de sinais histopatológicos da DA, gerando um desgaste em placas neuríticas, o que pode potencializar o efeito oxidativo no cérebro, acelerando a degeneração neuronal³⁸.

Além disso, doenças frequentes na senescência também estão associadas ao aumento do estresse oxidativo, como a doença de Parkinson, o acidente vascular encefálico, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata⁴⁵.

Assim, as ERO possuem importante papel no desenvolvimento da disfunção endotelial e de doenças crônicas como a hipertensão e a aterosclerose²⁰. Diversos estudos demonstram que pacientes com DA apresentam um desequilíbrio redox, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano. Os autores sugerem que esse desbalanço ocasione aumento da peroxidação lipídica e está intimamente ligado às desordens neurodegenerativas, e parece que a oxidação da célula é o primeiro processo que antecede o desenvolvimento desta enfermidade ^{9; 10; 64}.

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres por apresentar alto consumo de oxigênio e possuir grande quantidade de

ácidos graxos poli-insaturados, além do nível diminuído de enzimas antioxidantes quando comparado a outros tecidos^{4; 5}. Desta forma, com o avanço da idade, o cérebro sofre mudanças morfológicas e funcionais, afetando as árvores de dendritos e sinapses, neurotransmissão, circulação e metabolismo, alterando o sistema motor e sensorial, de memória e aprendizado. Além disso, existe uma tendência a aumentar as reações que produzem ERO, paralelamente a uma diminuição dos processos que defendem o organismo de moléculas reativas^{39; 64}.

Em adição a esses fatos, os alvos moleculares afetados pelas ERO incluem DNA nuclear e mitocondrial, lipídios, proteínas, homeostase do cálcio, dinâmica e função mitocondrial, arquitetura celular, tráfego de receptores e endocitose e homeostase energética. O metabolismo celular anormal, por sua vez, poderia afetar a produção e o acúmulo de proteína Tau hiperfosforilada e de proteína β amiloide, que independentemente poderiam exacerbar a disfunção mitocondrial e a produção de ERO, contribuindo assim para um ciclo vicioso^{23; 56}.

Diferentes pesquisas têm demonstrado que atividades de lazer e físicas estão envolvidas na redução da perda cognitiva presente na doença. É sugerido que a atividade física promova neurogênese e sinaptogênese através de fatores neurotróficos, que teriam sua produção aumentada durante a sua prática, e a possível ampliação da reserva cognitiva, que ocorreria particularmente em idosos com manutenção de atividades com maior estímulo cognitivo por longo período⁴⁷.

A prática diária de exercício físico tem sido apontada como uma intervenção não medicamentosa e vem apresentando vastos benefícios sobre a deterioração funcional e estrutural de sistemas fisiológicos em envelhecimento^{7; 63}. Durante o processo de envelhecimento, a capacidade muscular também fica prejudicada, incidindo em uma redução no recrutamento e ativação de unidades motoras. Isto se mostra importante, já que origina um aumento significativo do risco de quedas, uma vez que 65,5% desses episódios ocorrem em idosos com déficit cognitivo⁶³.

Os estudos acerca dos benefícios da prática regular de atividade física sobre funções cognitivas e a capacidade funcional em idosos com demência vêm aumentando consideravelmente e mostra que o exercício físico age sobre a função cognitiva direta ou indiretamente. Os mecanismos que atuam de forma direta, aumentam a agilidade do

processamento cognitivo, constituindo em uma melhora da circulação cerebral e uma alteração na síntese e degradação de neurotransmissores com mudanças em estruturas cerebrais 7; 63.

Um estudo transversal de Simar e col. (2007)⁵¹ ao avaliar idosos com 60 a 90 anos de idade, altamente ativos fisicamente, em repouso e após o exercício agudo mostraram uma maior capacidade na produção de moléculas antioxidante e em níveis mais baixos em marcadores de dano oxidativo quando comparado com os idosos menos ativos. Este resultado foi apoiado pelo fato de que a aptidão aeróbica estava positivamente correlacionada com a capacidade antioxidante e negativamente com a expressão de dano oxidativo.

Este trabalho visa avaliar as possíveis melhoras no estresse oxidativo em idosos com a doença de Alzheimer em dois momentos: de exercício físico e se esses estímulos contribuem de alguma maneira para a redução do progresso da doença.

METODOLOGIA

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido em conformidade com as normas vigentes expressas na Resolução 196 de outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma, Santa Catarina, sob o parecer número 3.034.010. No seu desenvolvimento foram observadas as orientações e demais normas e recomendações éticas para a realização de pesquisas no Brasil. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi entregue aos participantes, os quais ficaram de posse de uma cópia permanecendo outra com o pesquisador. O material coletado foi de uso exclusivo do pesquisador, sendo utilizado com a única finalidade de fornecer elementos para a realização deste projeto de conclusão de curso, da própria pesquisa e dos artigos e publicações que dela resultem. No projeto da pesquisa e mesmo na escrita da dissertação, foi assegurada a confidencialidade dos dados e das informações que possibilitem a identificação dos participantes.

A pesquisa não ofereceu nenhum dano ou desconforto aos participantes e não foi objeto de nenhum benefício, ressarcimento ou pagamentos aos mesmos. O material coletado não foi objeto de comercialização ou divulgação que pudesse prejudicar os entrevistados.

EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM IDOSOS

O projeto é um ensaio clínico não controlado, desenvolvido na Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma, Santa Catarina, no período de Julho a Setembro de 2018, com pacientes que participam do Grupo “Bem Viver com Alzheimer” e que aceitaram participar a pesquisa. Foi realizado uma análise dos dados obtidos pré e pós intervenção, analisando se o programa de exercício físico de hidroginástica com baixa intensidade pode ter contribuído para a mudança do perfil de marcadores oxidativos deste público.

A amostra foi composta por 6 pessoas com o diagnóstico da doença de Alzheimer, residentes de Criciúma que não fazia nenhum tipo de programa de exercício físico regular. Como fator de exclusão, foram consideradas quando o paciente possuíam contraindicações de ordem médica para a prática de exercício.

A hidroginástica é constituída de exercícios aquáticos específicos, baseados no aproveitamento da resistência da água como sobrecarga e do empuxo como redutor do impacto, o que permite a prática de um exercício, mesmo em intensidades altas, com diminuídos riscos de lesão (Kruel, 2000).

O protocolo empregado consistia na prática de exercícios de hidroginástica com duração de 60 minutos e durante o período de três meses. Todos os participantes apresentaram atestado declarando a possibilidade de participar de um programa de exercício físico monitorado pelos pesquisadores e juntamente com o auxílio de seus respectivos cuidadores.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

COLETA SANGUÍNEA

A coleta sanguínea ocorreu no primeiro dia de exercício e no último dia da realização dos mesmos. Os pacientes foram encaminhados primeiramente a uma sala no Bloco T, na Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os mesmos foram devidamente acomodados e preparados para a realização das coletas. Devidamente paramentados, com luvas e jaleco, foi realizado o garroteamento de um dos braços e realizado a asepsia no local da punção. Com o sistema de coleta montado, puncionou-se a veia, e realizado a coleta de 5 mL de sangue total e transferindo para um tubo sem anticoagulante. O mesmo processo transcorreu com todos os integrantes no início e ao término da intervenção.

O sangue total foi deixado em repouso por 30 minutos na posição vertical, para a formação do trombo, logo após, efetuou-se o processo de centrifugação, em 3000 rotações por minuto durante 10 minutos, a 4 °C. O soro foi separado, armazenado a - 20 °C após o doseamento de proteínas, até a obtenção de todas as amostras.

PROTEÍNA PELO METODO DE LOWRY

A dosagem de proteínas totais foi determinada de cada amostra através do método de **Lowry (1951)**, onde a albumina bovina sérica foi utilizada como padrão. Todas as amostras analisadas foram dosadas em triplicatas.

CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A detecção de proteínas carboniladas é um índice global de estresse oxidativo celular. O princípio é baseado no fato do nível de grupos carbonilas ser aumentado quando proteínas de um extrato são oxidadas. A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina (DNPH). Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado por espectrofotometria a 370nm como previamente descrito por Levine e cols (1990)³⁷.

O preparo da amostra deu-se através 5µL do soro diluídos em 995µL de tampão

fosfato, pH 7.4. Para a técnica, foi utilizado 100µL da diluição do soro. As proteínas foram precipitadas pela adição de 20% ácido tricloroacético e reagiu com DNPH. O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em $\lambda=370$ nm. Os resultados foram expressos como conteúdo de carbonil nmol/mg proteína x 10^{-12} .

ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A catalase, uma enzima heme, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, é uma das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante da célula³⁵. As amostras foram diluídas em 5µl do soro com 995µl de tampão fosfato, pH 7.4. Desta diluição, adicionou-se 20µl da amostra era adicionado ao meio básico de reação, contendo tampão fosfato 50mm, pH 7,4, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10mM. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorbância em 240nm¹.

ESPÉCIES REATIVAS POR DIACETATO DE DIFLUORESCÉINA (DCFH)

A oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da diclorofluoresceína (DCF) que pode facilmente ser lida em fluorímetro. A amostra foi diluída através a adição de 995µl de tampão fosfato, pH 7.4, com 5µl do soro. Neste ensaio, 100 µL de água e 75 µL de DCFH-DA foram adicionados a 25 µL de amostra diluída, homogeneizados em vortex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde utilizou-se como padrão o DCF 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras, quanto a curva de calibração, foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram realizadas as leituras no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas³⁶.

RESULTADOS

Neste trabalho, foi avaliado o efeito do exercício físico de baixa intensidade sobre parâmetros oxidativos, como conteúdo de proteínas carboniladas e de espécies reativas em DCFH. Foi possível observar na figura 1A uma diminuição na carbonilação proteica, assim como a figura 1B demonstrou uma redução nos níveis de espécies reativas observados pela oxidação de DCFH, no soro dos idosos diagnosticados com doença de Alzheimer, após 3 meses de intervenção física.

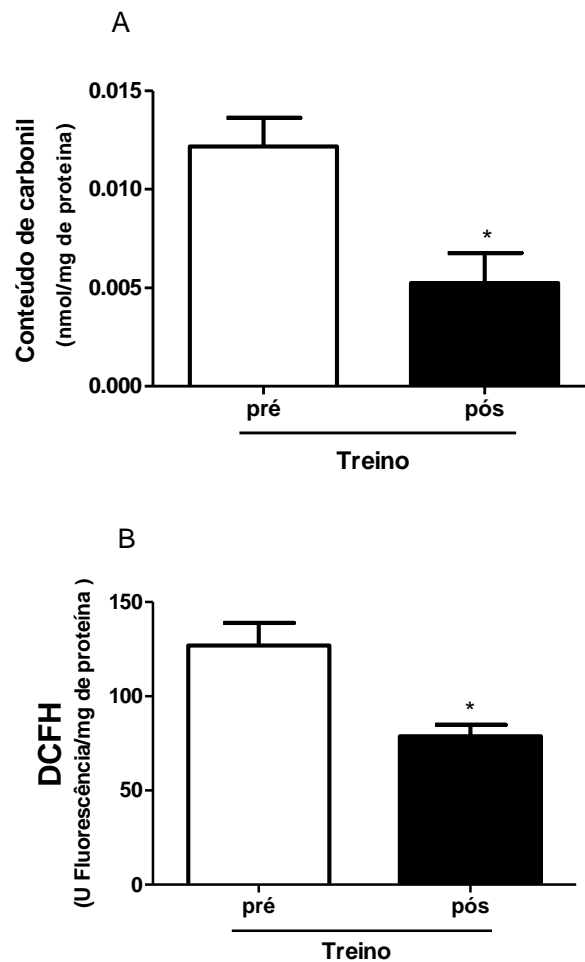


FIGURA 1. Efeitos do exercício físico sob o estresse oxidativo pré e pós protocolo de exercício. Conteúdo total de carbonilo (A), oxidação do DCFH (B). As barras são apresentadas como média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ versus Pré Treino.

Nota: Dados da pesquisa.

Além disso, para verificar a atividade antioxidante foi avaliada a atividade da enzima catalase nos soro dos pacientes antes e após o período total do exercício. Como

demonstrado na figura 2, após os 3 meses de treinamento físico, houve uma diminuição da atividade da mesma.

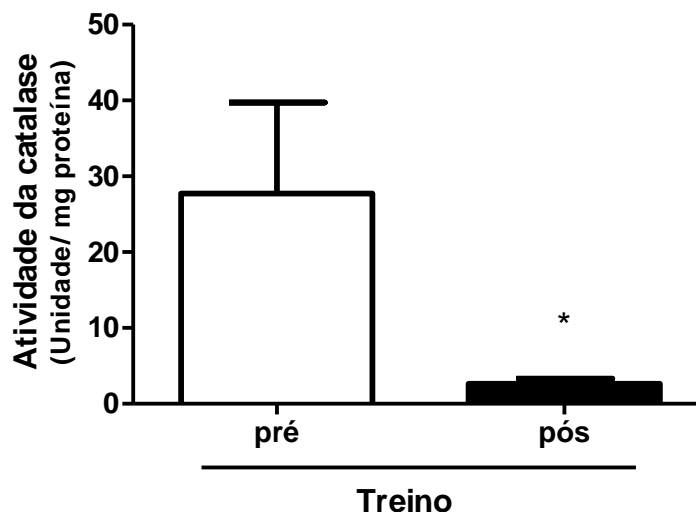


FIGURA 2. Efeitos do exercício físico sob o estresse oxidativo pré e pós protocolo de exercício sobre a atividade da enzima catalase. As barras são apresentadas como média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ versus Pré Treino.

Nota: Dados da pesquisa.

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A análise dos dados obtidos neste trabalho demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade foi capaz de diminuir dano oxidativo induzido pela doença de Alzheimer. Isto pode ser observado pela diminuição do nível de carbonilação proteica e da oxidação de DCFH no soro dos pacientes. Entretanto, também foi possível observar que a atividade da enzima catalase diminuiu.

Já está bem esclarecido o fato de que a DA está relacionada com a produção de espécies reativas, e parece que o estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre defesas antioxidantes e o aumento destas espécies, está envolvido com a morte de neurônios. A produção excessiva de radicais livres causa lesão neuronal, em parte por dano em lipídeos demonstrado por peroxidação lipídica e também pela oxidação das proteínas de membrana, observado pelo conteúdo de carbonil⁵⁹.

Várias estratégias vem sendo utilizadas com a intenção de diminuir estes danos resultantes do estresse oxidativo em indivíduos com DA. Dentre as alternativas o exercício físico tem mostrado resultados significativos na diminuição de parâmetros oxidativos em diversas doenças, inclusive em pacientes com a doença de Alzheimer²⁷ e este parece ser um fator importante para a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, Heyn²⁸ e colaboradores destacaram, por meio de uma revisão sistemática, uma melhora significativa das funções cognitivas globais através da prática de exercícios físicos em indivíduos com declínio cognitivo leve ou com demência. Nesses estudos, destacam-se as atividades aeróbicas, que aumentam o fluxo sanguíneo e a neurogênese, diminuem o estresse oxidativo e, possivelmente, reduzem as placas amiloides.

Existe um interesse crescente no papel do exercício físico como estratégia terapêutica para indivíduos com DA. Morris et al. (2017)⁴² avaliaram o efeito de 6 meses de um programa de exercícios aeróbicos supervisionados na memória, função executiva, capacidade funcional e depressão no início da DA. Os resultados mostraram que o exercício aeróbico no início da DA está associado a benefícios na capacidade funcional em comparação com indivíduos do grupo que não realizou atividade física. Embora o exercício físico tenha um efeito protetor no envelhecimento, principalmente nas funções cognitivas, o estresse oxidativo antes e após o exercício físico em idosos com DA carece de resultados. Em vista disso, neste trabalho foi avaliado o efeito de uma atividade física através de exercício de baixa intensidade, sobre parâmetros oxidativos.

Contudo, estudos de coorte longitudinais têm sugerido que a atividade física na meia-idade protege contra o declínio cognitivo e demência na velhice^{25; 52}. Hammer e col. (2009)²⁵ em uma revisão sistemática calcularam o risco relativo (RR) para o desenvolvimento de doenças e obtiveram resultados interessantes. O RR para o desenvolvimento de demência em indivíduos que realizaram atividade física reduziu consideravelmente. Esses resultados sugerem que a atividade física está inversamente associada ao risco de desenvolver demência, portanto parece ser um fator protetivo contra o surgimento de demência. Outras revisões, incluindo ensaios clínicos randomizados (ECR) que examinam o efeito do exercício físico na cognição de indivíduos idosos saudáveis apoiam essa proposição^{3; 12; 55}. De acordo com a revisão da Cochrane

envolvendo 11 ECR com indivíduos cognitivamente saudáveis, o exercício aeróbico melhora o desempenho cognitivo em testes que medem a atenção e a lembrança tardia de um determinado evento³. Colaborando com esses achados duas outras análises indicaram que o efeito mais pronunciado do exercício é a função executiva^{12; 55}.

A fim de avaliar o dano às proteínas, o conteúdo de carbonil é o indicador mais frequentemente utilizado. A carbonilação de uma proteína é considerada uma das alterações mais irreversíveis e danosas, sendo considerado um dos principais marcadores de estresse oxidativo¹⁸. O aumento do conteúdo de carbonil tem sido observado em várias patologias humanas, incluindo a DA¹⁴.

Corroborando esses dados foi visto também que proteínas carboniladas são altamente acumuladas no cérebro da DA e localizadas em filamentos helicoidais emparelhados (PHF) e placas amilóides, sugerindo que essas modificações proteicas podem desempenhar um papel crucial na progressão da doença. Como o dano oxidativo da proteína pode resultar em disfunção proteica, haverá consequências relevantes para o sistema nervoso, resultando em metabolismo energético anormais, respostas anormais ao dobramento de proteínas e respostas ao estresse oxidativo, anormalidades citoesqueléticas e degradação proteica prejudicada^{11; 21}. Radak et al. (2008)⁵⁰ reportam que a melhoria da função cognitiva está relacionada à diminuição de marcadores de carbonilação protéica, lipoperoxidação e danos ao DNA no cérebro de roedores submetidos a treinamento físico. No presente estudo também pode-se observar que a prática de exercício físico de baixa intensidade, 2 vezes por semana induziu uma diminuição da carbonilação proteica sugerindo que este tipo de exercício pode auxiliar na redução de danos neuronais e desta maneira melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Em estudos de Kozakiewicz e col.³⁴ com idosos de 74 a 99 anos submetidos a atividade física de intensidade moderada resultou em uma diminuição da concentração plasmática de isoprostanos e carbonilação de proteína, corroborando com o nosso estudo.

A produção de ERO também foi avaliada utilizando o DCFH-DA³⁶. Effting et al. (2018)¹⁶ encontraram uma redução de níveis de DCFH em camundongos obesos após o treinamento resistido, sugerindo um importante papel da atividade física na regulação dos níveis oxidantes. Em adição, Souza (2012)⁵³ investigou o efeito de um treinamento de

natação por oito semanas em camundongos com DA induzida pelo peptídeo A β 1-40 e foi observado que o treinamento foi capaz de atenuar o aumento dos níveis de ERO mensurados pelo DCFH. Considerando que os níveis de DCFH encontram-se diminuídos pós-treino, sugerimos que houve uma diminuição de ERO nessa condição, concordando com os estudos acima.

Vale ressaltar, que dependendo de sua intensidade e duração, o exercício físico pode aumentar a geração de radicais livres e a atividade dos sistemas antioxidantes. A intensidade moderada aumenta a proteção contra o estresse oxidativo, enquanto o exercício de alta intensidade aumenta o estresse oxidativo²². A duração dos exercícios também é outro fator que precisa ser considerado, uma vez que 8 semanas de exercícios aeróbicos não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em pacientes com diabetes tipo 2⁴¹. Em contrapartida, 12 meses de exercícios foi capaz de diminuir os marcadores de estresse oxidativo em outra amostra de pacientes com diabetes tipo 2⁴⁶.

Além disso, pesquisas apontam que a prática regular de atividades físicas de baixa a moderadas, leva à adaptação do tecido contra os radicais livres, aumentando a resistência ao estresse oxidativo, como redução nos níveis de ERO, bem como aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH) e redução de dano oxidativo. Em adição, esta prática diminui a incidência de doenças associadas a ERO, como a DA. Em síntese, os parâmetros oxidativos mostram que o músculo esquelético se adapta aos níveis aumentados de ERO, reduzindo o risco de danos dos radicais livres no tecido após exercícios^{49; 50; 54; 60}. Portanto, exercícios regulares podem proporcionar uma excelente manutenção de níveis mais baixos de estresse oxidativo com níveis adequados de antioxidantes, promovendo um envelhecimento saudável.

No entanto, Ferrari et al. (2010)¹⁹ afirma que quando praticado de forma não regular, o exercício físico agudo está associado a uma considerável redução dos níveis sanguíneos da CAT. Nossos resultados apontam para uma considerável redução da CAT no pós-treino, fato este que pode ser explicado pela pequena duração e a falta de regularidade da intervenção.

Embora não tenhamos medido os níveis de atividade da enzima GPx, alguns pesquisadores sugeriram que esta pode ser mais responsiva ao estresse oxidativo induzido pelo exercício^{13; 17; 31}, talvez por este motivo os níveis de catalase não foram

aumentados neste trabalho, já que 2 vezes na semana possui um intervalo superior para ser considerado regular. A GPx e a CAT possuem funções similares na decomposição do H₂O₂. No entanto, as atividades da CAT podem ser desreguladas por atividades elevadas de GPx em resposta a altos níveis ERO, incluindo H₂O₂⁶¹. Uma vez que o marcador de dano oxidativo (DCFH) encontrou-se diminuído após a intervenção no presente estudo, pode-se sugerir que a GPx poderia estar elevada, uma vez que esta enzima é mais eficiente na presença de altas concentrações de ERO que foram refletidas no pré-exercício por altas concentrações de DCFH⁴⁴.

De fato, ERO induzidas por sessões repetidas de exercícios aeróbicos estimulam aumentos na síntese de algumas enzimas antioxidantes²⁷. Semelhante ao nosso estudo e tempo de intervenção, Takahashi et al. (2013)⁵⁷ investigaram os efeitos do exercício físico de baixa intensidade (100min/semana) no estresse oxidativo em idosos na faixa etária de 65-78 anos divididos no grupo controle e exercício. O programa de exercícios consistiu em caminhar 30-60 min / sessão, 2 dias por semana, durante 3 meses. Foi observado uma diminuição da atividade da CAT apenas no grupo exercício. Como demonstrado anteriormente, as diferentes respostas da enzima catalase ao exercício está relacionada aos diferentes tipos de protocolo de exercícios e a intensidade.

Vale salientar que uma limitação desse estudo foi apenas uma avaliação parcial do sistema antioxidante, assim como somente alguns biomarcadores de estresse oxidativo; portanto não podemos excluir que outros fatores relacionados ao sistema redox não foram afetados nos idosos com DA e devem ser avaliados em futuros trabalhos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram que idosos com DA após a intervenção de 3 meses de exercício físico, realizados duas vezes por semana apresentam menores níveis de oxidação por DCFH e de conteúdo carbonil, refletindo diminuição do estresse oxidativo, além de uma redução da atividade da enzima catalase, provavelmente devido a intervalos irregulares da prática de atividade física.

REFERÊNCIAS

- ¹ Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. **Oxygen Radicals in Biological Systems**, 121–126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- ² Andrade-Mores CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimarães DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LR, Polichiso L, Gomes BV, Oliveira LM, Rodriguez RD, Leite RE, Ferretti-Rebustini RE, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Lent R. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain**. 2013 Dec;136 (Pt 12):3738-52.
- ³ Angevaren M, Aufdemkampe G, Verhaar HJ, Aleman A, Vanhees L. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. **Cochrane Database Syst Rev**. 2008; (3):CD005381
- ⁴ Bourdel-Marchasson, I. et al. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing**, v. 30, p. 235-241, 2001.
- ⁵ Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Res. Rev.** 25, 335-358.
- ⁶ BRASIL, **Associação Brasileira de Alzheimer**. Brasília, 2010. Disponível em:<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/demencias-detalhes-Instituto_Alzheimer_Brasil/33/entendendo_a_doenca_de_alzheimer_da_atraves_de_estudos_realizados_com_populacoes_epidemiologia
- ⁷ Brito-Moreira J, Paula-Lima AC, Bomfim TR, Oliveira FB, Sepúlveda FJ, De Mello FG, Aguayo LG, Panizzutti R, Ferreira ST. A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. **Curr Alzheimer Res**. 2011 Aug;8(5):552-62.
- ⁸ Castellani RJ, Perry G. The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease. **Biochem Pharmacol**. 2014 Apr 15;88 (4):671-6.
- ⁹ Chang Y T, Chang W N, Tsai N W, et al. The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. **Biomed Res Int** 2014; 2014: 182303.
- ¹⁰ CHAUHAN, V.; CHAUHAN A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, 2006.
- ¹¹ Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**. 2014 Apr;30(2):271-81.

- ¹² Colcombe S, Kramer AF. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. **Psychol Sci.** 2003 Mar;14(2):125-30.
- ¹³ Covas MI, Elosua R, Fitó M, Alcántara M, Coca L, Marrugat J. Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. **Med Sci Sports Exerc.** 2002; 34(5):814-9.
- ¹⁴ Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta.** 2003. Mar;329(1-2):23-38.
- ¹⁵ DRÖGE, Wulf. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. **Experimental Gerontology**, [s.l.], v. 37, n. 12, p.1333-1345, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00175-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00175-4).
- ¹⁶ Effting PS, Brescianini SMS, Sorato HR, Fernandes BB, Fidelis GSP, Silva PR, Silveira PC, Nesi RT, Ceddia RB, Pinho RA. Resistance Exercise Modulates Oxidative Stress Parameters and TNF- α Content in the Heart of Mice with Diet-Induced Obesity **Arq. bras. cardiol** 2019; 112(5): 545-552.
- ¹⁷ Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordoñez-Llanos J, Marrugat J. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. **Atherosclerosis.** 2003; 167(2):327-34.
- ¹⁸ Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrom Rev.** 2014 Mar-Apr;33(2):79-97.
- ¹⁹ Ferrari CKB. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **J Health Sci Inst.** 2010;28(4):307–10.
- ²⁰ Fortuño, A.; José, G.S.; Moreno, M.U.; Díez, J.; Zalba, G. Oxidative stress and vascular remodeling. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 4, p. 457- 462, 2005.
- ²¹ Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer. **Cell Adh Migr.** 2009; 3(1): 88–93
- ²² Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. **Circulation.** 2003; 108(5):530-5.
- ²³ Greenough, M. A., Camakaris, J. and Bush, A. I. (2013) Metal dyshomeostasis and

oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochem Int** 62, 540-555.

²⁴ Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th. Oxford, UK: **Clarendon Press**; 2007.

²⁵ Hammer M, Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. **Psychol Med**. 2009; 39(1):3-11

²⁶ Hashimoto et al. Apolipoprotein E, especially Apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. **J Neurosci**. 2012; 32(43):15181-15192.

²⁷ Hellsten Y, Nyberg M. Cardiovascular Adaptations to Exercise Training. **Compr Physiol**. 2015;6(1):1-32.

²⁸ Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. **Arch Phys Med Rehabil**. 2004; 85(10):1694-704.

²⁹ Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**. 2012 Jan;8(1):1-13.

³⁰ KAMAT, Pradip K. et al. Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 76, p.32-41, out. 2014. Elsevier BV.

³¹ Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. **Med Sci Sports Exerc**. 2007; 39(2):283-8.

³² 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.

³³ Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. **Science**. 2003 Apr 18;300(5618):486-9.

³⁴ Kozakiewicz, M; Rowiński, Rafał; Kornatowski, Maciej; Dąbrowski, Andrzej; Kędziora-Kornatowska, Kornelia; Strachecka, Aneta. Relation of moderate physical activity to blood markers of oxidative stress and antioxidant defense in the elderly. Polônia: **Oxidative**

Medicine And Cellular Longevity, 2019.

- ³⁵ Krych-Madej, J., & Gebicka, L. (2017). Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 171, 10–17.
- ³⁶ LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1990; 104(1):17-24.
- ³⁷ Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol**. 1990; 186: 464-478.
- ³⁸ Mancuso C, Bates TE, Butterfield DA, Calafato S, Cornelius C, De Lorenzo A, Dinkova Kostova AT, Calabrese V: Natural antioxidants in Alzheimer's disease. **Expert Opin Investig Drugs** 2007, 16:1921-1931.
- ³⁹ Mariani, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 827, p. 65-75, 2005.
- ⁴⁰ Michael R, Otto C, Lenferink A, Gelpi E, Montenegro GA, Rosandić J, Tresserra F, Barraquer RI, Vrensen GF. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: a confocal Raman microspectroscopic study. **Exp Eye Res**. 2014 Feb;119:44-53.
- ⁴¹ Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, Puddey IB. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. **Metabolism**. 1999;48(11):1402-8.
- ⁴² Morris JK, Vidoni ED, Johnson DK, Van Sciver A, Mahnken JD, Honea RA, Wilkins HM, Brooks WM, Billinger SA, Swerdlow RH, Burns JM. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. **PLoS One**. 2017;12(2):e0170547
- ⁴³ Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2012 May;71(5):362-81.
- ⁴⁴ Neubauer O, König D, Kern N, Nics L, Wagner KH. No indications of persistent oxidative

- stress in response to an ironman triathlon. **Med Sci Sports Exerc.** 2008; 40(12):2119-28
- ⁴⁵ Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **Br Med Bull** 1993; 49(3): 653-67.
- ⁴⁶ Nojima H, Watanabe H, Yamane K, Kitahara Y, Sekikawa K, Yamamoto H, Yokoyama A, Inamizu T, Asahara T, Kohno N; Hiroshima University Health Promotion Study Group. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism.** 2008; 57(2):170-6
- ⁴⁷ Petroianu A, Capanema HXM, Silva MMQ, Braga NTP. Atividade física e mental no risco de demência em idosos. **Jor Bras Psi.** 2010.
- ⁴⁸ Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. **N Engl J Med.** 2010 Jan 28;362(4):329-44.
- ⁴⁹ Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc Immunol Rev.** 2001;7:90-107
- ⁵⁰ Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med.** 2008; 44(2):153-9.
- ⁵¹ Simar D, Malatesta D, Badiou S, Dupuy AM, Caillaud C. Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60-90 years. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2007; 62(12):1413-9.
- ⁵² Sofi F, Valecchi D, Bacci D, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Macchi C. Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. **J Intern Med.** 2011; 269(1):107-17.
- ⁵³ Souza LC. Efeito neuroprotetor do exercício físico em um modelo de doença de alzheimer induzido pelo peptídeo β -amilóide (1-40) em camundongos [**Dissertação de mestrado**]. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Itaqui (RS): Universidade Federal do Pampa; 2012.
- ⁵⁴ Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia.** 2009; 50(4):811-23.

- ⁵⁵ Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, Browndyke JN, Sherwood A. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. **Psychosom Med.** 2010; 72(3):239-52.
- ⁵⁶ Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, et al. Nuclear tau: A key player in neuronal DNA protection. **J Biol Chem.** 2010;286:4566–4575.
- ⁵⁷ Takahashi M, Miyashita M, Kawanishi N, Park JH, Hayashida H, Kim HS, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. Low-volume exercise training attenuates oxidative stress and neutrophils activation in older adults. **Eur J Appl Physiol.** 2013; 113(5):1117-26.
- ⁵⁸ Takeda S, Hashimoto T, Roe AD, Hori Y, Spires-Jones TL, Hyman BT. Brain interstitial oligomeric amyloid β increases with age and is resistant to clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB J.** 2013 Aug;27(8):3239-48.
- ⁵⁹ Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 2017; 57(4):1105-1121
- ⁶⁰ Tortosa-Martínez J, Clow A. Does physical activity reduce risk for Alzheimer's disease through interaction with the stress neuroendocrine system *Stress*. 2012; 15(3):243-61.
- ⁶¹ Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** 2003; 189(1-2):41-54.
- ⁶² Valko, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2006.
- ⁶³ Vital TM; Hernandez SSS; Gobbi S; Costa JLRC; Stella F. Atividade física sistematizada e sintomas de depressão na demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **J. bras. psiquiatr.** 2010.
- ⁶⁴ Zhu, X. et al. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1772, p. 494-502, 2007.
- ⁶⁵ Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. **Braz Arch Biol Technol.** 2010; 53(6):1333-42.
- ⁶⁶ Barreiros, A. L. B. S., David, J. M. & David, J. P. d. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova.** 2006. (29) 113-123.

⁶⁷ Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidante micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. **J AmDiet Assoc** 1996;96:693–702.

PROJETO DE CONCLUSÃO DE CURSO

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

KELLEN UGIONI SIMON

**ESTRESSE OXIDATIVO, PARAMETROS INFLAMATÓRIOS E FATORES NEUROTROFICOS
EM SANGUE DE IDOSOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

CRICIÚMA

2019

KELLEN UGIONI SIMON

**ESTRESSE OXIDATIVO, PARAMETROS INFLAMATÓRIOS E FATORES NEUROTROFICOS
EM SANGUE DE IDOSOS COM DOENÇA DE ALZHEIMER**

Projeto apresentado como parte de avaliação da disciplina de Projeto de Pesquisa, no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller

CRICIÚMA

2019

RESUMO

A demência é um termo geral utilizados para designar perda de memória e algumas outras funções cognitivas suficientes para interferir no cotidiano de seu portador. Possui causa idiopática, pautadas somente de hipóteses provenientes de inúmeras evidências, podendo apresentar segundo estudos existentes fatores de risco genéticos, a idade, o sexo feminino, e o histórico familiar positivo. Com base em dados do IBGE, no Brasil a ocorrência da DA está em torno de 1,5 milhão de indivíduos, com uma incidência em torno de 100 mil novos casos por ano. Em achados, foram encontrados em cérebros dos indivíduos diagnosticados uma abundância de placas β -amiloide e emaranhados neurofibrilares. As placas senis são depósitos extracelulares esféricos de agregados insolúveis da proteína beta-amiloide, localizadas, inicialmente, no sistema límbico. Os emaranhados neurofibrilares são feixes de filamentos, insolúveis e resistentes à eliminação in vivo, localizados no citoplasma perinuclear. As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas, sendo moléculas multifuncionais podem ser sintetizadas por quase todas as células nucleadas. São rapidamente alteradas em resposta a infecções ou trauma, elas foram classificadas como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Muitos deles são referidos como interleucinas (ILs), indicando que são secretados por e atuam em leucócitos. Outros tipos importantes de citocinas, como fatores de necrose tumoral (TNFs), interferon (IFN) e fatores de crescimento transformadores (TGF) que podem causar morte celular, ativam células NK e macrófagos. Mecanismos indiretos agem sobre a doença diminuindo a pressão arterial, decréscimo dos níveis de triglicérides no plasma sanguíneo e inibição da agregação plaquetária, melhorando funções cognitivas e a capacidade funcional geral, refletindo-se, dessa maneira, no aumento da qualidade de vida nos portadores de DA. Pesquisas demonstram que a influência de atividades de lazer e físicas na redução da perda cognitiva ocorrem pelo estímulo da neurogênese e da sinaptogênese produzida por fatores neurotróficos, que teriam sua produção aumentada durante a prática regular dos exercícios e a possível ampliação da reserva cognitiva, que ocorreria particularmente em idosos com manutenção de atividades com maior estímulo cognitivo por longo período. A prática diária de exercício tem sido apontada como intervenção não medicamentosa apresentando vastos benefícios sobre sistemas fisiológicos que exibem deterioração funcional e estrutural com o decurso do envelhecimento. Estudos atuais têm confirmado

resultados benéficos decorrentes da prática regular de atividade física, em relação às funções cognitivas e a capacidade funcional em idosos com demência. O exercício físico age sobre a função cognitiva de forma direta ou indireta. Os mecanismos que atuam de forma direta, aumentam a agilidade do processamento cognitivo, constituindo em uma melhora da circulação cerebral e alterações na síntese e degradação de neurotransmissores com mudanças em estruturas cerebrais.

Palavras-chave: Alzheimer, estresse oxidativo, citocinas, pró-inflamatório, anti-inflamatório.

1 INTRODUÇÃO

A demência é um termo geral utilizados para designar perda de memória e algumas outras funções cognitivas suficientes para interferir no cotidiano de seu portador. A doença de Alzheimer (DA), ou popularmente dita por Mal de Alzheimer, foi descrita pela primeira vez pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1906, onde foram visualizados os primeiros indícios, sintomas e lesões histológicas presentes em amostras de uma paciente de 51 anos de idade (LINDEBOOM, 2004; ZHAO, 2002; JANUS, 2001).

A doença é caracterizada histopatologicamente, pelo aumento da perda sináptica e morte neuronal nas regiões cerebrais responsáveis pelas diversas funções cognitivas, como o córtex cerebral, o hipocampo entre outras partes. Possui causa idiopática, pautadas somente de hipóteses provenientes de inúmeras evidências, podendo apresentar segundo estudos existentes fatores de risco genéticos, a idade, o sexo feminino, e o histórico familiar positivo (MACHADO, 2006; KARRAN et al., 2011; ANDRADE-MORAES et al., 2013; MICHAEL et al., 2014; CASTELLANI e PERRY, 2014).

É a principal causa de dependência funcional, institucionalização e mortalidade entre a população idosa, e associada a vários fatores de risco como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e hiperlipidemia (QIU, 2012; SINGER, 2005, HELZNER, 2008). Além desses fatores, idade, sexo, baixa escolaridade, depressão e alterações genéticas podem ser responsáveis pelo aumento da incidência da doença (REITZ, 2011; KARCH, 2014; CHI, 2014).

Com base em dados do IBGE, no Brasil a ocorrência da DA está em torno de 1,5 milhão de indivíduos, com uma incidência em torno de 100 mil novos casos por ano. O Instituto diz também que, em 2050, 30% da população brasileira será acometida por Alzheimer o que significa 65 milhões de portadores. Mundialmente, se tem uma estimativa de 35,6 milhões pessoas com a doença. (BRASIL, 2010).

Atualmente estima-se haver cerca de 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, chegando a 74,7 milhões em 2030 e a 131,5 milhões em 2050 segundo dados fornecidos pelo Relatório de 2015 da Associação Internacional de Alzheimer (ADI). À medida que a população mundial envelhece, espera-se que o número de pessoas que vivem com demência triplique – de 50 milhões para 152 milhões até 2050. (OMS, 2017).

Em achados, foram encontrados em cérebros dos indivíduos diagnosticados uma abundância de placas β -amiloide e emaranhados neurofibrilares. As placas são formadas através de depósitos de fragmentos de peptídeos β -amiloide que acumula nas fendas sinápticas. Já os emaranhados são fibras torcidas provenientes de outra proteína chamada tau que se acumula no interior das células (HASHIMOTO, 2012; HARDY, 2009; NELSON, 2012).

As placas senis são depósitos extracelulares esféricos de agregados insolúveis da proteína beta-amiloide, localizadas, inicialmente, no sistema límbico. Essas placas são oriundas de peptídeos $A\beta$ formados a partir da via amiloidogênica, gerando fragmentos peptídicos tóxico, que podem se agregar levando à formação de placas insolúveis (QUERFURTH, 2010; KAYED, 2003).

Os emaranhados neurofibrilares são feixes de filamentos, insolúveis e resistentes à eliminação in vivo, localizados no citoplasma perinuclear. É composto por proteínas TAU com alteração química estrutural em estado hiperfosforilado sendo responsável pela agregação e estabilização de microtúbulos que transportam nutrientes e informações dos prolongamentos dos neurônios ao seu corpo celular e vice-versa (KARRAN et al., 2011; CASTELLANI e PERRY, 2014). A causa dessa modificação na TAU ainda é desconhecida e sua evolução é crucial no desenvolvimento dessa demência e determinação da gravidade clínica (KARRAN et al., 2011; HYMAN et al., 2012; TAKEDA et al., 2013).

As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas, sendo moléculas multifuncionais podem ser sintetizadas por quase todas as células nucleadas. São rapidamente alteradas em resposta a infecções ou trauma, elas foram classificadas como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Muitos deles são referidos como interleucinas (ILs), indicando que são secretados por e atuam em leucócitos. Outros tipos importantes de citocinas, como fatores de necrose tumoral (TNFs), interferon (IFN) e fatores de crescimento transformadores (TGF) que podem causar morte celular, ativam células NK e macrófagos (Szelényi, 2001; Cong Zheng, 2016).

O NGF desempenha o seu papel trófico tanto durante o desenvolvimento como na idade adulta, garantindo a manutenção da característica fenotípica e funcional de várias populações de neurônios, bem como de células imunitárias (Ebendal, 1992). No sistema nervoso central (SNC), a maior quantidade de NGF é produzida no córtex, no hipocampo e na glândula pituitária, motivo pelo qual é relacionada a DA (onde ocorre danos principalmente nas regiões de córtex e hipocampo, responsáveis pela

memória) e podendo relacionar a sua atividade neuroprotetora mostrando sua atuação na neurotoxicidade da A β e na hiperfosforilação da Tau (mecanismos da DA) (Fischer, 1987; Tuszynski).

O TGF- β , uma citocina imunossupressora que protege os neurônios contra danos, tem um papel complexo na modulação da patologia A β . A superexpressão de TGF- β em longo prazo por astrócitos em camundongos transgênicos levou ao aumento da depuração da placa A β por microglia ativada e melhora do comprometimento do comportamento induzido por A β (Wyss-Coray^a,2001; Chen JH, 2015). No entanto, o TGF- β também pode promover a agregação de astrócitos em torno de microvasos cerebrais e depósitos de A β nas membranas basais vasculares. Portanto, o TGF- β pode reduzir a patologia A β do parênquima cerebral, ao mesmo tempo que causa o comprometimento da perfusão sanguínea nas regiões associadas (Wyss-Coray^b, 1995; Ueberham, 2005).

O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica que tem uma função semelhante, mas mais fraca, à IL-4 na regulação positiva do MHC da classe II (Butovsky,2005), implicando uma característica imunossupressora da citocina. A mudança de nível de IFN- γ em pacientes com DA não foi relatada, entretanto, a superexpressão de IFN- γ resulta em uma diminuição significativa dos depósitos A β e infiltração de monócitos periféricos, o que é consistente com as observações de que IFN- γ aumenta A β absorção pela microglia e ativa a microglia para facilitar a motilidade das células T e a formação de sinapses in vitro (Chakrabarty, 2010; Monsonego, 2006).

O TNF- α é outro mediador, produzido ativamente pela microglia durante a inflamação, embora seus níveis sejam baixos em cérebros saudáveis, dificultando a determinação de sua função fisiológica (Tweedie et al, 2007). Tem sido demonstrado que desempenha um papel fundamental na morte celular mediada por neuroinflamação em diferentes neuropatologias, incluindo a DA, e, portanto, sua inibição pode constituir uma estratégia terapêutica para diferentes distúrbios neurodegenerativos (Zheng et al, 2016). Em estudo de Yamamoto (2009) e colegas, mostraram que o TNF- α estimula a expressão de BACE1 e aumenta o processamento amiloidogênico de astrócitos expressando APP e neurônios corticais.

A gama-enolase é considerada um marcador neuronal (Herrmann; Ehrenreich, 2003), bem como um marcador de status morfológico na DA (Chaves *et al*, 2010) e possui uma atividade neurotrófica (Hattori *et al.*,1995). Controla a sobrevivência, diferenciação e regeneração de neurônios neuronais ativando as vias de transdução

de sinal da fosfatidilinositol3-quinase (PI3k) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Hafner *et al*, 2012), assim como outros fatores neurotróficos, como NGF (Kaplan & Miller, 1997). A atividade neurotrófica da γ -enolase está associada à capacidade de ser translocada para a membrana plasmática e com sua extremidade C-terminal intacta, que é clivada pela catepsina cisteína-protease X (Obermajer *et al.*, 2009; Hafner *et al*, 2010).

Mecanismos indiretos agem sobre a doença diminuindo a pressão arterial, decréscimo dos níveis de triglicérides no plasma sanguíneo e inibição da agregação plaquetária, melhorando funções cognitivas e a capacidade funcional geral, refletindo-se, dessa maneira, no aumento da qualidade de vida nos portadores de DA (OLIVEIRA, 2011). Porém, os efeitos positivos do exercício no aumento da perfusão cerebral dependem da condição cardíaca do paciente, devendo ser realizada uma avaliação profunda de verificação de suas condições cardiovasculares (VITAL, 2010).

Pesquisas demonstram que a influência de atividades de lazer e físicas na redução da perda cognitiva ocorrem pelo estímulo da neurogênese e da sinaptogênese produzida por fatores neurotróficos, que teriam sua produção aumentada durante a prática regular dos exercícios e a possível ampliação da reserva cognitiva, que ocorreria particularmente em idosos com manutenção de atividades com maior estímulo cognitivo por longo período (PETROIANU, 2010).

Acredita-se que o exercício físico poderia aumentar o fluxo sanguíneo cerebral, melhorando a oferta de oxigênio e outros substratos energéticos, proporcionando, assim, a melhora da função cognitiva. Outra hipótese relaciona os efeitos do estresse oxidativo sobre o sistema nervoso central, de modo que a prática de exercício físico aeróbico poderia aumentar a atividade de enzimas antioxidantes de forma semelhante ao que ocorre em outros tecidos, aumentando a capacidade de defesa a danos provocados por espécies reativas de oxigênio, influenciando expressivamente na plasticidade sináptica (OLIVEIRA, 2011).

A prática diária de exercício tem sido apontada como intervenção não medicamentosa apresentando vastos benefícios sobre sistemas fisiológicos que exibem deterioração funcional e estrutural com o decurso do envelhecimento (VITAL, 2010; BRITO-MOREIRA, 2011). Durante o processo de envelhecimento, a capacidade muscular também é prejudicada, incidindo em uma redução no recrutamento e ativação de unidades motoras com um aumento significativo do risco de quedas, uma vez que 65,5% desses episódios ocorrem em idosos que apresentam déficit cognitivo

(VITAL, 2010).

Estudos atuais têm confirmado resultados benéficos decorrentes da prática regular de atividade física, em relação às funções cognitivas e a capacidade funcional em idosos com demência. O exercício físico age sobre a função cognitiva de forma direta ou indireta. Os mecanismos que atuam de forma direta, aumentam a agilidade do processamento cognitivo, constituindo em uma melhora da circulação cerebral e alterações na síntese e degradação de neurotransmissores com mudanças em estruturas cerebrais (VITAL, 2010; CHRISTOFOLETTI, 2007; BRITO-MOREIRA, 2011).

1.1 JUSTIFICATIVA

Conforme o aumento da expectativa de vida, aumenta consigo uma gama de patologias relacionadas ao envelhecimento, como o Alzheimer. Porém não é há uma cura para a mesma. Trata-se de um ensaio clínico não randomizado, pois corresponde há um grupo de intervenção e a participação dos indivíduos será relacionado com a doença de Alzheimer, tanto diretamente (paciente) quanto indiretamente (cuidador). Como muitas pesquisas têm demonstrado a ação benéfica do exercício físico sobre a cognição e como modulador do estresse oxidativo, tendo em vista atividades anti-inflamatórias e neurotróficas.

1.2 HIPÓTESE

Algumas pesquisas têm demonstrado a ação benéfica do exercício físico sobre a cognição. Por meio deste estudo tem-se por objetivo verificar efeitos da atividade física de baixa intensidade sobre o estresse oxidativo, a regulação de interleucinas e fatores neurotróficos em pacientes com demência do tipo Alzheimer. Espera-se que a atividade física de baixa intensidade, desenvolvida de forma regular, sistematizada, constitua um recurso importante para idosos com DA, contribuindo para a o balanço favorável do estresse oxidativo e uma regulação nas interleucinas pró inflamatórias, diminuendo efeitos progressivos da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de um programa de exercício físico de intensidade leve, em pessoas idosas com diagnóstico de demência devida a DA, se o exercício aeróbico num período de 3 meses pode produzir efeitos divergentes sobre os fatores neuroprotetores de crescimento, citocinas inflamatórias, e possíveis efeitos sobre o estresse oxidativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do exercício físico de intensidade leve em pacientes com Doença de Alzheimer sobre a produção em níveis séricos de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes;
- Avaliar os efeitos do exercício físico de intensidade leve em pacientes com Doença de Alzheimer sobre os níveis em níveis séricos de IL10, TNF α , β NGF, IFN γ e BDNF.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa será desenvolvido em conformidade com as normas vigentes expressas na Resolução 196 de outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde. O projeto será submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma, Santa Catarina, e no seu desenvolvimento serão observadas as orientações e demais normas e recomendações éticas para a realização de pesquisas no Brasil. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será entregue aos participantes, os quais ficarão de posse de uma cópia permanecendo outra com o pesquisador. O material coletado será de uso exclusivo do pesquisador, sendo utilizado com a única finalidade de fornecer elementos para a realização deste projeto de pesquisa, da própria pesquisa e dos artigos e publicações que dela resultem. No projeto da pesquisa e mesmo na escrita da dissertação, será assegurada a confidencialidade dos dados e das informações que possibilitem a identificação dos participantes.

A pesquisa não oferecerá nenhum dano ou desconforto aos participantes e não será objeto de nenhum benefício, ressarcimento ou pagamentos aos mesmos. O material coletado não será objeto de comercialização ou divulgação que possa prejudicar os entrevistados.

3.2 EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM IDOSOS E CUIDADORES

O delineamento da pesquisa acontecerá por meio da coleta de dados pré e pós intervenção, analisando se o programa de exercício físico pode ter contribuído para a mudança deste público. A amostra será composta por 15 pessoas com o diagnóstico da doença de Alzheimer, com disponibilidade de participar do programa por duas vezes na semana, com duração de 60 minutos e num período de três meses. Todos os participantes deverão apresentar o atestado declarando a possibilidade de participar de um programa de exercício físico monitorado pelos pesquisadores e juntamente com o auxílio de seus respectivos cuidadores.

Será realizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma, Santa Catarina, no período de Julho a Setembro de 2019. Serão recrutadas pacientes diagnosticados com a Doença de Alzheimer, localizadas na região, homens e mulheres diagnosticados, que não faça nenhum tipo de programa de exercício físico regular. Foram excluídas aquelas com contraindicação de ordem médica para a prática de exercício físico.

Para como grupo controle será feito com os cuidadores responsáveis por paciente que farão parte dos exercícios de hidroginástica com duração de 45 minutos devidamente selecionados por estudantes de Educação Física da universidade, durante o período de 3 meses.

3.3 COLETA SANGUINEA

A coleta será realizada no último dia da realização de exercícios. Os idosos e seus cuidadores serão encaminhados primeiramente a uma sala no Bloco T, na Universidade do Extremo Sul Catarinense e após serão encaminhados a piscina onde será realizada as atividades. Após a sessão de exercícios, os participantes serão encaminhados novamente a sala, para uma nova coleta.

3.4 TESTE DE CITOCINAS SÉRICAS

As dosagens sérica das citocinas Enolase, β NGF, BDNF e TNF- α serão realizadas através do método de ELISA, segundo as especificações do fabricante (R&D Systems).

As dosagens das citocinas IL-10 e IFN γ serão realizadas através do método de ELISA, segundo as especificações do fabricante (Invitrogen).

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas será determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina (DNPT). Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas será determinado por espectrofotometria a 370nm como previamente descrito por Levine e cols (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg.

3.5.2 Ânion Superóxido

A atividade da SOD será determinada segundo Bannister e Calabrese (1987). A atividade enzimática foi estimada por espectrofotometria (480nm) pela inibição da auto oxidação da adrenalina. Os resultados foram calculados como unidades(U)/ mg de proteínas. Cada U corresponde a 50% de inibição da oxidação da adrenalina.

3.5.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

3.5.4 Espécies reativas por diacetato de difluoresceína (DCFH)

A oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da diclorofluoresceína

(DCF) que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 µL de água e 75 µL de DCFH-DA foram adicionados a 25 µL de amostra, homogêneos em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde utilizou-se como padrão o DCF 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras, quanto a curva de calibração, foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram realizadas as leituras no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas.

4 CRONOGRAMA

Tabela 1: Cronograma das atividades para a realização do Projeto de Pesquisa e TCCII.

Atividades	2018											
	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ag.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação do projeto de Pesquisa					X							
Entrega final do projeto de pesquisa					X							
Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa						X						
Início do Exercício Físico de Baixa intensidade							X	X				
Análises Bioquímicas (Estresse oxidativo)								X	X			
ELISAs									X			
Análises estatísticas												
Defesa TCCII												X
Correção												X
Entrega final TCCII												x

5 ORÇAMENTO

Material orçado:

Material	Custo (R\$)
ELISA IL-10 (Invitrogen) para 10 placas	2,634.50

ELISA Enolase (R&D) para 10 placas	2289.59
ELISA β NGF (R&D) para 10 placas	2,310.00
ELISA BDNF (R&D) para 10 placas	2,310.00
TNF- α (R&D) para 10 placas	2,310.00
ELISA IFN γ (Invitrogen) para 10 placas	2,310.00
Placas de ELISA 50 placas	1,341.00
Dinitrofenilhidrazina (Sigma) 25g	162.00
Adrenalina (Sigma) 1mL	899.00
Peróxido de Hidrogênio(Sigma) 100mL	243.00
Diclorofluoresceína (Sigma) 5g	562.00

REFERÊNCIAS

- Andrade-Mores CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimarães DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LR, Polichiso L, Gomes BV, Oliveira LM, Rodriguez RD, Leite RE, Ferretti-Rebustini RE, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Lent R. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain**. 2013 Dec;136(Pt 12):3738-52.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for SOD. **Meth Biochem Anal**. 1987; 32: 279-312.
- BRASIL, **Associação Brasileira de Alzheimer**. Brasília, 2010. Disponível em:<
http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/demencias-detalhes-Instituto_Alzheimer_Brasil/33/entendendo_a_doenca_de_alzheimer_da_atraves_de_estudos_realizados_com_populacoes_epidemiologia > Acesso em: 30 maio 2019.
- Brito-Moreira J, Paula-Lima AC, Bomfim TR, Oliveira FB, Sepúlveda FJ, De Mello FG, Aguayo LG, Panizzutti R, Ferreira ST. A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. **Curr Alzheimer Res**. 2011 Aug;8(5):552-62.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol Cell Neurosci**. 2005;29(3):381–93.
- Castellani RJ, Perry G. The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease. **Biochem Pharmacol**. 2014 Apr 15;88(4):671-6.
- Chakrabarty P, Ceballos-Diaz C, Beccard A, Janus C, Dickson D, Golde TE, et al. IFN-gamma promotes complement expression and attenuates amyloid plaque deposition in amyloid beta precursor protein transgenic mice. **J Immunol**. 2010;184(9):5333–43.
- Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, Mazzini GS, Souza DO, Portela LV. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. **J. Neuroinflammation**. 2010.
- Chen JH, Ke KF, Lu JH, Qiu YH, Peng YP. Protection of TGF-beta1 against neuroinflammation and neurodegeneration in Abeta1-42-induced Alzheimer's disease model rats. **PLoS One**. 2015;10(2):e0116549.
- Chi S, Yu JT, Tan MS, Tan L. Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management. **J Alzheimers Dis** 2014; 42:739-55.
- CHRISTOFOLETTI, G.; OLIAN, I. M. M.; GOBBI, S.; STELLA, F. Effects of Motor Intervention in elderly patients with dementia: an analysis of randomized controlled trials. **Topics in Geriatric Rehabilitation**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 14954, 2007.
- Cong Zheng, Xin-Wen Zhou, and Jian-Zhi Wang. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . **Transl Neurodegener**. 2016.
- Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. **J Neurosci Res**. 1992;32:461–470.
- Fischer W, Victorin K, Bjorklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. **Nature**. 1987;329:65–68.
- Gabbita S.P., Johnson M.F., Kobritz N., Eslami P., Poteshkina A., Varadarajan S., et al. Oral TNF α modulation alters neutrophil infiltration, improves cognition and diminishes tau and amyloid pathology in the 3xTgAD mouse model. **PLoS One**. 2015;10:1–28.
- Hafner A, Obermajer N, Kos J. γ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of PI 3-K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways, **Biochem**. 2012. J. 443, 439–450.
- Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. **J Neurochem**. 2009 Aug;110(4):1129-34.
- Hashimoto et al. Apolipoprotein E, especially Apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. **J Neurosci**. 2012; 32(43):15181-15192.
- Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S. Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. **Neurosci**. 1995.

Res. 21, 191–198.

Helzner EP, Scarmeas N, Cosentino S, Tang MX, Schupf N, Stern Y. Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases. **Neurology** 2008; 71:1489-95.

Herrmann M, Ehrenreich H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. **Restor Neurol Neurosci.** 2003;21(3-4):177-90.

Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.** 2012 Jan;8(1):1-13.

Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Physiol Behav.** 2001;73(5):873-86.

Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.** 1997. 9, 213–221.

Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. **Biol Psychiatry.** 2014; 77:43-51.

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.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. **Science.** 2003 Apr 18;300(5618):486-9.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol.** 1990; 186: 464-478.

Lindeboom J, Weinstein H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. **Eur J Pharmacol.** 2004;490(1-3):83-6.

Machado, Jacqueline; Caram, Carmen Lucia Barreto; Frank, Andrea Abdala; Soares, Eliane de Abreu; Jerson Laks. Estado nutricional na doença de Alzheimer. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2009.

Michael R, Otto C, Lenferink A, Gelpi E, Montenegro GA, Rosandić J, Tresserra F, Barraquer RI, Vrensen GF. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: a confocal Raman microspectroscopic study. **Exp Eye Res.** 2014 Feb;119:44-53.

Monsonogo A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006;103(13):5048–53.

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2012 May;71(5):362-81.

Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonovič UP, Kos J. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2009. 4, 1685–1696.

Oliveira J, Hort MA, Moreira EL, Glaser V, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD, Farina M, Latini A, de Bem AF. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience.** 2011 Dec 1;197:99-106.

OMS. Demência: número de pessoas afetadas triplicará nos próximos 30 anos.
Disponível em:

<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5560:demencia-numero-de-pessoas-afetadas-triplicara-nos-proximos-30-anos&Itemid=839>. Acesso em: 30 maio 2019.

Petroianu A, Capanema HXM, Silva MMQ, Braga NTP. Atividade física e mental no risco de demência em idosos. **Jor Bras Psi.** 2010.

Qiu C. Preventing Alzheimer's disease by targeting vascular risk factors: hope and gap. **J Alzheimers Dis** 2012; 32:721-31.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. **N Engl J Med.** 2010 Jan 28;362(4):329-44.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol.** 2011; 7:137-52.

Singer RB. Mortality derived from 5-year survival in patients with Alzheimer disease. **J Insur Med.** 2005; 37:264-71.

Sommer G., Kralisch S., Lipfert J., Weise S., Krause K., Jessnitzer B., et al. Amyloid precursor protein expression is induced by tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 adipocytes. **J. Cell. Biochem.** 2009;108(6):1418–1422.

Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Res Bull.** 2001;54(4):329–338.

Takeda S, Hashimoto T, Roe AD, Hori Y, Spires-Jones TL, Hyman BT. Brain interstitial oligomeric amyloid β increases with age and is resistant to clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB J.** 2013 Aug;27(8):3239-48.

Tuszynski MH, Sang H, Yoshida K, Gage FH. Recombinant human nerve growth factor infusions prevent cholinergic neuronal degeneration in the adult primate brain. **Ann Neurol.** 1991;30:625–636.

Tweedie D., Sambamurti K., Greig N.H. TNF-alpha inhibition as a treatment strategy for neurodegenerative disorders: new drug candidates and targets. **Curr. Alzheimer Res.** 2007;4(4):378–385.

Ueberham U, Ueberham E, Bruckner MK, Seeger G, Gartner U, Gruschka H, et al. Inducible neuronal expression of transgenic TGF-beta1 in vivo: dissection of short-term and long-term effects. **Eur J Neurosci.** 2005;22(1):50–64.

Vital TM; Hernandez SSS; Gobbi S; Costa JLRC; Stella F. Atividade física sistematizada e sintomas de depressão na demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **J. bras. psiquiatr.** 2010.

Wyss-Coray^a T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, et al. TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. **Nat Med.** 2001;7(5):612–8.

Wyss-Coray^b T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, et al. Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. **Am J Pathol.** 1995;147(1):53–67.

Yamamoto M., Kiyota T., Horiba M., Buescher J.L., Walsh S.M., Gendelman H.E., et al. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α regulate Amyloid- β plaque deposition and β -secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. **Am. J. Pathol.** 2007;170(2):680–692.

Zhao Q, Tang XC. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **Eur J Pharmacol.** 2002;455 (2-3):101-7.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

A CONTRIBUIÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA FUNÇÃO COGNITIVA E MOTORA DE PESSOAS DIAGNOSTICADAS COM DOENÇA ALZHEIMER

Objetivo: Avaliar a contribuição do exercício físico na melhora do desempenho cognitivo e atividade motora de pessoas com diagnóstico de Alzheimer.

Período da coleta de dados: 01/07/2019 a 30/09/2019

Tempo estimado para cada coleta: 60 dias

Local da coleta: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Pesquisador/Orientador: Alexandre Pastoris Müller

Telefone: (48) 988688655

Pesquisador/Acadêmico: Kellen Ugoni Simon

Telefone: (48) 996205641

9ª fase do Curso de Farmácia da UNESC

O(A) Sr(a) _____ está sendo convidado(a) para participar voluntariamente da pesquisa e objetivo acima intitulados. Aceitando participar do estudo, poderá desistir a qualquer momento, bastando informar sua decisão diretamente ao pesquisador responsável ou à pessoa que está efetuando a pesquisa. Fica esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, não haverá nenhuma remuneração, bem como o (a) senhor (a) não terá despesas para com a mesma. Os dados referentes à sua pessoa serão sigilosos e privados, preceitos estes assegurados pela Resolução nº 466/2012 do CNS - Conselho Nacional de Saúde, podendo o (a) senhor (a) solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação dos dados obtidos a partir desta. Para tanto, esclarecemos também os procedimentos, riscos e benefícios, a saber:

DETALHES DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS NA PESQUISA

Relato de caso: Trata-se de um ensaio clínico não randomizado, pois corresponde há um grupo de intervenção e a participação dos indivíduos será relacionado com a doença de Alzheimer, tanto diretamente (paciente) quanto indiretamente (cuidador). Sendo assim, o delineamento da pesquisa acontecerá por meio da coleta de dados pré e pós intervenção, analisando se o programa de exercício físico pode ter contribuído para a mudança deste público. A amostra será composta por 15 pessoas com o diagnóstico da doença de Alzheimer, com disponibilidade de participar do programa por duas vezes na semana, com duração de 60 minutos e num período de três meses. Todos os participantes deverão apresentar o atestado declarando a possibilidade de participar de um programa de exercício físico monitorado pelos pesquisadores e juntamente com

Página 1 de 2

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (continuação)



Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

o auxílio de seus respectivos cuidadores.

RISCOS

Esta pesquisa apresenta riscos durante a realização dos exercícios físicos, como quedas, desconfortos torácicos, que deverão ser minimizados pela participação do cuidador junto a todas as atividades, e o controle da intensidade dos esforços físicos deverá ser realizado pelo pesquisador responsável pela pesquisa, para a realização das atividades com maior segurança.

BENEFÍCIOS

A presente pesquisa poderá contribuir para a melhora das capacidades físicas e habilidades motoras, convívio social, aspectos cognitivos e na autonomia funcional dos participantes.

Diante de tudo o que até agora fora demonstrado, declaro que todos os procedimentos metodológicos e os possíveis riscos, detalhados acima, bem como as minhas dúvidas foram devidamente esclarecidos, sendo que para tanto, firmo ao final a presente declaração em duas vias de igual teor e forma ficando na posse de uma e outra sido entregue ao pesquisador responsável.

Em caso de dúvidas, sugestões ou denúncias, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UNESC pelo telefone (48) 3431-2723 ou pelo e-mail cetica@unesc.net.

ASSINATURAS

Voluntário/Participante	Pesquisador Responsável
<hr/> <p style="text-align: center;">Assinatura</p>	<hr/> <p style="text-align: center;">Assinatura</p>
Nome: _____	Nome: _____
CPF: _____ - _____	CPF: _____ - _____

Criciúma (SC), ____ de _____ de 2019.

Página 2 de 2

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação da CEP.

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A CONTRIBUIÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA FUNÇÃO COGNITIVA E MOTORA DE PESSOAS DIAGNOSTICADAS COM DOENÇA ALZHEIMER

Pesquisador: Joni Marcio de Farias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01819818.0.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.034.010

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa pretende avaliar a contribuição do exercício físico na função cognitiva e motora de pessoas portadoras da doença de Alzheimer. Trata-se de um ensaio clínico não randomizado, pois corresponde há um grupo de intervenção e a participação dos indivíduos será relacionado com a doença de Alzheimer, tanto diretamente (paciente) quanto indiretamente (cuidador). Sendo assim, o delineamento da pesquisa acontecerá por meio da coleta de dados pré e pós intervenção, analisando se o programa de exercício físico pode ter contribuído para a mudança deste público. A amostra será composta por 15 pessoas com o diagnóstico da doença de Alzheimer, com disponibilidade de participar do programa por duas vezes na semana, com duração de 60 minutos e num período de três meses. Todos os participantes deverão apresentar o atestado declarando a possibilidade de participar de um programa de exercício físico monitorado pelos pesquisadores e juntamente com o auxílio de seus respectivos cuidadores.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a contribuição do exercício físico na melhora do desempenho cognitivo e atividade motora de pessoas com diagnóstico de Alzheimer.

Objetivo Secundário:

Endereço: Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2606

E-mail: cetca@unesc.net

ANEXO B – Carta de aprovação da CEP continuação

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 3.034.010

- Verificar a relação entre o exercício físico e alterações no perfil psicossocial em indivíduos com a doença de Alzheimer;
- Avaliar a efetividade do exercício físico e atividades cognitivas pré e pós-intervenção nos sintomas da doença de Alzheimer;
- Analisar o programa de exercício físico no ganho de desempenho da capacidade funcional e cognitiva nos pacientes com doença de Alzheimer;
- Comparar a prática do exercício físico sobre os marcadores bioquímicos séricos de neurotrofinas, inflamação e estresse oxidativo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta pesquisa apresenta riscos durante a realização dos exercícios físicos, como quedas, desconfortos torácicos, que deverão ser minimizados pela participação do cuidador junto a todas as atividades, e o controle da intensidade dos esforços físicos deverá ser realizado pelo pesquisador responsável pela pesquisa, para a realização das atividades com maior segurança.

Benefícios:

A presente pesquisa poderá contribuir para a melhora das capacidades físicas e habilidades motoras, convívio social, aspectos cognitivos e na autonomia funcional dos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa é relevante e poderá contribuir para um melhor qualidade de vida dos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados.

Recomendações:

Recomendamos que ao término da pesquisa seja postado na plataforma Brasil o relatório final da pesquisa conforme o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa não apresenta pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida Universitária, 1.105
Bairro: Universitário CEP: 88.806-000
UF: SC Município: CRICIUMA
Telefone: (48)3431-2606 E-mail: cetca@unesc.net

ANEXO C – Carta de aprovação da CEP continuação

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 3.034.010

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1232901.pdf	28/10/2018 08:21:43		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	28/10/2018 08:21:29	Joni Marcio de Farias	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_aceite.pdf	17/10/2018 15:15:39	Joni Marcio de Farias	Aceito
Folha de Rosto	folho_rosto.pdf	08/10/2018 17:25:09	Joni Marcio de Farias	Aceito
TCLE / Temos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/10/2018 17:23:20	Joni Marcio de Farias	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CRICIUMA, 22 de Novembro de 2018

Assinado por:
RENAN ANTONIO CERETTA
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Universitária, 1.105
Bairro: Universitário CEP: 88.806-000
UF: SC Município: CRICIUMA
Telefone: (48)3431-2606 E-mail: cetca@unesc.net

NORMAS DE ENVIO DE ARTIGOS DA REVISTA SELECIONADA

Inova Saúde

Diretrizes para Autores

Normas de formatação

As publicações da Revista Inova Saúde possuem abordagens baseadas em metodologias qualitativas e/ou quantitativas. Os artigos são publicados dentro das seguintes seções: Neurociências, Fisiopatologia, Exercício na Saúde na Doença e no Esporte, Atenção à Saúde, Tecnologias em Saúde, Saúde e Processos Psicossociais, Gestão em Saúde, Saúde Funcional. Cada edição publicará manuscritos que podem ser apresentados nas seguintes categorias:

Artigos originais: resultado de trabalho de natureza empírica, experimental ou conceitual. Deve conter as seções: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (máximo de 7.000 palavras).

Comunicações breves: nota prévia, relatando resultados parciais ou preliminares de pesquisa (máximo de 2.500 palavras).

Revisões de literatura: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes (máximo de 20.000 palavras, com o máximo de 50 referências bibliográficas).

Ponto de Vista: expressão da opinião sobre um determinado assunto pertinente. Deve conter: resumo, introdução, tópicos de discussão, considerações finais e referências bibliográficas (máximo de 1.000 palavras, com máximo de 15 referências bibliográficas).

Relato de Experiência: destina-se a descrição e discussão de experiências desenvolvidas junto a instituições, comunidades e/ou sujeitos e que apresentem algum aspecto original relacionados à ensino, pesquisa e/ou extensão (máximo de 5.000 palavras, com no máximo 15 referências bibliográficas).

1. Folha de Rosto

a) **Título completo:** Deve constar título completo (no idioma português e em inglês), nome(s) do(s) autor(es) e da(s) respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo apenas do autor responsável pela correspondência, incluindo e-mail;

b) **Título resumido:** máximo de 50 caracteres;

c) **Órgãos e instituições financiadores:** quando for o caso, citar duas linhas abaixo, logo após o endereço.

2. Resumo

Todos os artigos submetidos à Revista Inova Saúde, com exceção das contribuições enviadas às seções Ponto de Vista e Relato de Experiência, deverão ter resumo na língua portuguesa e em inglês. O Resumo deverá conter no máximo 1500 caracteres com espaço, escrito em parágrafo único, contendo o texto para objetivos, desenvolvimento, resultados e conclusões. Porém, não mencionar no resumo os itens que compõem a estrutura do manuscrito. Serão aceitos entre 03 e 05 palavras-chave que deverão estar de acordo com Descritores em Ciências da Saúde - DECS (<http://decs.bvs.br>). O resumo na tradução para o inglês será nomeado Abstract e deverá conter 3 a 5 keywords de acordo com os DECS e com Medical Subject Headings - MESH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

3. Apresentação das seções

O corpo de texto deve apresentar seqüência lógica, organizada em partes distintas (introdução, desenvolvimento, conclusões), considerando-se a categoria do manuscrito envolvida.

- a) corpo do texto: apresentado em folha A4, margem superior, inferior, direita e esquerda iguais a 2,5 cm. O texto deve possuir espaço 1,5 (entrelinhas), fonte Arial, tamanho 12. Deverá ser iniciado pela introdução e apresentado de maneira contínua, sem novas páginas para cada subtítulo;
- b) Notas de rodapé e anexos não serão aceitos.

4. Citações

- a) As citações devem ser numeradas de forma consecutiva, na medida em que ocorrerem no texto.
- b) As citações devem ser realizadas utilizando numeração arábica, sobrescrita, em ordem numérica crescente, com vírgula (Exemplo: Saúde Coletiva^{1,2,3}; Atenção Básica^{30-48,50}).

5. Referências

- a) o número de referências deve estar de acordo com a categoria do manuscrito apresentado à Revista Inova Saúde (ver categorias de manuscritos);
- d) as referências listadas serão normatizadas de acordo com o "Estilo Vancouver", norma elaborada pelo International Committee of Medical Journals Editors (<http://www.icmje.org>);
- e) a apresentação das referências listadas deverá ser em espaço simples, sem parágrafos, sem recuos e ordenadas numericamente de acordo com a ordem apresentada no texto;
- f) Para abreviaturas de títulos de periódicos, consultar:
 - em português: <http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>
 - em inglês: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

Exemplos:

a) Periódicos:

1. Harlow BL, Barbieri RL. Influence of education on risk of hysterectomy before age 45 years. *Am J Epidemiol*. 1999;150(8):843-7.

b) Livros:

-impresso:

2. Pastore AR, Cerri GG. Ultrassonografia em ginecologia e obstetrícia. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 1389 p.

- formato eletrônico:

3. Pompéia R. O Ateneu [Internet]. 16.ed. São Paulo: Ática;1996 [acesso em 2001 jun 27]. Disponível em: <http://www.bibvirt.futuro.usp.br/index.html>

c) Capítulos de livros:

4. Del Negro G. Doenças produzidas por fungos. In: Guimarães RY, Guerra CC. Clínica e laboratório: interpretação clínica das provas laboratoriais. São Paulo: Sarvier; 1984. p.272-5.

d) Dissertação e Tese:

5. Krug SBF. Sofrimento no trabalho: a construção social do adoecimento de trabalhadoras da saúde. [Tese]. [Porto Alegre]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006. 196 p.

e) Artigo de revista no prelo:

6. Ribas GC, Ribas EC, Rodrigues Jr AJ. O cérebro, a visão tridimensional, e as técnicas de obtenção de imagens estereoscópicas. Rev Méd. 2006;85(3). No prelo.

7. Simões-Costa MS, Azambuja AP, Xavier-Neto J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2006 Nov 15. [Epub ahead of print]

f) Artigo com DOI (Digital Object Identifier):

8. Isolan GR, Azambuja N, Paglioli Neto E, Paglioli E. Anatomia microcirúrgica do hipocampo na Amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. Arq Neuro-Psiquiatr. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2007000600031>.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista;

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word.

URLs para as referências foram informadas quando necessário.

O texto está apresentado em folha A4, margem superior, inferior, direita e esquerda iguais a 2,5 cm; possui espaço 1,5 (entrelinhas); fonte Arial, tamanho 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no corpo (meio) do texto, não como anexos.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.