



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**Efeito Do Exercício Físico Sobre A Sepse Induzida Por
Acinetobacter baumannii em Camundongos**

Autor: Rafael de Werk

Orientador: Dr. Octávio L. Franco

Co-orientadora: Dra. Danieli F. Buccini

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Setembro - 2024

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Efeito Do Exercício Físico Sobre A Sepse Induzida
Por *Acinetobacter baumannii***

Autor: Rafael de Werk

Orientador: Dr. Octávio L. Franco

Co-orientadora: Dra. Danieli F. Buccini

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia”

CAMPO GRANDE
Mato Grosso do Sul
Setembro - 2024

W484e Werk, Rafael de
Efeito do exercício físico sobre a sepse induzida
por *Acinetobacter baumannii* em camundongos/ Rafael
de Werk sob orientação do Prof. Dr. Octávio L. Franco
e Profa. Dra. Danieli F. Buccini.-- Campo Grande, MS
: 2024. 53 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2024
Bibliografia: p. 5

1. Exercicio fisico. 2. Sepse. 3. Inflamatório. 4.
SobrevidaI.Franco, Octávio Luiz. III.Buccini, Danieli
Fernanda. III. Titulo.

CDD: 579.3

“EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A SEPSE INDUZIDA POR ACINETOBACTER BAUMANNII EM CAMUNDONGOS”

Autor: RAFAEL DE WERK

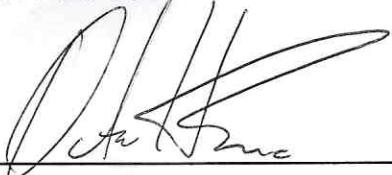
Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Profa. Dra. Danieli F. Buccini

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 13 de setembro de 2024.



Dr. Octávio Luiz Franco (Orientador) - UCDB

Dra. Danieli F. Buccini (Coorientadora) - UCDB

Dr. Samuel da Silva Aguiar – UCB

Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB

Dedico este trabalho ao meu filho Paulo Ricardo Lima de Werk.

AGRADECIMENTOS

Hoje após ter a oportunidade de executar um projeto de pesquisa acadêmica deixo meus sinceros agradecimentos.

A Deus, pelo milagre da vida, por ter colocado nesse caminho pessoas como os Médicos Dr. Marcelo Vilas Boas, Dr. Paulo Kadri, Dr. Luiz Cláudio Sorrilha, Dr Amauri de Oliveira, Dra Kênia Ádila Rodrigues Curvelo Muassab por todo o profissionalismo, atenção e carinho que tiveram comigo.

Pelas tentativas em vão em realizar a pós-graduação em outros programas de pós-graduação, sequer deixaram-me realizar a seleção. Hoje, tenho a certeza que pude apreender com os melhores pesquisadores do mundo.

Ao meu orientador Dr. Octávio Luiz Franco pela oportunidade, confiança em orientar um desconhecido. Por suas ricas aulas, as quais pudera sintetizar anos de prática em minutos de aulas. E pela dedicação a formação de pessoas.

A minha orientadora Dra. Danieli Fernanda Buccini, ser a primeira pessoa, antes mesmo de mim, a incentivar a realizar executar um projeto fora de objeto de estudo. Sem sua experiência com pesquisa em modelo animal seria inviável a execução deste projeto.

Aos docentes - Aline Castro, Ludovico Migliolo e Susana Elisa Moreno – colegas do grupo de pesquisa Ana Paula Ferreira Leal, Izabella de Souza Carchedi, Cauã Almeida Venâncio, Eduardo Costa Mendes Alves, Julia Morales, Raylla Gabrielly Monteiro Rodrigues, Valentina Nieto - técnicas do laboratório - Lorena, Nathalia Almeida e Natália Cunha - e a secretária Luciana Fukuhara Barbosa.

A minha Esposa Paola Medeiros de Lima por ter passado tudo isso junto comigo. Aos meus pais Elida de Werk e Ricardo de Werk por estarem sempre presentes na minha vida, e pelo apoio para concluir essa pós-graduação. Ao meu irmão Ricardo de Werk Filho por ajudar a conciliar outras atividades com a pós-graduação.

A FUNDECT Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pelo suporte financeiro através de bolsa de estudo.

A Universidade Católica Dom Bosco.

BIOGRAFIA

Rafael de Werk, filho de Elida de Werk e Ricardo de Werk. Nasceu em Campo Grande MS, no dia 01 de setembro de 1986. Bacharel em Educação física pela Universidade para o desenvolvimento do estado e da região do Pantanal, 2009. Atualmente é Servidor Público do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis em Mato Grosso do Sul.

RESUMO

WERK, RAFAEL D. **Efeito do exercício físico sobre a sepse induzida por *Acinetobacter baumannii*.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2024.

As infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos são um problema que afetam a saúde de milhões de pessoas no mundo todo. Dentre as bactérias causadoras de doenças, *Acinetobacter baumanii* vem se tornando um patógeno cada vez mais desafiador ao apresentar vários mecanismos de resistência à antibióticos. A aspiração da bactéria contamina os alvéolos nos pulmões, que permite o acesso do microrganismo a circulação sanguínea, causando a sepse. A resposta inflamatória causada na sepse, aumenta a expressão das citocinas pró-inflamatórias que em altas concentrações alteram a perfusão, diminuindo o oxigênio nos tecidos, induzindo a apoptose. O exercício físico, por sua vez, pode ter a capacidade de modular o recrutamento das células e citocinas na atividade inflamatória, podendo ser um forte aliado na diminuição dos danos causados durante uma sepse. Portanto, este estudo teve o objetivo de investigar se o exercício físico é capaz de reduzir os efeitos deletérios em camundongos submetidos a sepse por *Acinetobacter baumannii*. Para isso, foi desenvolvida a padronização do exercício, da sepse e posteriormente o ensaio de sobrevida. Neste ensaio os animais que realizaram a natação tiveram maiores concentrações de lactato em relação ao grupo controle. Verificou-se que o treinamento de 21 dias de natação proporcionou melhora na aptidão física dos animais que realizaram treinamento com sobrecarga, dado que os animais suportaram maiores incrementos de peso e por um tempo maior de atividade. Entretanto, este treinamento não alterou a quantidade basal de leucócitos e das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. Ao avaliar o efeito do exercício físico sobre a sepse, identificou-se que os animais que realizaram exercício físico no limiar anaeróbico e acima do limiar anaeróbico tiveram um aumento 17% na sobrevida frente ao grupo controle. Em suma o treinamento realizado com incremento de peso corpóreo aumentou a sobrevida dos animais submetidos a sepse por *A. baumannii*, ainda que não tenha alterado significativamente as concentrações basais de leucócitos e citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Exercício físico, sepse, inflamatório, sobrevida.

ABSTRACT

WERK, RAFAEL DE. **Effect of physical exercise on sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2024.

Infections caused by antimicrobial-resistant bacteria are a problem that affects the health of millions of people around the world. Among the various disease-causing bacteria, *Acinetobacter baumanii* has become an increasingly challenging pathogen as it presents several mechanisms of resistance to antibiotics. The aspiration of the bacteria contaminates the alveoli in the lungs, which allows the microorganism access to the bloodstream, causing sepsis. The inflammatory response caused by sepsis increases the expression of inflammatory cytokines, which in high concentrations alter perfusion, decreasing oxygen in tissues and inducing apoptosis. Physical exercise, in turn, may modulate the recruitment of cells and cytokines in inflammatory activity and may be a strong ally in reducing the damage caused during sepsis. Therefore, this study aimed to investigate the effect of different intensities of physical exercise on the survival of mice subjected to sepsis due to *A. baumannii*. To this end, the standardization of exercise, sepsis, and survival assay was developed. In this test, the animals that performed swimming had higher lactate concentrations compared to the control group. It was found that the 21-day swimming training improved the physical fitness of the animals, as the animals supported greater, more significant weight increases and for a longer, more extended period of activity. However, such training did not change the basal number of leukocytes and inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α . When evaluating the effect of physical exercise on sepsis, it was identified that animals that performed physical exercise at the anaerobic and anaerobic threshold had a 17% increase in survival compared to the control group. Therefore, the training increased the survival of animals subjected to sepsis due to *A. baumannii*, although it did not significantly change the basal concentrations of immune cells and inflammatory cytokines.

Keywords: Physical exercise, sepsis, inflammatory, survival.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	121
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Infecções bacterianas	13
1.2. Patógenos bacterianos	15
1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	17
1.4. SEPSE	19
1.5. Exercício físico	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos específicos.....	25
2.1.1. Padronizar um modelo de exercício físico de natação para camundongos.....	25
2.1.2. Verificar o efeito agudo do exercício físico na quantidade de leucócitos, linfócitos monócitos e neutrófilos circulantes.	25
2.1.3. Verificar o efeito agudo do exercício físico na expressão das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α.	25
2.2. Padronizar um modelo de sepse por <i>Acinetobacter baumannii</i> em camundongos.....	25
2.2.1. Padronizar o crescimento bacteriano de uma cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i>, de um isolado clínico.	25
2.2.2. Determinar uma concentração bacteriana capaz de diminuir a sobrevida dos animais de 50 a 80%.	25
2.3. Verificar se um treinamento de 21 dias aumenta a sobrevida dos animais submetidos a sepse.....	25

2.3.1. Constatar se um treinamento de 21 dias é capaz de alterar as quantidades de leucócitos, linfócitos monócitos, neutrófilos circulantes.....	25
2.3.2. Verificar se um treinamento de 21 dias altera as concentrações basais de citocinas IL-1, IL-6 e IL-10.....	25
2.4. Conferir os parâmetros imunológicos dos animais sobreviventes.....	25
2.4.1. Averiguar a quantidade de leucócitos, linfócitos monócitos, neutrófilos circulantes dos animais sobreviventes.....	25
2.4.2. Verificar as quantidades de citocinas dos animais sobreviventes IL-1, IL-6 e IL-10.....	25
3. METODOLOGIA	25
2.1. Animais experimentais	26
2.2. Padronização do treinamento em camundongos	27
2.2.1. Adaptação	27
2.2.2. Avaliação física	27
2.2.2.1. Mensuração de lactato	28
2.2.3. Treinamento	28
2.3. Eutanásia	29
2.4. Análise sanguínea	29
2.4.1. Contagem de células imunológicas	29
2.4.2. Dosagem de citocina	30
2.5. Padronização da curva de sobrevida	30
2.5.1. Padronização do crescimento bacteriano	30
2.5.2. Determinação de concentração bacteriana	31
2.6. Treinamento de natação e sobrevida em camundongos após infecção por <i>A. baumannii</i>	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	51
6. REFERÊNCIA	52

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1:	16
Figura 2	26
Figura 3.	29
Figura 4:	31
Figura 5.	34
Figura 6:	36
Figura 7:	38
Figura 8:	39
Figura 9:	41
Figura 10:	42
Figura 11:	43
Figura 12:	45
Figura 13:	46
Figura 14:	47
Figura 15:	48
Figura 16:	49
Figura 17.	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções bacterianas

As infecções bacterianas consistem em um problema de saúde pública global, impactando milhões de pessoas anualmente. Estima-se que ocorre cerca de 136 milhões de infecções associadas a bactérias resistentes em todo o mundo, sendo 4 milhões de casos no Brasil (Balasubramanian *et al.*, 2023). Define-se a infecção bacteriana pela presença de inflamação ou disfunção sistêmica, juntamente com evidências direta (cultura de bactérias positiva) ou indireta (marcadores inflamatórios ou resposta ao tratamento antibiótico) de um patógeno bacteriano compatível (Boyles e Wasserman, 2015). Esses critérios são essenciais para diferenciar infecções bacterianas de outras condições médicas que possam apresentar sintomas semelhantes, como infecções virais (Suranadi *et al.*, 2022).

A alta prevalência de infecções bacterianas ocorre porque, existem bactérias resistentes em praticamente todos os meios: ar, água, solo e até no corpo humano, permitindo que infecte o hospedeiro de diversas formas que vão desde a ingestão de alimentos contaminados (Martinson; Walk, 2020), até o contato com o patógeno em ambiente hospitalar (Aston *et al.*, 2024). A contaminação do alimento chama a atenção, pois pode ser encontrados microrganismos resistentes como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*, desde sua produção (Ababneh, Rousan, Jaradat, 2022) até sua disponibilização em mercados locais (Hassani, *et al.* 2022). Tais descobertas destacam a importância de rigorosos controles de qualidade na produção e distribuição dos alimentos. Ambientes recreativos, como piscinas em unidades de saúde, lares residenciais, alojamentos, hotéis, campings, pensões, condomínios e piscinas de uso público, também podem ser reservatórios de bactérias com genes de resistência, o que pode ser preocupante devido a exposição a várias pessoas simultaneamente, sendo um risco à saúde pública (Schiavano *et al.*, 2017). O ambiente hospitalar é um clássico reservatório de bactérias resistentes a antibióticos, em virtude de ser o local onde as infecções são tratadas, todavia bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* em unidade de

terapia intensiva põe em risco a vida dos pacientes (Aston *et al.*, 2024). A contaminação por bactérias resistentes também é um problema em sistemas de saneamento, sendo possível verificar a presença de bactérias como a *Escherichia coli* com genes de resistência a antibióticos em amostras de águas residuais de hospitais e estações de tratamento (Tettey *et al.*, 2024).

Haja vista que as bactérias estão disponíveis em vários ambientes, o processo infeccioso se inicia a partir da colonização do patógeno em algum tecido. A pele ao ser ferida por arranhões, perfurações, mordidas de insetos ou formigas, ou queimaduras causadas pela exposição ao sol, permitem que os patógenos entrem e causem uma dermatite (Aljamali, Zubaidy e Enad, 2021). Contudo, em alguns casos a lesão não se restringe a pele e atinge os ossos. Fissuras no osso ou mesmo pinos cirúrgicos contaminados por bactérias resistentes a antimicrobiano, possibilitam o acesso aos canalículos ósseos (De Mesy Bentley *et al.*, 2017), que conduzem o patógeno até os fibroblastos, sendo uma infecção muito difícil de combater (Yang *et al.*, 2018). Entretanto, o acesso ao organismo não ocorre apenas por lesões. A transmissão pode ocorrer por gotículas contaminadas com bactérias, expelidas por pessoas infectadas, que quando inaladas infectam as vias aéreas. À medida que a infecção se prolifera, a bactéria alcança os alvéolos nos pulmões, que são estruturas altamente vascularizadas, permitindo que o patógeno acesse a corrente sanguínea quando contaminados (Kumar, 2020). Quando o intestino é infectado, ocorre uma perturbação na relação simbiótica dos micro-organismos, enfraquecendo o sistema imunológico, tornando-o incapaz de controlar os micro-organismos patogênicos. Como resultado observa-se hiperpermeabilidade intestinal, uma condição em que a barreira intestinal se torna excessivamente permeável. A falha na barreira permite que bactérias e outras toxinas saiam do intestino delgado e entrem na corrente sanguínea (Fay, Ford, Coopersmith, 2017).

Ressalta-se que o processo infeccioso não se restringe apenas aos microrganismos externos. As bactérias residentes no intestino delgado ao entrarem em contato com a região periuretral, infectam a uretra podendo ascender à bexiga até alcançar os rins (Flores-Mireles *et al.*, 2015), onde conseguem acesso à circulação sanguínea. Ou seja, qualquer microrganismo, interno ou externo pode provocar infecção (Srivastava e Singh, 2024). Para

reverter o quadro infeccioso são utilizados antibióticos, os quais possibilitam erradicar ou inibir a proliferação bacteriana. No entanto, o uso excessivo e inadequado de antibióticos tem proporcionado a seleção de bactérias resistentes, inviabilizando o tratamento e promovendo um aumento significativo na taxa de mortalidade (Baran, Kwiatkowska, Kwiatkowska, 2023). A resistência bacteriana aos antibióticos consiste em um dos maiores desafios enfrentados pela medicina moderna, exigindo esforços coordenados para melhorar o uso de antibióticos e desenvolver novas estratégias terapêuticas (Muteeb *et al.*, 2023).

1.2. Patógenos bacterianos

Na literatura acadêmica são encontradas diversas classificações para caracterizar as bactérias, contudo dois grupos se sobressaem: as bactérias Gram-negativas e as bactérias Gram-positivas. Esta classificação leva o nome do pesquisador, Hans Christian Gram, que em 1884, provou que era possível distinguir as características bioquímicas da membrana das bactérias por meio de aplicação de contrates (Megrian *et al.*, 2020). Observando a figura 1A, percebe-se que a membrana da bactéria Gram-negativa é composta por 3 camadas, a primeira camada da membrana interna separa o citoplasma, enquanto segunda é composta por um peptidoglicano e a terceira camada, mais externa, é composta por uma bicamada assimétrica com um fosfolipídeo no folheto interno e o lipopolissacarídeo (LPS) no folheto externo. Quando coradas, as bactérias Gram-negativas adquirem a cor rosa (Fivenson *et al.*, 2023). Por sua vez, a membrana das bactérias Gram-negativas, observada na figura 1B é mais simples, pois não possui a membrana externa. Adicionalmente, a camada do peptidoglicano é mais espessa e reticulada, quando corada apresentam a cor azul (Fischetti, 2019).

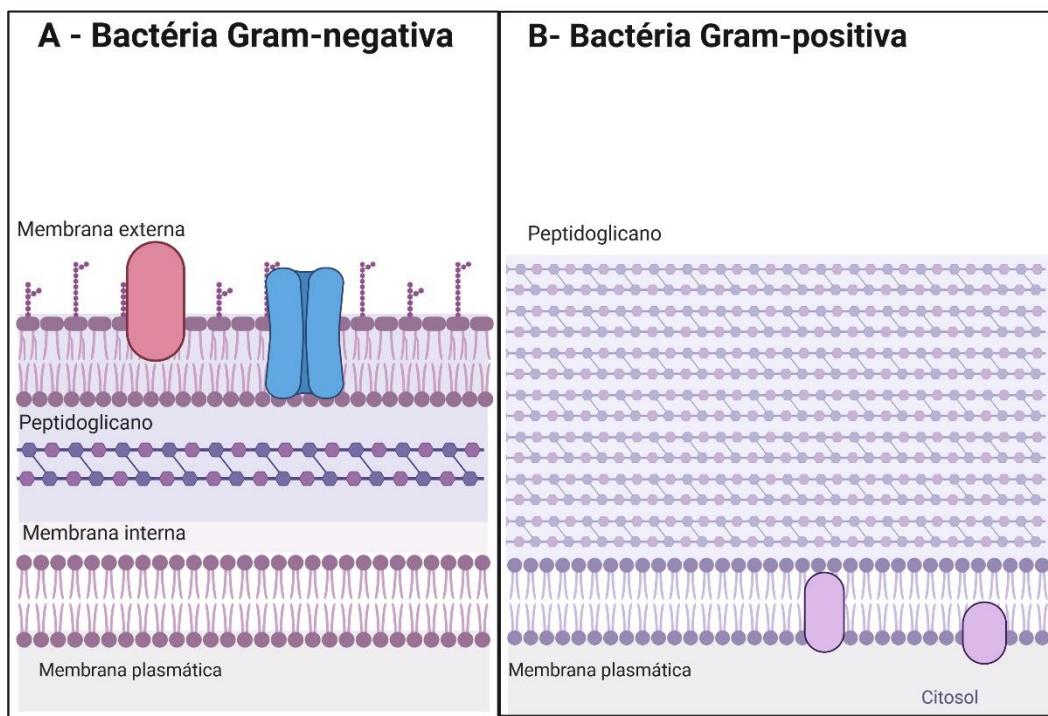


Figura 1: Representação sobre as diferenças da membrana das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A Membrana da bactéria Gram-negativa. B Membrana da bactéria Gram-positiva. Adaptado de “Gram-Negative Bacteria Cell Wall” e “Gram-Positive B

Dentre as várias bactérias classificadas como Gram-positivas e negativas, destaca-se um grupo particularmente preocupante, devido à sua resistência a múltiplos medicamentos: o grupo ESCAPE. Este grupo é de grande importância porque as infecções causadas por essas bactérias são extremamente difíceis de tratar, resultando em tratamentos mais longos e frequentemente menos eficazes. Essas infecções apresentam alta mortalidade e morbidade, especialmente em pacientes vulneráveis, como os hospitalizados e imunocomprometidos. Além disso, aumentam significativamente os custos de saúde e exigem rigorosas medidas de controle de infecções. A alta quantidades de mecanismos de resistência destaca a necessidade urgente de desenvolver novos antibióticos e tratamentos alternativos. A propagação global dessas bactérias representa um desafio internacional para a saúde pública, tornando-as o foco principal de pesquisa e vigilância (Miller e Arias, 2024). Entre os patógenos Gram-positivos, destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecium*. Entre os patógenos Gram-negativos, destacam-se *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter spp.*, todos notáveis por estarem presentes no organismo humano e por sua relevância no grupo ESCAPE.

1.3. *Acinetobacter baumannii*

O termo *Acinetobacter haemolyticus sp. nov.* consiste em uma homenagem aos seus descobridores Linda e Paul Baumann (Bouvet; Grimont, 1986), que conseguiram distinguir o patógeno após comparar uma série de propriedades nutricionais e bioquímicas de aproximadamente 100 cepas de moraxelas oxidase negativa (Baumann; Doudoroff; Stanier, 1968). Caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, aeróbica e não fermentadora, a *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) pode ser encontrada em diferentes habitats como água e solo (KarampatakiS; Tsergouli; Behzadi, 2024), bem como fontes alimentares, como carne e vegetais, animais de fazenda, inclusive animais domésticos, razão pela qual é muito conhecida nas clínicas veterinárias (Ahuatzin-Flores; Torres; Chávez-Bravo, 2024).

A capacidade de se adaptar em diversas condições e organismos torna *A. baumannii* altamente patogênica, sendo o microrganismo responsável por causar manifestações clínicas como: infecções urinárias, infecções de pele, fasciítés necrosante, meningite, osteomielite, endocardite e sepse (Arrigoni *et al.*, 2023). Contudo, o maior perigo reside nas infecções adquiridas em ambiente hospitalar.

A *A. baumannii* é um microrganismo formador de biofilme, que além de ser um mecanismo de resistências, permite a adesão do micróbio em superfícies não orgânicas, como plástico (Gaddy, Tomaras, Actis, 2009). Dessa maneira, a formação de biofilme mecanismo é crucial nas contaminações hospitalares, pois permite o microrganismo contaminar aparelhos de respiração mecânica que, na maioria das vezes, infecta pessoas em condições de saúde já comprometida na expressão de um forte mecanismo de resistência (Duan *et al.*, 2024).

Na fisiopatologia de *A. baumannii*, a *outer membrane proteins A* (OmpA) é a principal proteína envolvida no processo infeccioso, atuando de múltiplas maneiras. A OmpA participa do processo de adesão às células epiteliais, contribuindo para a virulência da bactéria (Choi *et al.*, 2008). Quando

encapsulada em vesículas, OmpA tem ação no meio extracelular. A vesícula permite a molécula atravessar a membrana das células e se inserir na mitocôndria, provocando a fragmentação mitocondrial e consequentemente o processo de apoptose (Tiku, 2022).

No tratamento de *A. baumannii* são utilizadas diversas classes de antibióticos como as fluoroquinolonas (Geisinger et al., 2019), macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (Martínez-Trejo et al., 2022), β-lactâmicos (Djahmi et al., 2014, Sethuvel et al., 2023) e polimixinas (Mohapatra, Dwibedy, Padhy, 2021). As fluoroquinolonas são medicamentos que visam impedir a síntese de DNA na bactéria, ligando-se às enzimas DNA girase tipo II e topoisomerase IV. Impedindo o processo de replicação do seu DNA (Geisinger et al., 2019). Os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B atuam no ribossomo da bactéria. Por sua capacidade de se ligar à subunidade ribossômica 50S, bloqueia a síntese de proteínas da bactéria inibindo a síntese de proteínas essenciais para seu funcionamento (Martínez-Trejo et al., 2022). Os antibióticos β-lactâmicos são moléculas, as quais se ligam às enzimas envolvidas na síntese da parede celular, no momento em que ocorre a ligação da molécula a enzima fica impedida de promover o processo de crescimento da membrana, provocando a lise da bactéria (Sethuvel et al., 2023). A classe das polimixinas atua principalmente na membrana externa da bacteriana, ao se ligar nos lipídios da membrana, perturba a sua integridade, provocando a lise da membrana, sendo considerado, portanto, como bactericida (Mohapatra, Dwibedy, Padhy, 2021).

No entanto, a *A. baumannii* possui diversos mecanismos de resistência incluindo bombas de efluxo modificação dos alvos dos antibióticos, alteração de proteínas ligantes a penicilina, metilação do RNA ribossômico, aquisição de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons (Tiku, 2022). O que torna o tratamento um desafio. O processo de extrusão de compostos é realizado por proteínas acopladas na membrana da bactéria. As proteínas são diferenciadas de acordo com as moléculas que interagem, por exemplo as proteínas AdeABC atuam em β-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, linamidas, cloranfenicol, aminoglicosídeos, enquanto o sistema AdeFGH é ativo em cloranfenicol e o sistema AdeIJK age sobre β-lactâmicos,

cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, linamidas, fluoroquinolonas, ácido fusídico, rifampicina e outros (Xu, Bilya, Xu, 2019). Até mesmo a proteína OmpA participa da extrusão de compostos do espaço (Smani *et al.*, 2013). Além de realizar a extrusão de compostos, existem cepas de *A. baumannii* produtores de enzimas inativadoras de antibióticos. As enzimas OXA-23, OXA-24/40 e OXA-58 hidrolisam carbapenêmicos, enquanto as metalo-β-lactamases, codificadas pelo Verona Integron, conferem resistência aos carbapenêmicos e β-lactâmicos. A enzima *New Delhi* metallo-β-lactamase pode hidrolisar quase todos os β-lactâmicos, exceto o monobactamicos (Djahmi *et al.*, 2014). Outro mecanismo de resistência a antimicrobianos é a capacidade da bactéria em modificar os alvos de ligação dos antibióticos. Alterações estruturais nas enzimas que sintetizam a parede celular impedem que a penicilina interaja com a enzima, tornando-a incapaz de impedir a síntese da parede celular (Sethuvel *et al.*, 2023). *A. baumannii* também é capaz de promover modificação pós-transcricional no RNA ribossômico através de metilação ou dimetilação no grupo funcional 50S, o que permite inativar o macrolídeo ou alterar o local de ligação (Martínez-Trejo *et al.*, 2022). Vale ressaltar que a literatura destaca a necessidade de não limitar o controle de infecções apenas ao uso de antibióticos. Devendo ser providenciadas medidas adicionais, como a triagem precoce dos patógenos, o aprimoramento da desinfecção das instalações e os processos de descolonização dos pacientes colonizados por bactérias resistentes, para o controle eficaz das infecções hospitalares (Ji, Ye, 2024).

1.4. SEPSE

O *Global Burden of Disease* consiste em um banco de dados que quantifica o impacto das doenças no mundo, Rudd et. al. (2020) avaliaram 109 milhões de dados do *Global Burden of Disease* e identificaram que a sepse tem sido responsável pelo óbito de 21 milhões de pessoas, em outras palavras, 1 em cada 5 mortes são causadas por sepse.

A sepse é uma designação médica, a qual nomina uma infecção sistêmica grave, que pode evoluir para uma síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e choque séptico (Berman-Riu *et al.*, 2024). O diagnóstico clínico da sepse prescinde de apresentação de 2 ou mais sintomas: febres, fraqueza muscular,

alterações na pressão arterial, aumento na frequência cardíaca respiratória, atividade mental alterada leucocitose ou leucopenia. (Singer, Deutschman, Seymour, 2016; Zhang e Ning, 2021). O prognóstico da sepse se agrava quando atinge pessoas idosas (Starr e Saito, 2014), obesas (Eng *et al.*, 2024), com doenças crônicas cardíacas, renais, sedentarismo, e até a demora na caracterização da doença pode ser um fator que afeta negativamente o prognóstico (Niederman *et al.*, 2021).

A obesidade pode ser considerada outro fator que modifica a atividade imunológica, pois o acúmulo excessivo e aumentado de adipócitos atrai a agregação de macrófagos, promovendo a inflamação, que resulta em desregulação imunológica e inflamação sistêmica crônica (Eng *et al.*, 2024).

Estudos mostram que praticantes de caminhada têm maiores chances de sobrevida, visto que o sedentarismo está associado a doenças crônicas e aumenta a atividade inflamatória no sistema imunológico (Stattin *et al.*, 2024; Lee *et al.*, 2024). Por fim, o fator mais crítico no prognóstico da sepse é o tempo de atendimento. Devido ao fato de pacientes em choque sépticos terem que iniciar o tratamento de antibiótico imediatamente após o diagnóstico, atrasos no reconhecimento implicam em uma diminuição na efetividade do tratamento (Niederman *et al.*, 2021).

No processo infeccioso, o micrório ao interagir com os抗ígenos ou receptores celulares, capazes de realizar o reconhecimento de padrões moleculares, consequentemente ocorre o aumento da expressão de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e *Tumor Necrosis Factor- α* (Moriyama; Nishida, 2021). As citocinas IL-1 β e TNF- α promovem o recrutamento de outros macrófagos, células-T e neutrófilos (Midiri *et al.*, 2021), enquanto, a IL-6 sinaliza a atividade bacteriana (Li *et al.*, 2021). Contudo, quando o microrganismo atinge a circulação sanguínea, a resposta inflamatória é exacerbada, um estudo retrospectivo com pacientes com sepse identificou 11 citocinas alteradas durante um quadro de sepse (Matsumoto *et al.*, 2018). A IL-1 β liberada pelo macrófago durante a resposta inflamatória, estimula a produção de óxido nítrico, que tem um efeito vaso dilatador no endotélio (Chandra *et al.*, 2006). O excesso de óxido nítrico induzido pela IL-1 β , reduz o desempenho cardíaco, levando a diminuição na perfusão. Com a hipoperfusão, a entrega de oxigênio às células é reduzida,

comprometendo o metabolismo aeróbico. A diminuição do oxigênio leva à célula a realizar a fosforilação da glicose. Razão pela qual, o ácido láctico é monitorado durante a sepse. Desse modo, maiores concentrações de lactato estão associadas a quadros de sepse mais graves (Nolt *et al.*, 2018).

Para diminuir os efeitos nocivos causados pela sepse sobre o organismo, o exercício físico (EF) pode ser um forte aliado para auxiliar o organismo a prevenir a sepse de um modo mais eficiente (Nieman e Wentz, 2019). A prática regular de EF proporciona o controle de peso corpóreo prevenindo o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, diabetes e hipertensão arterial, fatores que podem agravar o paciente durante um quadro de sepse (Fang; Zhang, 2024). Diversos estudos demonstram que o EF melhora atividade inflamatória, uma vez que promove a diminuição das citocinas pró-inflamatória, promovendo um efeito protetivo em diversos tecidos do organismo (Choi *et al.*, 2024.; Shabab *et al.*, 2024.; Vermeersch *et al.*, 2024). Dessa maneira, a prática de EF promove diversas alterações fisiológicas que ajudam na redução de desenvolvimento de doenças que agravam a sepse, melhora a oxigenação no organismo e regula a atividade inflamatória, todos fatores que podem contribuir com o agravo da sepse.

1.5. Exercício físico

No cotidiano das pessoas a atividade física e o EF são termos utilizados como sinônimos, entretanto na ciência do movimento, ambos possuem características bem distintas. A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos no qual resulte em gasto energético. É exemplo de atividade física, ir ao trabalho a pé. O EF é conceituado como conjunto de atividades físicas planejadas com o objetivo de melhorar ou manter um ou mais componentes de aptidão física, tal como o levantamento de peso (Bai; Hasnimy; Li, 2024). Conhecido por desempenhar um papel fundamental no bem-estar das pessoas, o EF se subdivide em aeróbico e anaeróbico. Conhecer suas diferenças é essencial para sua aplicação na saúde.

O exercício físico aeróbico possui a característica de ser um exercício de baixa intensidade e de duração prolongada, tal como uma corrida de maratona. A produção de adenosina trifosfato (ATP) é realizada através da metabolização

dos lipídios na presença de Oxigênio (O_2). Contudo, o aumento na demanda de ATP faz com que seja absorvido mais O_2 , aumentando também as concentrações de dióxido de carbono (CO_2) acidificando o sangue. Para atender o aumento da demanda por energia, as células metabolizam os carboidratos sem a presença de O_2 , característica que define o exercício físico anaeróbico. A respiração anaeróbica permite aumentar a produção de energia, diminuindo as concentrações de CO_2 (Hogan, 2020).

Após o processo de fosforilação da glicose é emitido um subproduto, o lactato. Portanto, maiores concentrações de lactato indicam uma maior intensidade do exercício, motivo que leva o monitoramento das concentrações sanguíneas de lactato para distinguir o exercício aeróbico do anaeróbico (Li *et al.*, 2022). O *American College of Sport Medicine*, para fins de prescrição do treinamento físico, classifica o EF em 3 tipos: de baixa, média e alta intensidade (Feito *et al.*, 2021). Neste conceito a intensidade corresponde com a quantidade de energia gasta durante a execução do EF. As diferentes intensidades de exercício modulam o sistema imunológico de maneiras diferentes, inclusive em momentos (Suzukie e Hayashida, 2021). Enquanto o exercício anaeróbico proporciona uma redução na atividade inflamatória, o exercício anaeróbico promove um aumento na atividade inflamatória (Scheffer; Latini, 2020).

As alterações induzidas pelo EF na atividade inflamatória promovem alterações na quantidade de leucócitos, linfócitos e neutrófilos e na expressão das citocinas (Schlagheck *et al.*, 2020), as quais podem ser observadas tanto logo após o encerramento da atividade física (Barcellos *et. al.*, 2021), quanto vários meses após o treinamento (Nieman e Wentz, 2019). O EF pode induzir as células imunes ativadas, macrófagos, neutrófilos e células T, a mudar da fosforilação oxidativa para a glicólise aeróbica de maneira semelhante às células tumorais (Wang, Wang, Tang, 2021), pois as células mesmo na presença de oxigênio utilizam níveis mais elevados de glicose – Efeito Warburg (Potter; Newport; Morten, 2016). Existem evidências mostrando que as imunomodulações causada pelo EF não apenas diminui a expressão das citocinas inflamatórias como também reduz o estresse oxidativo, esse efeito promovendo um efeito protetivo nos tecidos cerebrais (Choi *et al.*, 2024), cardíacos (Shabab *et al.*, 2024), pulmonares (Vermeersch *et al.*, 2024),

hepáticos (Osuru *et al.*, 2023) e renais (Costanti-Nascimento *et al.*, 2023), haja visto que reduz a expressão de genes apoptóticos.

Além disso o EF pode estar associada a um menor risco de contrair uma infecção ou sepse podendo ser um meio para reduzir os riscos de sepse (Lee *et al.*, 2024; Stattin, 2024). Durante o quadro de sepse, ocorre o aumento descontrolado da atividade inflamatória e disfunções no sistema cardiovascular, neurológico, respiratório e hepático, contudo em indivíduos treinados a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo são menores (Wu *et al.*, 2022). A fim de verificar o efeito do treinamento físico intervalado em esteira, realizado 3 dias por semana durante 8 semanas sobre a sepse induzida por ligação e punção do ceco, identificou-se que camundongos não treinados tem uma sobrevida de 20%, enquanto os animais treinados 70%, ademais os treinados apresentaram maiores concentrações de superóxido dismutase e catalase, enzimas importantes no processo de controle do estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2024).

Em modelo de sepse induzida por infecção pulmonar, animais treinados tiveram menores unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pneumoniae* que os animais não treinados (Olivo *et al.*, 2014). O efeito do exercício em promover diminuição nas unidades formadoras de colônias no pulmão também se repetiu em modelos de sepse induzida por *Klebsiella pneumoniae* (Sumar *et al.* 2021). Além de promover aumento da sobrevida em indivíduos em sepse, o EF também pode modular a resposta inflamatória, em modelo de sepse por LPS, o treinamento aeróbico proporcionou aumento das concentrações da citocina IL-10 e diminuição das citocinas IL-6 e TNF- α (Wang, Wang e Tang, 2021).

O treinamento, mesmo após um período de destreino, aparentemente é capaz de reduzir a expressão de marcadores de atividade inflamatória importantes, como TNF- α , IL-1 β , bem como as concentrações séricas de Glicose frente a uma infecção induzida por LPS (Zhang *et al.*, 2024). Dessa maneira, mostra-se promissora a utilização do EF como medida para prevenir o agravo da sepse, podendo ser um forte aliado no controle a sepse, uma vez que indivíduos treinados tiveram menores concentrações de citocinas inflamatórias (Olivo *et al.*, 2014; Sumar *et al.* 2021; Wang, Wang, Tang, 2021), maiores concentrações de enzimas antioxidantes (Kim *et al.*, 2024; Olivo *et al.*, 2014; Wang, Wang e Tang,

2021), menor produção de lactato (Wang, Wang e Tang, 2021) ainda que tenha aumentado a disponibilização da glicose circulante (Wang, Wang, Tang, 2021), menor formação de colônias bacterianas (Olivo *et al.*, 2014; Sumar *et al.* 2021), resultando em uma maior sobrevida (Kim *et al.*, 2024; Sumar *et al.* 2021; Wang, Wang, Tang, 2021).

2. OBJETIVOS

Investigar se o exercício físico é capaz de reduzir os efeitos deletérios em camundongos submetidos a sepse por *Acinetobacter baumannii*.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1.** Padronizar um modelo de exercício físico de natação para camundongos.
- 2.1.2.** Verificar o efeito agudo do exercício físico na quantidade de leucócitos, linfócitos monócitos e neutrófilos circulantes.
- 2.1.3.** Verificar o efeito agudo do exercício físico na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α .
- 2.2.** Padronizar um modelo de sepse por *Acinetobacter baumannii* em camundongos.
 - 2.2.1.** Padronizar o crescimento bacteriano de uma cepa de *Acinetobacter baumannii*, de um isolado clínico.
 - 2.2.2.** Determinar uma concentração bacteriana capaz de diminuir a sobrevida dos animais de 50 a 80%.
- 2.3.** Verificar se um treinamento de 21 dias aumenta a sobrevida dos animais submetidos a sepse.
 - 2.3.1.** Constatar se um treinamento de 21 dias é capaz de alterar as quantidades de leucócitos, linfócitos monócitos, neutrófilos circulantes.
 - 2.3.2.** Verificar se um treinamento de 21 dias altera as concentrações basais de citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10.
- 2.4.** Conferir os parâmetros imunológicos dos animais sobreviventes.
 - 2.4.1.** Averiguar a quantidade de leucócitos, linfócitos monócitos, neutrófilos circulantes dos animais sobreviventes.
 - 2.4.2.** Verificar as quantidades de citocinas dos animais sobreviventes IL-1 β , IL-6 e IL-10.

3. METODOLOGIA

Para a realização do estudo proposto foram conduzidos 3 experimentos (Figura 2). O primeiro experimento foi a padronização da natação em modelo animal como forma de exercício físico, o segundo experimento foi realizado para padronizar a concentração bacteriana capaz de causar de 50 a 80% de sobrevida e o terceiro experimento foi o treinamento de natação, com novos animais, e posteriormente os animais foram desafiados com sepse por *A. baumannii*.

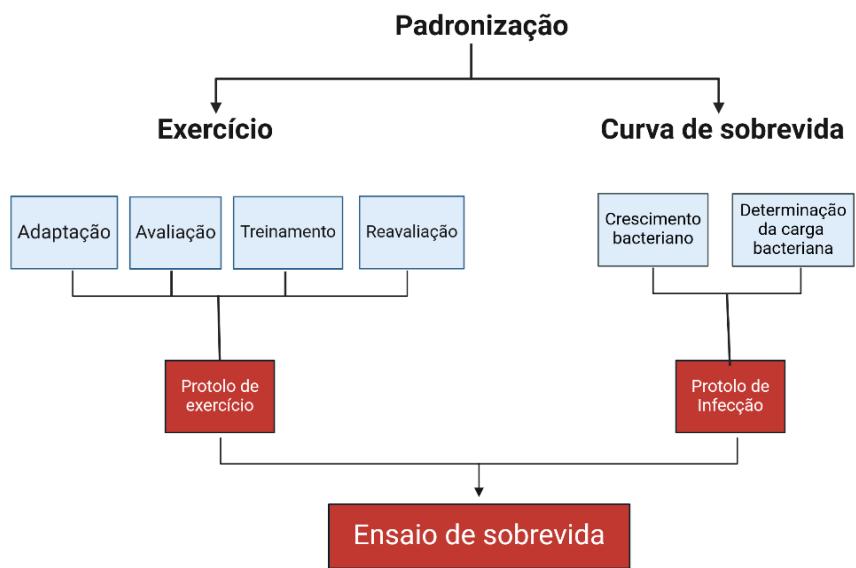


Figura 2 O fluxograma descreve os protocolos experimentais utilizados para avaliação do efeito do exercício físico sobre a sepse causada por *A. baumannii* em camundongos. A padronização do experimento foi dívida em duas etapas principais: padronização do exercício e padronização da curva de sobrevida. A seção de exercício foi composta pelos procedimentos adaptação, avaliação, treinamento e reavaliação, compondo o protocolo de exercício. Paralelamente ao exercício, a curva de sobrevida foi composta pelos procedimentos crescimento bacteriano e a determinação da carga bacteriana, conduzindo ao protocolo de infecção. Ambos os protocolos convergem para o ensaio de sobrevida, portanto, aplicação do protocolo de exercício físico, seguido pelo protocolo de infecção. “Ilustração produzida no BioRender.com”.

2.1. Animais experimentais

Nesse experimento foram utilizados 84 camundongos Swiss machos e fêmeas, com 4 semanas de idade com 22-25g, fornecidos pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, mantidos com livre acesso a água e ração padrão (Nuvilab® CR-1, Nuvital, PR, Brasil), em sala com iluminação (ciclos-claro e escuro de 12 h) e temperatura controlada (22-24°C), no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco - UCDB. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da UCDB, sob os protocolos 034/2022 e 031/2023.

2.2. Padronização do treinamento em camundongos

A primeira etapa do experimento consistiu na padronização da natação, com o objetivo de estabelecer um treinamento físico para camundongos, permitindo avaliar a aptidão física e promover o desenvolvimento físico dos animais. O ensaio teve a duração de 35 dias e foi dividido em três fases: natação, avaliação física, exercício físico e reavaliação.

2.2.1. Adaptação

Para o ensaio de adaptação foram utilizados 20 animais. O protocolo de adaptação teve uma duração de 12 dias e foi aplicado em todos os animais. Nos 3 primeiros dias, os animais foram retirados da caixa, imobilizados, contidos pelo dorso e cauda, por 3 vezes e colocados de volta a caixa (Figura 3A). Do 4º ao 6º dia, os animais foram novamente contidos e ao final do procedimento tinham a cauda levemente pressionada com auxílio de uma pinça cirúrgica. Ressalta-se que o procedimento de pressionar a cauda do animal foi inserido como uma etapa da contenção. No 7º dia, os animais foram contidos e colocados em uma piscina de 80cm de diâmetro com 2 litros de água a $30^{\circ}\pm1^{\circ}$, de modo que permitissem os camundongos encostar as patas no fundo da piscina. Do 8º até o 12º dia os camundongos foram contidos e a profundidade da piscina foi aumentada em 2 litros por dia – Figura 3B (Rodrigues *et al.*, 2017).

2.2.2. Avaliação física

Para determinar a capacidade física dos camundongos, foram escolhidos aleatoriamente 6 animais - 3 machos e 3 fêmeas. Inicialmente, foi coletado uma amostra de sangue $\sim 25\mu\text{L}$ da veia caudal, com auxílio de uma agulha 26G (13 x 0,45mm) para dosagem da concentração de lactato (Figura 3C, 1). Na sequência o animal era colocado para nadar (Figura 3C, 2). Decorridos 5 min de exercício, coletava-se outra amostra de sangue e acrescentava-se 0,5g de peso a sua cauda (Figura 1C, 3), retornando-o à piscina por mais 5 min (Figura 3C, 4). Ao término desse tempo, o animal foi retirado, coletado outra amostra de sangue e acrescentado mais 0,5g (Figura 3C, 5). Este processo se repetiu até o momento em que o animal apresentasse exaustão (Figura 3C, 6), considerando exausto quando fosse incapaz de manter as narinas acima da superfície da água por 10s (Kregel *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2018).

2.2.2.1. Mensuração de lactato.

A quantificação de lactato realizada durante a avaliação física foi determinada pelo aparelho lactímetro *Accutrend Lactate*, Roche. Para a análise, foi coletado ~25 μ L, colocados nas tiras próprias para análise e avaliadas pelo aparelho (Santos *et al.*, 2018).

2.2.3. Treinamento

Após as fases de adaptação e avaliação física, os animais foram separados em grupos para a etapa de treinamento. A modalidade de treinamento (exercício) utilizada foi a natação, aplicada conforme *Resource Book for Design of Animal exercise protocol* (Kregel *et al.*, 2006) com adaptações. O treinamento foi executado em uma piscina de PVC com 35 litros, com formato circular, medindo 80 cm de diâmetro, com profundidade de 25 cm e água mantida em $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram divididos em 4 grupos, cada um com 5 camundongos, sendo: grupo 1 – controle; grupo 2 – receberam treinamento de natação sem acréscimo de peso, grupo 3 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 1,5 g de peso corpóreo e grupo 4 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 3 g de peso corpóreo. Aos animais foram submetidos por 10 min de natação ao dia, durante 5 (cinco) dias por semana, com repouso aos finais de semana (2 dias), pelo período total de 3 (três) semanas (figura 1D). Três animais do mesmo sexo foram alojados simultaneamente na piscina, onde se impediam: o contato entre eles, subida na parede, balanço, flutuação ou mergulho (Kregel *et al.*, 2006). Ao término de cada sessão de exercício físico, os camundongos foram secos com flanela apropriada, para evitar hipotermia, observados por 30 min e mantidos em temperatura ambiente. No último dia de treinamento, os animais foram reavaliados fisicamente, por meio da análise de mensuração do lactato (figura 3C). Os demais camundongos executaram o treinamento proposto (figura 3D). Os animais foram eutanasiados após o treinamento e avaliação.

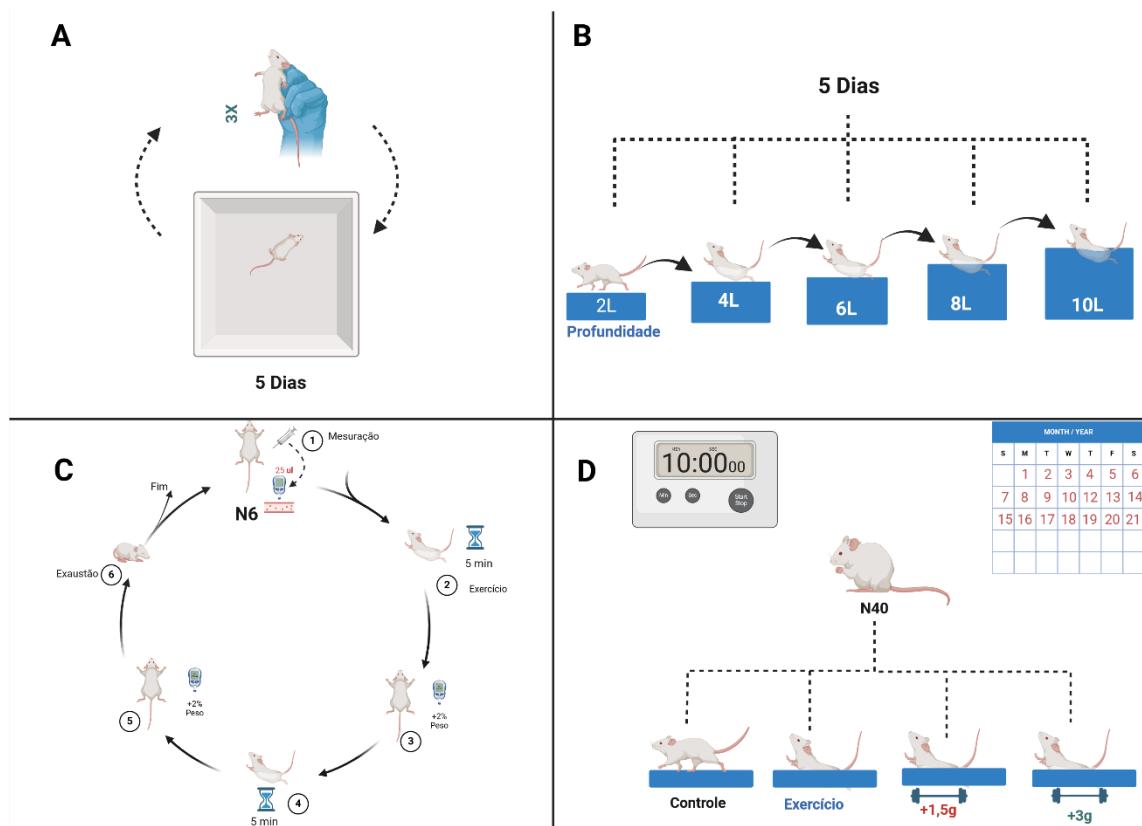


Figura 3 Representação esquemática do programa de exercício. Adaptação ao manuseio dos animais (A). Adaptação ao meio (B). Processo de Avaliação física (C). Programa de treinamento (D). “Ilustração produzida Ilustração produzida no BioRender.com”.

2.3. Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por aprofundamento de anestésico com cetamina e xilazina (150 mg. kg^{-1}) e ($7,5 \text{ mg. kg}^{-1}$), seguido de deslocamento cervical; o sangue total dos animais foi coletado pelo método cardiocentese, utilizando seringa de 1 mL e agulha 26G.

2.4. Análise sanguínea

2.4.1. Contagem de células imunológicas

O sangue foi destinado para a contagem automatizada de células sanguíneas pelo equipamento analisador hematológico URIT5160. Determinando a quantidade de células leucocitárias, linfócitos, monócitos, neutrófilos. O plasma do sangue foi armazenado para análise de citocina.

2.4.2. Dosagem de citocina

Foram quantificadas as concentrações plasmáticas das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 utilizando kit Peprotech, de acordo com instruções do fabricante, para as amostras de plasma previamente armazenadas.

2.5. Padronização da curva de sobrevida

2.5.1. Padronização do crescimento bacteriano

A cepa de *A. baumannii* utilizada nesse experimento foi adquirida de um isolado clínico. Para determinação da fase exponencial (*log*) e das unidades formadoras de colônia (UFC.mL $^{-1}$), a cepa foi cultivada em meio Mueller-Hinton ágar - MHA - (Figura 4A), por 18h, *overnight*, a 37 °C. No dia seguinte, 3 colônias distintas da bactéria foram transferidas para um tubo *falcon* de 50 mL, com Mueller-Hinton caldo (MHC) *overnight* a 37°C, com agitação de 200 rpm (Figura 4B). Posteriormente, uma alíquota de 100 µL da cultura foi adicionada a 4900 µL de MHC. A partir disso, foram realizadas leituras pontuais a cada 30 min, em espectrofotômetro (*Eppendorf BioPhotometer*) a um comprimento de onda de 600 nm (figura 4C). Estabelecida a fase *log*, determinou-se os valores de unidades das UFC.mL $^{-1}$, a partir da Densidade Óptica (DO) que correspondesse a 50% da fase *log*. Dessa forma, uma alíquota de 100 µL da cultura *overnight* foi adicionada a 4900 µL de MHC para que cada cultura pudesse atingir a DO ideal (Figura 4D). Em seguida, foi realizada uma diluição seriada, semeadas em MHA e incubados em estufa a 37°C, para posterior contagem de colônias, contadas manualmente. O valor total foi calculado pela seguinte equação:

$$N = \frac{C \times 10^D}{5 \times 10^{-2}}$$

N= Concentração bacteriana, expressa em UFC.mL $^{-1}$; C= n.^o da média de colônias por placa, D= n.^o da diluição; 5×10 $^{-2}$ mL= volume utilizado para a semeadura 50 µL (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008).

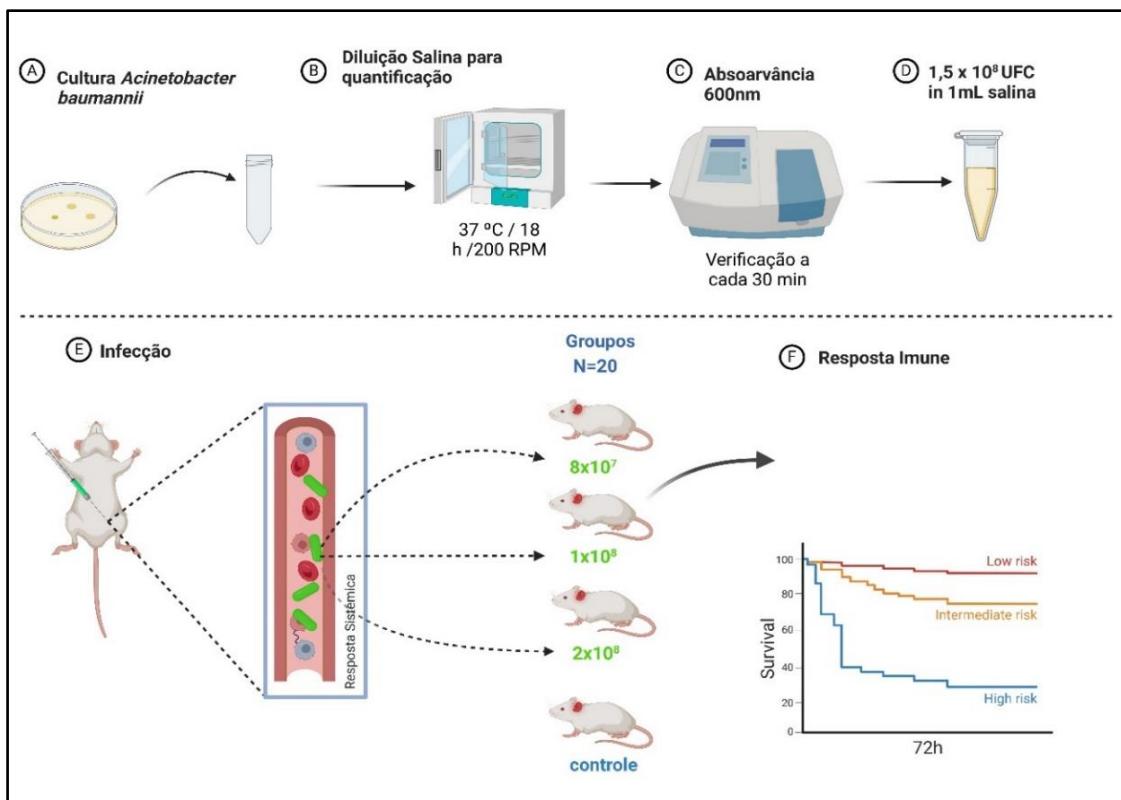


Figura 4: Representação esquemática da padronização do processo de determinação de carga bacteriana. “Ilustração produzida Ilustração produzida no BioRender.com”.

2.5.2. Determinação de concentração bacteriana

Objetivando uma sobrevida entre 50% e 80%, foi realizado experimento com 20 animais divididos em 4 grupos, 5 camundongos por grupo. Sendo, que o grupo controle recebeu uma solução fisiológica; os demais grupos receberam respectivamente uma concentração bacteriana de 8×10^7 , 1×10^8 e 2×10^8 (Figura 4E). Após a infecção, os animais foram monitorados por 5 dias (figura 2F), observando quanto a presença de dor, angústia ou estresse causado, utilizando a tabela “*A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh*” da *European Commission Expert Working Group* (Hawkins *et al.*, 2011).

2.6. Treinamento de natação e sobrevida em camundongos após infecção por *A. baumannii*

Após a etapa de padronização de concentração bacteriana foi realizado o ensaio, o qual os animais foram treinados e após o treinamento foram desafiados pela sepse por *A. baumannii*. No ensaio de sobrevida foram utilizados 40

camundongos. Para execução do treinamento foi utilizado o protocolo descrito no **2.2**. Na etapa seguinte, foram selecionados 6 animais, 2 de cada grupo que realizou exercício, aleatoriamente para a realização da avaliação física, de acordo como item **2.2.2**. Determinado o limiar anaeróbio, os animais foram submetidos ao treinamento estabelecido no protocolo **2.2.3** por 21 dias de exercício. Ao final do treinamento, os animais ficaram 48 h de repouso e após a recuperação, os camundongos (3 animais de cada grupo) foram separados para eutanásia, visando verificar se o programa de exercício físico foi capaz de alterar os parâmetros imunológicos dos animais. Vinte e quatro animais foram selecionados para participar do desafio de sepse. A infecção foi realizada por via intraperitoneal, utilizando 200 µL de solução fisiológica contendo uma concentração de 1×10^8 bactérias *A. baumannii*, concentração que resultou em uma taxa de sobrevivência de 60%. Após a infecção, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros de sofrimento (*endpoints*), conforme descrito por Hawkins *et al.* (2011). Os animais que sobreviveram após sete dias foram submetidos à eutanásia, conforme o protocolo descrito na seção 2.3, e o sangue foi coletado para análise dos parâmetros imunológicos.

2.7. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram calculadas através do programa GraphPad Prism 5. Neste programa, utilizou a análise de variância (ANOVA One Way) para comparar as diferenças entre as análises. As comparações múltiplas foram realizadas pelo pós-teste de Bonferroni. Para a comparação das médias da concentração de lactato sanguíneo, utilizou-se o *Test-T Student* para amostras independentes. Os resultados foram expressos como média ± e desvio padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de verificar o efeito do EF sobre a sepse causada por *A. baumannii* em camundongos, o trabalho foi dividido em 3 fases. A padronização do exercício e da curva de sobrevida e o desafio à sepse (figura 1). A padronização do exercício, foi subdividida em 4 etapas: adaptação ao manuseio e adaptação ao exercício, avaliação física dos animais, treinamento e reavaliação. Na segunda fase, foi realizado a padronização do crescimento da bactéria *in vitro*, a qual foi subdividida em outras 2 etapas: crescimento bacteriano *in vitro* e a curva de sobrevida. Por fim, o ensaio de sobrevida foi composto pelo treinamento dos animais com indução a sepse por *A. baumannii*.

Na primeira etapa de padronização do treino de natação, foram utilizados 20 camundongos. Após a fase de adaptação, 6 dos 20 animais foram escolhidos aleatoriamente para avaliação física. Os camundongos foram submetidos a um teste progressivo de esforço até a exaustão, mensurando a concentração de lactato periodicamente, como descrito na secção da metodologia, item 2.2.2.1, para produzir uma curva de lactato.

Na Figura 5, verifica-se que a média da concentração basal de lactato no grupo de exercício foi de $4,66 \text{ mmol.L}^{-1}$. Após 5 min de exercício, essa concentração aumentou para $6,96 \text{ mmol.L}^{-1}$, momento em que foi incrementado 0,5g de peso corpóreo. Após 10 min, a concentração de lactato subiu para $7,03 \text{ mmol.L}^{-1}$ e o peso corpóreo incrementado para 1g. Aos 15 min, a concentração de lactato subiu ligeiramente $7,05 \text{ mmol.L}^{-1}$, sendo incrementado o peso corpóreo para 1,5g de peso. Aos 20 min, com 2g de peso, a média da concentração de lactato aumentou significativamente para $11,08 \text{ mmol.L}^{-1}$ em comparação com a concentração anterior ($p<0,05$, *Test-T Student*). Neste ponto, o exercício foi interrompido devido à exaustão física dos animais. As medições subsequentes, foram realizadas após a cessação do exercício, mostraram um retorno gradual à homeostase, com a última mensuração indicando uma concentração de $6,03 \text{ mmol.L}^{-1}$. O grupo controle foi expostos à piscina com água em uma profundidade que os permitisse encostar as patas no fundo e tiveram o lactato mensurado a cada 5 min, da mesma maneira que o grupo exercício, com duração igual ao tempo de execução da avaliação física. No início do experimento, a média da concentração de lactato no grupo controle foi de

4,66 mmol.L⁻¹. Aos 20 min de avaliação, essa concentração aumentou para 6,5 mmol.L⁻¹ (Figura 5). Comparando as médias das concentrações de lactato entre o grupo controle e o grupo exercício, verifica-se que a média do grupo exercício é significativamente maior ($p<0,05$, *Test-T Student*). Portanto, os aumentos na concentração de lactato dos camundongos submetidos a natação (figura 5) indicam que o protocolo desenvolvido pode ser considerado EF na modalidade natação, visto que o grupo exercício atingiu maiores concentrações de lactato ao comparar com o grupo controle. Além disso, foi possível determinar limiar de anaeróbico aos 15 min de exercício, com o acréscimo de 1,5 g de peso corpóreo, alcançando uma concentração de 7,05 mmol.L⁻¹. O aumento nas concentrações de lactato aos 20 min de exercício foi significativamente maior do que a medição anterior ($p<0,05$, *Teste-T Student*). Aos 40 min, as médias das concentrações de lactato entre os grupos exercício e controle não apresentaram diferenças significativas.

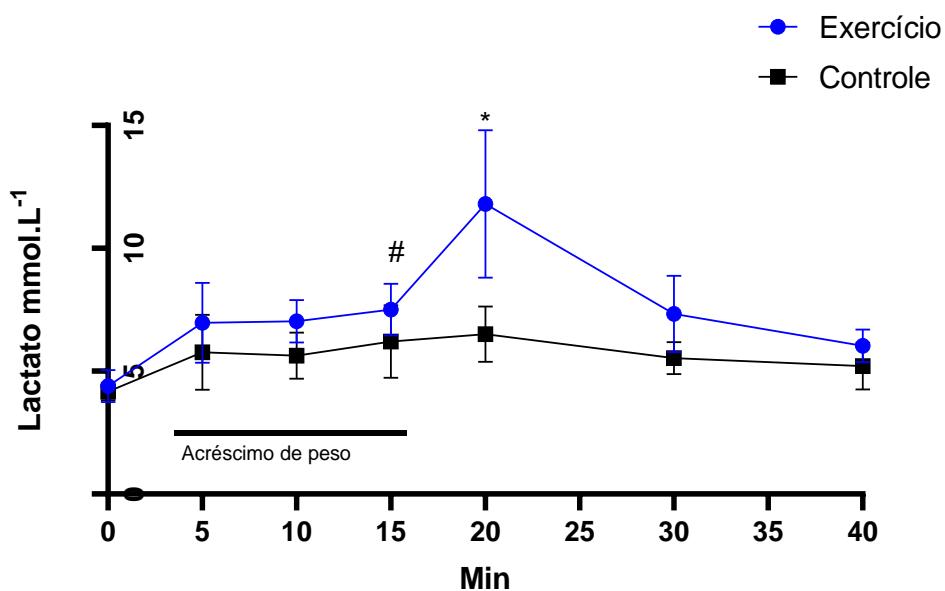


Figura 5 Curva de lactato sanguíneo dos camundongos submetidos à avaliação física relativa ao ensaio de padronização do exercício, mensurada com o uso de lactímetro (mmol.L⁻¹). A linha azul refere-se as mensurações da concentração de lactato do grupo exercício. Enquanto, a linha preta se refere mensuração de lactato dos animais do grupo controle. # Comparaçao das médias de lactato do grupo exercício $p<0,05$, *Test-T Student*. * Comparaçao das concentração de lactato entre os grupos controle e exercício, $p<0,05$, *Test-T Student*. A barra de acréscimo indica que o

primeiro acréscimo de peso ocorreu no 5º min de exercício sendo incrementado a cada 5 min até o 20º min.

A curva de lactato consiste em um instrumento que permite identificar as condições de esforço, as quais se encontram o exercício aeróbico ou anaeróbico, portanto, sendo um indicador utilizado para prescrição de um treinamento físico. Durante a aplicação de um teste progressivo de esforço são coletadas amostras de lactato sanguíneo, a cada momento em que o exercício é intensificado. Ao final do teste, os dados obtidos da concentração de lactato são plotados em um gráfico. No momento em que se é verificado um aumento significativo na concentração de lactato indica a transição do exercício aeróbico para anaeróbico. O limiar é a condição limite do exercício aeróbico (Beck *et al.*, 2014). No processo de metabolização dos carboidratos, conforme o ácido láctico é produzido, o organismo é capaz de remover a molécula, porém no limiar, a remoção de lactato se iguala a produção, porém quando aumenta a importância anaeróbica o organismo produz mais lactato do que pode remover (Orsi *et al.*, 2023).

Determinada as condições que difere cada tipo de exercício, os animais foram divididos em 4 grupos, cada um com 5 animais. Grupo 1 – controle, grupo 2 – receberam treinamento de natação sem acréscimo de peso, grupo 3 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 1,5 g de peso corpóreo e grupo 4 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 3 g de peso corpóreo. E os três últimos grupos foram submetidos a 21 dias de treinamento. No 21º dia foi realizado uma reavaliação da aptidão física com os mesmos indivíduos que realizaram a avaliação física. Os animais que não participaram da avaliação fizeram novamente uma sessão de exercício, conforme as condições estabelecidas para cada grupo.

Observa-se na figura 6 que a média da concentração basal de lactato do grupo exercício estava em $3,96 \text{ mmol.L}^{-1}$, aumentando para $4,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, aos 15 min de exercício, a média da concentração de lactato diminui para $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, em 20 min voltou a aumentar, $6,33 \text{ mmol.L}^{-1}$, 25º min teve uma ligeira redução para $6,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ no 30º min a concentração de lactato teve um pequeno aumento para $6,13 \text{ mmol.L}^{-1}$, atingindo o pico, $8,25 \text{ mmol.L}^{-1}$, em 35 min de

exercício, com acréscimo de 3,5g de peso, encerrando a avaliação física devido aos animais terem chego à exaustão.

Os dados da reavaliação demonstram que houve melhora nos indicadores de aptidão física, pois comparando com os dados da avaliação física (figura 5), todos os parâmetros tiveram alterações. As concentrações de lactato ao final da avaliação diminuíram em $3,55 \text{ mmol.L}^{-1}$, enquanto o tempo de execução de exercício aumentou em 15 min e a carga suportada aumentou 1,5g, representando um aumento de 75% tanto no tempo de execução do exercício, quanto na capacidade de suportar acréscimo de peso.

Avaliando os animais do grupo controle, percebe-se que no 30º min suas concentrações de lactato aumentaram a ponto de não ser possível distinguir do grupo exercício, aos 35 min, a concentração de lactato do grupo exercício aumentou significativamente do grupo controle, $p>0,0005$ (figura 6).

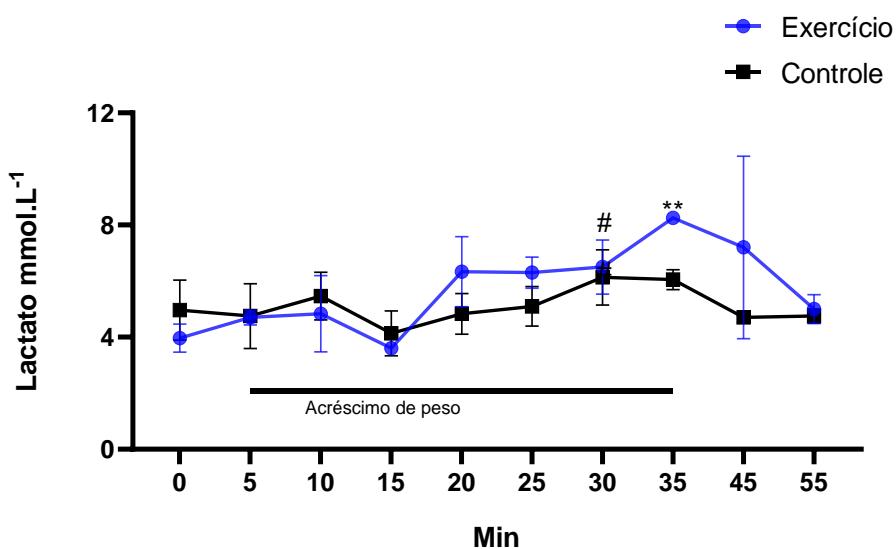


Figura 6: Curva de lactato sanguíneo dos camundongos submetidos à reavaliação física relativa ao ensaio de padronização do exercício. A linha azul refere-se as mensurações da concentração de lactato do grupo exercício. Enquanto a linha preta se refere mensuração de lactato dos animais do grupo controle. # Comparação das médias de lactato do grupo exercício $p<0,05$. ** comparação das médias entre os grupos controle e exercício $p<0,001$, *Test-T Student*. A barra de acréscimo indica que o primeiro acréscimo de peso ocorreu no 5º min de exercício, sendo incrementado a cada 5 min até o 35º min.

Gibb *et al.* (2016) treinaram um grupo de camundongos FVB/NJ em aproximadamente 75% de sua capacidade máxima durante 4 semanas.

Comparado os dados da aptidão física, pré-treinamento com pós-treinamento, constatou uma melhoria de ~1,7 vezes na distância percorrida e um aumento de ~2,4 vezes na força de trabalho dos camundongos, sendo calculada através da fórmula [calculado como o produto do peso corporal (kg) pela distância vertical (m); distância vertical = (distância percorrida) ($\sin\theta$), onde θ = o ângulo de inclinação da esteira de 0° a 15°]. Logo, os dados obtidos indicam que a exposição dos animais a piscina pode ser considerada EF, uma vez que quando os animais do grupo exercício foram considerados exaustos apresentaram maiores concentrações de lactato quando comparados com o grupo controle. Além disso, a exposição da natação com acréscimo de peso pode ser considerado um modelo de treinamento, pois, os camundongos, após executarem 21 dias de treinamento, obtiveram melhora na aptidão física, dado que os animais permaneceram mais tempo em exercício e suportaram mais acréscimo de peso.

Após a reavaliação física, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para realização de um hemograma. O exame demonstrou que a quantidade de leucócitos média do grupo 1 foi de $\sim 1,3 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, grupo 2 $\sim 1,5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, grupo 3 $\sim 2,33 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ e grupo 4 $\sim 2,823 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ (figura 7A). A comparação entre os grupos demonstra que a média de leucócitos do grupo 4 foi significativamente maior do que o grupo 1 ($p < 0,0005$) e grupo 2 ($P < 0,05$), Anova One way, pós teste *Bonferroni*. Ao avaliar a quantidade de linfócitos na figura 7B, verifica-se que o grupo 1 apresentou uma quantidade média $\sim 0,35 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, o grupo 2 $\sim 0,94 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, o grupo 3 $\sim 1,578 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ e grupo 4, $\sim 0,95 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. Comparando as variâncias entre os grupos, percebe-se que as médias do grupo 4 foi maior do que o grupo 1 e grupo 2 ($p < 0,0005$). Já o grupo 3 apresentou uma média maior do que o grupo 1, Anova One way, pós teste *Bonferroni*. A avaliação da quantidade de monócitos (figura 7C) mostra que o grupo 1 apresentou uma média de $\sim 0,05 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, o grupo 2 $\sim 0,18 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, o grupo 3 $\sim 0,15 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ e grupo 4 $\sim 0,05 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. Ao comparar as médias entre os grupos, verifica-se que o grupo 2 apresentou valores médios maiores do que o grupo 1 e grupo 4 ($p < 0,005$). O grupo 3 deve maiores concentrações de monócitos maiores, ($\sim 0,15 \times 10^9 \cdot L^{-1}$) apenas quando comparados ao grupo G1 ($p < 0,05$) Anova One way, pós teste *Bonferroni*. Por fim, ao avaliar a quantidade

de neutrófilos, observa-se que a média do grupo 1 $\sim 0,40 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, grupo 2 $\sim 0,51 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, grupo 3 $\sim 0,51 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, grupo 4 $\sim 1,75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. Comparando as médias obtidas pelo grupo 4, foi maior do que o grupo 1, grupo 2, grupo 3 ($p<0,005$), não havendo diferenças entre os demais grupos (figura-7D).

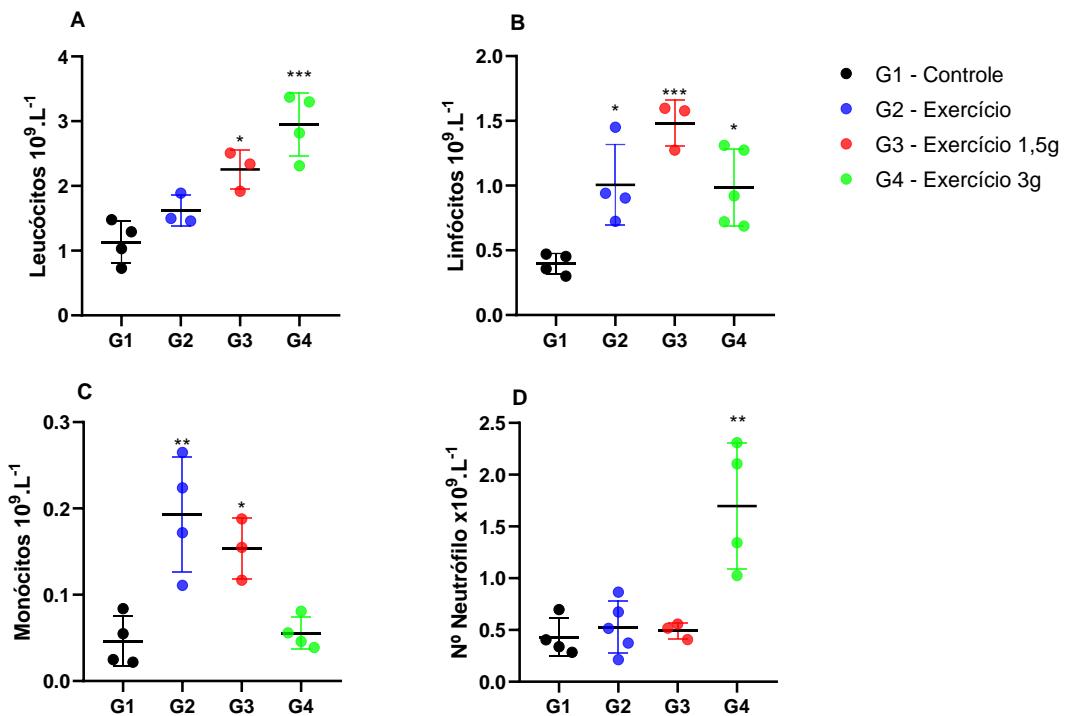


Figura 7: Painel referente a contagem de células: leucócitos - A, linfócitos - B, neutrófilos - C, monócitos, neutrófilos - D dos camundongos do grupo controle – G1; natação – G2; natação com acréscimo de 1,5g– G3; natação com acréscimo de 3g - G4, logo após o exercício. A contagem de células foi realizada de modo automatizado pelo equipamento analisador hematológico URIT5160. (* $p<0,05$, ** $p=0,005$, *** $p<0,0005$; Anova One-Way, Pós Teste Bonferroni).

O aumento da quantidade de leucócitos em camundongos após o exercício, teve um efeito similar ao que ocorre em homens adultos submetidos a um treinamento de 50 min de exercício aeróbico, $p<0,01$ (Schlagheck *et al.*, 2020). Apesar dos grupos estudados terem tempo de exposição ao EF diferente, em ambos os ensaios o EF ocasionou aumento nas quantidades de leucócitos, $p<0,0005$.

Com o objetivo de verificar a atividade das células logo após a realização do EF, avaliou-se as concentrações de citocinas das TNF- α IL-6 e IL-1 β dos animais submetidos ao ensaio de exercício físico. Os animais do grupo 1 apresentaram valores significativamente maiores, de TNF- α (601 pg.mL^{-1}), IL-6

(1295 pg.mL⁻¹) e IL-1 β (1090 pg.mL⁻¹), quando comparado aos camundongos dos grupos 2, grupo 3 e grupo 4 (figura 8).

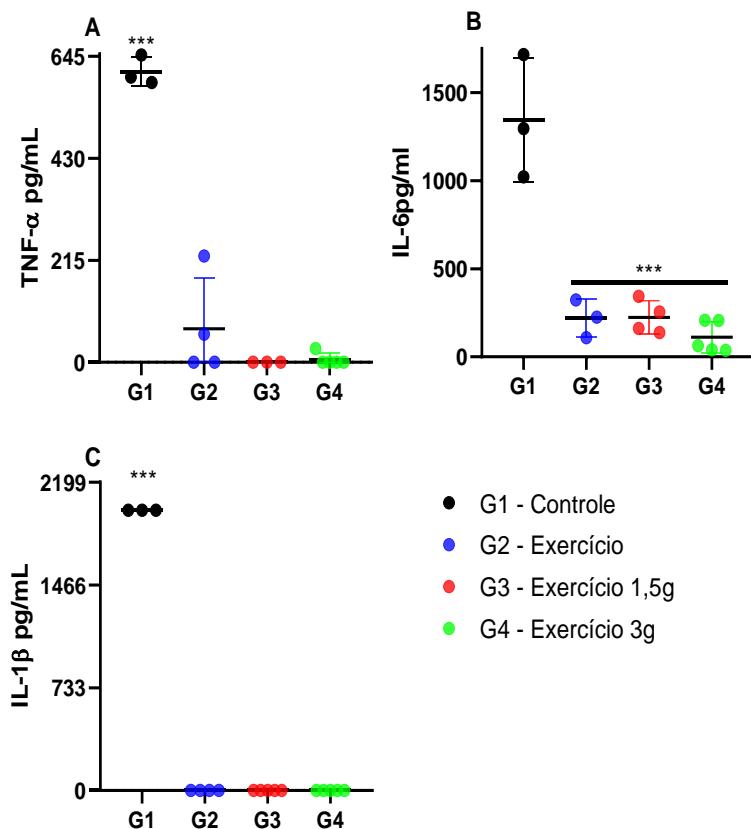


Figura 8: Avaliação das concentrações das citocinas TNF- α A, IL-6 B, IL-1 β C em ensaios *in vivo* camundongos: controle – G1; Submetidos a natação – G2; natação com acréscimo de 1,5g de peso corpóreo – G3; natação com acréscimo de 3g - G4, após 21 dias de exercício. A avaliação da expressão das citocinas foi realizada utilizando o método ELISA sanduíche, com o kit ABTS (PeproTech). A detecção de coloração foi realizada em um leitor de microplaca a 405nm com correção de comprimento de onda 650nm. *** p<0,0005; Anova One-Way, Pós Teste Bonferroni. Os valores neste experimento com valor igual a zero ficaram abaixo de nível de detecção do kit.

Diferente do que foi identificado no ensaio de citocinas, o treinamento camundongos a corrida em esteira de alta intensidade, aumentou a concentração de IL-6 2300 pg.mL⁻¹; TNF- α 8000 pg.mL⁻¹; e IL-1 β 10000 pg.mL⁻¹ (Barcellos *et al.*, 2021). Cabe ressaltar, que os valores no estudo, a análise das citocinas foi avaliada diretamente do músculo, enquanto no ensaio de exercício verificamos as citocinas do plasma.

Avaliando o comportamento das células logo após o treinamento (figura 8), percebe-se que o grupo 4 teve um aumento nos números de leucócitos e neutrófilos e uma diminuição da quantidade de monócitos em comparação ao grupo 1. Contudo, quando comparamos com a atividade de citocinas (figura 7), o grupo 1 teve maiores concentrações das citocinas inflamatórias. Portanto, esses achados sugerem que o aumento dos neutrófilos do grupo 4 não indica aumento da atividade inflamatória, podendo estar mais relacionado com a reparação dos tecidos (Park *et al.*, 2024).

Após a realização da padronização do treinamento foi realizado um ensaio para padronizar o crescimento bacteriano, pois as cepas de *A. baumannii* utilizadas nesta pesquisa são provenientes de um isolado clínico. Desta forma, foi realizada a curva de crescimento, determinaram-se as fases de exponencial (*log*) e estacionária.

Pode-se observar na figura 9 que a fase lag se encontra entre 30 e 60 min. Já a fase exponencial entre 60 e 180 min. Em 210 min, o crescimento bacteriano entra na fase estacionária. Logo, a metade da fase log ficou estabelecida em 120 min. Simultaneamente foi determinado a UFC.mL^{-1} . A seta, indica a quantidade das unidades formadoras de colônias observadas na padronização do crescimento bacteriano. Em 120 min, encontra-se o valor de unidades formadora de colônias correspondente a OD de trabalho, $9,1139 \text{ UFC.mL}^{-1}$, correspondente a 50% da fazer log.

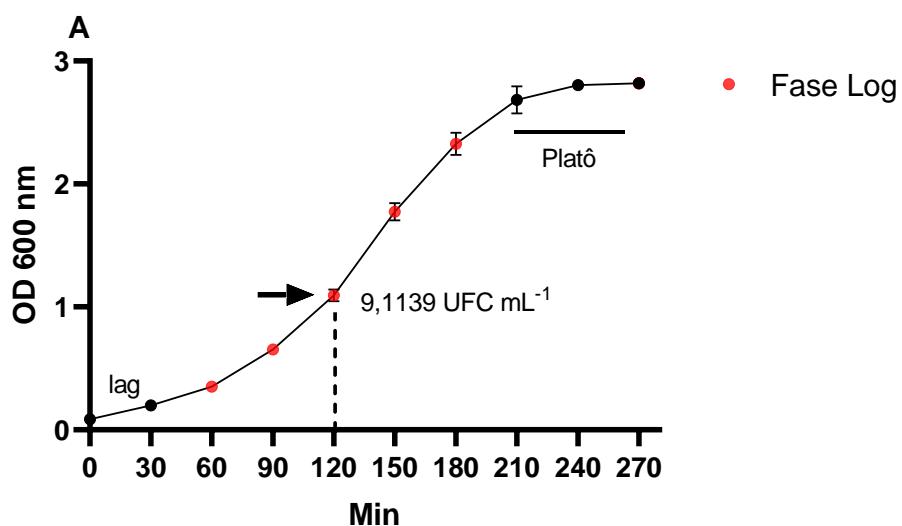


Figura 9: Padronização do crescimento bacteriano da cepa de *A. baumannii* avaliada por espectrofotômetro. A seta indicada no gráfico se refere a concentração bacteriana em UFC.mL^{-1} da metade da fase exponencial obtida após diluição seriada, semeadas em MHA e incubados em estufa a 37°C , contadas manualmente.

Realizada a etapa de padronização do crescimento bacteriano, foi realizado um ensaio de sobrevida com objetivo de estabelecer a concentração de bactérias necessárias para infectar os camundongos a sepse de modo a proporcionar uma sobrevida de 50 a 80%. Para isso, foi induzida a sepse em 4 grupos experimentais, cada grupo foi composto por 5 camundongos, dividido de acordo com a concentração bacteriana recebida. Inicialmente, foi realizado o crescimento das bactérias *in vitro* conforme padronizado no item **2.5.1**. Logo em seguida, foram preparadas 4 soluções sendo: 8×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 UFC.mL^{-1} de uma cepa de *A. baumannii* e uma solução salina. Após a infecção os animais foram monitorados por 5 dias.

Pode-se observar na figura 10 que os grupos foram tratados com diferentes concentrações de *A. baumannii*. O grupo controle, tratado com salina, mostrou uma taxa de sobrevida de 100% durante todo o período de observação. No grupo infectado com a concentração de 8×10^7 UFC.mL^{-1} , a sobrevida também permaneceu alta, 100% ao final das 120h. Os camundongos infectados com 2×10^8 UFC.mL^{-1} apresentaram uma redução na taxa de sobrevida, estabilizando em aproximadamente 80% após as primeiras 24h e mantendo-se constante até o final do experimento. No grupo com a concentração mais alta, 1×10^8 UFC.mL^{-1} , a sobrevida caiu drasticamente nas primeiras 24h, estabilizando em torno de 60% após 48h e permanecendo constante até as 120h.

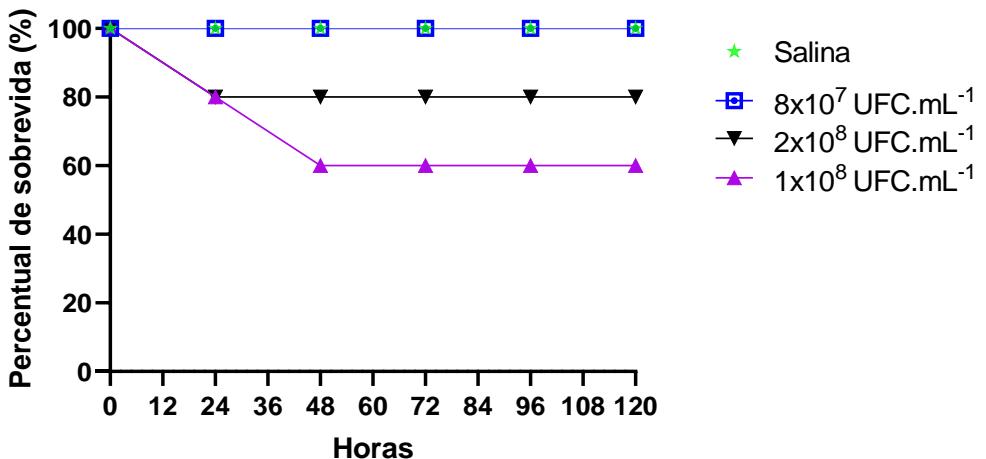


Figura 10: Avaliação da sobrevida em ensaio *in vivo* de camundongos da linhagem Swiss submetidos à sepse por *A. baumannii*, com diferentes concentrações bacterianas de 8×10^7 , 2×10^8 , 1×10^8 UFC.mL $^{-1}$

Lim *et al.* (2024), infectou camundongos Balb-c com uma solução com 1×10^8 UFC.mL $^{-1}$ de *A. baumannii*. Entretanto, após o período de 30h da infecção os animais não sobreviveram. Apesar de ter apresentado uma mortalidade maior, demonstra que a concentração utilizada é adequada para induzir camundongos de linhagens diferentes à sepse. Por fim, para verificar se o EF promove um efeito protetivo contra a sepse por *A. baumannii*, foi repetido, minunciosamente, o protocolo de treinamento de acordo com a padronização prévia, (**item 2.2**), com 40 animais. Após 21 dias de treinamento, os animais ficaram 48h de repouso e foram desafiados a sepse com uma concentração de 1×10^8 UFC.mL $^{-1}$ de *A. baumannii*.

A figura 11 mostra o resultado da avaliação física dos animais, primeira etapa do treinamento. Percebe-se que a concentração basal de lactato no grupo de exercício foi de 4,3 mmol.L $^{-1}$, aumentando para 5,6 mmol.L $^{-1}$, após 5 min de exercício. Aos 10 min, a concentração de lactato elevou-se para 5,8 mmol.L $^{-1}$, e, aos 15 min, alcançou 5,83 mmol.L $^{-1}$. Neste ponto, foi identificado o limiar anaeróbico dos animais, pois, aos 20 min de exercício com 2g de peso, a concentração de lactato aumentou significativamente para 7,8 mmol.L $^{-1}$. Nesse momento, os animais chegaram à exaustão física e a avaliação foi interrompida. As medições subsequentes foram realizadas com os animais em repouso, aos 25 min as concentrações diminuíram para 7,3 mmol.L $^{-1}$, aumentando novamente para 7,9 mmol.L $^{-1}$ no 30º min. As mensurações realizadas após os 20 min foram

afeirdas após o encerramento do exercício. Ao comparar as médias da concentração de lactato do grupo exercício com o grupo controle, verificou-se que no 20º min de manipulação dos animais, a concentração de lactato do grupo exercício foi estaticamente maior do que o grupo controle.

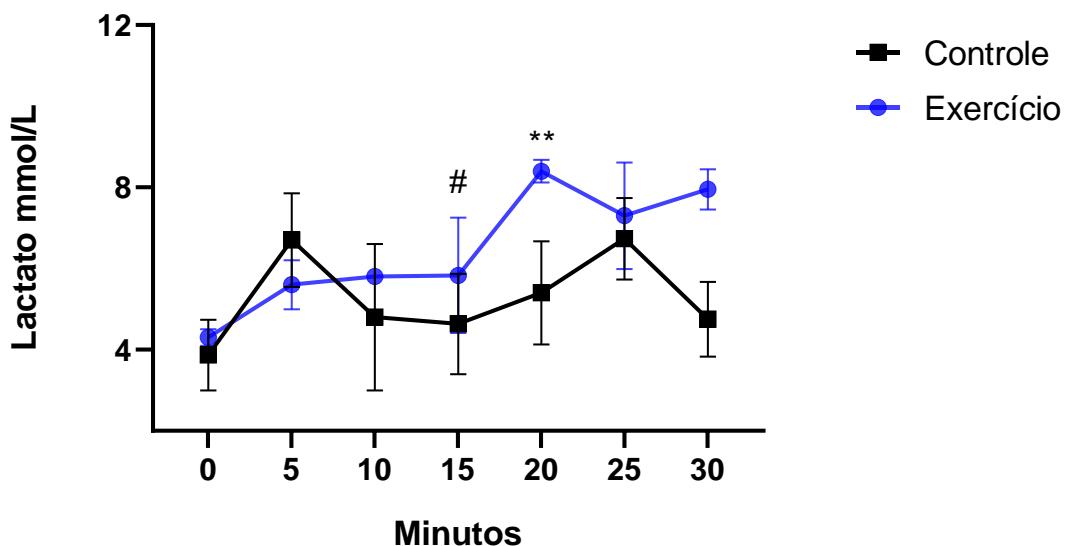


Figura 11: Curva de lactato dos camundongos submetido à avaliação física. A linha azul refere-se as mensurações da concentração de lactato sanguíneo (mmol.L^{-1}) do grupo que realizou o teste de esforço. A linha preta se refere à avaliação da contração de lactato dos animais controle. A concentração do lactato foi mensurada com o uso de lactímetro. # comparação das médias da concentração lactato do grupo exercício em relação a concentração posterior. ** Comparação das médias entre os grupos controle e exercício $p<0,001$, *Test-T Student*. A barra de acréscimo indica que o primeiro acréscimo de peso ocorreu no 5º min de exercício sendo incrementado a cada 5 min até o 20º min.

Apesar do grupo controle ter sido manipulado da mesma maneira que os animais do grupo exercício, até o 15º min não foram identificadas diferenças significativas dos grupos avaliados. Pois, à medida que foi executado as mensurações, a concentração de lactato aumentou a cada passagem como se estivessem fazendo exercício.

Lønbro *et. al* (2019), identificaram que camundongos ficavam mais estressados quando eram estimulados com suaves toques durante corridas de intensidade baixa. As fêmeas da linhagem CDF1, quando não estimuladas, apresentavam aproximadamente 4 mmol.L^{-1} de lactato ao correrem a 20 m/min, enquanto as estimuladas apresentavam cerca de 7 mmol.L^{-1} . Portanto, a ausência de diferenças significativas na concentração de lactato entre o grupo

controle e o grupo de exercício pode ser atribuída ao estresse causado pelas perfurações na cauda para coleta de sangue e manipulações (Figura 12).

Após a etapa de avaliação física, os animais foram divididos em 4 grupos com 5 camundongos e foram submetidos ao treinamento por 21 dias: grupo 1 - controle, sem exercício de natação; grupo 2 – receberam treinamento de natação sem acréscimo de peso, grupo 3 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 1,5g de peso corpóreo e grupo 4 - receberam treinamento de natação com acréscimo de 3g de peso corpóreo. No 21º dia foram separados 4 animais do grupo que realizou exercício com 3g para fazer uma reavaliação física.

Ao reavaliar os animais (Figura 12), observou-se que a concentração basal de lactato do grupo de exercício foi de $5,375 \text{ mmol.L}^{-1}$, aumentando para $8,52 \text{ mmol.L}^{-1}$ aos 10 min. Aos 15 min de exercício, a concentração subiu para $9,4 \text{ mmol.L}^{-1}$; entretanto, aos 20 min, a concentração diminuiu para $8,36 \text{ mmol.L}^{-1}$. Aos 25 min com acréscimo de 2,5g a concentração de lactato aumentou significativamente para $10,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ e exercício foi interrompido devido aos animais chegarem à exaustão física. As medições posteriores, foram realizadas com os animais em repouso. No 30º min a concentração de lactato diminui para $8,95 \text{ mmol.L}^{-1}$. Todavia a média aumenta para $9,15 \text{ mmol.L}^{-1}$ no 35º min e $10,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ no 40º min. Ao avaliar as concentrações de lactato do grupo controle

percebe-se que as concentrações de lactato no 10º e no 25º min são menores quando comparadas as concentrações de lactato do grupo exercício ($p<0,05$).

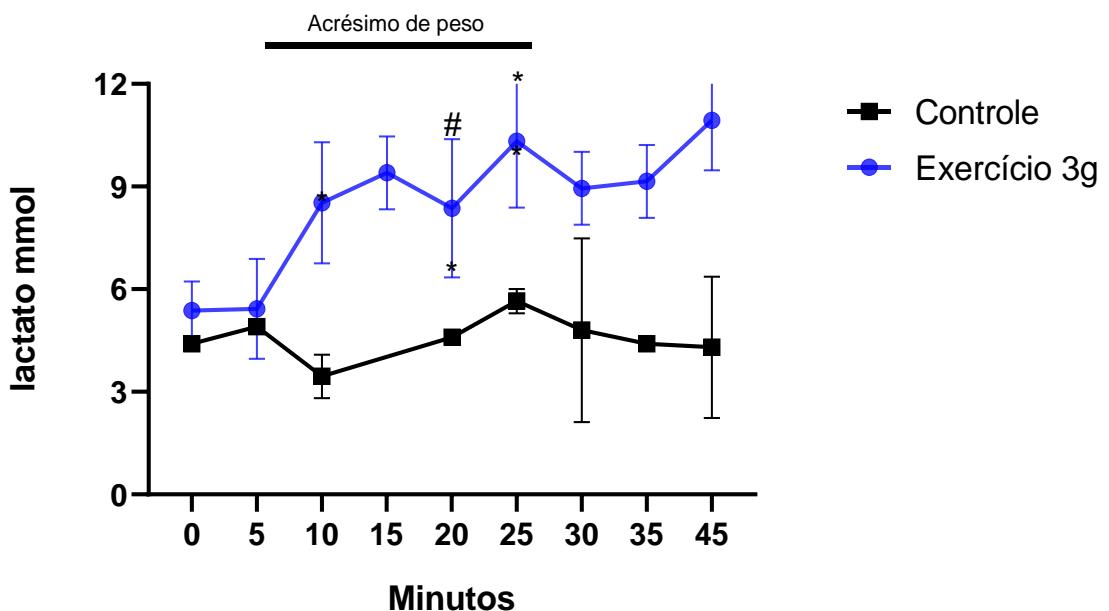


Figura 12: Curva de lactato dos camundongos submetido à avaliação física após 21 dias de treinamento. A linha azul refere-se as mensurações da concentração de lactato sanguíneo (mmol.L^{-1}) do grupo que realizou o teste de esforço. A linha preta se refere à avaliação da contração de lactato dos animais controle. A concentração do lactato foi mensurada com o uso de lactímetro. # Refere-se à comparação das médias da concentração lactato do grupo exercício. * Comparação das médias entre os grupos controle e exercício $p<0,005$, *Test-T Student*. A barra de acréscimo indica que o primeiro acréscimo de peso ocorreu no 5º min de exercício sendo incrementado a cada 5 min até o 25º min.

Ao realizar um teste progressivo de esforço para produção de uma curva de lactato, quando se identificar o limiar anaeróbico pode-se, atribuir o estado estacionário máximo de lactato, nessa abordagem o ponto do limiar é utilizado para aplicação de treinamentos de corrida a longas distâncias, por ser a melhor relação entre velocidade e produção de lactato (Orsi *et al.*, 2023). Este estudo reforça a importância da avaliação de lactato para prescrição de treinamento físico de rendimento.

Ao final do treinamento, os animais ficaram 48h de repouso. Decorrido este período, foram separados 3 animais de cada grupo para realização de um ponto de eutanásia para verificar o efeito do exercício no sistema imunológico antes da indução à sepse. Entretanto, ao avaliar os leucócitos, linfócitos, monócitos e

neutrófilos não foi identificado diferenças nas médias das concentrações em nenhum dos grupos avaliados, figura 13.

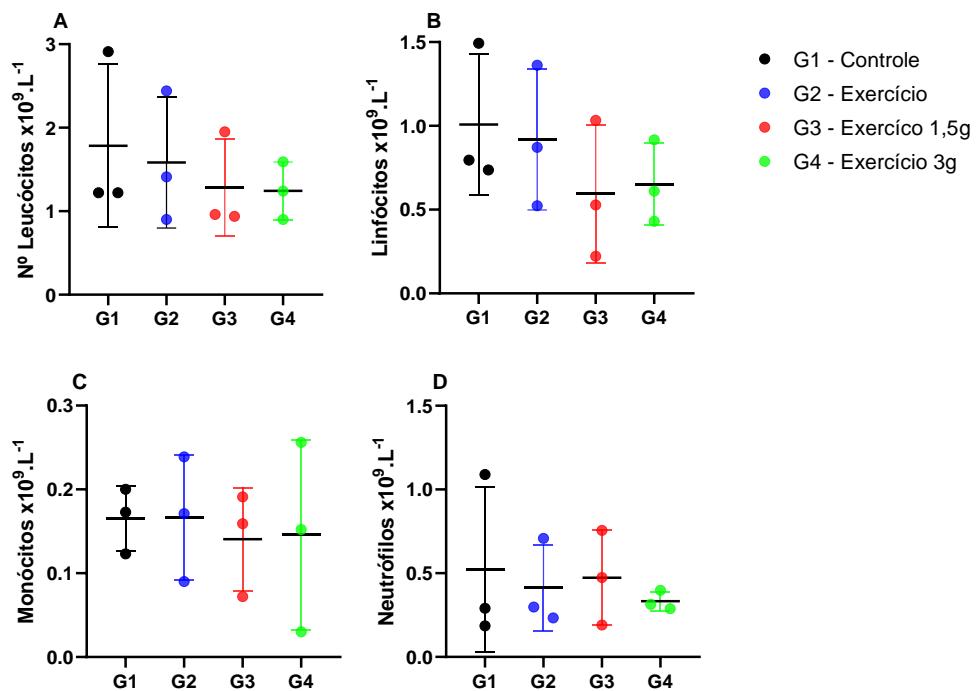


Figura 13: Painel de células contagem células: leucócitos - A, Linfócitos - B, Neutrófilos - C, Monócitos – D. Camundongos: controle – G1; submetidos à natação – G2; natação com acréscimo de 1,5g de peso corpóreo– G3; e submetidos à natação com acréscimo de 3g, antes da sepse. A contagem de células foi realizada de modo automatizado pelo equipamento analisador hematológico URIT5160

Os dados apresentados convergem com os dados apresentados pela literatura. Gomes *et al.* (2020) avaliaram a quantidade de linfócitos, monócitos e neutrófilos em 3 momentos: antes de uma única sessão de treinamento físico, após 30 min e após 24h do exercício. E identificaram que apesar das células avaliadas terem aumentado logo após o exercício, após 24h, verificou que as células retornaram aos valores basais. O retorno da quantidade de células imunológicas acontecer em 24h, justifica o fato de não terem sido identificado diferenças nas células imunológicas, uma vez que neste ensaio as amostras foram coletadas 48h após o encerramento do exercício. Na sequência foi avaliado o perfil das citocinas IL-6, IL-1 β e IL-10, 48h depois dos animais terem executado o protocolo de treinamento. Todavia, não foi encontrado nenhuma diferença entre os grupos avaliados (figura 14).

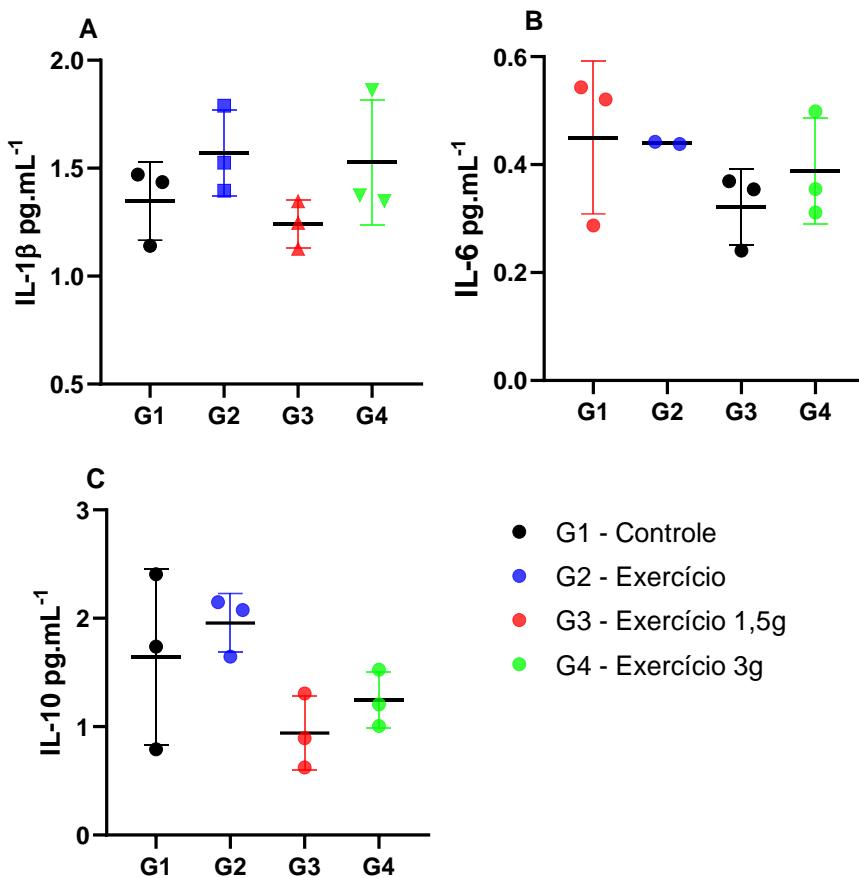


Figura 14: Avaliação da expressão das citocinas IL-1 β A, IL-6 B, IL-10 C em ensaios *in vivo* antes da sepse em camundongos: controle – G1; Submetidos a natação– G2; submetidos a natação com acréscimo de 1,5g– G3; e submetidos a natação com 3g - G4, após 21 dias de exercício. A avaliação da expressão das citocinas foi realizada utilizando o método ELISA sanduíche, com o kit ABTS (PeproTech). A detecção de coloração foi realizada em um leitor de microplaca a 405nm com correção de comprimento de onda 650nm.

O efeito de 21 dias treinamento sobre as concentrações basais de citocinas dos camundongos apresentou comportamento similares as citocinas de humanos submetidos a 4 semanas de treinamento aeróbico, uma vez que ao comparar a expressão genética de RNA das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 antes do treinamento e 7 dias após o treinamento não foram encontradas diferenças significativas na expressão das citocinas. Ou seja, em ambos os ensaios independentemente da duração, o EF não promoveu alterações nas concentrações basais de citocina (Garneau *et al.*, 2024).

Em paralelo, a eutanásia ocorrida 48h do término do exercício, foi induzida a sepse, em todos os grupos que realizaram 21 dias de exercício. O protocolo

foi adotado objetivando desafiar os camundongos a sepse, com uma solução de 1×10^8 UFC.mL $^{-1}$ *A. baumannii*, por meio de injeção intraperitoneal, como previamente padronizado (figura 7). Após a infecção, os animais foram monitorados para verificar as condições de sofrimento animal, presença ou ausência de secreções no corpo, observando a mobilidade do animal e resposta ao estímulo ao ser tocado, para aplicação dos *end points*. Os animais do grupo 1 tiveram uma sobrevida de 66% nas primeiras 24h, mantendo-se o percentual de sobrevida durante todo o experimento. Já do grupo 2 tiveram uma sobrevida de 66% nas primeiras 24h, após 48h, diminuiu para 48%, animais do grupo 3 nas primeiras 24h tiveram a sobrevida reduzida para 83%, se mantendo até o final do experimento, enquanto os animais do Grupo 4 100% sobreviveram nas primeiras 24h reduzindo a sobrevida para 83% após 24h (figura 15).

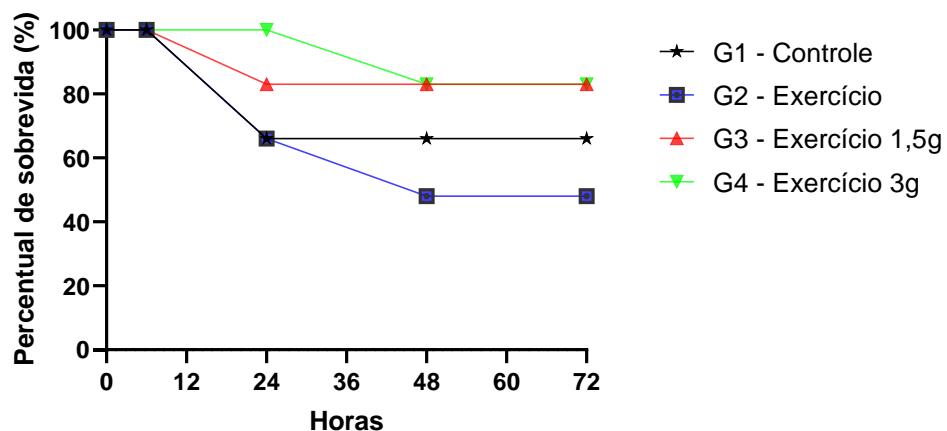


Figura 15: Avaliação da sobrevida em camundongos submetidos a sepse por *A.baumannii*: controle – G1; Submetidos a exercício aeróbico – G2; submetidos a exercício no limiar anaeróbico – G3; e submetidos exercícios anaeróbicos - G4, submetidos a sepse por *A. baumannii* por meio de injeção intraperitoneal 1×10^8 UFC.mL $^{-1}$, após realização de 21 dias de exercício físico.

O aumento da sobrevida de camundongos submetidos a sepse pode-se ser verificado independente da modalidade de treinamento. Pois, o treinamento aeróbico conduzido por 8 semanas realizado em esteira proporcionou aumento da sobrevida em camundongos submetidos sepses induzidos por LPS, quando comparado com animais não treinados (Wang, Wang, Tang, 2021).

Portanto, os dados obtidos neste estudo demonstram que o EF pode ter efeito protetivo frente a infecções causadas por bactérias. A fim de elucidar as

causas que levaram o aumento da sobrevida dos animais, após 120h da infecção foi realizada a eutanásia dos animais sobreviventes. E o sangue foi coletado e destinado para realização de um hemograma.

Ao avaliar a quantidade de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos, não foi identificado diferenças significativas entre as médias dos 17 camundongos sobreviventes a sepse por *A. baumannii* (figura 16).

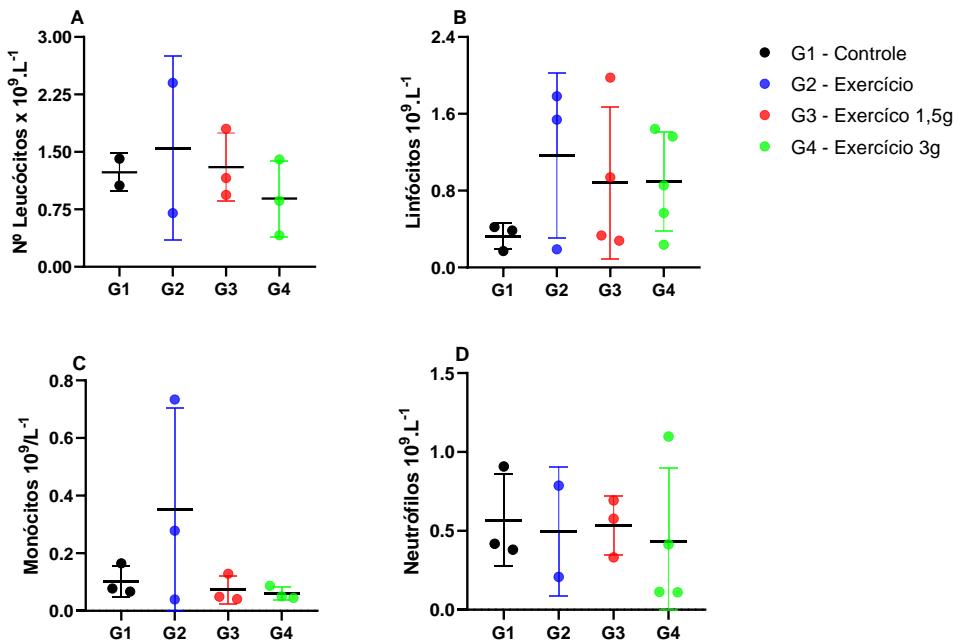


Figura 16: Painel de células contagem células: leucócitos - A, Linfócitos - B, Neutrófilos - C, Monócitos - D com camundongos: controle – G1; Submetidos a exercício aeróbico – G2; submetidos a exercício no limiar anaeróbico – G3; e submetidos exercícios anaeróbico - G4, pós sepse. A contagem de células foi realizada de modo automatizado pelo equipamento analisador hematológico URIT5160.

Os neutrófilos são células muito recrutadas em um processo de infecção bacteriana em modelo de infecção pulmonar inoculada intranasalmente por *A. baumannii* em camundongos, ao comparar o efeito de um tratamento com um anticorpo monoclonal para depleção dos neutrófilos com o grupo controle em camundongos. Observou-se que os animais não tratados 24 h após a infecção tinham $\sim 55 \times 10^5 \cdot \text{L}^{-1}$ de neutrófilos e após 72 h o número reduziu para $\sim 18 \times 10^5 \cdot \text{L}^{-1}$. 7 dias após a infecção realizou uma bacteriologia quantitativa e observou que enquanto não foi identificado a presença de bactéria em animais não tratados, os camundongos tratados com o anticorpo apresentaram $5 \times 10^5 \text{ UFC}^{-1}$ (Van Faassen *et al.*, 2007).

Por fim, foi quantificado as concentrações plasmáticas das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 dos animais sobreviventes para verificar se a sepse por *A. baumannii* alterou os parâmetros das citocinas. Porém, não foi observado diferença estatística entre os grupos para nenhuma das citocinas analisadas (figura 17).

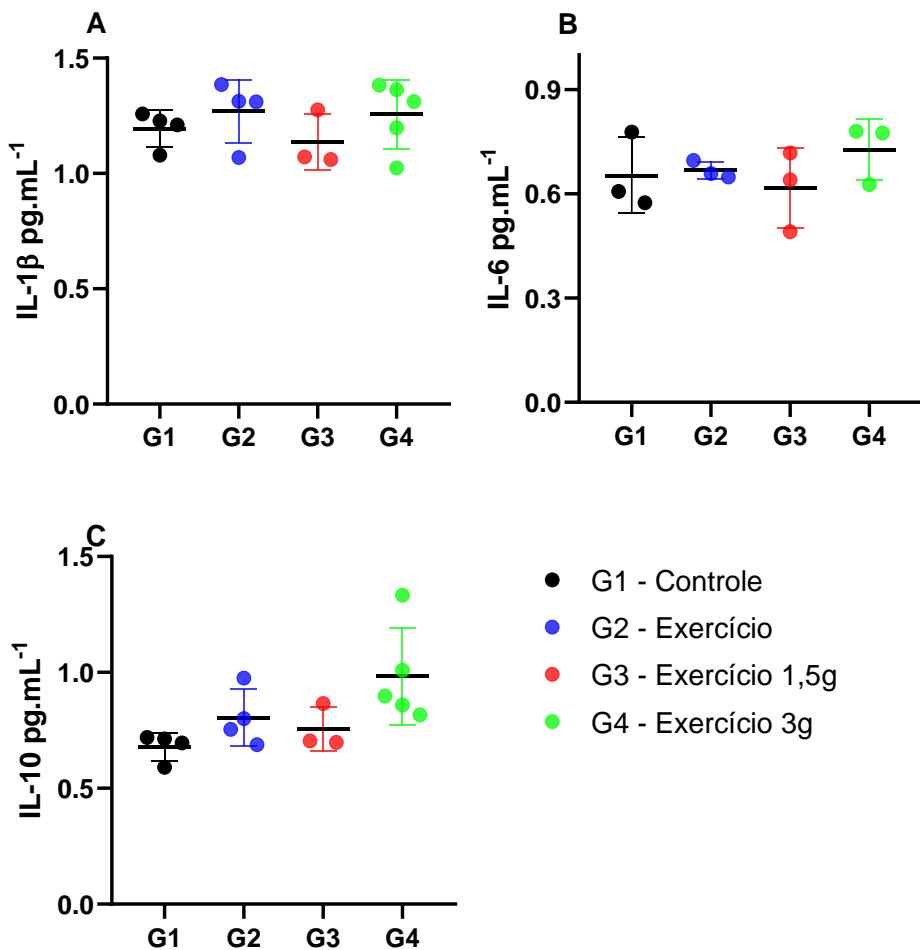


Figura 17: Avaliação da expressão das citocinas IL-1 β A, IL-6 B, IL-10 C em ensaios *in vivo* antes da sepse em camundongos: controle – G1; submetidos a exercício aeróbico – G2; submetidos a exercício no limiar anaeróbico – G3; e submetidos exercícios anaeróbico - G4, após 21 dias de exercício. A avaliação da expressão das citocinas foi realizada utilizando o método ELISA sanduíche, com o kit ABTS (PeproTech). A detecção de coloração foi realizada em um leitor de microplaca a 405nm com correção de comprimento de onda 650nm.

Os macrófagos ao reconhecerem o patógeno, expressam citocinas pró-inflamatórias, para iniciar a resposta inflamatória. Na sepse por *A. baumannii* o

aumento das concentrações das citocinas TNF- α indica o envolvimento da resposta imune inata (Bergamini *et al.*, 2021).

A IL-6 está associada ao recrutamento da atividade inflamatória, entretanto altas concentrações da IL-6 estão associadas a piora no quadro da sepse (Honda *et al.*, 2016). Por sua vez IL-10, está associada a diminuição da atividade inflamatória, portanto a sua falta dificulta a modulação da atividade inflamatória, agravando o processo infeccioso. YEUNG *et al.*, (2023). Ao avaliar as concentrações de citocinas dos animais sobreviventes, não se verificou alterações na expressão das citocinas, indicando que os animais não se encontram em processo inflamatório.

A partir dos dados observados neste ensaio, verifica-se que o aumento da aptidão física dos animais pode estar relacionado com o aumento da sobrevida dos animais, ainda que não tenha modificado a quantidade total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos, bem como das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α entre os grupos avaliados, antes ou após a infecção.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o EF praticado com sobrecarga desempenha um papel significativo na melhora da sobrevida de camundongos submetidos à sepse induzida por *A. baumannii*. As diferentes prescrições de exercício mostraram variações importantes nos parâmetros imunológicos e inflamatórios, logo após o exercício. Observou-se que os exercícios de moderada e alta intensidade (grupos 3 e 4) foram associados a um aumento na sobrevida dos animais, enquanto o exercício de baixa intensidade (grupo 2) esteve relacionado à piora do quadro infeccioso. No entanto, apesar da melhora na sobrevida, as análises das citocinas e células imunológicas indicaram que o EF não promoveu alterações crônicas significativas nesses parâmetros após 21 dias de treinamento e 120h pós-sepse, sugerindo que o mecanismo exato pelo qual o EF melhora a sobrevida ainda necessita de mais investigações.

Portanto, futuras pesquisas devem aprofundar-se nos mecanismos imunológicos e inflamatórios influenciados pelo EF, explorar variações nos protocolos de exercício. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de

diretrizes clínicas que incorporem a prática de EF como complemento no manejo da sepse, especialmente em casos envolvendo patógenos multirresistentes.

6. REFERÊNCIAS

- ABABNEH, Q.; AL-ROUSAN, E.; JARADAT, Z. Fresh produce as a potential vehicle for transmission of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Food Contamination**, v. 9, n.5, jul. 2022.
- AHUATZIN-FLORES, O. E.; TORRES, E.; CHÁVEZ-BRAVO, E. *Acinetobacter baumannii*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, abr. 2024.
- ALJAMALI, N. M.; AL-ZUBAIDY, Z. H.; ENAD, A. H. Bacterial infection and common bacterial diseases: A Review. **Pharmaceuticals and Nanotechnology**, v. 3, n. 2, out. 2021.
- ARRIGONI, R.; Ballini, A., Santacroce L, Palese LL. The Dynamics of OXA-23 β-Lactamase from *Acinetobacter baumannii*. **International Journal Molecular Sciences**. v. 24, n 15, dez. 2023.
- ASTON, A. et al. Drug-resistant bacteria were found to contaminate inanimate surfaces and equipment in the Intensive Care Unit at Kawempe National Referral Hospital. **Research Square**, fev. 2024.
- BAI, D.; HASNIMY, A.; LI, Y. Mediating role of body mass index on the relationship between physical activity and physical fitness among junior high school students in Shanghai. **Preventive medicine reports**, v. 41, mai. 2024.
- BALASUBRAMANIAN, R. et al. Global incidence in hospital-associated infections resistant to antibiotics: An analysis of point prevalence surveys from 99 countries. **PLoS medicine**, v. 20, n. 6, jun. 2023.
- BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance - A Short Story of an Endless Arms Race. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, jan. 2023.
- BARCELLOS et al. Effect of Physical Training on Exercise-Induced Inflammation and Performance in Mice. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 4, fev. 2021.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A Study of the Moraxella Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 5, mai. 1968.
- BECK, W. F. et al. Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. **Bratislava Medical Journal**, v. 115, n. 10, out. 2014.

BERGAMINI, G. et al. Mouse pneumonia model by *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant strains: Comparison between intranasal inoculation, intratracheal instillation and oropharyngeal aspiration techniques. **PLOS ONE**, v. 16, n. 12, dez. 2021.

BERMAN-RIU, M. et al. Dysfunctional mitochondria, disrupted levels of reactive oxygen species, and autophagy in B cells from common variable immunodeficiency patients. **Frontiers in immunology**, v. 15, mar. 2024.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, abr. 1986.

BOYLES, T. H.; WASSERMAN, S. Diagnosis of bacterial infection. **South African Medical Journal**, v. 105, n. 5, set. 2015.

CHANDRA, A. et al. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. **Clinics**, v. 61, n. 1, fev. 2006.

CHOI, C. H. et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, dez. 2008

CHOI, J.W. et al. Aerobic exercise attenuates LPS-induced cognitive dysfunction by reducing oxidative stress, glial activation, and neuroinflammation. **Redox biology**, v. 71, mai. 2024.

COSTANTI-NASCIMENTO, A.C., et al. Physical exercise as a friend not a foe in acute kidney diseases through immune system modulation. **Frontiers in Immunology**, v. 14, out. 2023.

DE MESY BENTLEY, K. L. et al. Evidence of *Staphylococcus aureus* Deformation, Proliferation, and Migration in Canaliculi of Live Cortical Bone in Murine Models of Osteomyelitis. **Journal of Bone and Mineral Research. The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 5, mai. 2017.

DJAHMI, N. et al. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. **BioMed Research International**, v. 2014, n.1, mai. 2014.

DUAN, Z. et al. Nosocomial surveillance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a genomic epidemiological study. **Microbiology spectrum**, v.12, n.2 jan. 2024.

ENG, M. et al. Correction: Sepsis and obesity: a scoping review of diet-induced obesity murine models. **Intensive care medicine experimental**, v. 12, n. 1, jun. 2024.

FANG, X.; ZHANG, Z. Hotspots and trends in health-oriented physical literacy research: a visual analysis based on the WOS database. **BMC public health**, v. 24, n. 1, jun. 2024

FAY, K. T.; FORD, M. L.; COOPERSMITH, C. M. The intestinal microenvironment in sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 10, out. 2017.

FEITO, Y.; FOUNTAINE, C.; ROY, A. B. LIGURI, G. **ACSM, American College of Sports Medicine**, 11º edição. Disponível em: <<http://www.acsm.org>>. Acesso em 13 out. 2023, 22:00.

FISCHETTI, V. A. Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, jul. 2019.

FIVENSON, E. M. *et al.* A role for the Gram-negative outer membrane in bacterial shape determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 35, ago. 2023.

FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* Urinary Tract infections: epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, abr. 2015.

GADDY, J. A.; TOMARAS, A. P.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, mai. 2009.

GARNEAU, L. *et al.* Myokine Secretion following an Aerobic Exercise Intervention in Individuals with Type 2 Diabetes with or without Exercise Resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 9, abr. 2024.

GEISINGER, E. *et al.* The Landscape of Phenotypic and Transcriptional Responses to Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii*: Acquired Resistance Alleles Modulate Drug-Induced SOS Response and Prophage Replication. **mBio**, v. 10, n. 3, jun. 2019.

GIBB, A. A. *et al.* FVB/NJ Mice Are a Useful Model for Examining Cardiac Adaptations to Treadmill Exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 7, dez. 2016.

GOMES, J. H. *et al.* Acute leucocyte, muscle damage, and stress marker responses to high-intensity functional training. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, 3 dez. 2020.

HASSANI, S. *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, mar. 2022.

HAWKINS, P. *et al.* A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the VAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, jan. 2011.

HOGAN, M. C. What Wasserman wrought: a celebratory review of 50 years of research arising from the concept of an “anaerobic threshold”. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 4, nov. 2020.

HONDA, S.I. *et al.* Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc α /μR-coupled TLR4 signalling. **Nature communications**, v. 7, n. 1, mai. 2016.

JI, B.; YE, W. Prevention and control of hospital-acquired infections with multidrug-resistant organism: A review. **PubMed**, v. 103, n. 4, jan. 2024.

KARAMPATAKIS, TSERGOULI, K.; BEHZADI, P. Pan-Genome Plasticity and Virulence Factors: A Natural Treasure Trove for *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, mar. 2024.

KIM, T. *et al.* Impact of Exercise Training on Survival Rate and Neural Cell Death in Sepsis Through the Maintenance of Redox Equilibrium. **International Neurourology Journal**, v. 28, n. 1, mar. 2024.

KREGEL, K.C. *et al.* **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**. American Physiological Society. fev. 2006.

KUMAR, V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 11, ago. 2020.

LEE, K. H. *et al.* Physical Activity and the Incidence of Sepsis: A 10-year Observational Study Among 4 Million Adults. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 50, n3, abr. 2024.

LI, X. *et al.* Lactate metabolism in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, set. 2022.

LI, Z. *et al.* Cytokine Expression of Lung Bacterial Infection in Newly Diagnosed Adult Hematological Malignancies. **Frontiers in immunology**, v. 12, dez. 2021.

LIM, J. *et al.* Antimicrobial peptide thanatin fused endolysin PA90 (Tha-PA90) for the control of *Acinetobacter baumannii* infection in mouse model. **Journal of biomedical science**, v. 31, n. 1, abr. 2024.

LØNBRO, S. *et al.* Reliability of blood lactate as a measure of exercise intensity in different strains of mice during forced treadmill running. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, mai. 2019.

MARTÍNEZ-TREJO, A. et al. Evasion of Antimicrobial Activity in *Acinetobacter baumannii* by Target Site Modifications: An Effective Resistance Mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, jan. 2022.

MARTINSON, J. N. V.; WALK, S. T. *Escherichia coli* residency in the gut of healthy human adults. **EcoSal Plus**, v. 9, n. 1, set. 2020.

MATSUMOTO, H. et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, set. 2018.

MEGRIAN, D. et al. One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. **Molecular Microbiology**, v. 113, n. 3, mar. 2020.

MIDIRI, A. et al. The Relevance of IL-1-Signaling in the Protection against Gram-Positive Bacteria. **Pathogens**, v. 10, n. 2, jan. 2021.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, jun. 2024.

MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 3, ago. 2021.

MORIYAMA, K.; NISHIDA, O. Targeting Cytokines, Pathogen-Associated Molecular Patterns, and Damage-Associated Molecular Patterns in Sepsis via Blood Purification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, ago. 2021.

MUTEEB, G. et al. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, nov. 2023.

NIEDERMAN, M. S. et al. Initial antimicrobial management of sepsis. **Critical Care**, v. 25, n. 1, ago. 2021.

NIEMAN, D. C.; WENTZ, L. M. The compelling link between physical activity and the body's defense system. **Journal of Sport and Health Science**, v. 8, n. 3, mai. 2019.

NOLT, B. et al. Lactate and Immunosuppression in Sepsis. **Shock**, v. 49, n. 2, fev. 2018.

OLIVO, C. R. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 9, 1 nov. 2014.

ORSI, J. B. et al. Critical Velocity, Maximal Lactate Steady State, and Muscle MCT1 and MCT4 after Exhaustive Running in Mice. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 21, out. 2023.

OSURU, H. P. et al. Moderate exercise-induced dynamics on key sepsis-associated signaling pathways in the liver. **Critical Care**, v. 27, n. 1, jul. 2023.

PARK, J. Y. et al. Effect of exercise-induced Neutrophil maturation on skeletal muscle repair *in vitro*. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 38, jul. 2024.

POTTER, M.; NEWPORT, E.; MORTEN, K. J. The Warburg effect: 80 years on. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 5, out. 2016.

RODRIGUES, N. A. et al. Lactate minimum underestimates the maximal lactate steady-state in swimming mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 1, jan. 2017.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and National Sepsis Incidence and mortality, 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, jan. 2020.

SANTOS, A.B. et al. Incremental Swimming Exercise Test: A Protocol to Evaluate Physical Performance in Rats, **Journal of Exercise Physiologyonline**, v. 21, n. 4 ago. 2018.

SETHUVEL, D. P. M. et al. β -Lactam Resistance in ESKAPE Pathogens Mediated Through Modifications in Penicillin-Binding Proteins: An Overview. **Infectius Diseases and Therapy**, v. 12, n. 3, mar. 2023.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, 23 fev. 2016.

SCHEFFER, D.; LATINI, A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, abr. 2020.

SCHIAVANO, G. F. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of oprD in imipenem resistant isolates. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, dez. 2017.

SCHLAGHECK, M. L. et al. Cellular immune response to acute exercise: Comparison of endurance and resistance exercise. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 1, abr. 2020.

SHABAB, S. et al. Diabetic cardiomyopathy in rats was attenuated by endurance exercise through the inhibition of inflammation and apoptosis. **Heliyon**, v. 10, n. 1, jan. 2024.

SMANI, Y. *et al.* Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, dez. 2013.

SRIVASTAVA, V.; SINGH, S. Organ support in sepsis: A panoramic view from infection to death. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 80, n. 1, jan. 2024.

STARR, M.E., SAITO H. Sepsis in Old Age: Review of Human and Animal Studies. **Aging and Disease**, v. 5, n. 2, abr. 2014

STATTIN, K. *et al.* Physical activity is associated with a lower risk of contracting and dying in infection and sepsis: a Swedish population-based cohort study. **Critical Care**, v. 28, n. 1, mar. 2024.

SUMAR, A. H. S. *et al.* Aerobic exercise ameliorates survival, clinical score, lung inflammation, DNA and protein damage in septic mice. **Cytokine**, v. 140, abr. 2021.

SURANADI, I. W. *et al.* A Retrospective Analysis of the Bacterial Infections, Antibiotic Use, and Mortality Predictors of COVID-19 Patients. **International Journal of General Medicine**, v. 15, abr. 2022.

SUZUKI, K.; HAYASHIDA, H. Effect of Exercise Intensity on Cell-Mediated Immunity. **Sports**, v. 9, n. 1, jan. 2021.

TETTEY, R. *et al.* Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* from Urban Environmental water sources in Accra, Ghana, Provides Insights into public health implications. **PloS one**, v. 19, n. 5, mai. 2024.

TIKU, V. *Acinetobacter baumannii*: Virulence Strategies and Host Defense Mechanisms. **DNA and Cell Biology**, v. 41, n. 1, jan. 2022.

VAN FAASSEN, H. *et al.* Neutrophils Play an Important Role in Host Resistance to Respiratory Infection with *Acinetobacter baumannii* in Mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, dez. 2007.

VERMEERSCH, V. *et al.* Moderate Exercise Modulates Inflammatory Responses and Improves Survival in a Murine Model of Acute Pneumonia. **Critical Care Medicine**, v. 52, n. 3, jan. 2024.

WANG, X.; WANG, Z.; TANG, D. Aerobic exercise improves LPS-induced sepsis via regulating the Warburg effect in mice. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, set. 2021.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, 2008.

WU, Y. *et al.* Roles and Molecular Mechanisms of Physical Exercise in Sepsis Treatment. **Frontiers in Physiology**, v. 13, jun. 2022.

Xu C., Bilya S.R, Xu W. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbes and New Infections**, v. 30, jul. 2019.

YANG, D. et al. Novel Insights into *Staphylococcus aureus* Deep Bone Infections: the Involvement of Osteocytes. **MBio**, v. 9, n. 2, abr. 2018.

YEUNG, S. T. et al. CD169+ macrophage intrinsic IL-10 production regulates immune homeostasis during sepsis. **Cell reports**, v. 42, n. 3, mar. 2023.

ZHANG, N. et al. Early-life exercise induces immunometabolic epigenetic modification enhancing anti-inflammatory immunity in middle-aged male mice. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, abr. 2024.

ZHANG, Y.; NING, B. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, nov. 2021.