

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

**Cinthia Maria Schöler**

**Macrófago Peritoneal: do Estado Quiescente para um Perfil Pró-Inflamatório.**

**Modulação -Adrenérgica Mediada pelo Exercício Físico**

Porto Alegre

2016

**Cinthia Maria Schöler**

**Macrófago Peritoneal: do Estado Quiescente para um Perfil Pró-Inflamatório.**

**Modulação -Adrenérgica Mediada pelo Exercício Físico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a Obtenção do título de Doutor em Ciências do Movimento Humano.

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Porto Alegre

2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Schöler, Cinthia Maria

Macrófago Peritoneal: do Estado Quiescente para um Perfil Pró-Inflamatório. Modulação &#945;-Adrenérgica Mediada pelo Exercício Físico / Cinthia Maria Schöler. -  
- 2016.  
161 f.

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Educação Física, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Exercício Físico. 2. Macrófago peritoneal. 3. Catecolaminas. 4. Fagocitose. 5. Sistema imunológico.  
I. Bittencourt Jr, Paulo Ivo Homem de, orient. II. Título.

**Cinthia Maria Schöler**

**MACRÓFAGO PERITONEAL: DO ESTADO QUIESCENTE PARA UM PERFIL  
PRÓ-INFLAMATÓRIO. MODULAÇÃO -ADRENÉRGICA  
MEDIADA PELO EXERCÍCIO FÍSICO**

Conceito final:

Aprovado em .....de ..... de .....

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira – UFRGS

---

Prof. Dr. Maurício da Silva Krause – UFRGS

---

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes – UFPR

---

Orientador – Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. - UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por estar sempre comigo me acolhendo e sustentando nos momentos mais difíceis. Proporcionando forças para me restaurar e seguir em frente, tornando-me mais forte para os desafios seguintes.

A minha família, minha mãe Dalva (*in memoriam*) que infelizmente não pode estar presente na finalização desta etapa que tanto apoiou, desde o início, mas tenho certeza que no camarote acompanhando. Meu pai, Luiz, que deu apoio e força nos momentos mais difíceis, a força de continuar seguindo em frente e a certeza de que o melhor estaria por vir. Meus irmãos, Alexandre e César, no apoio emocional frente aos desafios e quedas durante o percurso.

Aos meus padrinhos, Carmen e Tasso, muito bem escolhidos por meus pais, dando me apoio e muitos ensinamentos para os desafios diários que enfrentamos.

Obviamente, um trabalho deste porte e por 4 anos contou com o apoio de muitos colegas ao longo deste tempo, tanto os que trabalharam na parte experimental como os que acompanharam esta caminhada: Leandro, sempre muito querido e divertido; Lívia, sempre disposta a ajudar; Carine, agradeço o apoio; Gabriela, riso marcante também disposta ao auxílio; Ítalo, aprendeu a generosidade com a orientadora; Sofia, auxílio técnico aos Ics; Rossana, generosa no apoio aos colegas; Patrícia, grandes discussões, artigo, oportunidades e técnicas neste tempo. Hilton, ao seu jeito favoreceu meu fortalecimento; Luiz, no apoio da padronização das técnicas e nos momentos difíceis; Maciel, sempre disponível aos experimentos e no auxílio aos equipamentos; Maurício, uma nova oportunidade de conhecê-lo, agradeço a generosidade e apoio; Helena, Marcela, Victor e Graziela, os meus pimpolhos! Agradeço ao apoio emocional, experimental, a resolução dos problemas, a adaptação e cuidado com os animais, a parceria e a disposição (mesmo com o incentivo da pizza) nos experimentos da curva tempo-resposta. Que me perdoem os outros, mas Helena merece um agradecimento especial, felizmente seu currículo acadêmico e proximidade de sua universidade com a UFRGS, permitiu que acompanhasse a grande maioria dos experimentos da tese, participando de decisões experimentais, técnicas e do apoio psicológico. Afinal não foi à toa que recebeu destaque de sessão e indicação ao prêmio Jovem Pesquisador UFRGS 2016, do qual muito nos orgulhou. Maria Inês, nossa inesquecível, tenhas a certeza de que o

laboratório não é o mesmo quando não estás. Mulher guerreira e forte, porém com leves pitadas de organização, historiadora fisiológica, promotora de eventos e comediante, Maurício que o diga, da melhor qualidade. Muito obrigada pelo apoio técnico, psicológico, funcional e a disponibilidade de ajudar os outros, você mora em nossos corações. D. Ritinha, que convivo desde meu início no laboratório, queria ter a sua disposição, afeto e a certeza dos acontecimentos. Aos novos Cris, Paula, Carlinhos, Lucas, Gisele, Jorge e Daniela que, apesar de terem acompanhado apenas a finaleira, estão na torcida por mim.

Agradeço ao pessoal do apoio técnico, cujo trabalho foi essencial para que eu pudesse finalizar esta caminhada, os bioteristas e veterinários, secretaria do PPGCMH em especial à Ana que sempre rapidamente socorria nas dúvidas, professores (sempre instigando-nos a saber e estudar mais) e colegas, principalmente Josiane Krause, Juliano Farinha, Marcos Franken, Rodrigo Rodrigues, Matias Fröhlich, Mayra Casanova, Matheus Ferrareze e Rodrigo Rodrigues e aos Profs. Drs. Rochele Costa, Fábio Lanferdini e Bruno Teixeira. A banca de qualificação pelas discussões, dicas e aprendizados.

Preciso agradecer aos professores Alex Sander Araújo, socorro técnico, e Adriane Beló-Klein, ambos pela confiança e abertura de seu laboratório para que eu pudesse concluir minhas análises. Professor Fabrício Souza Campos auxílio ao desenho de primers e nos percalços da técnica, sempre disposto a ajudar. Professor Marcos Frizzo pela confiança e abertura de seu laboratório para que eu pudesse utilizar a estufa de CO<sub>2</sub>. Aos colegas da fisio: Jéssica, Rafaéis Colombo e Fernandes, Patrick, Cris, Tânia, Bruna e Alexandra (Leão), Débora, Ana Hoefel, Samir, Elaine, Everton (LaMEC), me ajudando com equipamentos, discussões, apoio e brincadeiras.

Aos parceiros de publicação Profs Drs Luís Fernando Deresz, Orlando Laitano, Randhall Carteri, Marcelo Sartori e Flávio Castro por acreditarem em minhas ideias e na execução das técnicas, agradeço o reconhecimento.

Agradeço a CAPES, CNPq e órgãos de fomento pela bolsa e financiamento do projeto.

Deste doutorado tive muitos aprendizados de: vida, técnicas, conhecimento, comportamentos, amadurecimento, enfim, ao finalizar esta etapa sou uma pessoa e profissional muito melhor em relação ao que já fui. Agradeço essa oportunidade que me foi permitida em 2012, após ter concluído meu sonho em cursar um mestrado em uma universidade federal de excelência, a 3<sup>a</sup> melhor universidade federal do país.

Agradeço a D. Míriam pelo apoio, suporte nos momentos difíceis, dicas e carinhos como o nosso grupo, desde o pós-doc até o IC.

Difícil descrever em palavras o que um orientador deste nível proporcionou na minha trajetória. Iniciou-se com a oportunidade de um sonho, concluído, seguiu-se para o curso de um doutorado, que nunca tinha passado pela minha cabeça, o primeiro artigo internacional, como primeira autora, e agora encerra-se com a conclusão de um doutorado. Um Professor que ensina como deve ser a Ciência, a buscar a informação correta, a minuciosidade de uma técnica ou resultado, a batalha pelos reagentes, a dica no escrever, enfim, um grande cientista munido de grande humildade e afeto, ou seja, um ser humano fantástico, que sempre surpreende. Nunca me esqueço de suas palavras antes de eu iniciar o doutorado, mais ou menos assim “de nada adianta todo meu conhecimento e experiência se eu levar para o túmulo, eu devo repassá-los para a Ciência continuar evoluindo”.

Agradeço sempre, imensamente por ele ter acreditado em mim. Foi e continua sendo uma honra ter estado ao lado dele e recebido esses ensinamentos científicos e de vida todos esses anos.

*“Só os que se arriscam a ir longe  
demais são capazes de descobrir  
quão longe se pode ir” (T. S. Eliot)*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Sistema imunológico e exercício físico .....	29
1.2 Receptores adrenérgicos em macrófagos .....	32
1.3 Macrófagos ativados e alternativos .....	33
2 PROBLEMA DA PESQUISA .....	39
3 OBJETIVOS:.....	39
3.1 Objetivo geral: .....	40
3.2 Objetivos específicos:.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Caracterização da pesquisa.....	42
4.2 Local de realização .....	42
4.3 Características especiais relacionadas à biossegurança.....	42
4.4 Equipamentos de biossegurança.....	43
4.5 Cálculo amostral .....	43
4.6 Aprovação nos comitês e comissões de ética em pesquisa e experimentação animal .....	44
4.7 Animais.....	44
4.8 Manipulação dos animais .....	45
4.9 Desenho experimental do estudo.....	45

4.10. Aplicação de Bloqueadores Farmacológicos.....	46
4.11. Protocolo de exercício físico .....	47
4.12 Cronometragem tempo de exaustão do grupo 8% .....	48
4.13 Dosagem de lactato.....	48
4.14 Dosagem de glicose .....	48
4.15 Morte dos animais .....	48
4.16 Obtenção dos macrófagos residentes peritoneais .....	49
4.17 Análise da capacidade fagocítica pela técnica do zimosan .....	50
4.18 Determinação da produção de nitritos .....	50
4.19 Dosagem de glicogênio hepático e músculo esquelético.....	51
4.20. Dosagem de proteínas.....	51
4.21 Western Blotting.....	52
4.22 Reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	53
4.23 Avaliação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico plasmáticas (TBA-RS).....	55
4.24 Avaliação dos grupos de sulfidrilas livres plasmáticas .....	55
4.25 Disposição final de resíduos e biossegurança.....	55
4.26 Análises estatísticas .....	56
4.27 Apoio financeiro .....	56
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
5.1 Avaliação do lactato sanguíneo .....	57
5.2 Análise do glicogênio muscular .....	59
5.3 Tempo de nado até a exaustão do grupo 8 % .....	61
5.4 Análise do glicogênio hepático.....	62

5.5 Glicose sanguínea.....	64
5.6 Dosagem de TBA-RS plasmático.....	65
5.7 Análise de sulfidrilas plasmáticas .....	66
5.8 Análise da produção de nitritos .....	68
5.9 Análise de fagocitose de zimosan marcado com vermelho neutro.....	70
5.10. Curva tempo-resposta de fagocitose de zimosan marcado com vermelho neutro.....	72
5.11 Curva tempo-resposta da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais.....	73
5.12 Curva tempo-resposta da detecção de TBA-RS plasmáticos .....	74
5.13 Curva tempo-resposta da detecção de sulfidrilas plasmáticas.....	75
5.14 Análise da capacidade fagocítica celular 6 h após o término da sessão de exercício físico com os diferentes bloqueios .....	76
5.15 Análise da produção de nitritos 6 h após o término da sessão de exercício físico com os diferentes bloqueios .....	82
5.16 Análise do TBA-RS plasmático, 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios.....	88
5.17 Análise de sulfidrilas plasmáticas 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios .....	93
5.18. Análise da expressão de proteínas, 6 h após o término da sessão de exercício com os diferentes bloqueios.....	98
5.19 Análise de PCR em tempo real, 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios.....	117
6 DISCUSSÃO.....	138
7 CONCLUSÃO.....	147
8 PERSPECTIVAS: .....	148
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149

## RESUMO

Em tempos atuais, com diversas síndromes/patologias relacionadas ao nosso sistema imunológico é imprescindível praticar exercícios que sejam imunoestimulantes, levando em consideração a influência de diversos hormônios e citocinas. Dentre esses, destacam-se as catecolaminas, que além de atuarem no aumento dos leucócitos circulantes, pela maior liberação de células da medula óssea e de órgãos linfoides, também influenciam as funções das células imunológicas. Surpreendentemente, pouco se sabe do efeito da intensidade do exercício físico sobre a resposta de células imunológicas teciduais, apesar de sua extrema importância, tanto na mobilização como na possível comunicação com outros órgãos. Essas células sofrem influência da intensa inervação, além da produção autógena de catecolaminas, estabelecendo um processo de neuroimunomodulação local e alterando seu fenótipo de acordo com o microambiente. Assim, o presente trabalho objetivou investigar se a estimulação adrenérgica afeta o perfil inflamatório de macrófagos residentes no peritônio de ratos, por meio de diferentes intensidades de exercício físico agudo. Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão aguda de natação com três intensidades de exercício (conforme sobrepeso atado à base da cauda, como porcentagem da massa no animal): repouso (20 min), 4 % (20 min) ou 8 % (até a exaustão). Trinta minutos antes das sessões de exercício, os animais receberam (i.p.) bloqueadores adrenérgicos [prazosina ( $\alpha_1$ ), ioimbina ( $\alpha_2$ ), metoprolol ( $\beta_1$ ), propranolol ( $\beta$  inespecífico) e duplo bloqueio ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ )], ou PBS como controle, sendo mortos imediatamente após o exercício ou depois de 6, 12 ou 24 h após as sessões de nado. Determinou-se uma curva intensidade de exercício-resposta em função do tempo sendo avaliada a função dos macrófagos por meio da capacidade fagocítica e de produção de óxido nítrico (NO, pela medida de nitritos em meio de incubação). Os dados mostraram que a maior influência do exercício sobre estas variáveis do macrófago dá-se 6 h após a sessão e que estas respostas são dependentes da carga e de estimulação  $\alpha$ -adrenérgica. Entretanto, o aumento na produção de NO não foi devido nem a incrementos na quantidade de moléculas da enzima NO sintase induzível (iNOS) nem de seu RNA mensageiro e nem da arginase-1 (proteína e RNAm) que compete pela arginina com a iNOS. A redução na quantidade de moléculas de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), que reprimem a expressão de iNOS, também não foi observada. Em conclusão, a modulação do perfil pró-inflamatório dos macrófagos peritoneais com o exercício é dependente da carga e da estimulação  $\alpha$ -adrenérgica.

## ABSTRACT

In current times, with the prevalence of several syndromes/pathologies related to our immune system, it is essential to practice exercises that are immunostimulants, taking into account the influences of various hormones and cytokines. Among these, catecholamines, which rise circulating leukocyte counts through increased release of bone marrow cells and lymphoid organs as well as influence the functions of immune cells. Surprisingly, there are a few studies about the effect of physical exercise load on the responses of tissue immune cells, which are extremely important, both in the mobilization as well as in the possible cross-talk with other organs. These cells are influenced by extensive innervation, besides their autogenic production of catecholamines, establishing a local neuroimmunomodulation and changing their phenotype according with microenvironment. Therefore, the present study aimed at investigating how adrenergic stimulation affects the inflammatory profile of rat peritoneal resident macrophages under different intensities of acute exercise. Wistar rats were submitted to a session of acute swimming with three exercise intensities (by an overweight attached to the base of the tail, as a percentage of animal body weight): rest (20 min), 4 % (20 min) or 8 % (to the point of exhaustion). Thirty minutes before the exercise sessions, the animals received (i.p.) adrenergic blockers [prazosin ( $\alpha_1$ ), yohimbine ( $\alpha_2$ ), metoprolol ( $\beta_1$ ), propranolol ( $\beta$  unspecific) and double blockade ( $\alpha_1$   $\alpha_2$  and  $\beta$ )], or PBS as control, being killed immediately after exercise or after 6, 12 or 24 h after the sessions. It was prepared an exercise intensity-response curve as a function of time, being evaluated the function of macrophages through the phagocytic capacity and production of nitric oxide (NO, by the measurement of nitrite in the incubation media). The data showed that the highest influence of exercise on these variables occurred 6 h after the session and that these responses are dependent on exercise load and of  $\alpha$ -adrenergic stimulation. However, the increase in the production of NO was not due nor to the increments in the number of molecules of the enzyme inducible NO synthase (iNOS), nor to its messenger RNA and neither to the arginase-1 (protein and mRNA) that competes for arginine with NOS. A possible reduction in the amount of molecules of the 70 kDa heat shock proteins (Hsp70), which suppress iNOS expression was also not observed. In conclusion, the modulation of peritoneal macrophage pro-inflammatory profile with exercise is dependent on exercise load and  $\alpha$ -adrenergic stimulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos desencadeados pelo exercício agudo que afetam o sistema imunológico.....	29
Figura 2 – Possíveis respostas do exercício moderado nos perfis M1/M2.....	37
Figura 3 – Possíveis respostas do exercício intenso nos perfis M1/M2.....	38
Figura 4 – Análise do lactato sanguíneo imediatamente após o exercício físico nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	58
Figura 5 – Avaliação do glicogênio muscular imediatamente após o exercício nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	60
Figura 6 – Tempo de exercício dos animais que nadaram até a exaustão.....	62
Figura 7 - Avaliação do glicogênio hepático imediatamente após o exercício nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	63
Figura 8 - Análise da glicemia imediatamente após o exercício físico nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	64
Figura 9 – Avaliação do TBA-RS plasmáticos, imediatamente após o exercício nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	65
Figura 10 - Avaliação das sulfidrilas plasmáticas, imediatamente após o exercício nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	67
Figura 11 – Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais, imediatamente após o exercício, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	69
Figura 12 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, imediatamente após o exercício, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios.....	70
Figura 13 – Análise da curva tempo-resposta do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico.....	72
Figura 14 – Análise da curva tempo-resposta da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico.....	73
Figura 15 – Análise da curva tempo-resposta da detecção de TBA-RS plasmático dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico.....	74
Figura 16 – Análise da curva tempo-resposta da detecção de sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico.....	75
Figura 17 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do	

exercício.....	77
Figura 18 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	78
Figura 19 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	79
Figura 20 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	80
Figura 21 – Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	81
Figura 22 – Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	82
Figura 23 – Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	83
Figura 24 – Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	84
Figura 25 – Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	85
Figura 26 – Avaliação da produção de nitrios pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	86
Figura 27 – Avaliação do TBA-RS plasmático dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	88
Figura 28 – Avaliação do TBA-RS plasmático dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	89
Figura 29 – Avaliação do TBA-RS plasmático dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	90
Figura 30 – Avaliação do TBA-RS plasmático dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	91
Figura 31 – Avaliação do TBA-RS plasmático dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	92
Figura 32 – Avaliação das sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram nas diferentes	

intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	93
Figura 33 – Avaliação das sulfidrilas plasmáticas dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	94
Figura 34 – Avaliação das sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	95
Figura 35 – Avaliação das sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	96
Figura 36 – Avaliação das sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	97
Figura 37 – Avaliação do conteúdo intracelular de HSP70 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	98
Figura 38 – Avaliação do conteúdo intracelular de HSP70 nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	99
Figura 39 – Avaliação do conteúdo intracelular de HSP70 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	100
Figura 40 – Avaliação do conteúdo intracelular de HSP70 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	101
Figura 41 – Avaliação do conteúdo intracelular de HSP70 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	102
Figura 42 – Avaliação do conteúdo intracelular de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	103
Figura 43 – Avaliação do conteúdo intracelular de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	104
Figura 44 – Avaliação do conteúdo intracelular de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	105
Figura 45 – Avaliação do conteúdo intracelular de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	106
Figura 46 – Avaliação do conteúdo intracelular de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com	



análise de ANOVA de duas vias.....	107
Figura 47 – Avaliação do conteúdo intracelular de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	108
Figura 48 – Avaliação do conteúdo intracelular de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	109
Figura 49 – Avaliação do conteúdo intracelular de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	110
Figura 50 – Avaliação do conteúdo intracelular de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	111
Figura 51 – Avaliação do conteúdo intracelular de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	112
Figura 52 – Avaliação do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I) nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	113
Figura 53 - Avaliação do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I) nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	114
Figura 54 – Avaliação do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I) nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	115
Figura 55 – Avaliação do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I) nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	116
Figura 56 – Avaliação do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I) nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....	117
Figura 57 – Avaliação da expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....	118
Figura 58 – Avaliação da expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	119
Figura 59 – Avaliação da expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	120
Figura 60 – Avaliação da expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....	121

- Figura 61 – Avaliação da expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....122
- Figura 62 – Avaliação da expressão de HSP73 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....123
- Figura 63 – Avaliação da expressão de HSP73 nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....124
- Figura 64 – Avaliação da expressão de HSP73 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....125
- Figura 65 – Avaliação da expressão de HSP73 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....126
- Figura 66 – Avaliação da expressão de HSP73 nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....127
- Figura 67 – Avaliação da expressão de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....128
- Figura 68 – Avaliação da expressão de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....129
- Figura 69 – Avaliação da expressão de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....130
- Figura 70 – Avaliação da expressão de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....131
- Figura 71 – Avaliação da expressão de iNOS nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....132
- Figura 72 – Avaliação da expressão de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício.....133
- Figura 73 – Avaliação da expressão de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....134
- Figura 74 – Avaliação da expressão de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....135
- Figura 75 – Avaliação da expressão de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 h, com os diferentes bloqueios.....136
- Figura 76 – Avaliação da expressão de arginase I nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades e bloqueios, após 6 h do exercício, com análise de ANOVA de duas vias.....137
- Figura 77 – Modulação adrenérgica no perfil inflamatório do macrófago peritoneal após 6 h do rato ter sido submetido ao exercício físico de intensidade moderada.....142

Figura 78 – Modulação adrenérgica no perfil inflamatório do macrófago peritoneal após 6 h do rato ter sido submetido ao exercício físico de intensidade exaustiva.....144

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	.....	Adenosina monofosfato cíclico (do inglês, <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
AMPK	.....	Proteína cinase ativada por AMP (do inglês, <i>AMP-activated protein kinase</i> )
AP-1	.....	Proteína ativadora 1
BHT	.....	Hidroxitolueno butilado (do inglês, <i>butylated hydroxytoluene</i> )
cDNA	.....	Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CRH	.....	Hormônio liberador de corticotropina (do inglês, <i>corticotropin-releasing hormone</i> )
DEPC	.....	Dietilpirocarbonato
DNA	.....	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTNB	.....	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (do inglês, <i>5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)</i> )
DUSP	.....	Fosfatase dual-específica (do inglês <i>dual-specificity phosphatase</i> )
EDTA	.....	Ácido etilenodiaminotetra-acético
eNOS	.....	Óxido nítrico sintase endotelial (do

		inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ERK	.....	Cinase regulada por sinal extracelular (do inglês, <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> )
ERO	.....	Espécies reativas ao oxigênio
ERON	.....	Espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio
GAPDH	.....	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HBSS	.....	Solução salina equilibrada de Hank (do inglês, <i>Hank's buffered salt solution</i> )
HSC	.....	Célula tronco hematopoiética (do inglês, <i>Hematopoietic Stem Cell</i> )
HSP70	.....	Proteína de choque térmico de 70 kDa (do inglês, <i>heat shock protein</i> )
IFN-	.....	Interferon-
IL-10	.....	Interleucina-10
IL-12	.....	Interleucina-12
IL-13	.....	Interleucina-13
IL-1ra	.....	Receptor antagonista de IL-1 (do inglês, <i>interleukin-1 receptor antagonist</i> )
IL-1	.....	Interleucina-1

IL-4	.....	Interleucina-4
IL-6	.....	Interleucina-6
IL-8	.....	Interleucina-8
iNOS	.....	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
IRAK	.....	Cinase associada ao receptor de IL-1 (do inglês, <i>IL-1R-associated kinase</i> )
LPS	.....	Lipopolissacarídeo
MAPK	.....	Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês, <i>mitogen activated protein kinase</i> )
M-CSF	.....	Fator estimulante de colônias de macrófagos (do inglês, <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MCT	.....	Massa corporal total
MDA	.....	Malondialdeído
MDR	.....	Reação de desaparecimento de macrófagos (do inglês, <i>macrophage disappearance reaction</i> )
MIP-1	.....	Proteína inflamatória macrofágica 1 (do inglês, <i>macrophage inflammatory protein 1</i> )
MLSS	.....	Máxima fase estável do lactato (do inglês, <i>maximal lactate steady state</i> )
MPG	.....	Macrófagos peritoneais grandes

MPP	.....	Macrófagos peritoneais pequenos
MyD88	.....	Proteína resposta-primária de diferenciação mieloide inflamatória 88 (do inglês, <i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i> )
NADP <sup>+</sup>	.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF-κB	.....	Fator nuclear B (do inglês, <i>nuclear factor B</i> )
NK	.....	Natural Killer
nNOS	.....	Óxido nítrico sintase neuronal (do inglês, <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NO	.....	Óxido nítrico
NOHA	.....	N-hidroxil-L-arginina
NOS	.....	Óxido nítrico sintase (do inglês, <i>nitric oxide synthase</i> )
NOX	.....	NADPH oxidase
OAT	.....	Ornitina aminotransferase
ODC	.....	Ornitina descarboxilase
OMS	.....	Organização Mundial da Saúde
P5C	.....	l- <sup>1</sup> -pirrolina-5-carboxilase
PBS	.....	Tampão salina fosfato (do inglês, <i>phosphate buffer saline</i> )

PCK	.....	Proteína cinase C (do inglês, <i>protein kinase C</i> )
PGC-1	.....	Coativador 1 do receptor gamma ativado por proliferadores de peroxissoma (do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1</i> )
PKA	.....	Proteína cinase A (do inglês, <i>protein kinase A</i> )
PLC	.....	Fosfolipase C (do inglês, <i>phospholipase C</i> )
PMSF	.....	Fluoreto fenilmetilsulfonil (do inglês, <i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i> )
qRT-PCR	.....	Transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa (do inglês, <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
RNA	.....	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )
RNA <sub>m</sub>	.....	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI 1640	.....	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SDS	.....	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SFB	.....	Soro fetal bovino
SIRS	.....	Síndrome da resposta inflamatória



		sistêmica (do inglês, <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> )
SNS	.....	Sistema nervoso simpático
STAT1	.....	Ativador de transdução de sinal e transcrição 1 (do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 1</i> )
STAT6	.....	Ativador de transdução de sinal e transcrição 6 (do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 6</i> )
sTNF-r1 e 2	.....	Receptor 1 e 2 solúvel de TNF- (do inglês, <i>soluble TNF- receptors 1 and 2</i> )
TBA-RS	.....	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TBS-T	.....	Solução de salina tamponada com Tris – tween 20 (do inglês, <i>tris-buffered saline-tween 20</i> )
TGF- 1	.....	Fator 1 de crescimento transformador (do inglês, <i>transforming growth factor – 1</i> )
TLCK	.....	N- -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
TLR	.....	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>toll-like receptor</i> )

TNF- ..... Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumoral necrose factor-* )

U.A. ..... Unidade arbitrária

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2011, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que em torno de 24,7 milhões das mortes registradas até então, foram decorrentes de doenças relacionadas a insuficiências referentes ao sistema imunológico (doenças infecciosas e parasíticas, câncer, doenças relacionadas ao sobrepeso e diabetes). A entidade faz um prognóstico, estimando um aumento em torno de 50 % de novos casos de câncer em 2030. Destaca-se também, o fato de 3,2 milhões de óbitos causados pela inatividade física, visto que ao realizarmos exercício físico de modo periódico, diminuimos de 20-30 % os riscos de todas as causas de mortalidade (2011). Portanto, pesquisas e alternativas que ativem o sistema imunológico são idealizadas, sendo o exercício físico alternativa viável e eficaz.

Este sistema apresenta respostas que definem as imunidades inata e adaptativa. A primeira representa a resposta imediata a uma injúria ou infecção e é compreendida por células fagocitárias, como monócitos, macrófagos e neutrófilos; a segunda apresenta resposta característica a um determinado patógeno, sendo representada pelos linfócitos, que podem ser classificados basicamente em B ou T (Leandro, de Castro et al. 2007).

Estas células são originadas na medula óssea por meio de células tronco hematopoiéticas (HSC) (células iniciais) as quais originam dois tipos de células progenitoras multipotentes: a) células linfoides e mieloides e b) células mieloides, eritrócitos e plaquetas. O primeiro (a) gera precursores de células linfoides e algumas mieloides e o segundo (b) cria linhagens eritrocíticas, monocíticas, megacariocíticas e granulocítica as quais via fatores de estimulação de colônias, promotoras do crescimento e desenvolvimento de células leucocitárias, originam, respectivamente, células sanguíneas vermelhas, monócitos, plaquetas e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Estes fatores de desenvolvimento providenciam um mecanismo para repor leucócitos que possam ter sido consumidos durante um processo inflamatório e/ou imunológico (Abbas, Litchman *et al.*, 2014). Assim, após as rodadas de diferenciações, as células originadas das linhagens linfoides e mieloides são coletivamente denominadas leucócitos (Benschop, Rodriguez-Feuerhahn et al. 1996) e alcançam a circulação sanguínea, direcionando-se para as diferentes regiões do organismo nas quais irão atuar. Por esta pesquisa estar relacionada com macrófagos peritoneais, preocuparemos-nos, a partir deste parágrafo, em direcionar a tese para este tipo celular.

Na corrente sanguínea, monócitos circulantes estão juntos às demais células do sangue ou aderidos ao endotélio vascular. Ao passarem para o interstício, atraídos por mediadores quimiotáticos liberados pelas células dos tecidos sob injúria, os monócitos alteram a sua função e diferenciam-se em macrófagos. Diferenciada, esta célula é responsável pela secreção de diversas moléculas que promovem ou inibem a inflamação, regulam o crescimento e a hematopoiese, influenciam a função do linfócito, afetam o reparo e renovação tecidual; liberam substâncias que agem como fatores regulatórios ou que possuem ação microbicida (Woods, Lu et al. 2000, Kizaki, Takemasa et al. 2008, Doan et al. 2008) apresentam capacidade de aderência, quimiotaxia e fagocitose (Heimbach, Reznikov et al., 2001, Leandro, de Castro et al., 2007, Doan et al., 2008) caracterizando-a, dessa forma, como a principal célula mediadora da resposta inflamatória (Heimbach, Reznikov et al. 2001).

Entretanto, estudos recentes sugerem que, em situações não inflamatórias ou infecciosas, macrófagos residentes teciduais sejam células hematopoiéticas derivadas da mesoderme, não dependendo de monócitos sanguíneos ou progenitores hematopoiéticos adultos para sua renovação. Desempenham funções em seus tecidos na condição *steady-state* e após *turnover* celular (Davies, Jenkins et al. 2013, Hashimoto, Chow et al. 2013, Varol, Mildner et al. 2015). Dessa forma, essas populações teciduais repovoam este local ao longo da vida adulta (Hashimoto, Chow et al. 2013).

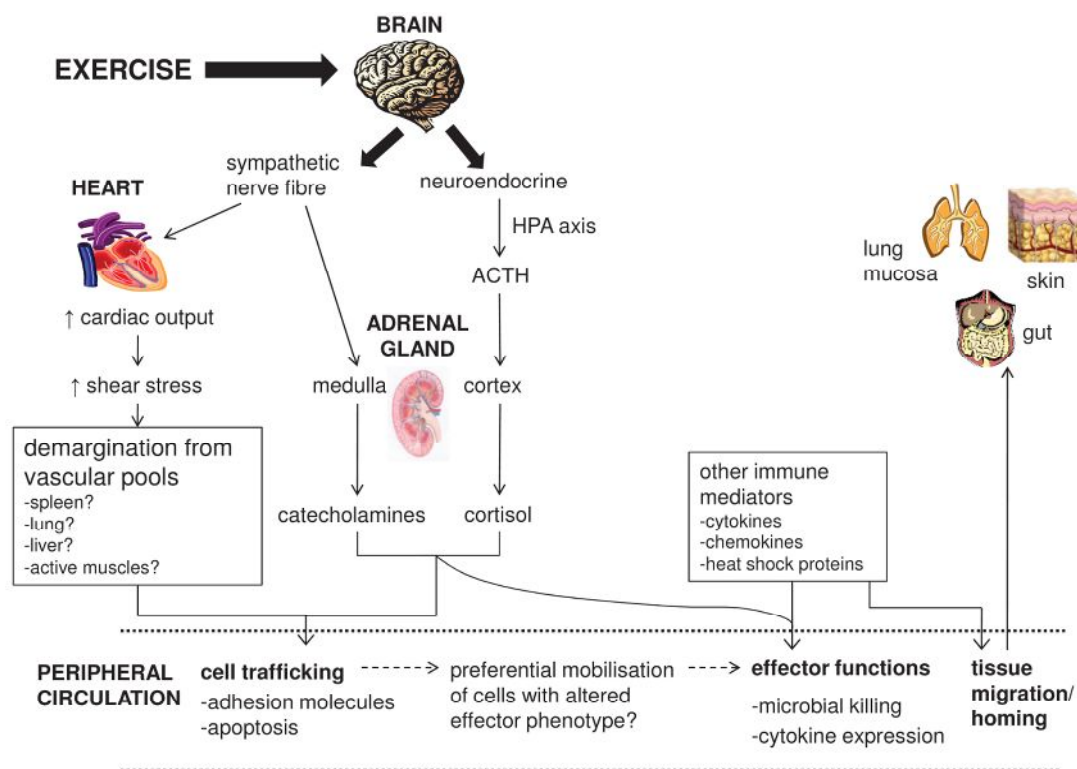
Macrófagos podem ser isolados por lavagem peritoneal suave, em camundongos, sugerindo que elas podem não estar aderentes ou aderem de modo fraco ao tecido local (Kim, Keshava et al. 1997). Nessa condição quiescente, pesquisas recentes sugerem, em camundongos, a existência de duas populações com diferentes tamanhos, no lavado peritoneal: macrófagos peritoneais grandes (MPG), em torno de 90 %, e macrófagos peritoneais pequenos (MPP), aproximadamente 10 %, derivados da migração dos monócitos circulantes (Ghosn, Cassado et al. 2010, Davies, Rosas et al. 2011, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Essa composição pode alterar através da reação de desaparecimento de macrófagos (MDR) quando camundongos ao serem submetidos *in vivo*, por injeção intraperitoneal, ao LPS, tioglicolato ou outros agentes inflamatórios, apresentam migração da intensa maioria de MPGs, em torno de 95 %, para tecidos linfoides e omento, sofrendo apoptose ou aderindo as margens do peritônio (Barth, Hendrzak et al. 1995, Zhu, Naito et al. 1997, Ghosn, Cassado et al. 2010, Davies, Rosas et al. 2011, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015).

As células permanentes na cavidade peritoneal, os 5 % restantes de MPGs, em resposta ao invasor, produzem elevadas concentrações de NO e de partículas/células fagocitadas. Para auxiliar no combate a inflamação, monócitos circulantes são recrutados para a cavidade peritoneal, por meio de diapedese, diferenciando-se em MPPs, renovando e melhorando as condições imunológicas das células peritoneais, de acordo com a intensidade do estímulo inflamatório. Supõem-se que, ao finalizar o processo inflamatório, os MPGs retornam a cavidade peritoneal, restaurando a homeostase por intermédio de intensa proliferação (Zhu, Naito et al. 1997, Ghosn, Cassado et al. 2010, Davies, Rosas et al. 2011, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Esta proliferação, após estresse em camundongos, é diretamente influenciada pela sinalização do ácido retinoico e M-CSF, estocados no omento, os quais podem influenciar a expressão de arginase-I, enzima responsável pela produção de ureia a partir da arginina servindo como competidora imediata da NO sintase durante a produção de NO. O omento, é um tecido adiposo que conecta estômago, pâncreas, baço e cólon, contendo muitos precursores de macrófagos, formando um microambiente favorável para a diferenciação, fornecimento de novas células a cavidade peritoneal, maturação ou proliferação de macrófagos (Zhu, Naito et al. 1997, Okabe and Medzhitov 2014, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Estes fagócitos também podem migrar para os tecidos linfoides facilitando a apresentação de antígeno e o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra patógenos invasores (Cao, Lawrence et al. 2005).

Portanto, pela resposta da MDR, a migração de macrófagos peritoneais e monócitos circulantes pode representar uma resposta orgânica benéfica que resulta na ativação e regulação de funções de macrófagos peritoneais (Zhu, Naito et al. 1997, Ghosn, Cassado et al. 2010, Davies, Rosas et al. 2011, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Aliás, nessas situações de estresse, uma redistribuição de células imunológicas a partir de compartimentos corporais é essencial para a efetiva vigilância e função imunológica. Afinal, não é à toa, que existe uma inervação por fibras e terminais catecolaminérgicos em todos os órgãos imunológicos. Pois, via catecolaminas, há mobilização das células imunológicas da corrente sanguínea e reforço no tráfego de subpopulações específicas para fora do sangue, em vias de vigilância tecidual, tecidos linfoides secundários e locais de inflamação. Assim como na resposta à infecção ou inflamação, esses processos também são aplicados aos efeitos do exercício na função e distribuição das células imunológicas, visto que as alterações endócrinas causadas pelo estresse são similares as do exercício (Nance and Sanders 2007, Dhabhar, Malarkey et al. 2012).

### 1.1 Sistema imunológico e exercício físico

Uma simples sessão de exercício, independente do tipo, duração e intensidade, pode induzir no sistema imunológico um aumento dos níveis de leucócitos circulantes (Malm, Nyberg et al. 2000, Starkie, Rolland et al. 2001, Natale, Brenner et al. 2003, Zaldivar, Wang-Rodriguez et al. 2006) enquanto que a secreção de catecolaminas (agindo direto na interação célula-célula) e o desprendimento de células do endotélio vascular estão relacionados com esta elevação durante a sessão de exercício físico (Rhind, Gannon et al. 1999, Woods, Lu et al. 2000), estando positivamente correlacionado à intensidade do exercício, via maior estresse de cisalhamento intravascular (Natale, Brenner et al. 2003). Em virtude desse aumento dos níveis celulares, nas horas subsequentes ao final desta série de exercício há uma redistribuição de células. As contagens celulares circulantes voltam aos valores de repouso e o excedente é direcionado para tecidos e órgãos linfóides (Fig. 1). Apesar de pouco pesquisada na fisiologia do exercício, esta migração celular parece ser importante para a vigilância imunológica, promovendo comunicação entre células, adequada resposta ao estímulo (Walsh, Gleeson et al. 2011, Dhabhar, Malarkey et al. 2012, Kruger, Lechtermann et al. 2008) e aumento da capacidade de resposta nos compartimentos imunológicos, protegendo o microambiente celular.



**Fig. 1. Mecanismos desencadeados pelo exercício agudo que afetam o sistema imunológico. Fonte: Walsh, 2011.**

Por outro lado, diversos pesquisadores acreditam na participação do cortisol no aumento do tráfego e nas funções das células imunológicas na situação de exercício físico (Walsh, Gleeson et al. 2011). Esta parece não ser verdadeira quando relacionada à ativação de monócitos/macrófagos em uma sessão aguda de exercício físico, principalmente de alta intensidade uma vez que, há somente um pequeno aumento na concentração de cortisol, podendo até mesmo ser confundida por variações diurnas normais nas concentrações hormonais (Hoffman-Goetz and Pedersen 1994, Bornstein and Chrousos 1999).

Macrófagos são ativados de forma rápida quando surge uma infecção no organismo e buscam a redução do crescimento ou eliminação do invasor microbiano, existindo resposta mais efetiva destas células quando o indivíduo realiza exercício físico de carga moderada. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstraram que monócitos circulantes de ratos, submetidos a exercício agudo de intensidade moderada e coletados em seguida após o término do esforço, apresentaram aumentos no número de partículas fagocitadas, liberação de peróxido de hidrogênio e NO (avaliado pela capacidade de produção de nitritos em incubações de 1 h) e expressão de iNOS, concebível pelo aumento de catecolaminas circulantes que ativam o monócito via NF- $\kappa$ B a produzirem TNF- $\alpha$ , que continua ativando o monócito/macrófago, numa estimulação autócrina de retroalimentação positiva (Silveira, Rodrigues et al. 2007, da Silva Rossato, Krause et al. 2014).

Células de Kupffer, macrófagos alveolares e monócitos circulantes de roedores submetidos a uma sessão aguda de exercício físico de moderada ou alta intensidade, apresentaram fagocitose aumentada logo após a sessão de exercício físico (Su, Chen et al. 2001, Sugiura, Sugiura et al. 2001, Yano, Kinoshita et al. 2004, Scholer, Marques et al. 2016), não havendo distinção por gênero ou idade (Ferrandez and De la Fuente 1999). Entretanto, nas horas subsequentes ao esforço físico de alta intensidade, parece ocorrer uma resposta imunológica anti-inflamatória compensatória com redução nas respostas de macrófagos e linfócitos T<sub>helper</sub>, como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) induzida pelo exercício, podendo ser responsável por imunossupressão sustentada e transitória, ao contrário da intensidade moderada. Muitos fatores conhecidos e similares podem estar envolvidos na SIRS induzida pelo exercício ou trauma, como hipóxia, estresse hormonal, metabólico e oxidativo, os quais aumentam a liberação de citocinas e consequente, inflamação (Vassilakopoulos, Zakynthinos et al. 1999, Shephard 2001, Fehrenbach and Schneider 2006, Scholer, Marques et al. 2016).

Agravando ou complementando este quadro de SIRS, o exercício intenso promove pequenas lesões nas paredes da mucosa intestinal ocasionadas por modificações na permeabilidade da membrana intestinal, liberando altas quantidades de LPS na circulação portal (Yano, Kinoshita et al. 2004). Contudo, esse tipo de resposta endotoxêmica e de SIRS estão associados com formas extremas de exercício físico como maratonas ou *ironman*, pois, em geral, o efeito do exercício é considerado anti-inflamatório (Lancaster and Febbraio 2014), pelo menos quando realizado cronicamente.

Auxiliando na sinalização, citocinas pró-inflamatórias e NO aumentam no exercício físico e alertam as demais células imunológicas do perigo iminente e estabelecido (Connolly, Caiozzo et al. 2004). Entretanto, ao longo do período de recuperação, há queda das concentrações dessas citocinas, sendo que a resposta de recuperação do organismo depende da intensidade/duração do esforço físico, ou seja, quanto mais intenso/longo for o exercício físico e quanto maior for o estresse orgânico, maior tempo de recuperação será exigido a fim de estabilizar de novo a homeostase (Ostrowski, Rohde et al. 1999). Para equilibrar este desbalanço, os mecanismos dos componentes da resposta anti-inflamatória, apesar de ainda não estarem totalmente claros, podem estar relacionados à estimulação associada ao exercício em humanos de IL-1ra, sTNF-r1, sTNF-r2, IL-10, IL-6, HSP70 intracelular, DUSP e outros mediadores que podem agir desativando as MAPKs ou vias de proteínas cinases ativadas pelo estresse com o organismo buscando dessa forma, uma diminuição da magnitude e da duração da resposta inflamatória ao exercício físico (Ostrowski, Rohde et al. 1999, Connolly, Caiozzo et al. 2004, Kizaki, Takemasa et al. 2008).

Dessa forma, parece existir concordância geral de que níveis moderados de exercício ou mesmo treinamento possam estimular por completo as defesas imunológicas, enquanto treinamento severo ou extenuante pode suprimir defesas imunológicas contra infecções virais e bacterianas (Nieman 1997). Suspeitamos que os prováveis protagonistas desse perfil divergente possam ser catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, pois, devido: (A) a rede de inervação simpática em torno de órgãos linfoides (Nance and Sanders 2007); (B) a síntese de catecolaminas pelas próprias células imunológicas (Josefsson, Bergquist et al. 1996, Brown, Meyers et al. 2003) (Flierl, Rittirsch et al. 2009); e (C) diversos estudos demonstrando seus efeitos pró e anti-inflamatórios sobre essas células. Logo, não deve ser uma simples coincidência a ocorrência de todos esses fatores associados a presença de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos em macrófagos e nas demais células do sistema imunológico (Elenkov and Chrousos 1999, Nance and Sanders 2007, Flierl, Rittirsch et al. 2009).



## 1.2 Receptores adrenérgicos em macrófagos

Macrófagos contêm receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , apresentando diferentes sensibilidades às catecolaminas e segundos mensageiros. O receptor  $\alpha_1$  apresenta maior afinidade pela noradrenalina e ativa a fosfolipase C (PLC) e proteína cinase C (PKC), o  $\alpha_2$  também possui preferência pela noradrenalina, agindo via inibição do acúmulo de AMPc e ativação de PLC. O receptor  $\beta_1$  apresenta igual afinidade por ambas catecolaminas e ativa a produção de AMPc, enquanto que o  $\beta_2$  possui maior afinidade pela adrenalina e também ativa a produção de AMPc (Ignatowski, Gallant et al. 1996, Della Rocca, van Biesen et al. 1997, Nakamura, Johns et al. 1999, Sigola and Zinyama 2000, Grisanti, Woster et al. 2011). Desta forma, as respostas do macrófago dependerão do adrenérgico, do receptor envolvido e o segundo mensageiro.

Receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico de células mononucleares do sangue periférico, quando estimulados por noradrenalina, ativam PLC e, logo após, PKC, apresentando ativação preferencial de ERK2 via fosforilação de tirosina em relação à ERK1, levando a indução de citocinas pró-inflamatórias (Roupe van der Voort, Kavelaars et al. 2000). Em situações de repouso e exercício, há aumento no potencial fagocítico, produção de nitritos e expressão de iNOS e HSP70, resultados estes obtidos pela utilização de bloqueadores adrenérgicos para o receptor  $\alpha_1$  (da Silva Rossato, Krause et al. 2014).

Nos receptores  $\alpha_2$ , a ativação por agonistas e/ou noradrenalina, promove aumentos proteico e da expressão de TNF- $\alpha$ , além da produção de intermediários reativos ao oxigênio, quando as células são expostas ao LPS, causando inibição na formação de AMPc (Ignatowski, Gallant et al. 1996, Ignatowski, Kunkel et al. 2000, Gosain, Muthu et al. 2007), o qual eleva a produção de nitritos (Zinyama, Bancroft et al. 2001), provável pela via da fosfolipase C. Porém, Maes e colaboradores (Maes, Lin et al. 2000) descrevem o efeito inibitório promovido por  $\alpha_2$ -adrenoreceptores agonistas na secreção de TNF- $\alpha$  e elevação nas concentrações de IL-1ra.

A ativação de receptores  $\beta$  promove aumentos nas concentrações intracelulares de AMPc e, conseqüente ativação da proteína cinase A (PKA), diminuindo proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK-p38), e promovendo a diminuição ou bloqueio do Fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), em sua ativação e translocação nuclear, levando à resistência antiviral, aumento no poder fagocítico, quimiotaxia, IL-10 e IL-6 e diminuição da produção de IL-8, IL-12, Proteína inflamatória macrófágica 1 (MIP-1), NO, peróxido de hidrogênio, IFN- $\gamma$ ,

TNF- em macrófagos após o estresse imposto, apesar de ocorrer acúmulo de RNA mensageiro de TNF- (Ignatowski, Gallant et al. 1996, Hasko, Shanley et al. 1998, Farmer and Pugin 2000, Straub, Mayer et al. 2000, Zinyama, Bancroft et al. 2001, Muthu, He et al. 2010, Henricks, van Esch et al. 1986, Hasko, Shanley et al. 1998, Kohut, Davis et al. 1998, Mastorakos, Pavlatou et al. 2005, Kondomerkos, Kalamidas et al. 2006, Kizaki, Shirato et al. 2009), visando diminuir a robusta liberação de citocinas pró-inflamatórias, pois o balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias também determina a consequente resposta imunológica (Feng, Wang et al. 2002).

A ativação isolada de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos por agonistas adrenérgicos, promove elevação na regulação de mRNA e de concentração proteica de IL-1 e IL-6, via estimulação de ERK1/2 e MAPK p38, independentes de PKA (Tan, Nackley et al. 2007), embora outros autores demonstrem elevações nas concentrações de AMPc, em macrófagos (Gosain, Muthu et al. 2007). Portanto, receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos parecem ativar vias pró-inflamatórias de monócitos/macrófagos enquanto que receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos exercem funções opostas, sinalizando um perfil anti-inflamatório a fim de reduzir a inflamação (Barnes, Carson et al. 2015).

Observamos dessa forma, clara polarização de macrófagos promovida por catecolaminas, visto que há um fenótipo ativado, pró-inflamatório, com elevadas produção de NO e expressão de iNOS quando as células são expostas a adrenalina ou noradrenalina (Chi, Qui et al. 2003), e perfil oposto, anti-inflamatório, denominado alternativo, mediado por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no qual estas células aumentam a expressão de IL-4, IL-10 e arginase-I e diminuem a expressão de iNOS e IL-12 (Barnes, Carson et al. 2015)

### **1.3 Macrófagos ativados e alternativos**

A mesma classificação da resposta de linfócitos, perfil  $T_{H1}/T_{H2}$ , é utilizada para determinar o fenótipo de macrófagos. Assim, são divididos em macrófagos clássicos ou fenótipo *killing/fighting* (M1) e macrófagos alternativos ou fenótipo *healing/fixing* (M2), sendo classificados pela rota metabólica intracelular de arginina. Ambos metabolizam arginina, via iNOS (M1) ou hidrolisam arginina via arginase-I (M2), enzimas extensivamente conservadas durante a evolução (Nussler, Billiar et al. 1994, Mills, Thomas et al. 2014, Rath, Muller et al. 2014).

O perfil M1 apresenta efeitos antiproliferativos e microbicidas através da iNOS, que reduz seu átomo de nitrogênio para a formação do NO e citrulina, principais produtos, além

de NOHA (Nussler, Billiar et al. 1994, Bansal and Ochoa 2003, Mills, Thomas et al. 2014, Rath, Muller et al. 2014). A produção de óxido nítrico é dependente da concentração intracelular de arginina, sendo este aminoácido o fator limitante para a atividade enzimática da iNOS. Este gás é um agente celular protetor. Todavia, em grandes quantidades, pode inibir a replicação de linfócitos e respiração mitocondrial, induzindo apoptose nestas células. Além disso, em combinação com superóxido, este gás pode formar peroxinitrito, uma espécie bastante tóxica ao próprio macrófago e células vizinhas (Mills 2001, Mori 2007, Rath, Muller et al. 2014, Weinberg, Sena et al. 2015).

Embora algumas isoformas de NOS sejam expressas de modo constitutiva e dependentes de cálcio, a NOS expressa em macrófagos de mamíferos, iNOS, é independente de cálcio, pode ser inibida pela excessiva produção de NO, além de ser induzida por citocinas (Nussler, Billiar et al. 1994, Chang, Liao et al. 1998), como TNF- $\alpha$ , IL-12 e -18 e IFN- $\gamma$ . Esta última é produzida por linfócitos T, macrófagos ou células NK e constitui-se como o estímulo mais potente, em macrófagos de roedores, a produzir NO via iNOS (Mills 2001).

Macrófagos em perfil M1 mostram altos níveis de glicólise e absorção de glutamina na presença de oxigênio, altas produções de ácido láctico e succinato e baixo consumo de oxigênio, quando relacionado a macrófagos quiescentes, sugerindo um elevado metabolismo glicolítico (Pearce and Pearce 2013, Ganeshan and Chawla 2014, Covarrubias, Aksoylar et al. 2015, Weinberg, Sena et al. 2015). A diminuição na respiração mitocondrial parece ocorrer por bloqueio na cadeia transportadora de elétrons, promovido pela produção de NO mediado por iNOS, facilitando a produção de EROs na defesa do hospedeiro (Pearce and Pearce 2013, Ganeshan and Chawla 2014, Covarrubias, Aksoylar et al. 2015, Weinberg, Sena et al. 2015).

Além disso, tanto glicólise (via das pentoses-fosfato), como glutaminólise (via lançadeira malato-aspartato e malato desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup>) contribuem para a síntese de NADPH, necessária para a geração de EROs, pelo sistema NOX, e riboses, necessárias para a síntese de RNA e DNA (Ganeshan and Chawla 2014), tanto para a proliferação celular quanto para a síntese de novas proteínas, necessárias para a resposta imunológica.

Entretanto, ao mesmo tempo em que as células são ativadas por determinados estímulos, há a indução de vários genes relacionados com a proteção dos macrófagos situados neste microambiente muito tóxico, protegendo e, aparentemente, preparando as células para o fenótipo M2. Dentre esses candidatos, poderíamos destacar a arginase I, reconhecida pelo seu

papel proliferativo celular, e as HSP70s. As HSPs são proteínas com grande conservação durante a evolução que apresentam aumentos em seu conteúdo intracelular, quando as células são desafiadas a diversos fatores estressantes (King, Lin et al. 2002, Calini, Urani et al. 2003, Padmini, Uthra et al. 2011). As elevadas concentrações de HSP70 no citossol celular promovem citoproteção, indução de mecanismos antiapoptóticos da célula, modulação da progressão do ciclo celular, ação anti-inflamatória, auxílio no reparo de proteínas danificadas e na degradação de proteínas danificadas de forma irreversível (Simar, Malatesta et al. 2004, Asea 2007). Contudo, ao ser secretada para o meio extracelular, assim como outras citocinas, estimula receptores de macrófagos, os quais deflagram a resposta inflamatória, sendo portanto considerada molécula imunomoduladora (Kovalchin, Wang et al. 2006, Calderwood, Theriault et al. 2007).

Por outro lado, macrófagos M2 apresentam grandes concentrações intracelulares de arginase I e/ou II proporcionando efeitos opostos ao do perfil M1, agindo em reparo e proliferação tecidual (Mills, Thomas et al. 2014), após estímulo estressor, sendo ornitina e ureia os produtos principais da hidrólise da arginina, além de poliaminas e prolina (Nussler, Billiar et al. 1994, Bansal and Ochoa 2003, Mills, Thomas et al. 2014, Rath, Muller et al. 2014). Ornitina, pode ser convertida a putrescina por Ornitina descarboxilase (ODC) e depois para poliaminas, que são solicitadas para a replicação do DNA e proliferação e diferenciação celular. Além disso, ornitina via Ornitina aminotransferase (OAT) é também um precursor de L-<sup>1</sup>-pirrolina-5-carboxilase (P5C) que gera prolina, um componente do colágeno utilizado no reparo tecidual ou atua como uma matriz que pode promover uma replicação celular (Wu and Morris 1998, Mills 2001, Rath, Muller et al. 2014).

Ativando este perfil há as citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  1 e IL-4, -13 e -10, podendo estimular a via da arginase pelas suas duas isoformas, apesar de a arginase-I apresentar mais estudos comprobatórios (Munder, Eichmann et al. 1999, Mills 2001, Rodriguez-Prados, Traves et al. 2010, Rath, Muller et al. 2014). Dessa forma, ambas isoformas I e II, são expressas em macrófagos, catalisando a mesma reação química mas, são diferenciadas na expressão celular, regulação e localização subcelular (Mills 2001, Munder 2009), pois arginase I é citosolólica enquanto arginase II é mitocondrial e apresenta 59 % de similaridade com o tipo I (Mori 2007, Munder 2009).

Macrófagos alternativos exibem alto consumo basal de oxigênio, induzido por IL-4 ativando o ativador de transdução de sinal e transcrição 6 (STAT6) que induz o coativador 1

do receptor gamma ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 ) resultando em biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos (Weinberg, Sena et al. 2015), sugerindo que macrófagos M2 requeiram AMPK como estimulador da oxidação de ácidos graxos. Estes obtidos no compartimento lisossomal interno, algo lógico em virtude da proximidade da mitocôndria (Pearce and Pearce 2013, Weinberg, Sena et al. 2015).

Além disso, estudos descrevem a liberação de arginase para o meio extracelular visando o diminuir o consumo de arginina, reduzindo este substrato e evitando possíveis proliferações de micro-organismos presentes. Dessa forma, mantém uma ação inflamatória, mesmo na ausência da produção de óxido nítrico, o qual é reduzido por ser muito nocivo as células. Portanto, arginase é caracterizada por funções contraditórias, assim como HSP70, pois sua exportação caracteriza fenótipo citotóxico, enquanto que um aumento intracelular denota perfil anti-inflamatório, visando a proliferação celular. Independente da função a ser realizada, quando arginase é induzida, o metabolismo de arginina é direcionado para ela, influenciando de modo negativo a atividade de iNOS, que é dependente de arginina (Schneider and Dy 1985, Gotoh and Mori 1999).

Ambos os fenótipos de macrófagos são atuantes em locais de inflamação disputando o protagonismo do cenário e o consumo de arginina: primeiro há a ativação de M1 com elevada liberação de NO, peróxido de hidrogênio e superóxido e fagocitose, objetivando a esterilização do local e dependendo da intensidade da resposta, pode ocorrer ou não a liberação de arginase I para o meio extracelular. Concluído este processo, a liberação de NO espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio (ERON) é suspensa, ocorrendo uma supremacia na atividade de arginase I, resultando em proliferação e restauração da população celular, destacando-se como fenótipo característico de M2 (Gotoh and Mori 1999, Mills, Thomas et al. 2014).

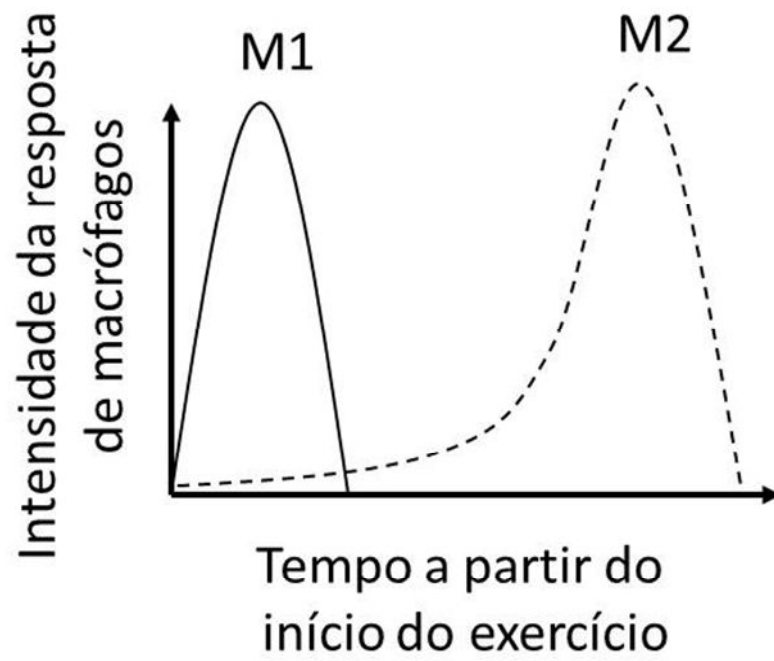
Interessantemente, esse parece ser o mesmo cenário estabelecido durante e após o término, a longo prazo, de uma sessão aguda de exercício físico de intensidade moderada (fig. 2). Ao nosso conhecimento, parece não existirem evidências e esclarecimentos a respeito da indução destes perfis com o estímulo do exercício físico. Contudo, podemos constatar ativação e desativação desta célula, determinando a finalização de um fenótipo para o início do outro (Vassilakopoulos, Zakyntinos et al. 1999, Shephard 2001, Fehrenbach and Schneider 2006, Silveira, Rodrigues et al. 2007, da Silva Rossato, Krause et al. 2014), inclusive no exercício intenso (fig. 3). Nesta situação, há uma potente estimulação celular

(M1), proporcional à intensidade do exercício físico, a qual parece apresentar uma redução no tempo de ativação celular e estabelecimento do perfil M2 após um longo período da resposta celular inicial.

Dentre os diferentes hormônios, citocinas e modificações metabólicas causadas pelo exercício físico, acreditamos que adrenalina e noradrenalina sejam os principais responsáveis pela alteração de perfil do macrófago, via seus receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos.



**Figura 2.** Possíveis respostas ao longo do tempo dos perfis M1/M2 pelo efeito do exercício físico de intensidade moderada. Fonte: a autora.



**Fig. 3.** Possíveis respostas ao longo do tempo dos perfis M1/M2 pelo efeito do exercício físico de alta intensidade. Fonte: a autora.

## **2 PROBLEMA DA PESQUISA**

Como diferentes intensidades de exercício físico agudo afetam o perfil inflamatório de macrófagos residentes no peritônio de rato pela modulação do sistema nervoso simpático?



### **3 OBJETIVOS:**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Investigar o efeito de uma sessão aguda de exercício físico em ratos sedentários, com diferentes intensidades, sobre parâmetros característicos de macrófagos peritoneais inflamatórios e a possível mediação adrenérgica.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

**A)** Descrever os efeitos agudos das diferentes intensidades de exercício físico associadas a bloqueios alfa e/ou beta-adrenérgicos, nos seguintes parâmetros:

- concentrações sanguíneas de glicose e lactato;
- conteúdo de glicogênios hepático e dos músculos gastrocnêmios;
- atividade funcional de macrófagos peritoneais pela análise da capacidade fagocítica e produção de nitritos;
- concentrações plasmáticas de lipoperóxidos e sulfidrilas.

**B)** Detectar, por uma curva tempo-resposta, o período pós-exercício de maior resposta funcional dos macrófagos, determinada por fagocitose e capacidade de produção de nitritos (indicativo da liberação de NO em cultura), nos animais do grupo controle, sem bloqueio farmacológico;

**C)** Descrever a influência das diferentes intensidades de exercício físico associadas a bloqueios alfa e/ou beta-adrenérgicos no tempo, pós-exercício, em que as células apresentaram maior resposta funcional, nos seguintes parâmetros:

- atividade funcional de macrófagos peritoneais determinada pela capacidade fagocítica e produção de nitritos;

- concentrações plasmáticas de lipoperóxidos e sulfidrilas;
- concentrações intracelulares de HSP70 (índice de estresse celular e bloqueadora da expressão de iNOS), de iNOS (enzima que retrata a ativação do processo inflamatório), de arginase I (enzima que compete com a iNOS pelo consumo de arginina intracelular), e do normalizador  $\alpha$ -actina em macrófagos peritoneais;
- expressão dos RNAs mensageiros para HSP72, HSP73, Arginase I, iNOS e GAPDH dos macrófagos peritoneais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da pesquisa

Este estudo caracterizou-se por ser experimental (in vivo), com grupos controle e exercício para as diferentes intensidades de exercício físico aeróbio (natação), de efeito agudo e subagudo, com aplicação de fármacos.

### 4.2 Local de realização

Este projeto teve origem no Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano (PPGCMH) da Escola de Educação Física (ESEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) no Campus Central desta universidade (Avenida Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170).

### 4.3 Características especiais relacionadas à biossegurança

O Laboratório de Fisiologia Celular (FisCel) da UFRGS dispõe de uma área total de **112 m<sup>2</sup>** e conta com várias áreas isoladas, para procedimentos específicos, estando dividido em um laboratório de procedimentos bioquímicos comuns (24 m<sup>2</sup>), uma área reservada a experimentos com biologia molecular e qRT-PCR (PCR em tempo real, 9 m<sup>2</sup>), uma câmara escura destinada a estudos de quimiluminescência, revelações fotográficas e microscopia de fluorescência (3 m<sup>2</sup>), um laboratório de procedimentos com animais (24 m<sup>2</sup>), duas salas de cultura celular com nível de biossegurança classe 2 (NB-2, CBQ classe II, 10 m<sup>2</sup> cada), uma área de preparação de rações animais (5 m<sup>2</sup>), um setor de autoclavagem e lavagem de materiais (5 m<sup>2</sup>), biotério específico para camundongos nocaute ou geneticamente modificados (10 m<sup>2</sup>), uma secretaria (8 m<sup>2</sup>), uma sala de seminários própria e uma copa com centro de convivência integrado à sala de estudos (24 m<sup>2</sup>).

O laboratório atende às especificações para área de **biossegurança** com nível **NB-2** contando com piso em manta de poliuretano hospitalar soldado liso com cantos arredondados, possuindo pias com acionamento por pedal nas entradas das salas de cultura (antessalas) e nas áreas de acesso aos laboratórios principais. Possui certificação para o sistema de gases (nitrogênio, gás carbônico e GLP que ficam em uma central externa ao prédio com tubulação dedicada apenas ao laboratório), sistema de proteção contra incêndio, chuveiro de proteção com lava-olhos, iluminação de emergência e para manipulação de radioquímicos e sistema de condicionamento de ar, além de rede elétrica com gerador próprio para todo o laboratório

(com autonomia para 10 horas com um tanque de diesel) e no-break (com autonomia de 2 horas) destinado aos principais circuitos evitando, assim, situações de emergência em caso de pane elétrica na rede pública.

O laboratório conta com uma Área de Lavagem e Esterilização que dispõe de um funcionário responsável pela sua operacionalidade.

Além das autoclaves, a Central também dispõe dos seguintes equipamentos e materiais: desionizador, sistema de água nanopura (MilliQ), destilador e bidestilador de água, fornos de esterilização e secagem, máquina de lavar louça, esterilizador ultravioleta de placas, condicionadores de ar, lavadores de pipetas, pias e bancadas.

#### **4.4 Equipamentos de biossegurança**

Cabines de fluxo laminar vertical; autoclaves e fornos de esterilização. Chuveiro de segurança com dispositivo para lavagem de olhos encontra-se no corredor de acesso ao Laboratório. Todo pessoal utiliza avental padronizado do laboratório, luvas, pró-pés e óculos de proteção, quando estes dois últimos itens são obrigatórios às atividades laboratoriais.

#### **4.5 Cálculo amostral**

Conforme recomendação do *National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research* (Reino Unido) utilizamos testes-piloto para determinar de modo adequado o número amostral em cada intervenção. Visto que até então não houve pesquisas utilizando macrófagos peritoneais coletados de ratos Wistar, machos, 60 dias e realizando exercício físico para que pudéssemos utilizar como parâmetro para o cálculo amostral.

Dessa forma, no primeiro momento da pesquisa, tempo 0 h, realizamos um teste-piloto com os animais em repouso e com as intensidades moderada e exaustiva. Estes foram mortos logo após o exercício, coletadas as células e analisadas para fagocitose, uma das principais variáveis do estudo. Utilizamos 18 animais, 6 por grupo, garantindo um poder estatístico de 85 % para um nível de significância de 0,05 %.

Após esta avaliação inicial, determinamos um número de 6 animais por grupo para os outros bloqueios testados com as mesmas intensidades de exercício. Dessa forma, na primeira situação experimental utilizamos 108 animais no repouso e nas 2 intensidades de exercício físico com 5 bloqueios farmacológicos e 1 controle.

Para a curva tempo-resposta utilizamos 54 animais, pois consideramos apenas 3 tempos, 6, 12 e 24 h, com o repouso e as 2 intensidades de exercício físico, uma vez que o tempo 0 h foi obtido na primeira situação experimental. Utilizando 4 animais por grupo obtivemos um poder estatístico de 92 % para um nível de significância de 0,05 %, no tempo que apresentou maior resposta na variável fagocitose, uma das principais variáveis do estudo, o 6 h.

Baseado no tamanho amostral da curva tempo-resposta, mínimo de 4 animais por grupo, utilizamos na última situação experimental 90 animais referente ao repouso e as 2 intensidades de exercício físico com 5 bloqueios farmacológicos, uma vez que o controle foi obtido na curva tempo-resposta. Eventualmente, em alguns grupos foram utilizados mais de 4 animais em virtude da dispersão de dados ou perda de análises em algumas variáveis.

As três etapas do desenho experimental totalizaram 252 animais.

#### **4.6 Aprovação nos comitês e comissões de ética em pesquisa e experimentação animal**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFRGS), sob o número 23451, após prévia revisão realizada por parecerista *ad hoc* nomeado para o projeto por comissão específica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos para o uso científico de animais, estabelecidos pela Lei nº 11794, Lei Arouca (BRASIL, 2008) e pelas resoluções normativas 12 e 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2013).

#### **4.7 Animais**

Foram utilizados neste estudo, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, Var. *Albinus*), adultos (60 dias), machos de 280-300 g obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, mantidos em caixas de polipropileno (33x17x40 cm) em um ciclo de claro (iluminação artificial) /escuro de 12 h e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, contendo em torno de 52 % de carboidratos, 21 % de proteínas e 4 % de lipídeos.

Ao serem retirados do CREAL foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas durante o período mínimo de três semanas, anteriores as etapas de adaptação e experimento, já que a minimização do estresse animal foi fundamental nesta pesquisa.

#### **4.8 Manipulação dos animais**

Para evitar situações e ambientes estressantes que ativassem o sistema simpático, de modo que não fosse pelo exercício físico, realizamos cuidados extremos com os animais. Além do tempo de adaptação dos animais durante três semanas ao biotério setorial, os mesmos eram adaptados por cinco ou seis vezes, ao laboratório onde foi desenvolvido o protocolo de exercício. Assim, como durante a adaptação dos animais, realizamos os mesmos procedimentos que seriam efetuados no dia dos experimentos, com exceção da colocação de sobrecarga de exercício, coleta por punção caudal e morte por decapitação. Dessa forma, por exemplo, simulamos a aplicação dos fármacos, no abdômen do animal, com uma ponteira de 10  $\mu$ L, tempos de espera dentro da caixa, manipulação pelos diferentes pesquisadores envolvidos no experimento, etc.

Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim 1995, Kregel, Allen et al. 2006) e as condições experimentais foram as mesmas descritas em metodologias já consagradas em nosso laboratório (Schöler and Homem de Bittencourt, Silveira, Rodrigues et al. 2007, Scholer, Marques et al. 2016).

#### **4.9 Desenho experimental do estudo**

O estudo foi dividido em três etapas:

1º) Nesta etapa, utilizamos 6 situações experimentais: 1 controle e 5 com bloqueios adrenérgicos em duas intensidades de exercício físico: 4 e 8 % da massa corpórea total (MCT) e o repouso. Após a sessão de exercício, foram realizadas as medidas de lactato e glicose sanguínea. Coletados esses dados, os animais foram mortos para a obtenção de plasma, lobo inferior do fígado, gastrocnêmios e macrófagos peritoneais, além da execução das análises de fagocitose de zimosan marcado com vermelho neutro e produção de nitritos;

2º) Etapa de determinação da curva tempo-resposta. Utilizamos 4 situações temporais: 0 (imediate), 6, 12 e 24 horas após a sessão de exercício, com duas intensidades de exercício físico, a saber, 4 e 8 % da MCT como sobrecarga e o repouso. Após a morte dos animais, foram coletados plasma e macrófagos peritoneais e realizadas avaliações de fagocitose e produção de nitritos, a fim de detectar o momento de maior resposta celular;

3º) Etapa da resposta celular e expressão proteica e gênica. Utilizamos as mesmas 6 situações experimentais da etapa 1, controle e bloqueios com as duas intensidades de exercício físico acima descritas e o repouso. Os animais nadaram e após o tempo de maior

resposta celular, determinado na 2ª etapa, foram mortos para coleta de plasma e macrófagos peritoneais, para *western blotting* e qRT-PCR. Além disso, realizamos as técnicas de fagocitose e produção de nitritos nos macrófagos peritoneais.

#### 4.10. Aplicação de Bloqueadores Farmacológicos

Os animais foram separados nos seguintes grupos:

Repouso	Exercício 4 % da MCT	Exercício 8 % da MCT
Tampão Salina-fosfato	Tampão Salina-fosfato	Tampão Salina-fosfato
Bloqueadores adrenérgicos	Bloqueadores adrenérgicos	Bloqueadores adrenérgicos

Em relação aos antagonistas adrenérgicos, foram utilizados **5 grupos** experimentais neste estudo, todos diluídos em PBS:

- 1) prazosina ( $\alpha_1$ ), 1 mg/kg (Flavahan and McGrath 1980) diluída em 1 mL/kg;
- 2) ioimbina ( $\alpha_2$ ), 1 mg/kg (Flavahan and McGrath 1980) diluída em 1 mL/kg;
- 3) propranolol ( $\beta_1$  e  $\beta_2$  inespecífico), 0,5 mg/kg (Elfellah and Turnbull 1978) diluído em 1 mL/kg;
- 4) metoprolol ( $\beta_1$ ), 10 mg/kg (Hocht, Di Verniero et al. 2004) diluído em 1 mL/kg;
- 5) associação entre prazosina (1 mg/kg) (Flavahan and McGrath 1980), ioimbina (1 mg/kg) (Flavahan and McGrath 1980) e propranolol (0,5 mg/kg) (Elfellah and Turnbull 1978) diluídos em 1 mL/kg, gerando um efeito de duplo bloqueio.

No último grupo experimental, **controle**, os animais receberam volumes equivalentes de PBS aos administrados nos animais tratados, ou seja, 1 mL/kg. Vale ressaltar que nos experimentos da curva tempo-resposta os animais também receberam aplicação intraperitoneal de PBS, de modo que também pudessem ser comparados aos demais grupos.

A aplicação dos bloqueadores farmacológicos ou solução de PBS, no caso do controle, foi realizada por injeção intraperitoneal, 30 min antes da sessão de nado. Para realizar uma aplicação rápida, buscando minimizar o estresse do animal, utilizamos um volume de no máximo 1000  $\mu$ L (proporção do peso do animal com a diluição de administração

volume/massa), sendo essa quantidade aceitável pela literatura, visto que a dose máxima para aplicação em ratos por esta via é de até 20 mL/kg (Diehl, Hull et al. 2001).

#### **4.11. Protocolo de exercício físico**

A cada sessão de adaptação os animais eram habituados ao ambiente de natação em cinco sessões de 8 min, sem carga, que aconteceram nos dias anteriores ao do da sessão de exercício físico (Schöler, Marques *et al.*, 2016). Foram escolhidos de forma aleatória para o grupo repouso, permanecendo em câmaras plásticas (55 cm de profundidade, 36,2 cm de comprimento e 27 cm de largura, cada), com preenchimento de 5 cm de água  $30 \pm 1$  °C, para simulação do estresse de estar em contato com a água. Os animais que foram destinados ao exercício físico foram colocados em tanque próprio para natação, com câmaras de vidro individuais (55 cm de profundidade, 20 cm de comprimento e 20 cm de largura), preenchidas com água a  $30 \pm 1$  °C. Esta temperatura foi escolhida para evitar uma imersão em água fria ou muito quente (estresse térmico), que possa interferir nos resultados (lembrando que uma das variáveis em estudo, HSP70, é dependente da temperatura do animal), conforme já verificado em outros estudos (Niess, Dickhuth et al. 1999). Para todas as sessões de nado, os animais eram transportados do biotério até o laboratório, submetidos ao protocolo de adaptação ou exercício, secos em toalhas de pano e devolvidos ao biotério, com exceção dos animais que morreram logo após o exercício físico.

No dia do experimento pela manhã, entre 8 e 9 h, a fim de evitar concentrações hormonais elevadas de corticosterona, adrenalina e noradrenalina (De Boer and Van der Gugten 1987), ratos foram submetidos a exercício/protocolo de natação de 20 min ou até exaustão nas mesmas condições da adaptação. Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos, 4 e 8 %, sendo adicionados, como modulador da intensidade de nado, contrapeso de chumbinhos de pesca, fixados com fita adesiva à base da cauda dos mesmos, pesando 4 e 8 % da MCT de cada animal. Outros animais formaram o grupo controle (sem exercício) sendo mantidos nas mesmas condições da adaptação.

Os animais que formaram o grupo com 8 % da MCT, foram submetidos até a exaustão do exercício, conforme protocolos na literatura, sendo este momento determinado quando o animal permanecia por até dez segundos submerso e/ou apresentava a perda da coordenação motora (de Araujo, Papoti et al. 2007, Anand, Phani Kumar et al. 2012, Lima, Stamm et al. 2013). O exercício físico constituiu-se como procedimento de GRAU DE SEVERIDADE ELEVADO, por termos utilizado intensidade de exercício que leva o animal a exaustão



(apesar da aclimatação) e por ter sido um protocolo no qual foi provável que os animais experienciaram dor, sofrimento ou desconforto moderados e que provavelmente causaram prejuízos moderados no bem-estar ou condições gerais dos animais, mas com curta recuperação pois foi finalizado com a morte do animal. A administração das drogas via intraperitoneal foi caracterizada como GRAU DE SEVERIDADE LEVE.

#### **4.12 Cronometragem tempo de exaustão do grupo 8%**

Os animais do grupo 8 % foram submetidos a exercício exaustivo, cujos tempos foram cronometrados a partir da colocação do animal na água até o momento em que ele permanecia por dez segundos submersos, sem conseguir retornar a superfície pelos seus próprios esforços (Anand, Phani Kumar et al. 2012, Lima, Stamm et al. 2013).

#### **4.13 Dosagem de lactato**

Amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção na veia caudal (~ 25 µL), após a sessão de exercício físico e analisadas com o Accutrend® Plus System da Roche.

#### **4.14 Dosagem de glicose**

Amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção na veia caudal (~ 5 µL), logo após a sessão de exercício físico e analisadas com o glicosímetro One Touch® da Johnson.

#### **4.15 Morte dos animais**

Após cada período experimental e respectivos tratamentos, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, **sem anestesia**, para coleta de sangue (5 mL), macrófagos peritoneais e fígado e gastrocnêmio para a posterior realização das análises.

A sala onde os animais a serem submetidos à morte aguardavam, era distinta da sala destinada à realização da decapitação. O ambiente possuía exaustão e a sala era composta de mesa central para coleta de material e de bancada lateral com pia, sobre a qual se encontrava a guilhotina. Entre a morte de um animal e outro, a guilhotina, a pia e todo o restante do material era higienizado com água, detergente e álcool, evitando-se assim, maior estresse para os animais.

A decapitação é eficaz, pois induz a perda imediata de reflexos, provocando mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e a realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação e o **GRAU DE SEVERIDADE** para este procedimento é considerado como **SEM RECUPERAÇÃO**. A

morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, era incompatível com nossos experimentos, porque todos os principais anestésicos utilizados em estudos com animais experimentais levam a intensa hiperglicemia em roedores (Brown, Umino et al. 2005, Saha, Xia et al. 2005). Além disso, esses anestésicos interferem nas funções das células envolvidas na produção de HSP70, como os monócitos (Chang, Chen et al. 2005). Portanto, a morte dos animais foi executada sem anestesia.

Após a morte e protocolos experimentais, as carcaças dos animais foram, então, colocadas em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20 °C), destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Fisiologia Celular. Através de cronograma semanal (**quintas-feiras**), este material biológico foi encaminhado ao CREAL para aguardar, nas mesmas condições de armazenamento descritas no ítem anterior, a coleta do lixo realizada pelo **Serviço de Coleta licitado pela Universidade** onde foram autoclavados e destinados a aterros sanitários conforme a legislação em vigor.

#### **4.16 Obtenção dos macrófagos residentes peritoneais**

Após as mortes dos animais, foi injetado, na cavidade intraperitoneal, 20 mL de PBS, pH 7,4. Massageou-se o abdômen de cada animal em torno de 30 segundos, para deslocar as células da parede interna da cavidade abdominal. A pele da região abdominal foi removida, realizamos laparotomia e retiramos o fluído contendo as células, em torno de 15 mL, com pipeta de plástico *Pasteur*. Separamos as amostras em dois tubos: A) ~ 4 mL para as análises funcionais, que aguardaram em temperatura ambiente e ao término da morte dos animais foi centrifugada à 370 x g, 10 min, à temperatura ambiente. Este sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspenso em meio HBSS, pH 7,4 contendo glicose 5,5 mM e L-arginina 0,2 M. (B) Do restante dos lavados peritoneais, 1 mL foram separados para o RT-qPCR e junto com o tubo dos macrófagos aguardaram a 4 °C. O tubo com o lavado peritoneal foi preparado para western blotting iniciando com centrifugação a 500 x g, 5 minutos, 4 °C. Se a amostra apresentasse eritrócitos contaminantes, era submetida a tampão de hemólise pH 7,4, cloreto de amônia 150 mM; EDTA 0,1 mM e bicarbonato de sódio 10 mM; por 5 minutos, a 4 °C. Após este período, foi adicionado PBS e a amostra foi centrifugada a 370 x g, 5 min, 4 °C. Esse processo foi repetido até no máximo 3 vezes. Após esta hemólise ou não, os sobrenadantes foram retirados, quebrados os pellets, adicionados tampão de extração com inibidores de proteases e fosfatases, Tris HCl pH 8,0 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1 % (v/v), desoxicolato de sódio 0,5 % (m/v), SDS 0,1 % (m/v), EDTA pH 8,0 0,5 M, leupeptina 2 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, TLCK 20 µM, PMSF 100 µM, ortovanadato de sódio 1mM,

molibdato de sódio 1 mM e -glicerofosfato 1 mM. As amostras foram homogeneizadas a 4 °C com homogeneizador ultrassônico (Hielscher ultrasound) por 60 segundos, amplitude de 50 %, pulso 0,5 e congeladas em ultrafreezer – 86 °C.

#### **4.17 Análise da capacidade fagocítica pela técnica do zimosan**

Macrófagos peritoneais foram incubados com zimosan (membranas de células de *Saccharomyces cerevisiae*) (Sigma - Z4250) marcado com vermelho neutro, para analisar a função fagocítica, conforme descrito em Schöler et al., 2016.

Após a ressuspensão em HBSS, com retirada de volume para as análises de nitritos, foi adicionado 10 % de SFB e as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro, dentro de placas de 6 poços, para proceder a adesão celular, por 30 minutos em estufa aquecida a 37 °C. Ao mesmo tempo desta incubação, as partículas de zimosan marcado com vermelho neutro, preparadas anteriormente de acordo com Schöler e colaboradores (2016), foram incubadas com soro sanguíneo autólogo na proporção de volume 1:1 em banho aquecido 37 °C, sob agitação. Após este período, as partículas ( $0,4 \times 10^8$ ) foram lavadas 3 vezes com PBS e centrifugação de  $15000 \times g$ , 10 s, sendo ressuspensas em meio RPMI 1640 (R4130 – Sigma) e homogeneizadas com seringa de insulina. As células foram lavadas 3 vezes com PBS pré-aquecido 37 °C e ressuspensas em meio RPMI 1640 com adição de 10 % (v/v) de soro sanguíneo autólogo e 10 % (v/v) das partículas opsonizadas de zimosan marcadas com vermelho neutro e, de novo, submetidas a incubação em estufa aquecida por 30 min. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado, a fim de parar a função fagocítica, e as placas colocadas em gelo para aguardar posterior contagem no microscópio digital IX-81 (Olympus). Para analisar o rendimento celular, utilizamos o índice de Hishikawa (Hishikawa, Cheung et al. 1991), no qual o resultado da proporção das partículas totais fagocitadas pelo número total de células foi multiplicado pela proporção das células que fagocitaram mais de uma partícula pelo total de células e multiplicado por 100 para expressar o dado em porcentagem.

#### **4.18 Determinação da produção de nitritos**

Utilizamos a produção de nitritos por macrófagos incubados por 1 h para avaliarmos a capacidade do macrófago em produzir NO, visto que aquele é o produto de várias reações que esse sofre por estar na forma gasosa e reagir com diversas moléculas presentes no microambiente. Foi utilizada a técnica de Rossato e colaboradores, 2014, conforme descrito em Schöler et al., 2016.

Macrófagos ressuspensos em HBSS enriquecido com L-arginina 0,2 M e glicose 5,5 mM foram incubados em placas de 96 poços, durante 1 h em estufa aquecida a 37 °C, concomitante com uma curva de concentrações crescentes de nitrito de sódio. Após a incubação, coletamos o sobrenadante das amostras nas placas e centrifugamos 1000 x g por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante dos microtubos foi coletado e pipetado em novos poços, com imediata adição das soluções de Griess I e II, nas amostras e curva. A placa foi submetida à leitura espectrofotométrica em 540 nm, em leitora de microplacas (Benchmark Bio-Rad). Os dados foram expressos em nmol de NO/10<sup>5</sup> células.

#### **4.19 Dosagem de glicogênio hepático e músculo esquelético**

Após a decapitação e coleta dos macrófagos peritoneais, foi retirado o lóbulo inferior do fígado e gastrocnêmios, lavados em PBS e imediatamente congelados, com *freeze-clamp*, em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em *ultrafreezer*.

Para a mensuração do conteúdo de glicogênio, foi aplicada a técnica descrita por Van Handel (Van Handel 1965), pela qual o glicogênio é obtido após digestão tecidual com hidróxido de potássio 30 % e precipitado com etanol (1:4). Após este procedimento, o precipitado e uma curva padrão de glicogênio bovino (Sigma - G0885) sofreram hidrólise ácida com ácido clorídrico e neutralização com carbonato de sódio para liberação dos monômeros de glicose a serem medidos (Geary, Langhans et al. 1981). As amostras e a curva foram quantificadas via análise espectrofotométrica em miligrama de glicogênio/grama de tecido, utilizando kit específico para glicose Glicose Liquiform (Labtest).

#### **4.20. Dosagem de proteínas**

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford 1976), através da comparação com curva padrão, com diferentes concentrações conhecidas de albumina bovina sérica. Pela técnica, as proteínas das amostras ligam-se a solução de Bradford, Azul Coomassie Brilhante-G-250 0,01 % (m/v) em ácido fosfórico 8,5 % (m/v) e etanol 4,7 % (m/v), e este complexo formado foi analisado em leitora de microplacas a 595 nm (Benchmark Bio-Rad).

Esta etapa foi fundamental para as análises normalizadas pelo conteúdo proteico e em todo o processo de *western blotting* para determinação da expressão de proteínas nas amostras contendo macrófagos peritoneais, uma vez que quantidades iguais de proteínas foram carregadas nos géis de eletroforese.

Após o descongelamento das amostras a 4 °C, estas foram submetidas à centrifugação de 15000 x g, 4 °C por 20 min. Executada a dosagem de proteínas, as amostras foram diluídas de modo que todas apresentassem a mesma concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Adicionamos tampão de amostra desnaturante e redutor (Laemmli 1970), seguido de fervura em banho termostático (Novusa), durante cinco minutos. Com este processo, os dissulfetos das proteínas foram clivados e estas carregadas negativamente (devido à presença de SDS), permitindo a corrida das proteínas por peso molecular.

#### 4.21 Western Blotting

Quantidades iguais de proteína celular foram separadas em gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio para eletroforese (SDS-PAGE) em cuba *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 186 mM e SDS 0,1 % (m/v), pH 8,3. Utilizamos 1 cm de gel de entrada 5 % (m/v) e gel de separação 10 % (m/v) em termos de monômeros de acrilamida, para corridas nos géis com tampão de amostra redutor 5 x, contendo Tris-HCl 1 M pH 6,8, glicerol 50 % (m/v), SDS 10 % (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 10 %. Nesse mesmo gel, foi aplicado marcador de peso molecular 161-0375 (Bio-Rad), para detectar o correto posicionamento das proteínas investigadas. Após a eletroforese, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare) por eletrotransferência (100 V, 1 h 15 min) em cuba *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) com tampão de transferência contendo Tris-HCl 25 mM, glicina 1,92 M, metanol 20 % e SDS 0,037 %. A confirmação da transferência foi feita pela incubação da membrana com solução contendo Vermelho Ponceau S a 0,1 % (m/v) em ácido acético a 5 % (v/v).

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio (*blotto*) constituído de leite em pó desnatado 5 % (m/v) diluído em TBS-T [Tris 200 mM (m/v), cloreto de sódio 5 M (m/v) e Tween 20 0,05 % (m/v)], e submetidas às incubações (3 h, temperatura ambiente) com anticorpos primário, diluídos em TBS-T/albumina a 2 % (m/v), com as seguintes diluições e contra as proteínas de interesse: 1:500 HSP70 (Sigma, H5147), 1:250 iNOS (Sigma, N7782), 1:250 arginase I (Sigma, SAB2500101), 1:500  $\beta$ -actina (Santa Cruz, Sc-1616). Depois dessas incubações, as membranas foram lavadas e mais uma vez incubadas com solução, TBS-T/albumina a 2 % (m/v), contendo o segundo anticorpo marcado com peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP), nas seguintes diluições: 1: 5000 HSP70 (Sigma, A9044), 1:500 iNOS (Sigma, A0545), 1:500 Arginase I e  $\beta$ -actina (Sigma, A5420). Terminadas as incubações, as membranas foram lavadas de novo em TBS-T, e, logo

após, submetidas à solução para revelação, com 5 mL de Tris-HCl pH 8,8 contendo 22 µL de peróxido de hidrogênio (Fluka) e solução de 5 mL de Tris-HCl pH 8,8 contendo 22 µL de ácido p-coumárico (Fluka) e 50 µL de luminol (3-aminoftalidrazida, Fluka). As imagens foram captadas pelo programa ImageQuant 350 Capture (GE) e analisadas pelo programa Image Quant (GE).

#### **4.22 Reação em cadeia da polimerase em tempo real**

As células do lavado peritoneal foram coletadas no volume de 1 mL em microtubos e centrifugadas a 15000 x g, 30 s. Caso houvesse eritrócitos contaminantes, as amostras eram submetidas a tampão de hemólise conforme protocolo descrito no item 3.16. Após este processo, procedemos conforme as instruções do fabricante sendo as amostras homogeneizadas com seringa de insulina em tampão RA1 do kit para RNAm *illustra TM mRNA purification kit* (GE Healthcare) com adição de 3,5 µL de β-mercaptoetanol. Após esta etapa, as amostras eram congeladas em *ultrafreezer*.

Após o descongelamento a 4 °C, foi extraído o RNA total dos macrófagos através de kit RNAm *illustra TM mRNA purification kit* (GE Healthcare), sempre com as amostras mantidas a 4 °C. Ao final do processo, o RNA extraído foi ressuspensão em água MilliQ com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1 % (m/v). Após a extração, o RNA total das amostras foi analisado em espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare), para verificação da pureza das amostras, contaminação por proteína, presença de impurezas e concentração de RNA. Normalmente, as amostras apresentaram grau de pureza aceitável (relação de absorvância a 260 nm por 280 nm > 2) e com pouca contaminação por proteína.

A segunda etapa consistiu da conversão de RNA total para DNA complementar, através do kit para transcrição reversa de alto rendimento (Applied Biosystems). Até 1 µg de RNA total das amostras foi adicionado em solução contendo tampão, nucleotídeos e a enzima transcriptase reversa e submetidos a ciclo termal para realizar a transcrição reversa: 1°) 25 °C 10 min, 2°) 37 °C 120 min, 3°) 85 °C 5 min em termociclador (MX3005-P Stratagene). Após este ciclo, as amostras foram congeladas.

A última etapa foi o qPCR propriamente dito, onde as amostras foram colocadas em microtubos, na concentração de 640 ng/poço, sendo também adicionados Brilliant II SYBR Green QPCR *master mix*, corante de referência ROX (Stratagene), *primers forward* e *reverse*, para cada gene de interesse nas concentrações abaixo descritas, e água ultrapura com DEPC. Utilizou-se como protocolo, para todos os primers, para reação em cadeia da

polimerase em tempo real: desnaturação 1 ciclo 10 min 95 °C, anelamento e extensão 50 ciclos 30 s 95 °C/30 s 60 °C e para temperatura de dissociação 1 min 95 °C, 30 s 55 °C e 30 s 95 °C.

Como parâmetros de análise utilizamos o programa (Mx-Pro Stratagene) para quantificar o ciclo limiar (Cycle Threshold, CT), ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial permitindo a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência do reagente SYBR® Green (Stratagene), um reagente que fluoresce quando se liga de modo específico à fita dupla do DNA, adicionado à reação. Determinado o Ct, utilizamos como cálculo o método  $Ct$  ( $Ct = Ct_{RNA\ alvo} - Ct_{RNA\ controle\ endógeno}$ ). Além disso, os *primers* utilizados foram avaliados para a especificidade do produto e possíveis contaminações de outros genes. Assim, seguem abaixo as informações desses *primers*:

**Tabela 1. Informações sobre os primers utilizados no qRT-PCR.**

Gene de interesse	Primer (F/R)	Temperatura de anelamento	Concentração no poço
HSP72 (HSPA1A)	Forward: 5' – GCT GCG GAT CAT CAA CG – 3' Reverse: 5' – GCT GCG GAT CAT CAA CG – 3'	Forward: 54,1 °C Reverse: 56,3 °C	500 nM
HSP73 (HSPA8)	Forward:: 5' – GAT TTG CTG CTC TTG GAT GTC – 3' Reverse: 5' – GCT TGA TGA CGA CAG TCATGA C – 3'	Forward: 54,2 °C Reverse: 55,6 °C	500 nM
iNOS	Forward: 5'-CAA CAT CCT GGA GGA AGT GG -3' Reverse: 5'-GGT CCA TGA TGG TCA CAT TCT-3'	Forward: 58 °C Reverse: 63 °C	500 nM
Arginase I	Forward: 5' GTG GGA AAA GCC AAT GAA CAG C 3' Reverse: 5' ATC CAC CCA AAT GAC GCA TAG G 3'	Forward: 55 °C Reverse: 55 °C	300 nM

GAPDH	Forward:	Forward:	500 nM
	5'-AGT GCC AGC CTC GTC TCA TAG-3'	58,7 °C	
	Reverse:	Reverse:	
	5'-TGA CTG TGC CGT TGA ACT TGC-3'	58,5 °C	

#### 4.23 Avaliação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico plasmáticas (TBA-RS)

Como estimativa de lipoperoxidação sistêmica, avaliou-se a produção TBA-RS, uma medida indireta do MDA (Ohkawa, Ohishi et al. 1979), uma espécie química que sempre é gerada quando ocorre lipoperoxidação. O ácido tiobarbitúrico reage com aldeídos formando bases de Schiff, cuja coloração rosada pode ser mensurada por espectrofotômetro a 532 nm.

Os plasmas destinados para essas análises receberam 4,5 mM de BHT diluído em etanol para evitar novas oxidações. Os microtubos eram congelados em ultrafreezer e a técnica era realizada nos dias seguintes ao do experimento.

Nesta técnica, os plasmas e curva, com diferentes concentrações de MDA (Sigma - T9889), foram incubados com hidroxitolueno butilado 4,5 mM (m/v) em etanol, ácido acético 20 % (m/v) pH 3,5, SDS 8,1 % (m/v) e ácido tiobarbitúrico 0,73 % (m/v) e submetidos à fervura, durante uma hora. Ao final, as amostras e curva foram pipetadas em placas de 96 micropoços e lidas a 532 nm, em leitora de microplacas. As amostras foram normalizadas pela concentração de proteína plasmática.

#### 4.24 Avaliação dos grupos de sulfidrilas livres plasmáticas

Utilizamos a técnica de Himmelfarb e colaboradores (Himmelfarb, McMonagle et al. 2000), pela qual incubamos as amostras com tampão Tris 0,1 M/ EDTA 10 mM (m/v) em pH 8,2 e DTNB 10 mM (m/v) diluído em metanol. Os controles (brancos) para cada amostra foram preparados com todos os reagentes acima descritos, porém sem DTNB no metanol. A leitura espectrofotométrica foi realizada em leitora de microplacas em 412 nm. Após a subtração das amostras e brancos, a concentração de grupos sulfidrilas foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de  $14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e normalizados pela concentração proteica da respectiva amostra, gerando resultados expressos em  $\mu\text{mol/mL/mg}$  proteína.

#### 4.25 Disposição final de resíduos e biossegurança

Após os experimentos, restos de tecidos e carcaças de animais foram congelados e entregues ao **Serviço de Coleta** licitado pela **Universidade**. Meios de cultura celulares e



células foram colocados em garrafas de poliestireno e depois embalados em sacos apropriados, autoclavados, etiquetados como Lixo Biológico e entregues, também, **ao Serviço de Coleta da UFRGS**. Resíduos de géis de poliacrilamida e agarose (contendo brometo de etídio) foram tratados como **Lixo Químico**, coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

#### **4.26 Análises estatísticas**

Todo o tratamento estatístico e gráficos foram realizados no programa GraphPad Prisma, versão 7. Os dados foram submetidos à procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais. Em todas as análises utilizamos como medidas de uma variância o teste de ANOVA de uma via, seguido dos *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey. Optamos por esta escolha, independente da distribuição normal dos dados, por ser esta a opção adequada quando se utilizam dados com N pequeno e com diversos grupos para serem analisados juntos pelo teste de ANOVA de uma via. Esta é uma medida conveniente garantindo a robustez da análise, conforme verificada por muitos autores (Khan and Rayner 2003, Norman 2010, Krzywinski and Altman 2014). Para avaliar o efeito conjunto das variáveis intensidade e bloqueio farmacológico ou tempo, recorreremos a ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey. O nível de significância para a probabilidade de erro do tipo I no teste de hipóteses foi determinado em, no mínimo,  $p < 0,05$ .

Os dados gráficos e escritos estão expressos pelas medidas de tendência central, média, e de dispersão, erro padrão da média (média  $\pm$  EPM). A fim de facilitar a rápida compreensão e não confundir os diferentes tempos empregados, utilizamos dois tipos de gráficos: no tempo logo após o exercício, aplicamos o tradicional gráfico de coluna vertical e no tempo de 6 h, adotamos a coluna com os dados em dispersão.

#### **4.27 Apoio financeiro**

Este projeto contou com suporte financeiro do CNPq e Propesq/UFRGS.

## **5 RESULTADOS**

Conforme descrito em sessão anterior, este trabalho foi desenvolvido em três situações experimentais. Seguiremos a ordem descrita na seção de Materiais e Métodos por ser o modo como o trabalho foi desenvolvido ao longo do tempo.

Objetivando caracterizar o protocolo experimental de exercício físico, começamos mensurando parâmetros metabólicos e o tempo que o animal levou para chegar à exaustão, no grupo de alta intensidade, de modo a auxiliar na caracterização das intensidades de exercício físico.

### **5.1 Avaliação do lactato sanguíneo**

Análises de lactato plasmático constituem-se como ferramenta útil para determinação da capacidade aeróbica de um indivíduo. Em situações de repouso e exercícios de baixa intensidade, os fluxos de produção e remoção deste metabólito são equivalentes. Entretanto, em altas intensidades o acúmulo de lactato resulta em aumento na produção, sendo maior que a sua remoção (Billat, Sirvent et al. 2003). Ocasionalmente pela compensação da glicólise anaeróbica em virtude de metabolismo aeróbio insuficiente, há o acúmulo de lactato e diminuição no desempenho da contração da musculatura esquelética e assim, estabelecimento de fadiga (Abreu, Mendes et al. 2016).

A elevação nas concentrações plasmáticas de lactato, ocorrem em dois momentos, primeiro e segundo limiares ventilatórios, transição aeróbica-anaeróbica. Em humanos, adotam-se as concentrações de 2 e 4 mmol/L de lactato sanguíneo, respectivamente, para determinar as intensidades correspondentes a esta transição (Abreu, Mendes et al. 2016). Porém, estudos realizados em ratos sedentários, submetidos a uma sessão aguda de natação com sobrecarga de 5 e 6 % do peso corporal, demonstram um segundo limiar, MLSS, de 5,5 mmol/L (Gobatto, de Mello et al. 2001), portanto mais elevado que em humanos.

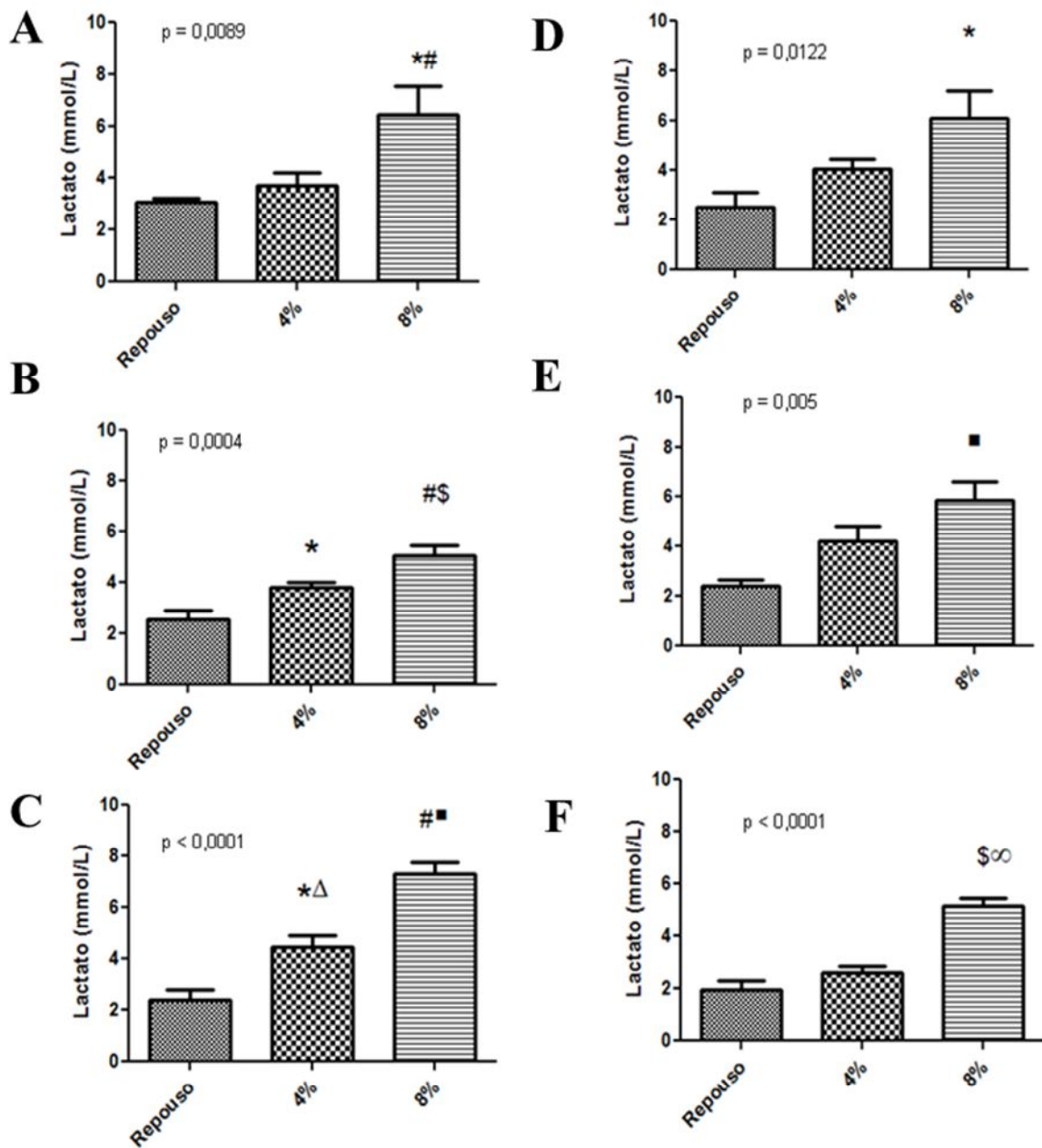


Figura 4. Avaliação do lactato sanguíneo, mmol/L, imediatamente após o exercício dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, com ação dos diferentes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol, (F) duplo bloqueio. Para determinar as diferenças estatísticas utilizamos ANOVA de uma via com post-hoc de Bonferroni.

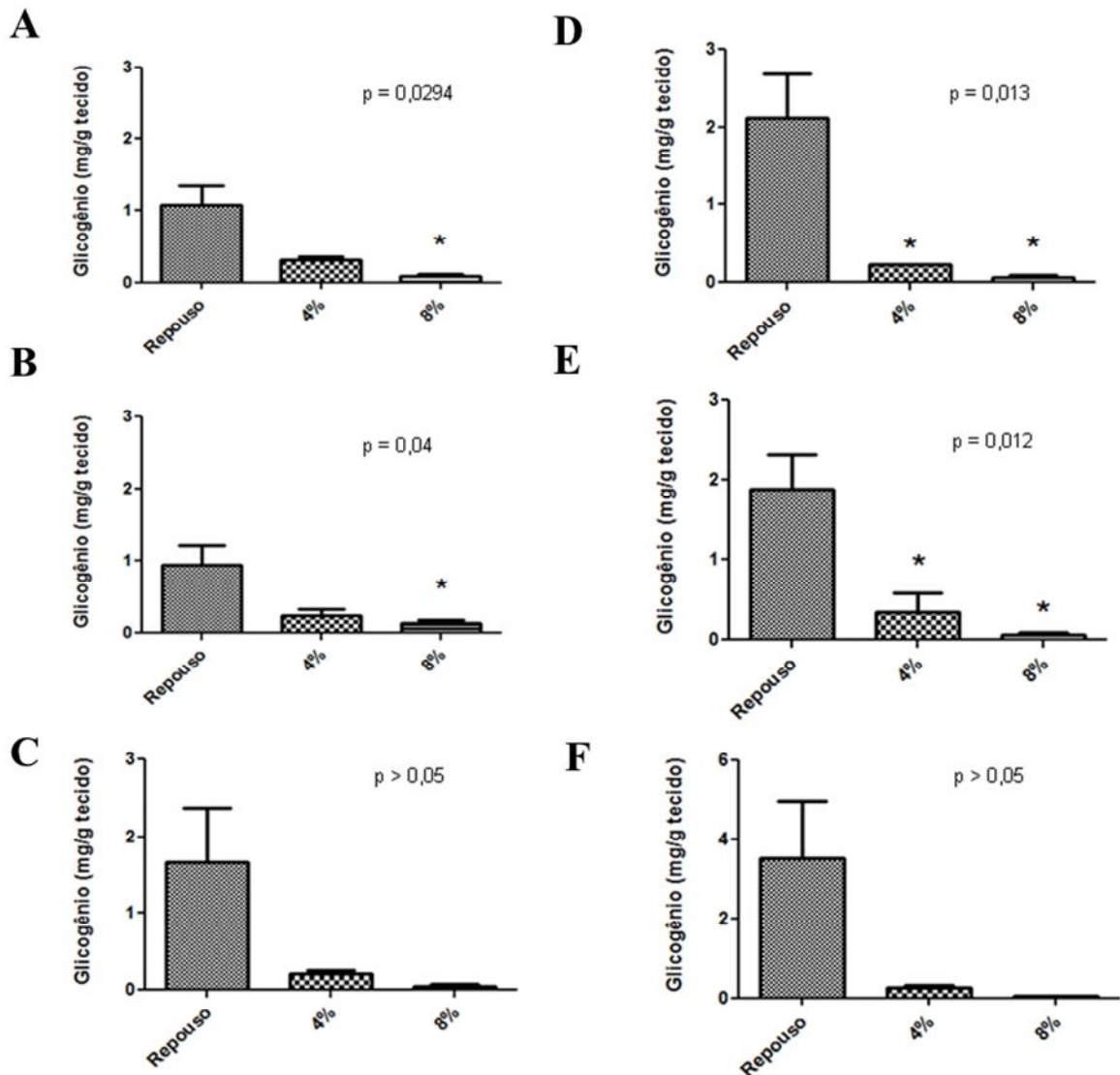
- (\*) Diferença significativa,  $p < 0,05$ , em relação ao repouso;
- (#) Diferença significativa,  $p < 0,05$ , em relação ao grupo 4 %;
- (\$) Diferença significativa,  $p < 0,001$ , em relação ao repouso;
- ( ) Diferença significativa,  $p < 0,01$ , em relação ao repouso;

- ( ) **Diferença significativa,  $p < 0,01$ , em relação ao grupo 4 %;**
- ( ) **Diferença significativa,  $p < 0,001$ , em relação ao grupo 4 %.**

Conforme podemos visualizar no gráfico acima (fig. 4), os animais, quando avaliados no repouso e nas duas intensidades de exercício, apresentaram diferenças significativas em todos os bloqueios utilizados, com alterações, principalmente, entre o grupo repouso e o 8 %. Calculando a média desses dois grupos em todos os bloqueios, verificamos que a intensidade exaustiva demonstrou concentrações de lactato 2,4 vezes maiores que o repouso. Estes dados sugerem que os animais realizaram de modo efetivo o esforço pretendido, independente dos bloqueios utilizados.

## **5.2 Análise do glicogênio muscular**

Para comprovarmos a efetividade do exercício até a exaustão, dosamos o conteúdo de glicogênio dos músculos gastrocnêmios, reconhecidos por serem altamente recrutados durante este nado intenso e por apresentar elevado conteúdo de fibras glicolíticas, respondendo ao componente anaeróbico desta intensidade (Brau, Ferreira et al. 1997).



**Figura 5.** Avaliação do glicogênio muscular, mg/g tecido, logo após o exercício dos animais que nadaram nas duas intensidades de exercício físico e o repouso, com ação dos diferentes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol, (F) bloqueio duplo. Utilizamos ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Bonferroni em todos os bloqueios testados.

(\*) Diferença significativa,  $p < 0,05$ , em relação ao repouso.

Os dados da figura 5, acima, de modo claro demonstram a efetividade do exercício físico, apesar de sua curta duração, nos ratos que nadaram com sobrecarga de 8 % da MCT, até a exaustão. Independente do bloqueio adrenérgico utilizado, há marcante redução do conteúdo do glicogênio muscular em relação aos seus controles, de até 96 %.

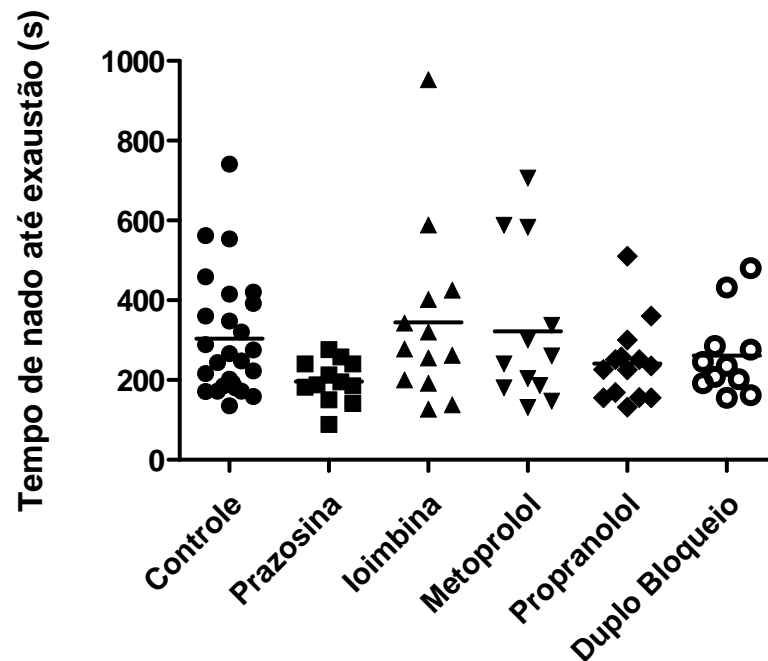
A mobilização do glicogênio intramuscular durante o exercício ocorre pela atividade contrátil muscular e hormonal. Em ratos, há efeito conhecido da adrenalina sobre receptores

$\alpha_2$ -adrenérgicos em músculos constituídos de fibras de contração rápida, promovendo a glicogenólise. Porém, em nosso estudo, independente do bloqueio utilizado, houve redução significativa no grupo 8 %. Parece que a via adrenérgica não teve participação nessa redução, sendo esta promovida pela intensa contração muscular a qual os animais foram submetidos (Scheurink and Steffens 1990, Hespel and Richter 1992).

Os bloqueios ioimbina e duplo bloqueio, não apresentaram diferenças significativas, sendo provável que esta resposta tenha sido provocada pela variabilidade de dispersão dos dados no grupo repouso. Aliás, a variabilidade na distribuição dos dados coletados neste grupo foi um fator que ocorreu em todos os bloqueios efetuados, pois os animais eram muito curiosos. Realizavam diversas flexões/extensões dos membros inferiores para a posição bípede, buscando uma maior exploração do ambiente, apesar de terem sido adaptados ao local e situação nos dias anteriores. Por esta variabilidade, acreditamos que a estatística não conseguiu comprovar a diferença observada entre os grupos repouso e 4 % em todos os bloqueios. É inegável que o aumento do número amostral deste grupo, seria a alternativa adequada para que visualizássemos esta diferença estatística, porém isto implicaria na morte de um número maior de animais, não sendo justificado, já que a observação gráfica não gera dúvidas.

### **5.3 Tempo de nado até a exaustão do grupo 8 %**

Conforme descrito na metodologia, foi considerado como critério de exaustão, o momento em que o animal permanecia dez segundos submerso, sem conseguir retornar a superfície.



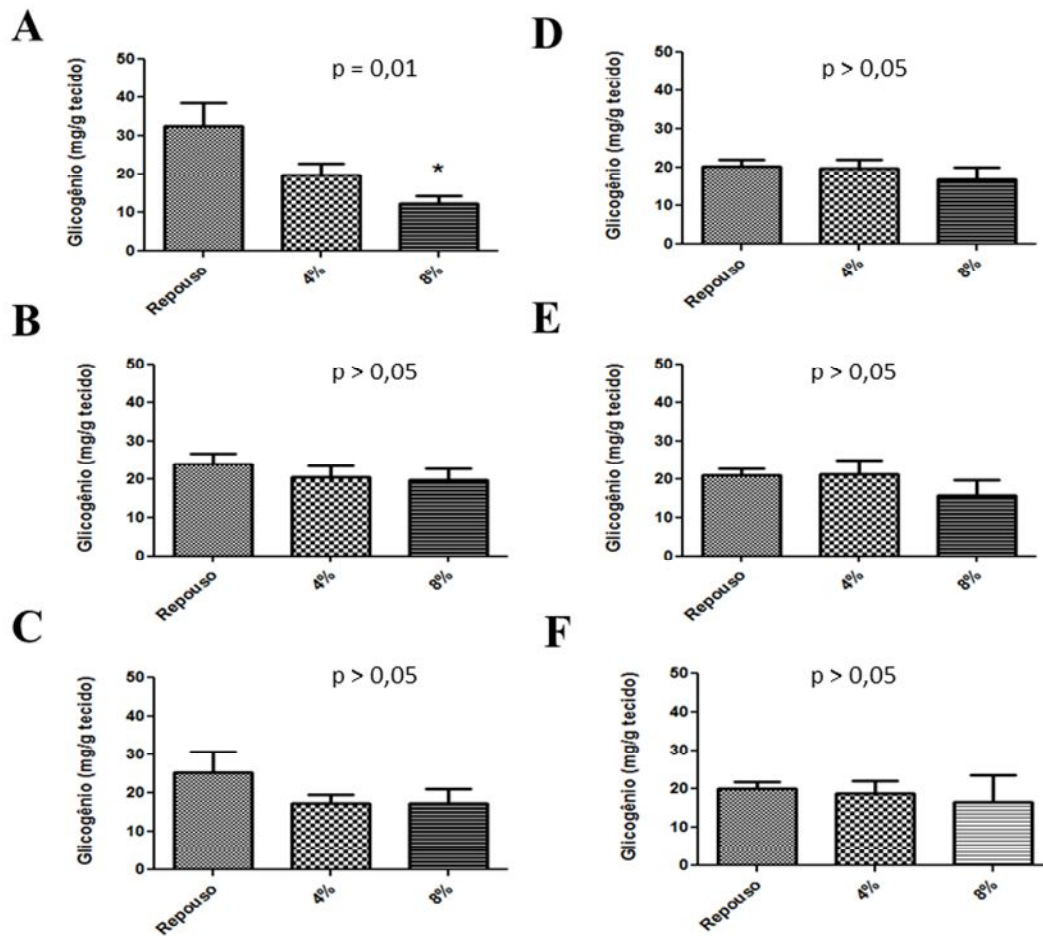
**Figura 6.** Tempo de exercício dos animais que nadaram até a exaustão do grupo 8 %, com ação dos diferentes bloqueios: controle, prazosina, ioimbina, metoprolol, propranolol e duplo bloqueio.

Na figura 6, acima, não observamos diferença estatística entre os bloqueios utilizados nessa carga de exercício.

Além disso, os tempos obtidos pelo grupo controle de nosso estudo foram mais elevados em relação a outros animais que utilizaram a mesma carga de exercício, porém com uma temperatura da água bem mais fria, 23-25 °C, (Tanaka, Baba et al. 2008, Nozaki, Mizuma et al. 2009, Anand, Phani Kumar et al. 2012) ou com uma elevada carga de trabalho, 13 % da MCT, com a mesma temperatura utilizada por nós (Lima, Stamm et al. 2013).

#### **5.4 Análise do glicogênio hepático**

A dosagem do conteúdo de glicogênio hepático foi utilizada para confirmar a efetividade metabólica do exercício, visto que a estimulação simpática do animal se exercitando tende a incrementar a glicogenólise hepática (Christensen and Galbo 1983).



**Figura 7.** Avaliação do glicogênio hepático, mg/g tecido, após o exercício dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com ação dos diferentes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. Análise estatística por ANOVA de uma via, post-hoc de Bonferroni.

(\*). Diferença significativa,  $p < 0,05$ , em relação ao repouso.

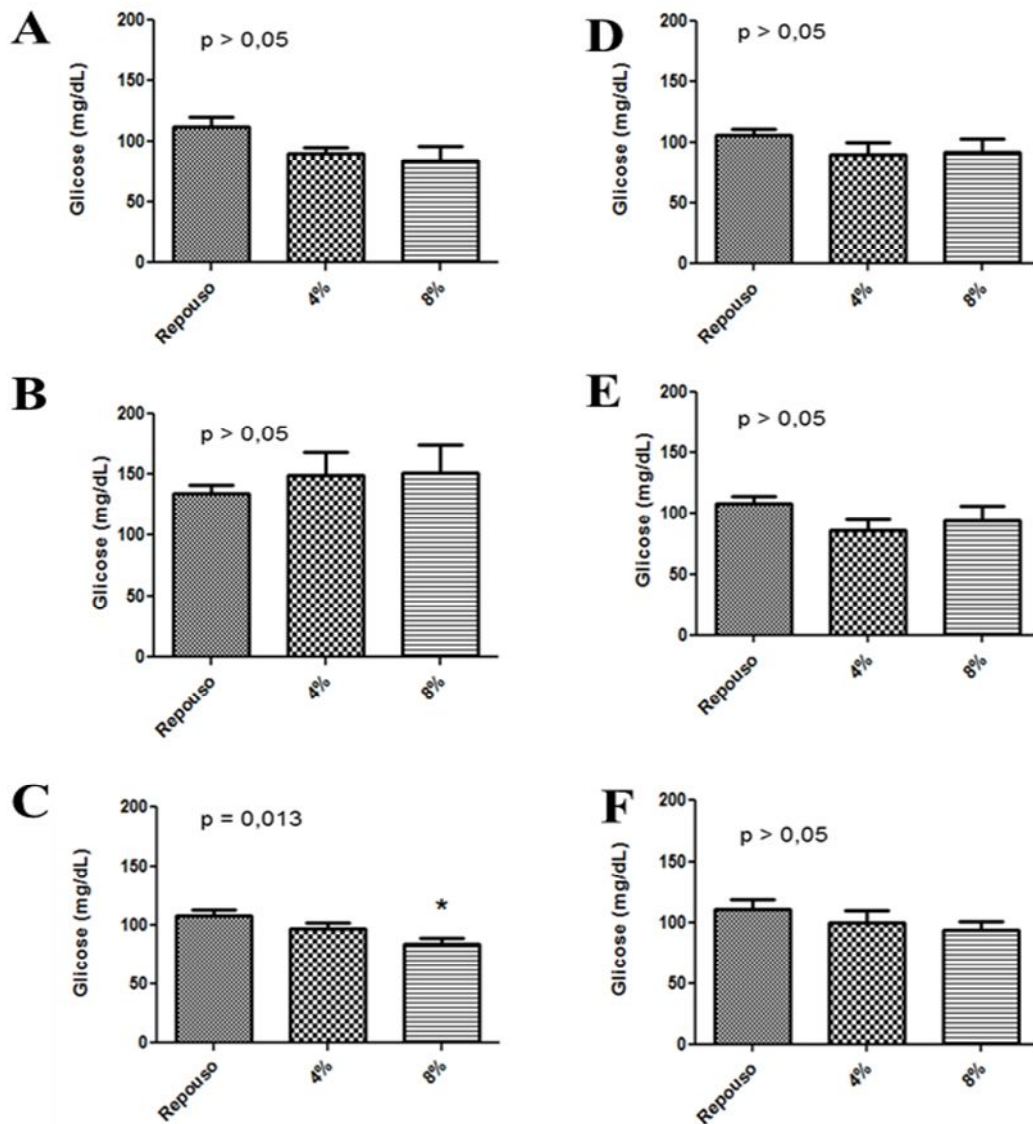
Na figura 7, destaca-se a redução significativa na concentração de glicogênio hepático nos animais considerados controles. Ao relacionar com seu grupo repouso, visualizamos redução de 2,65 vezes do grupo 8 %, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Nos animais bloqueados com prazosina, propranolol e duplo bloqueio não observamos diferenças nos conteúdos de glicogênio hepático entre as diferentes intensidades de exercício físico. Esse era um efeito esperado, pois tanto em ratos como em humanos, a glicogenólise hepática é mediada por catecolaminas pela via  $\alpha_1$ , principalmente, e  $\beta_2$ -adrenérgica (Jakob and Diem 1975, Morgan, Blackmore et al. 1983, Opie 1985, Aarnio, Lauritsen et al. 2001).



### 5.5 Glicose sanguínea

Para confirmar que nossos animais estavam euglicêmicos realizamos essa análise, depois do exercício físico.



**Figura 8.** Avaliação da glicose sanguínea, mg/dL, após o exercício dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com ação dos diferentes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. Utilizamos o teste ANOVA de uma via para detectar as diferenças significativas com pós-teste de Bonferroni.

(\*) Diferença significativa,  $p < 0,05$ , em relação ao repouso;

Conforme visualizamos na figura 8, acima, com exceção do grupo ioimbina a 8% de carga, os bloqueios não demonstraram diferenças significativas nesta análise.

### 5.6 Dosagem de TBA-RS plasmático

Não há dúvidas de que exercícios aeróbicos ou anaeróbicos apresentam potencial para produzir radicais livres e ERONs, podendo promover alterações conhecidas nas respostas funcionais de macrófagos (Fisher-Wellman and Bloomer 2009, Tan, Wang et al. 2016). Portanto, verificar a possível lipoperoxidação foi importante para detectar possíveis modificações que possam indicar uma peroxidação lipídica mais elevada, influenciando a célula de nosso estudo.

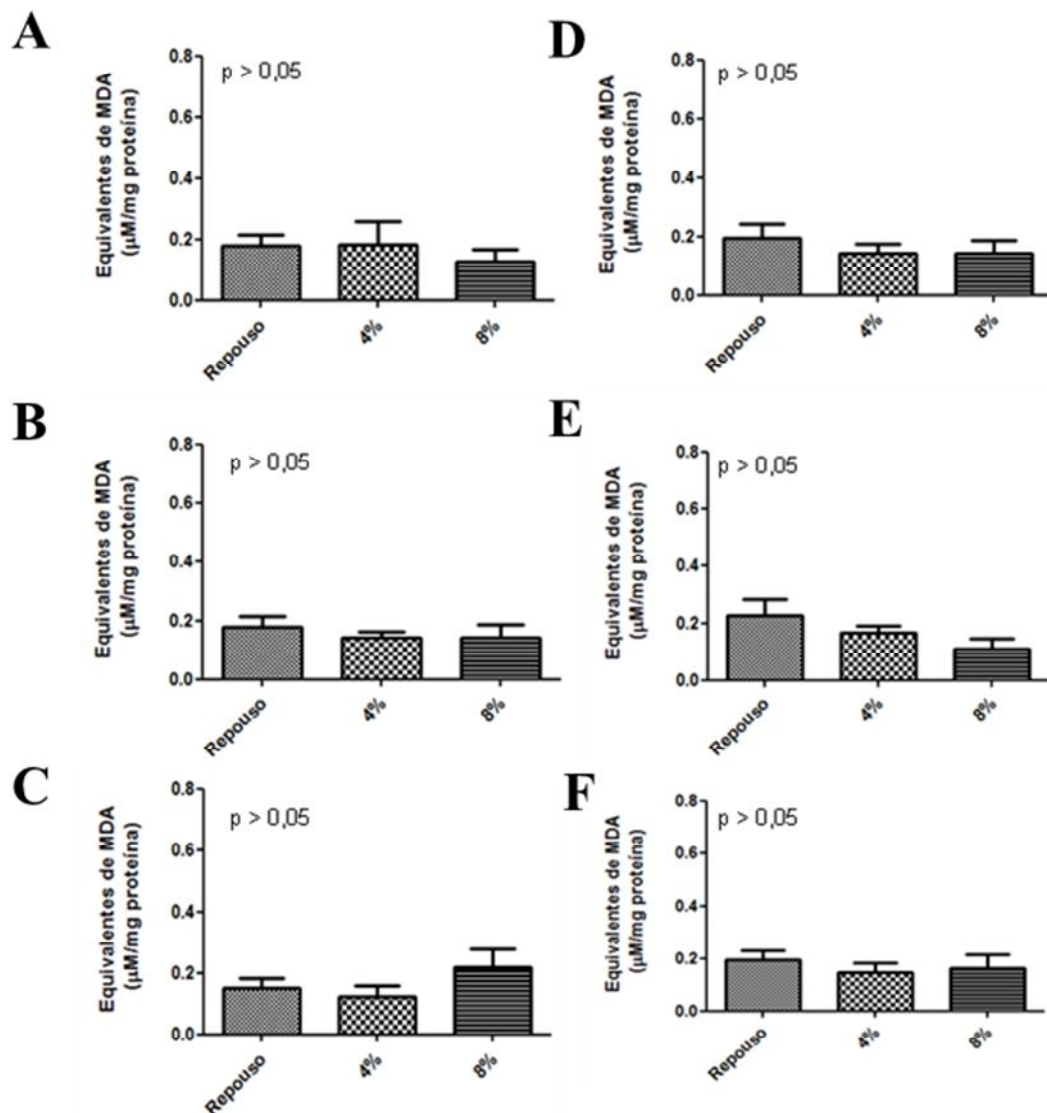
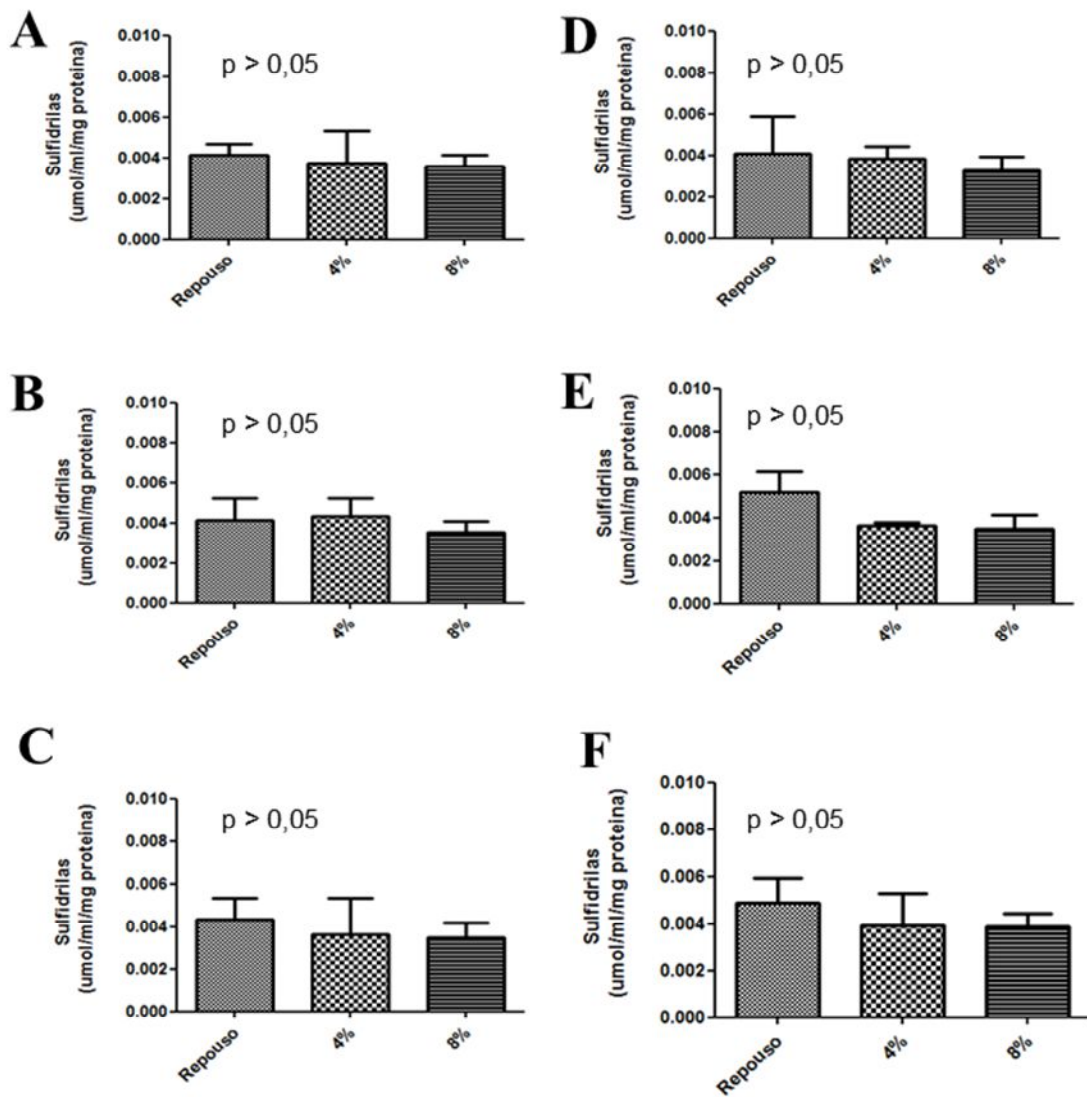


Figura 9. Avaliação do TBA-RS plasmático, equivalentes de MDA ( $\mu\text{M} / \text{mg}$  proteína), imediatamente após o exercício físico dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) duplo bloqueio. Em todos os bloqueios analisados não houve diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Na figura 9 não detectamos diferenças significativas nos dados obtidos, tanto pela avaliação do efeito do bloqueio como pelo efeito da intensidade do exercício físico, dados não mostrados ( $p < 0,05$ ). Há dois fatores importantes que devem ser levados em consideração quando não há produção de ERON: a defesa antioxidante do organismo, que consegue suprimir a quantidade de ERON gerada, e a intensidade do exercício, visto que exercícios de baixa intensidade e/ou curta duração parecem contar com as defesas antioxidantes no combate ao dano oxidativo (Fisher-Wellman and Bloomer 2009).

### **5.7 Análise de sulfidrilas plasmáticas**

Para detectar possível utilização de sulfidrilas como agentes redutores de ERONs, verificamos a concentração plasmática de sulfidrilas totais nas diferentes intensidades de exercício e bloqueios adrenérgicos.



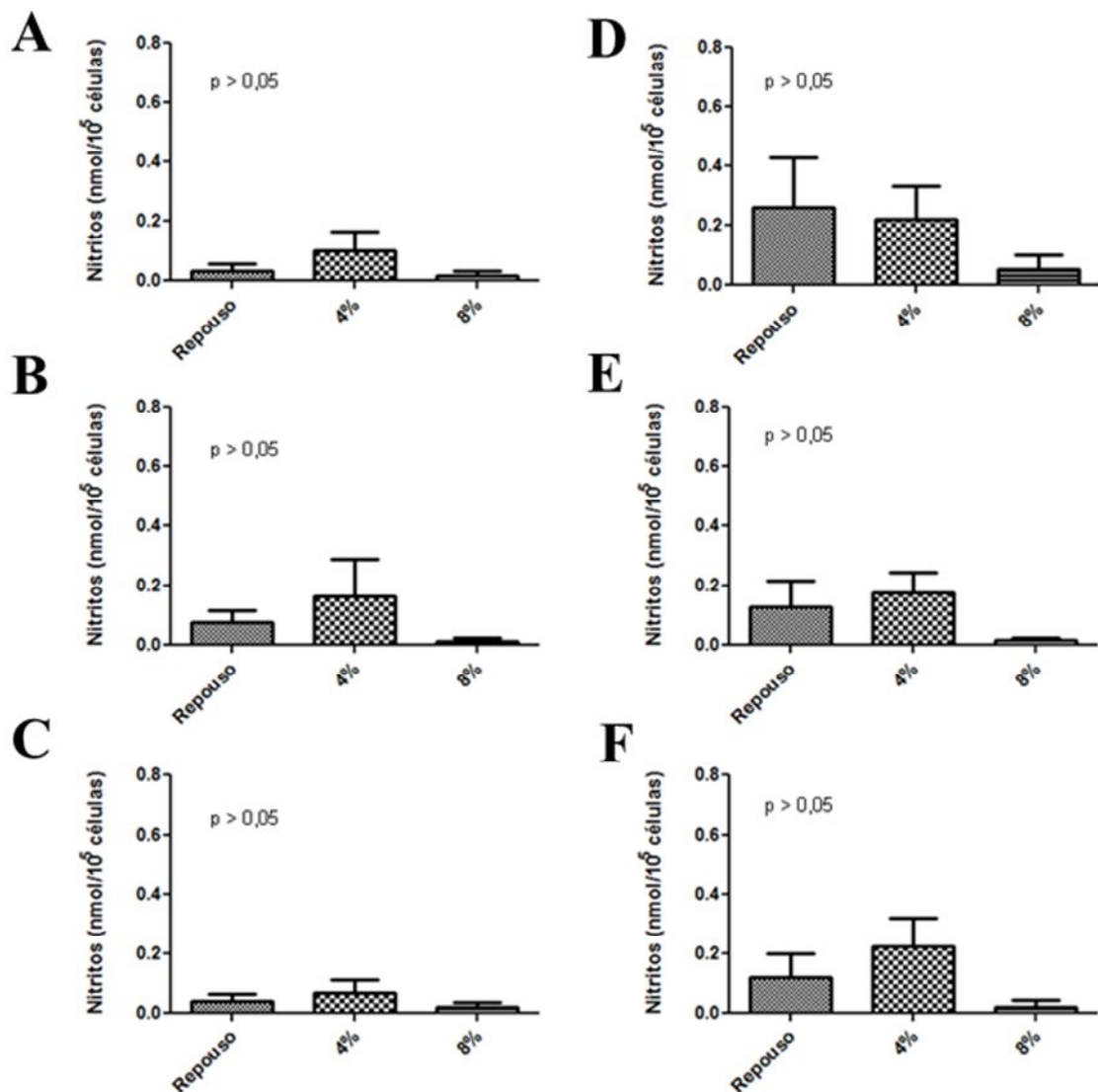
**Figura 10.** Avaliação das sulfidrilas plasmáticas,  $\mu\text{mol/mL/mg}$  proteína, logo após a sessão de exercício dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) duplo bloqueio. O teste ANOVA de uma via não detectou diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) nos bloqueios testados.

Na figura 10, acima, não visualizamos alterações significativas nas concentrações de sulfidrilas plasmáticas em todos os bloqueios testados.

Portanto, nas intensidades de exercício propostas não houve o estabelecimento de danos em lipídios ou redução de sulfidrilas provocados por ERONs.

## 5.8 Análise da produção de nitritos

A produção de NO por macrófagos objetiva ações microbicidas e tumoricidas, atuando como molécula antiproliferativa. Em macrófagos, essa produção é mediada somente pela enzima iNOS. Uma vez secretado para o espaço extracelular, o gás NO é oxidado muito rápido para diferentes metabólitos, todos produzindo nitritos e/ou nitratos como metabólitos finais (Nussler, Billiar et al. 1994, Bansal and Ochoa 2003, Silveira, Rodrigues et al. 2007, Mills, Thomas et al. 2014, Rath, Muller et al. 2014). Mesmo iNOS sendo considerada induzível, necessitando um determinado período de tempo para a produção de NO, houve estudo anterior de nosso laboratório (da Silva Rossato, Krause et al. 2014) que demonstrou sua produção logo após o exercício de longa duração.



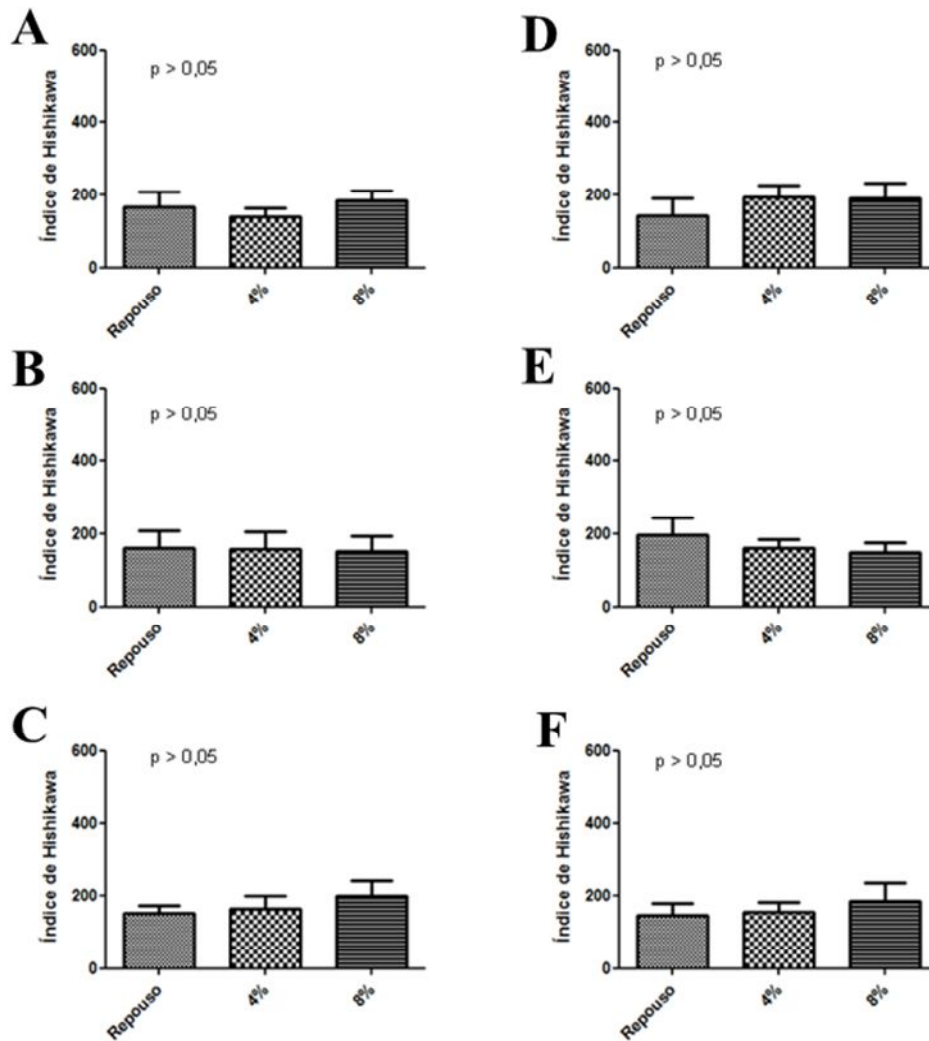
**Figura 11.** Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais, nmol/10<sup>5</sup> células, após o exercício dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) duplo bloqueio. O teste ANOVA de uma via não detectou diferenças estatísticas em nenhum dos bloqueios testados ( $p > 0,05$ ).

Os gráficos da figura 11, acima, mesmo sem diferenças estatísticas, tanto no efeito do bloqueio ( $p > 0,05$ ) como na intensidade ( $p > 0,05$ ), dados não demonstrados, exibem padrões de respostas diferentes entre os receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos.

Diferente de estudo prévio de nosso laboratório utilizando monócitos circulantes de rato (da Silva Rossato, Krause et al. 2014), nosso estudo não detectou produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais ao final do exercício de curta duração, nas diferentes intensidades e bloqueios testados.

### 5.9 Análise de fagocitose de zimosan marcado com vermelho neutro

Fagocitose é uma função clássica de monócitos/macrófagos e muito potente no combate a invasores ou inflamações (Woods, Lu et al. 2000), sendo importante a ser analisada no contexto de nosso estudo.



**Figura 12.** Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, no tempo zero, logo após o exercício, pelo índice de Hishikawa, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. Em todos os bloqueios testados não houveram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ), por ANOVA de uma via.

Surpreendente que, nos gráficos da figura 12, acima, não houve alterações na resposta fagocítica de macrófagos peritoneais em nenhuma das intensidades de exercício ou bloqueios testados.

Trabalhos anteriores ao nosso, observaram que macrófagos peritoneais de ratos e de camundongos idosos, coletados após uma série aguda de exercício físico, com diferentes intensidades, não responderam de forma tão robusta quanto a fagocitose de monócitos circulantes, também em situação de exercício físico (de la Fuente, Martin et al. 1990, Silveira, Rodrigues et al. 2007, Ferreira, Prestes et al. 2010). Além disso, estimulantes inflamatórios e/ou infecciosos quando aplicados pela via intraperitoneal, em modelos animais, também necessitam de maior período de tempo para que ocorra a ativação celular (Soudi, Zavaran-Hosseini et al. 2013). Logo, na grande maioria destes estudos, a coleta das células ativadas é realizada depois de alguns dias (Johnston, Godzik et al. 1978).

Neste contexto, merece destaque a importância da MDR, conforme descrita anteriormente. Macrófagos peritoneais, estimulados com o exercício físico, e não um invasor, parecem necessitar deslocar-se para tecidos omentais e linfóides para promover resposta adaptativa, ao mesmo tempo que recruta monócitos circulantes para a cavidade abdominal para que haja uma resposta desencadeada pelo estímulo estressor (Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Esta é uma resposta de direcionamento celular normal que ocorre após o exercício físico para órgãos e/ou tecidos imunológicos (Kruger, Lechtermann et al. 2008, Walsh, Gleeson et al. 2011, Dhabhar, Malarkey et al. 2012)

Portanto, para detectarmos o melhor período de ativação celular após o exercício físico, submetemos os animais controle (PBS) aos esforços propostos e os mesmos foram mortos 6, 12 e 24 horas após a sessão do exercício, para coleta e análise celular, estabelecendo uma curva tempo-resposta das funções de fagocitose e produção de nitritos.



### 5.10. Curva tempo-resposta de fagocitose de zimosan marcado com vermelho neutro

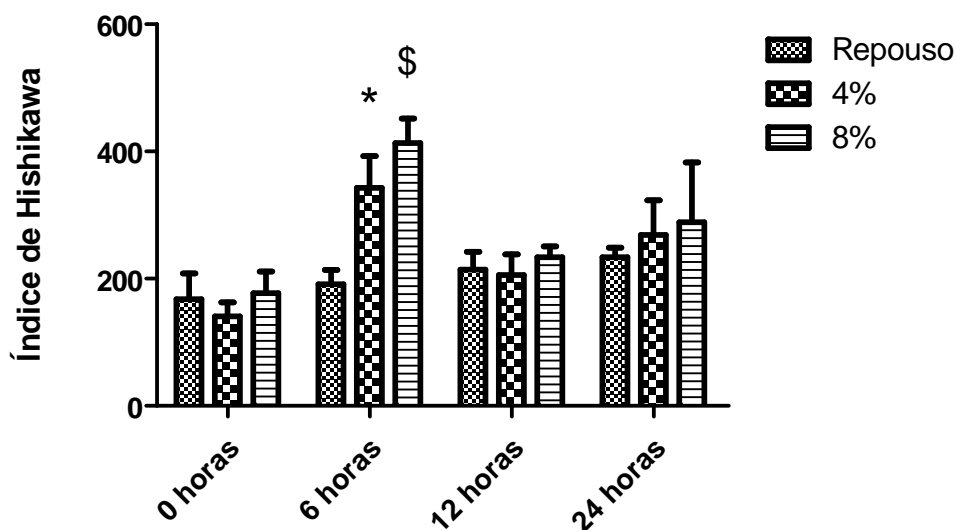


Fig 13. Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, pelo índice de Hishikawa, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4% e 8%, e o repouso com os diferentes tempos: 0, 6, 12 e 24 horas. Utilizando ANOVA de duas vias, com pós teste de Bonferroni, interação intensidade do exercício e efeito do tempo ( $p = 0,11$ ), variável intensidade do exercício ( $p = 0,03$ ) e efeito do tempo ( $p < 0,0001$ ).

(\$) Em relação ao controle do tempo 6 horas:  $p < 0,001$ .

(\*) Em relação ao controle do tempo 6 horas:  $p < 0,05$ .

Na figura 13 observamos que a maior resposta dos macrófagos em relação ao número de partículas fagocitadas ocorreu no tempo de 6 horas após o exercício, no qual os grupos 4 e 8 % tiveram aumentos de 79 e 116 %, respectivamente, em relação ao respectivo repouso. Pelo teste de multivariância os tempos de 12 e 24 h após a sessão de exercício não apresentaram diferenças significativas entre suas respectivas intensidades bem como em relação aos grupos do tempo 0 e 6 h.

Estudos utilizando diferentes estímulos inflamatórios ou infecciosos, injetados via intraperitoneal, apresentaram diferentes tempos de resposta dessas células, podendo atingir o pico máximo de até 24 horas de tratamento, como no caso de LPS (Ignatowski, Gallant et al. 1996, Soudi, Zavarán-Hosseini et al. 2013). Balestrieri e colaboradores (Balestrieri, Hsu et al. 2006) utilizando macrófagos peritoneais residentes de camundongos, ou seja, sem qualquer

estímulo inflamatório ou infeccioso intraperitoneal, observaram maior índice de fagocitose após 3 h, quando estas células eram incubadas com zimosan. Parece que, dependendo do estímulo empregado, macrófagos residentes teciduais necessitam de maior tempo para atingir seu desempenho máximo.

### 5.11 Curva tempo-resposta da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais

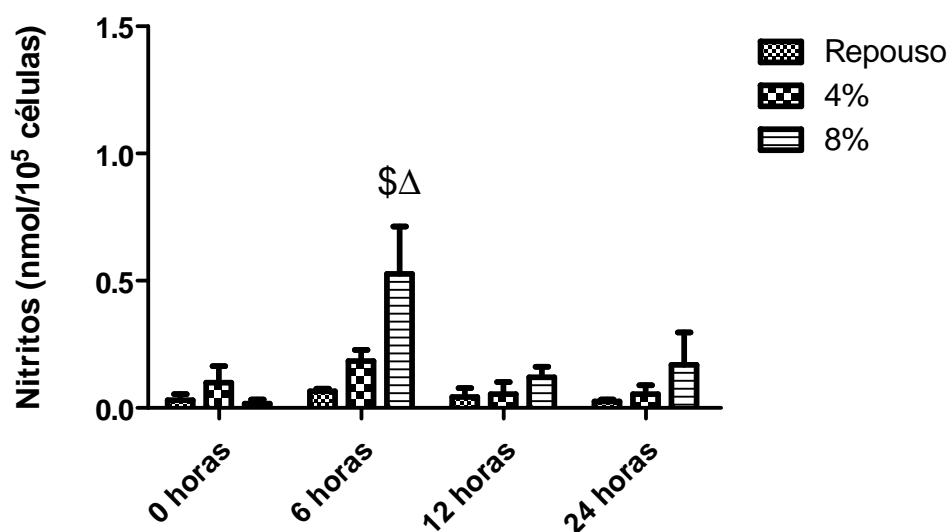


Figura 14. Avaliação da produção de nitritos, nmol/10<sup>5</sup> células, pelos macrófagos peritoneais, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os diferentes tempos: 0, 6, 12 e 24 horas. Por ANOVA de duas vias, a interação entre as variáveis ( $p = 0,02$ ), o efeito intensidade do exercício ( $p = 0,006$ ) e a variável efeito do tempo ( $p = 0,002$ ), demonstraram diferença significativa.

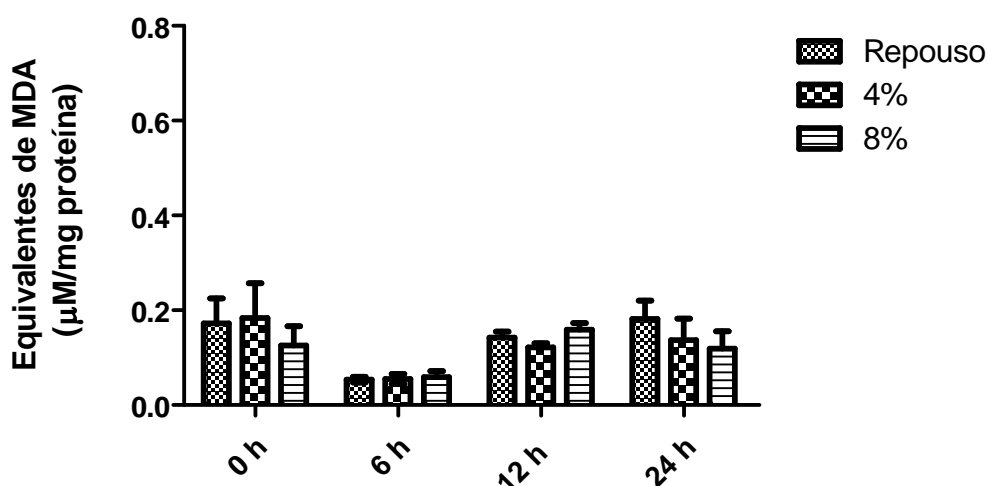
(\$) Em relação ao controle do tempo 6 horas:  $p < 0,001$ .

( ) Em relação ao 4 % do tempo 6 horas:  $p < 0,01$ .

Semelhante à fagocitose (fig. 13), a maior produção de nitritos, visualizada na figura 14, ocorreu em 6 h após o término da sessão de nado. Neste período, a análise estatística aponta diferenças do grupo 8 % em relação ao repouso e 4 %, sendo esta produção de nitritos 709 e 285 % maiores que esses, respectivamente. Porém, nos tempos posteriores, 12 e 24 h, analisando os valores de média, houve uma redução na produção de nitritos, com valores semelhantes ao grupo de animais que foram avaliados no momento 0 h, confirmado pela ausência de diferenças significativas.

Interessante que, estudos utilizando monócitos circulantes de ratos e exercício de intensidade moderada demonstraram aumentos na produção de nitritos após 6 e 12 h da sessão de exercício (Silveira, Rodrigues et al. 2007, Scholer, Marques et al. 2016), mas com redução nessa concentração em atividade intensa após 12 h do mesmo estímulo. Apesar de muitos monócitos migrarem para a cavidade abdominal, há um tempo de resposta celular diferente dessas mesmas células quando coletadas direto da circulação sanguínea, nas mesmas condições de intensidade e volume de exercício (Silveira, Rodrigues et al. 2007, Scholer, Marques et al. 2016).

### 5.12 Curva tempo-resposta da detecção de TBA-RS plasmáticos

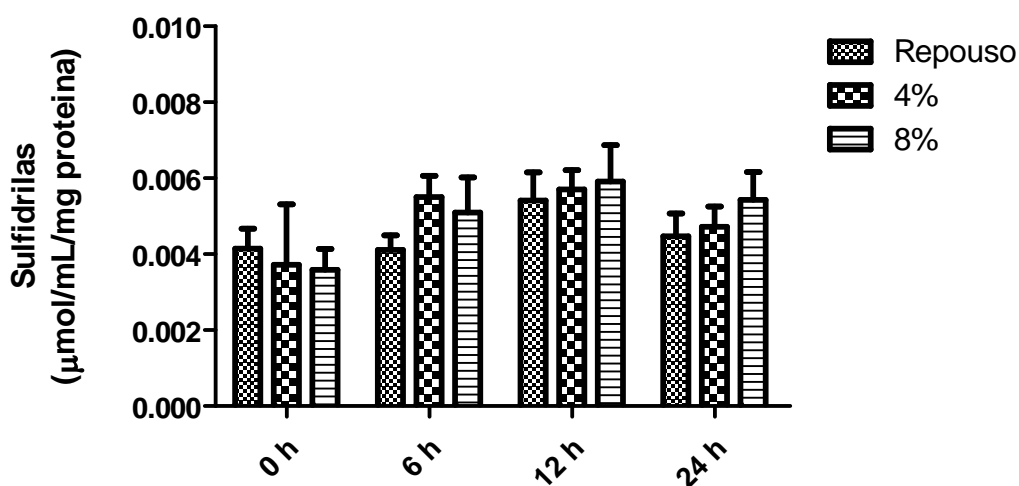


**Figura 15. Avaliação do TBA-RS plasmático, equivalentes de MDA  $\mu\text{M}$  /mg proteína, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os diferentes tempos: 0, 6, 12 e 24 horas. Utilizando ANOVA de duas vias, efeito interação ( $p = 0,804$ ) e efeito intensidade ( $p = 0,684$ ) sem diferença significativa e efeito do tempo ( $p = 0,0057$ ), apresentando alteração significativa. O pós teste de Tukey não encontrou alteração significativa.**

Na figura 15, apesar do teste estatístico de duas vias detectar diferença significativa em relação ao efeito do tempo, o teste post-hoc não detectou em qual grupo de dados ocorreu esta diferença. Ao observarmos redução nos valores de média do tempo 6 h, realizamos também os testes estatísticos para avaliações das variáveis tempo e intensidade de exercício, dados não demonstrados, entretanto nenhum destes apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Além disso, destacamos que a intensidade de exercício físico não influenciou a lipoperoxidação em nenhum dos tempos propostos.

### 5.13 Curva tempo-resposta da detecção de sulfidrilas plasmáticas



**Figura 16.** Avaliação de sulfidrilas plasmáticas,  $\mu\text{mol/mL/mg}$  proteína, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso com os diferentes tempos: 0, 6, 12 e 24 horas. Pelo teste de ANOVA de duas vias a análise de interação ( $p = 0,81$ ) e fator intensidade ( $p = 0,61$ ) não foram estatisticamente diferentes, porém no fator tempo ( $p = 0,03$ ) houve diferença significativa. Foi realizado o pós teste de Tukey.

Na figura 16 a análise do efeito do tempo apresentou diferença significativa, entretanto o programa estatístico não demonstrou em qual deles ocorreu esta alteração. Assim como no TBA-RS a intensidade do exercício não influenciou os resultados.

Portanto, escolhemos o tempo 6 h após o exercício físico, por ser o mais responsivo em relação as funções dos macrófagos peritoneais, para analisarmos o efeito dos bloqueadores nas funções e respostas pró- ou anti-inflamatórias destas células.

#### **5.14 Análise da capacidade fagocítica celular 6 h após o término da sessão de exercício físico com os diferentes bloqueios**

A partir deste momento, todas as análises subsequentes foram avaliadas em três modos distintos: 1º) uma avaliação do efeito dos bloqueios sobre as diferentes intensidades de exercício físico; 2º) analisamos o efeito das intensidades exercitadas sobre os diferentes bloqueios. Este tipo de interpretação gerou três gráficos e avaliações estatísticas na seguinte ordem: repouso, 4 e 8 %; 3º) através de ANOVA de duas vias, verificamos os efeitos da intensidade e do bloqueio, juntos, sobre os parâmetros estudados.

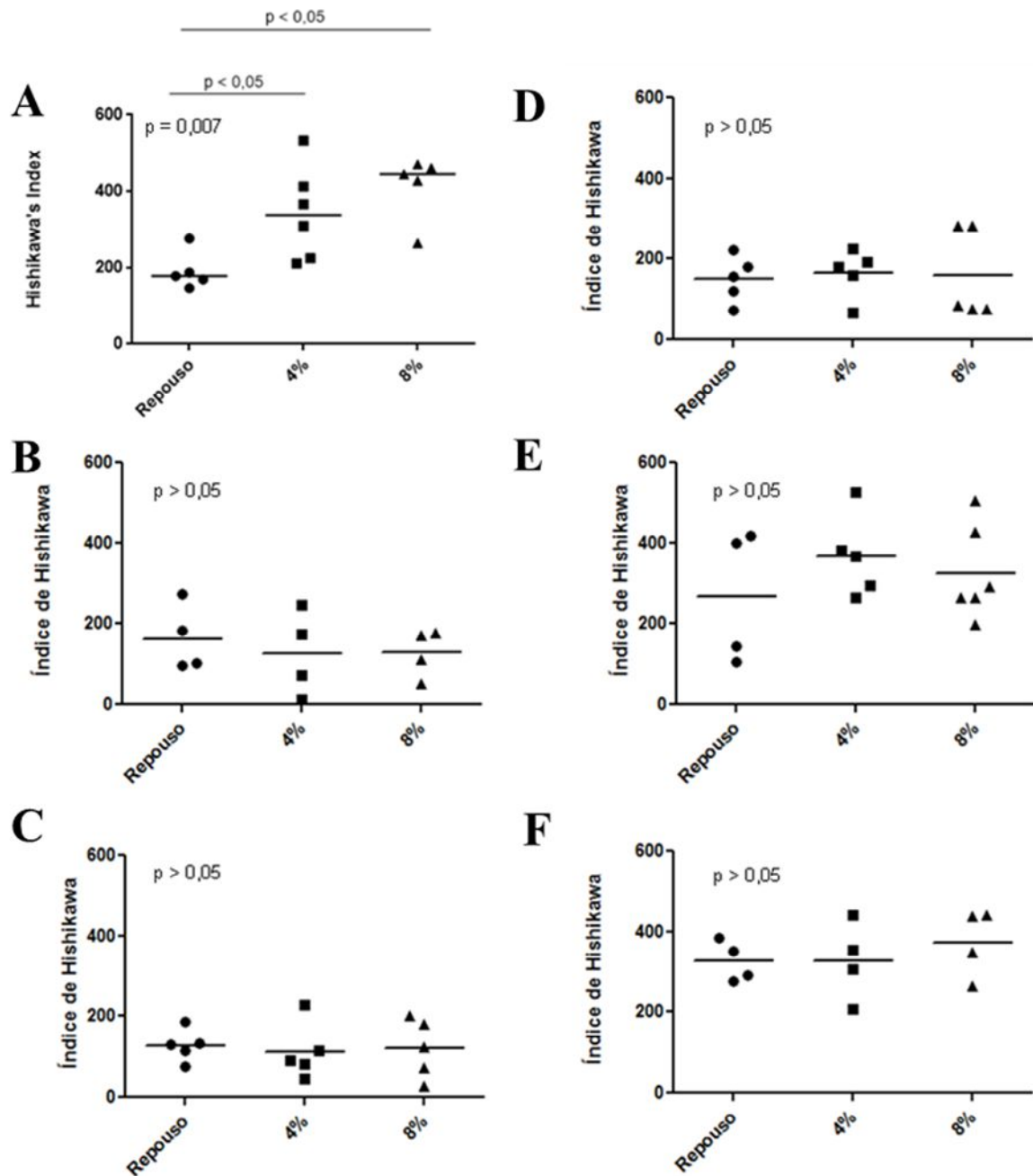
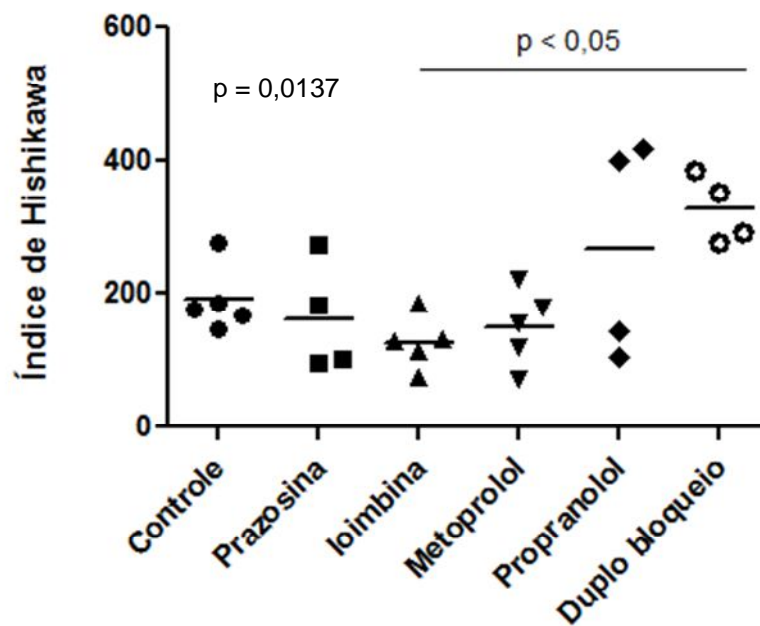


Figura 17. Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, pelo índice de Hishikawa, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via, com post-hoc de Tukey.

Pelos dados da figura 17, comprovamos aumentos nas respostas celulares, de modo intensidade-dependente no grupo controle ( $p = 0,007$ ), confirmando resultados anteriores de nosso laboratório utilizando monócitos circulantes (Silveira, Rodrigues et al. 2007, da Silva Rossato, Krause et al. 2014, Scholer, Marques et al. 2016). Essa diferença apresentou-se 179 e

216 % maiores nos grupos moderado e exaustivo, respectivamente, em relação a resposta celular do repouso. Além disso, não houve alterações significativas nos outros bloqueios ( $p > 0,05$ ), mas considerando os valores de média, percebemos diminuições nos números de partículas fagocitadas nos bloqueios  $\alpha$ - e  $\beta_1$ -adrenérgicos e aumentos no poder fagocítico dos bloqueios propranolol e duplo bloqueio.

*Grupos repouso:*



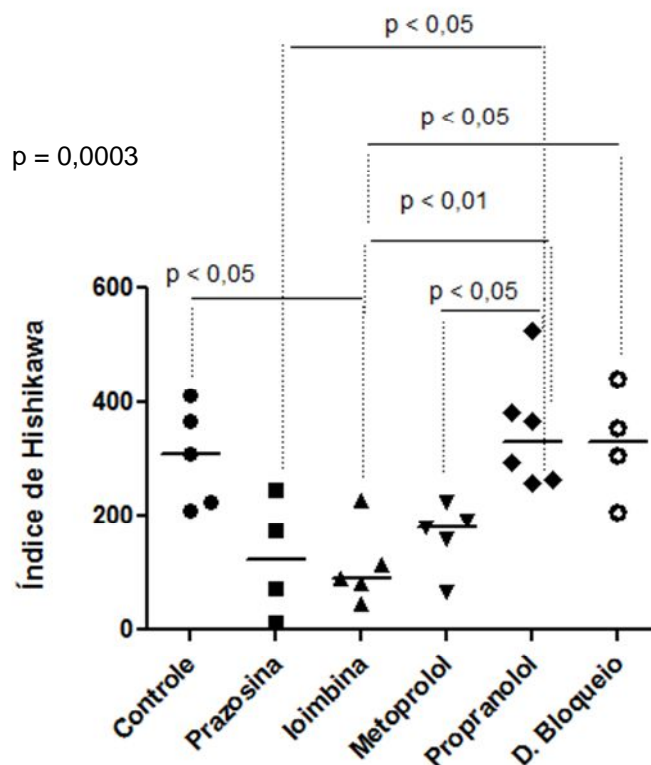
**Fig. 18.** Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, via Índice de Hishikawa, dos animais que permaneceram em repouso, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Os dados apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0137$ ), por ANOVA de uma via e post-hoc de Bonferroni. Houve diferença entre os grupos ioimbina e duplo bloqueio ( $p < 0,05$ ).

Apesar da análise estatística demonstrar diferença na intensidade repouso (fig. 18), observamos que isso seja possível pela desigualdade percebida entre os grupos duplo bloqueio e ioimbina.

Observamos aumentos nas médias da resposta de fagocitose nos grupos propranolol e duplo bloqueio, mesmo em repouso. O primeiro por estar com os receptores  $\beta$ -adrenérgicos liberados, podendo apresentar, principalmente no repouso, maior probabilidade de ingestão de partículas por essa via pró-inflamatória, pelo estresse de manipulação/ambiente no dia da sessão de exercício físico. O segundo, presume-se ocorrer pelo estresse sistêmico causado

pelo bloqueio total dos receptores adrenérgicos, uma vez que os animais visivelmente mostravam-se prostrados.

*Grupos 4 %:*



**Figura 19.** Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, via Índice de Hishikawa, dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores expressaram diferença significativa ( $p = 0,0003$ ) por ANOVA de uma via. O post-hoc de Bonferroni detectou diferenças entre: grupos controle e ioimbina; prazosina e propranolol; metoprolol e propranolol; e ioimbina e duplo bloqueio ( $p < 0,05$ ), além de ioimbina e propranolol ( $p < 0,01$ ).

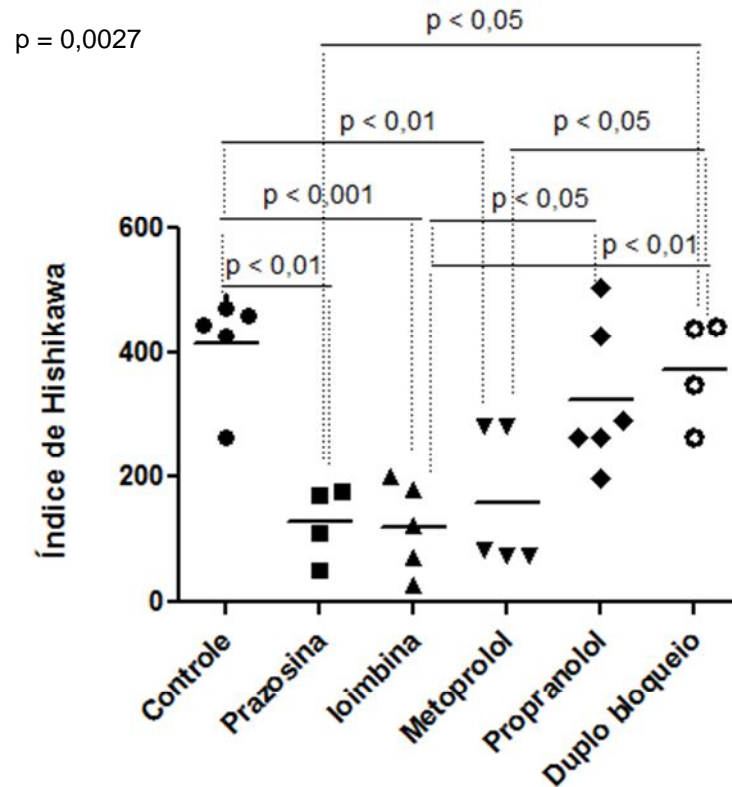
Na distribuição gráfica da figura 19, com comprovada diferença significativa, observamos 68 % de inibição na resposta de fagocitose no grupo ioimbina em relação ao controle. Ademais, os outros bloqueadores demonstraram respostas semelhantes ao controle. Assim, notamos que em relação ao grupo controle, o bloqueio do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, promoveu uma resposta anti-inflamatória dos macrófagos peritoneais. Logo, este pode ser o receptor responsável pela resposta pró-inflamatória de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a um exercício de intensidade moderada.

Este resultado é confirmado por estudo de nosso laboratório, utilizando monócitos circulantes de ratos, submetidos a intensidade moderada de natação, porém de longa duração. Pela combinação dos antagonistas adrenérgicos, prazosina e propranolol, liberando o receptor



$\alpha_2$ -adrenérgico, detectou-se aumento na capacidade fagocítica destas células (da Silva Rossato, Krause et al. 2014).

Grupos 8 %:



**Figura 20.** Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, via Índice de Hishikawa, dos animais que nadaram com 8 % da MCT até a exaustão, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores mostraram diferença significativa ( $p < 0,0027$ ) por ANOVA de uma via. O post-hoc de Bonferroni identificou diferenças entre os grupos: ioimbina e propranolol; metoprolol e duplo bloqueio ( $p < 0,05$ ); controle e prazosina; controle e metoprolol; ioimbina e duplo bloqueio ( $p < 0,01$ ); e controle e ioimbina ( $p < 0,001$ ).

Ao utilizarmos uma série de exercício extenuante (fig. 20), detectamos com diferenças muito significativas, diminuições de 69; 70,5 e 61 % nas respostas fagocíticas dos bloqueios prazosina, ioimbina e metoprolol, respectivamente, em relação ao grupo controle. Surpreendemo-nos que em atividades intensas, com provável elevada liberação de adrenalina e noradrenalina à circulação sanguínea, a robusta resposta fagocítica de macrófagos peritoneais parece ser mediada por ambos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, com maior resposta do  $\alpha_2$ , e receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, todos responsivos a noradrenalina. Apesar de atípica, a resposta comum por

receptores  $\alpha_2$  e sobre a função fagocítica de macrófagos, é reconhecida (Ortega, Giraldo et al. 2007).

Ao que parece, o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico está relacionado a um perfil anti-inflamatório (Elenkov and Chrousos 1999), limitando uma resposta inflamatória excessiva e, portanto, prejudicial. Pois, nesta intensidade há diminuição da resposta fagocítica no bloqueio com metoprolol, porém o contrário ocorre no bloqueio propranolol, que se assemelha ao grupo controle. Dessa forma, sendo a única diferença aparente entre os bloqueios beta-adrenérgicos a liberação do receptor  $\alpha_2$ .

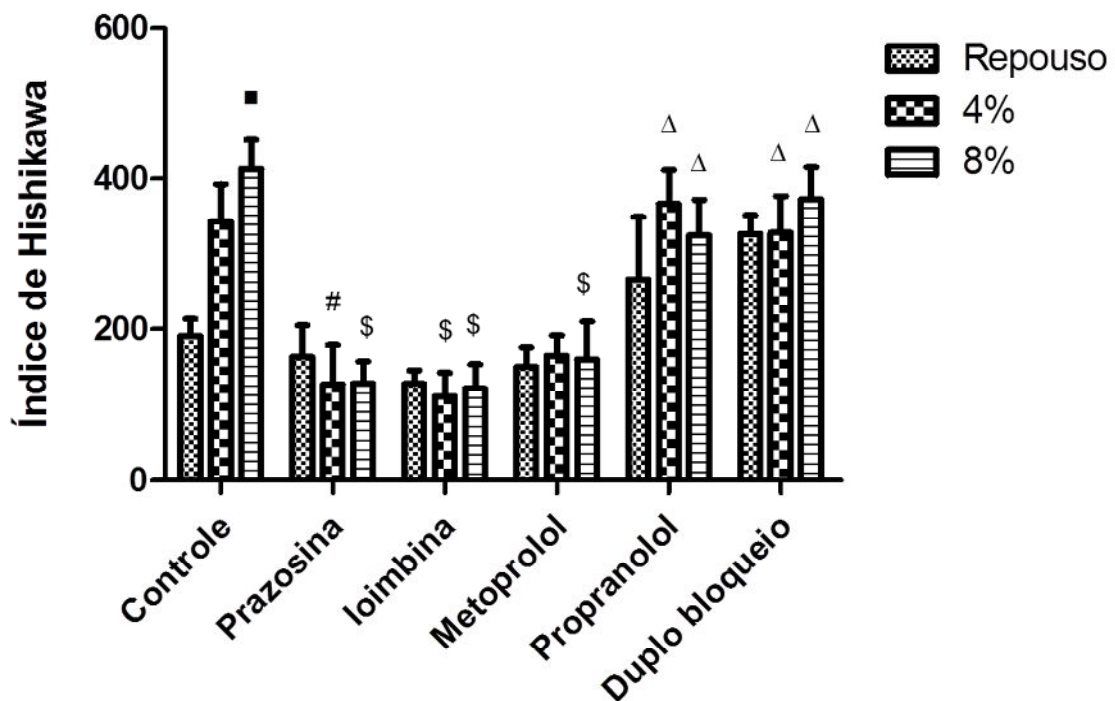


Figura 21. Avaliação do número de partículas fagocitadas pelos macrófagos peritoneais, via Índice de Hishikawa, dos animais que nadaram em diferentes intensidades, além do repouso, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. Por ANOVA de duas vias, a interação não apresentou diferença significativa ( $p = 0,166$ ), assim como a variável intensidade ( $p = 0,1$ ), porém o efeito bloqueio apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ). Para obter as diferenças entre os grupos foi utilizado o pós teste de Tukey.

( ) Em relação ao grupo 8 %:  $p < 0,05$ ;

(#) Em relação ao grupo 4 % controle:  $p < 0,05$ ;

(\$) Em relação à respectiva intensidade do bloqueio controle:  $p < 0,001$ ;

( ) Em relação às respectivas intensidades dos bloqueios prazosina e ioimbina:  $p < 0,05$ .

Pela disposição gráfica da figura 21, podemos observar o efetivo bloqueio desta função por prazosina, ioimbina e metoprolol e a resposta inversa para os bloqueios propranolol e duplo bloqueio.

### 5.15 Análise da produção de nitritos 6 h após o término da sessão de exercício físico com os diferentes bloqueios

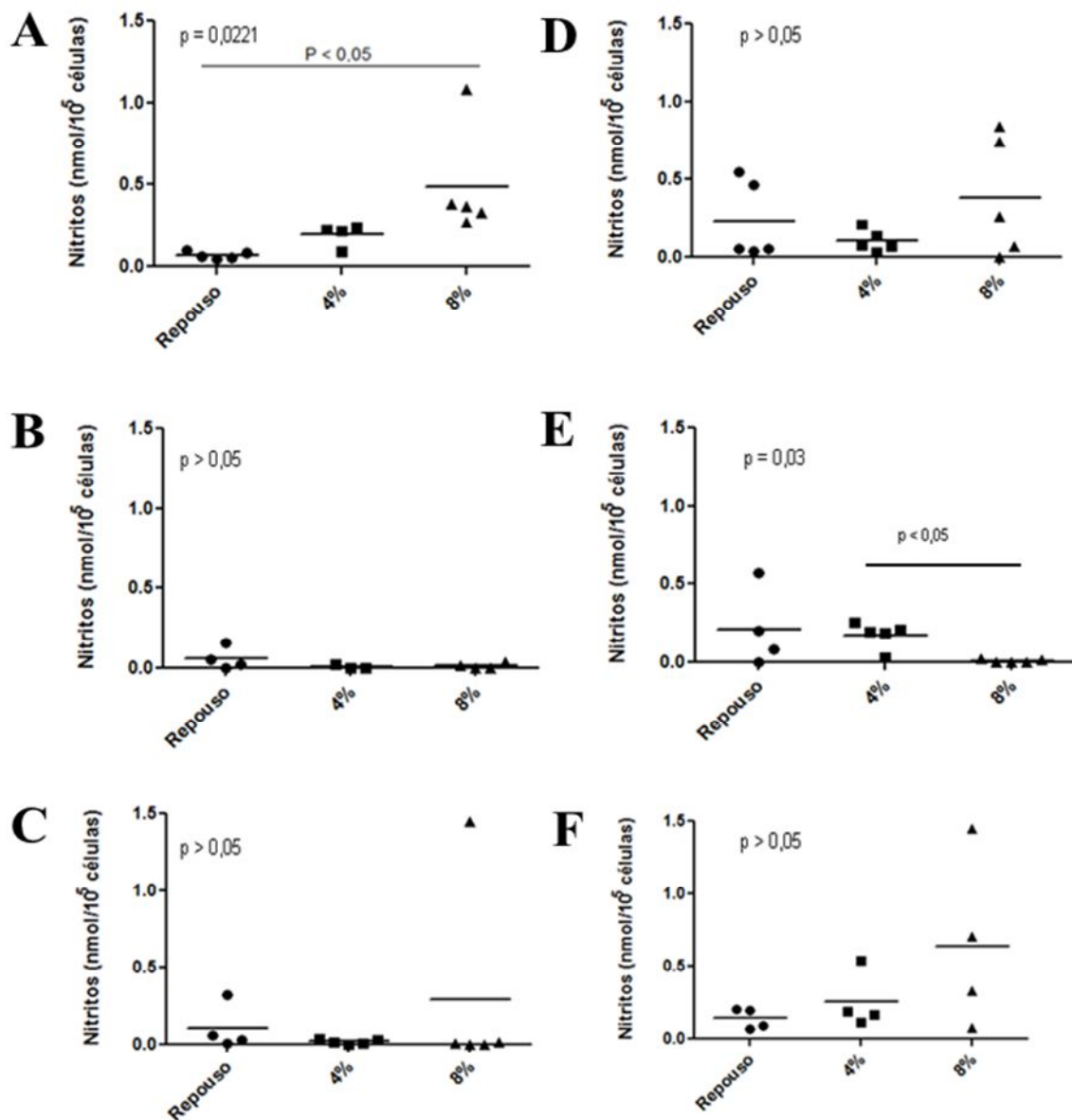


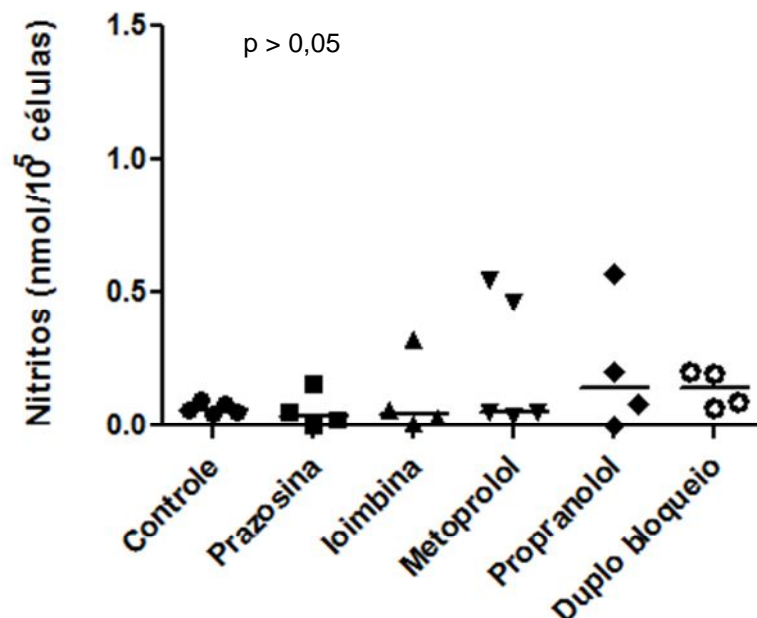
Figura 22. Avaliação da produção de nitritos, nmol/10<sup>5</sup> células, por macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. Em todos os bloqueios foi empregado ANOVA de uma via com post-hoc de Bonferroni.

Análogo à fagocitose (fig. 17), observamos na figura 22 que o grupo controle exibiu aumento na produção de nitritos dos macrófagos peritoneais de ratos submetidos ao nado, comprovado pela diferença significativa ( $p = 0,0221$ ). Além disso, o grupo exaustivo apresentou valor 8,1 vezes maior que o grupo repouso ( $p < 0,05$ ). Estudos prévios de nosso laboratório também demonstraram aumentos na produção de nitritos por monócitos circulantes de ratos submetidos a diferentes intensidades e durações de exercício físico (Silveira, Rodrigues et al. 2007, Scholer, Marques et al. 2016), confirmando os resultados encontrados no atual estudo, mesmo utilizando macrófagos residentes peritoneais.

Visualizamos também uma sólida redução na produção de nitritos do bloqueio propranolol da intensidade 4 % em relação a carga mais exaustiva, confirmada pela diferença estatística no bloqueio ( $p = 0,03$ ) e o pós-teste ( $p < 0,05$ ).

Além disso, observamos aumentos e reduções nas médias dos valores de nitritos, dos animais exercitados, nos bloqueios metoprolol e duplo bloqueio; e prazosina e ioimbina, respectivamente, porém, sem diferenças significativas dentro dos bloqueios.

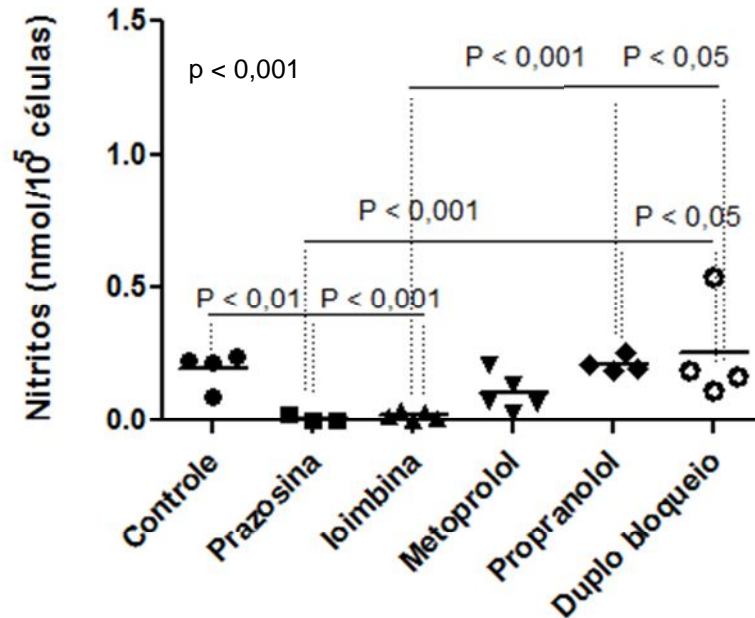
*Grupos repouso:*



**Figura 23.** Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores expressos em média, sem diferença significativa ( $p = 0,502$ ) pelo teste ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, na figura 23, não houve diferença significativa na produção de nitritos na intensidade repouso.

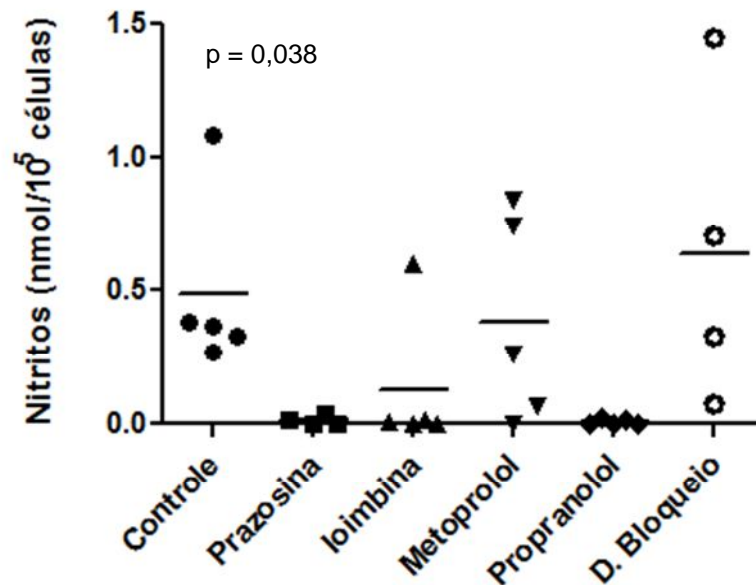
Grupos 4 %:



**Figura 24.** Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores com diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de ANOVA de uma via. Via pós-teste de Bonferroni, visualizamos diferenças entre os grupos: prazosina e duplo bloqueio; ioimbina e duplo bloqueio ( $p < 0,05$ ); controle e prazosina ( $p < 0,01$ ); controle e ioimbina; prazosina e propranolol; ioimbina e propranolol ( $p < 0,001$ ).

Na intensidade moderada, a resposta para produção de nitritos assemelhou-se a resposta fagocítica (figura 19), com diferenças significativas entre o controle e os grupos prazosina e ioimbina, este mais acentuado. Os bloqueios nestes grupos apresentaram diminuição de 94 % e 89 %, respectivamente, nas produções de nitritos. Portanto, em intensidade moderada de exercício físico, macrófagos peritoneais parecem ser ativados para a produção de óxido nítrico via receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Esta parece ser uma via conhecida de estimulação celular, pois células da microglia de rato estimuladas com agonista  $\alpha$ -adrenérgico, clonidina, apresentaram aumentos nas concentrações de nitritos, assim como estimulação por fenilefrina, agonista  $\beta$ -adrenérgico, porém produzindo metade da concentração de nitritos do agonista  $\alpha$ -adrenérgico (Mori, Ozaki et al. 2002).

Grupos 8 %:

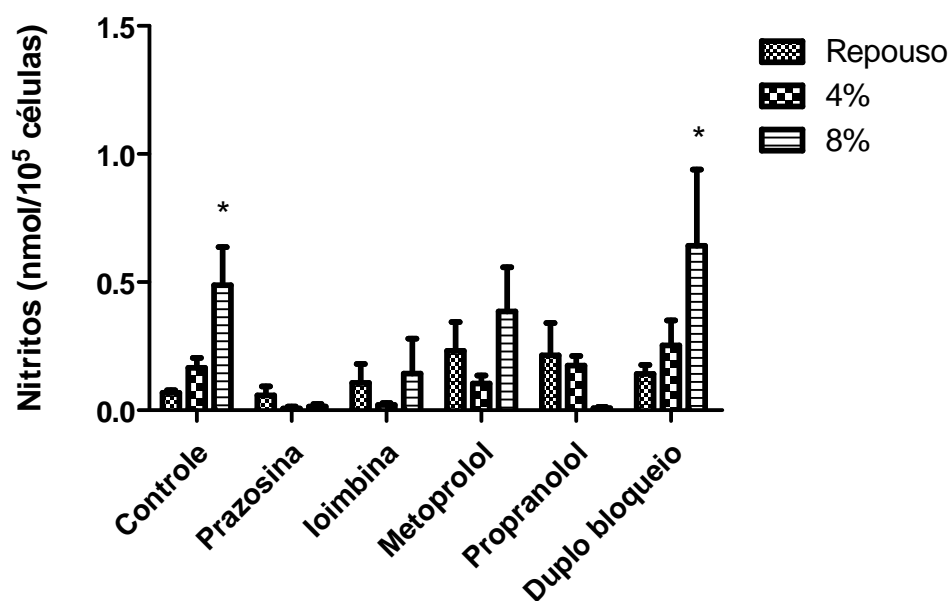


**Figura 25.** Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, até exaustão, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Dados com diferença significativa ( $p = 0,038$ ), por meio de ANOVA de uma via e pós teste de Bonferroni.

A figura 25, acima, apresentou diferença estatística, porém o pós-teste não detectou quais grupos foram diferentes. Verificamos bloqueio consistente e inquestionável da produção de nitritos nos grupos prazosina, ioimbina e propranolol.

Logo, assim como na intensidade moderada desta função e na intensidade exaustiva da fagocitose, a produção de nitritos parece ocorrer por ação conjunta dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, 1 e 2. Porém, ao contrário da fagocitose, e do esperado, a intensidade de 8 % não apresentou aumento na produção de nitritos no grupo propranolol.

A disponibilidade dos dois receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e a resultante produção de nitritos parece ser resposta aceitável para o bloqueio metoprolol. Entretanto, os mesmos receptores responsáveis por esta resposta pró-inflamatória celular estavam presentes no grupo propranolol e, de forma clara, a dispersão dos dados neste grupo não deixa dúvidas sobre a ausência da produção de nitritos.



**Figura 26.** Avaliação da produção de nitritos pelos macrófagos peritoneais, dos animais que nadaram em diferentes intensidades, além do repouso, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A interação ( $p = 0,04$ ) e as variáveis efeito da intensidade ( $p = 0,02$ ) e efeito do bloqueio ( $p = 0,02$ ) apresentaram diferenças significativa, pelo teste de ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey.

(\*) Em relação ao grupo repouso:  $p < 0,05$ .

Na figura 26, acima, além das diferenças encontradas na interação e nos efeitos da intensidade e bloqueio, observamos diferenças significativas entre o repouso e o grupo 8 % dentro de seus respectivos bloqueios, controle e duplo bloqueio.

Por este gráfico, observamos pelos valores de média a provável participação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, no perfil inflamatório de macrófagos peritoneais de ratos submetidos ao exercício físico, além da redução consistente na intensidade exaustiva do bloqueio com propranolol.

Para finalizar, em relação as funções celulares dos macrófagos peritoneais, ao que tudo indica, na intensidade moderada há influência, consistente, do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico enquanto que na intensidade exaustiva, há ativação conjunta de outros receptores, a fim de estabelecer sinalização mais eficiente. Além disso, merece destaque a possível modulação noradrenérgica, em ambas intensidades de exercício, visto que os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos apresentam maior afinidade por esta catecolamina.

De forma a visualizar os resultados das respostas celulares de modo mais compreensível, desenhamos a tabela abaixo:

**Tabela 2. Descrição das funções executadas pelo macrófago peritoneal nas diferentes intensidades de exercício físico e a ativação dos possíveis receptores adrenérgicos.**

	Grupo 4 %	Grupo 8 %
Fagocitose	Alfa 2	Alfa 1 e 2 e beta 1
Produção de nitritos	Alfa 1 e 2	Alfa 1 e 2 (?)



5.16 Análise do TBA-RS plasmático, 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios

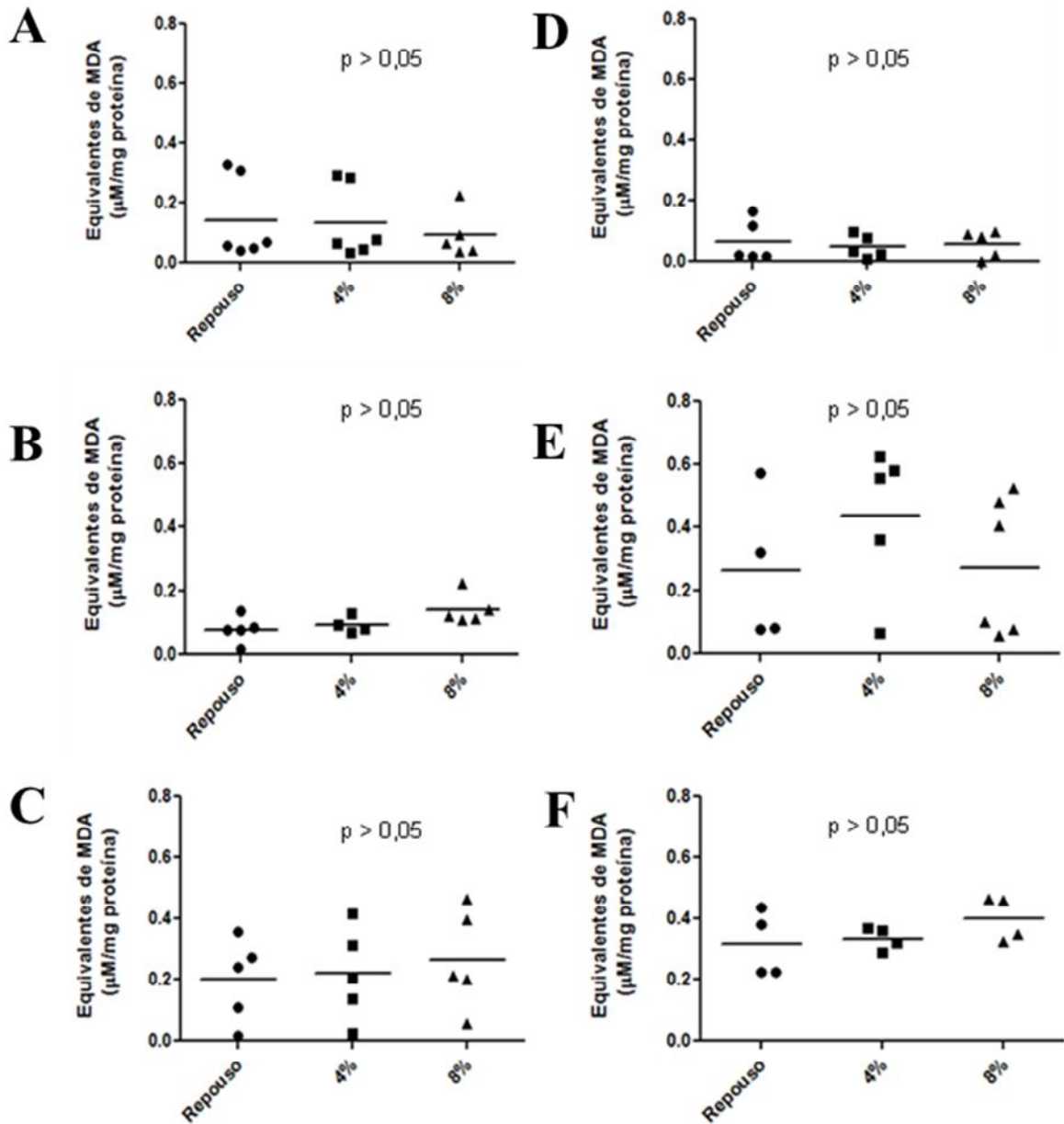


Figura 27. Concentração do TBA-RS plasmático, equivalentes de MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína), dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. O teste ANOVA de uma via não detectou diferenças significativa em nenhum dos bloqueios testados.

Visualizando a figura 27, não observamos diferenças entre as intensidades dentro de cada bloqueador, entretanto visualizamos um aumento dos valores de média de lipoperoxidação nos grupos bloqueados com ioimbina, propranolol e duplo bloqueio.

Grupos repouso:

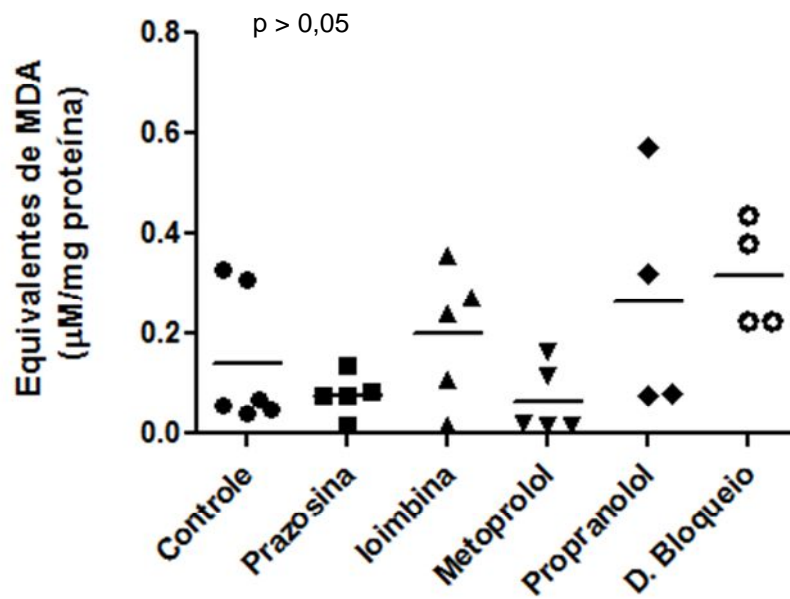
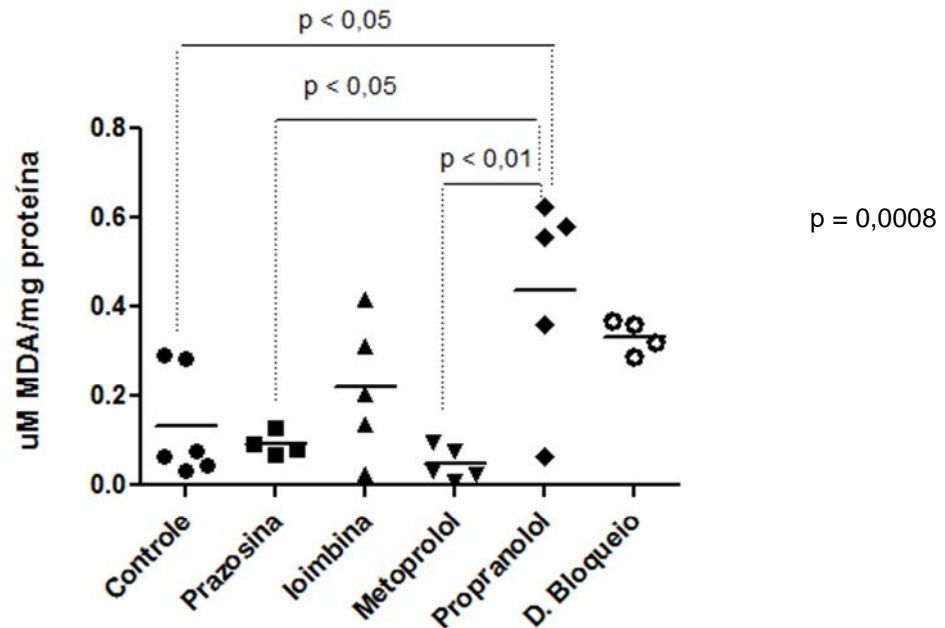


Fig 28. Concentração de TBA-RS plasmático dos animais, que permaneceram em repouso e com diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0507$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

Na figura 28 não observamos alteração significativa nos bloqueadores testados na situação repouso.

Grupos 4 %:

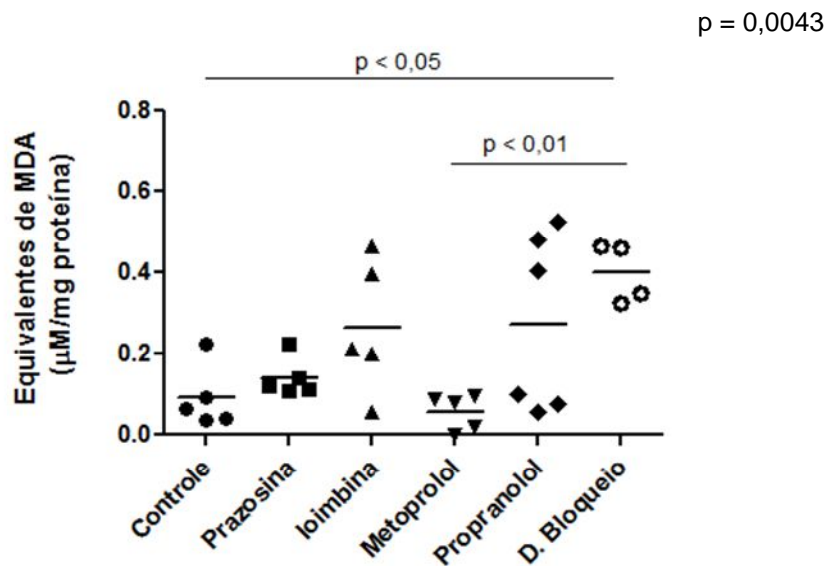


**Figura 29.** Concentração de TBA-RS plasmático dos animais que nadaram durante 20 minutos com intensidade de 4 % da MCT e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0008$ ) pelo teste de ANOVA de uma via. Pelo pós-teste de Bonferroni os grupos controle e prazosina apresentaram diferenças significativas em relação ao propranolol ( $p < 0,05$ ) e o grupo metoprolol em relação ao bloqueio ( $p < 0,01$ ).

Na figura 29 percebemos diferenças significativas do grupo propranolol com os bloqueadores metoprolol, prazosina e controle. O inibidor  $\beta$ -adrenérgico mostrou valor 3,3 vezes maior que o grupo que recebeu PBS ( $p < 0,05$ ).

O aumento do estresse oxidativo no bloqueio por propranolol, pode ser desencadeado pelos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, conhecidos por promover respostas pró-inflamatórias ao ligarem-se a noradrenalina, como na sepse em ratos (Miksa, Das et al. 2009). Adicionando, em virtude do bloqueio com metoprolol mostrar baixa peroxidação lipídica, o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico parece ser o responsável por equilibrar o estado inflamatório sistêmico, falhando quando bloqueado (de Montmollin, Aboab et al. 2009).

Grupos 8 %:



**Figura 30.** Concentração de TBA-RS plasmático, dos animais que nadaram até a exaustão, com sobrecarga de 8 % da MCT, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0043$ ) pelo teste de ANOVA de uma via. Os grupos controle e duplo bloqueio ( $p < 0,05$ ) e metoprolol e duplo bloqueio demonstraram diferença significativa ( $p < 0,01$ ), com o pós teste de Bonferroni.

Na intensidade exaustiva (fig. 30) observamos o valor do grupo duplo bloqueio sendo 4,4 vezes maior que o do controle, justificando a diferença estatística existente ( $p < 0,05$ ).

O aumento do TBA-RS sucedido nos animais do grupo duplo bloqueio não foi uma surpresa, já que foram administrados bloqueadores que, de modo isolado, demonstraram aumentos dos valores de média deste marcador em relação aos controles, como a ioimbina e o propranolol. Consideramos também todas as alterações metabólicas e sistêmicas que a anulação da sinalização adrenérgica desencadeou.

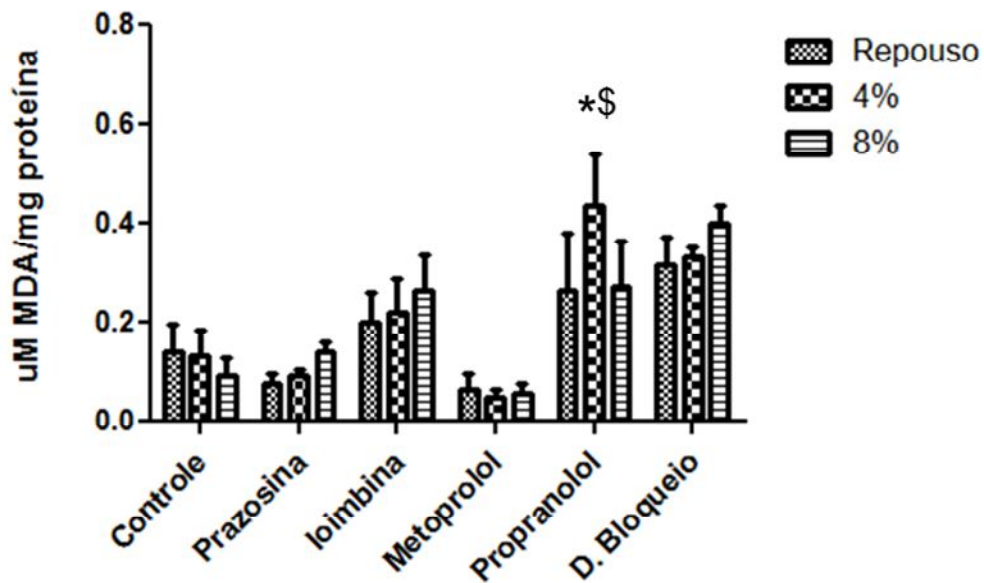


Figura 31. Concentração de TBA-RS plasmáticos, dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,69$ ) e do efeito da intensidade do exercício ( $p = 0,59$ ) não apresentaram diferenças significativas, porém a variável efeito do bloqueio apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ).

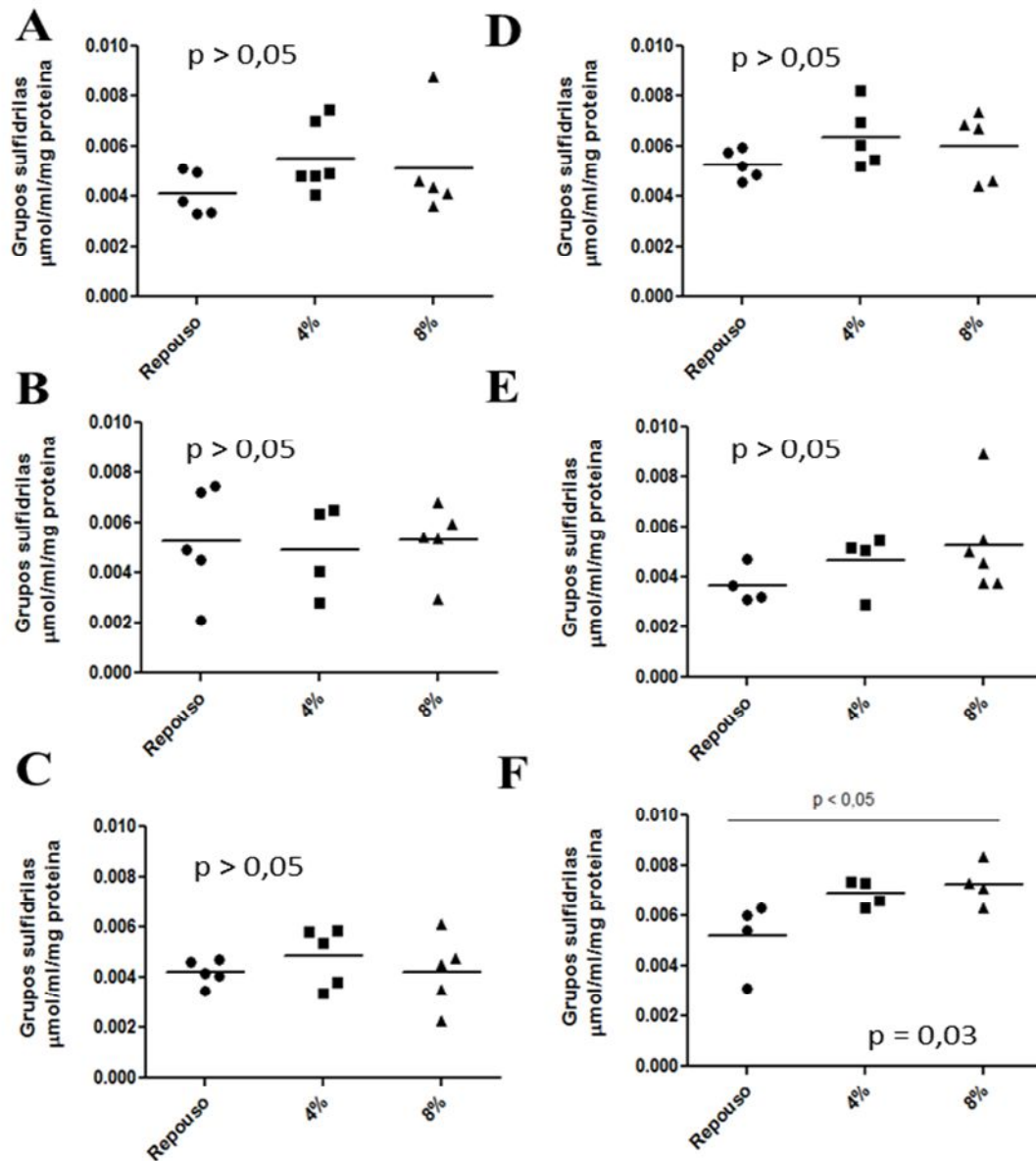
(\*) Em relação à respectiva intensidade nos bloqueios controle e prazosina:  $p < 0,05$ ;

(\$) Em relação à respectiva intensidade no bloqueio metoprolol:  $p < 0,01$ .

Pelo gráfico (fig. 31), observamos que as diferenças significativas em relação ao grupo controle ocorreram devida as elevadas concentrações de TBA-RS no grupo 4% do propranolol.

Ao analisarmos todos os bloqueios e intensidades de exercício juntos, observamos redução significativa nos valores de média, independente da intensidade de exercício, nos níveis desse marcador no grupo metoprolol. Ao contrário, os bloqueios ioimbina, propranolol e duplo bloqueio resultaram nos maiores valores de média das concentrações de TBA-RS.

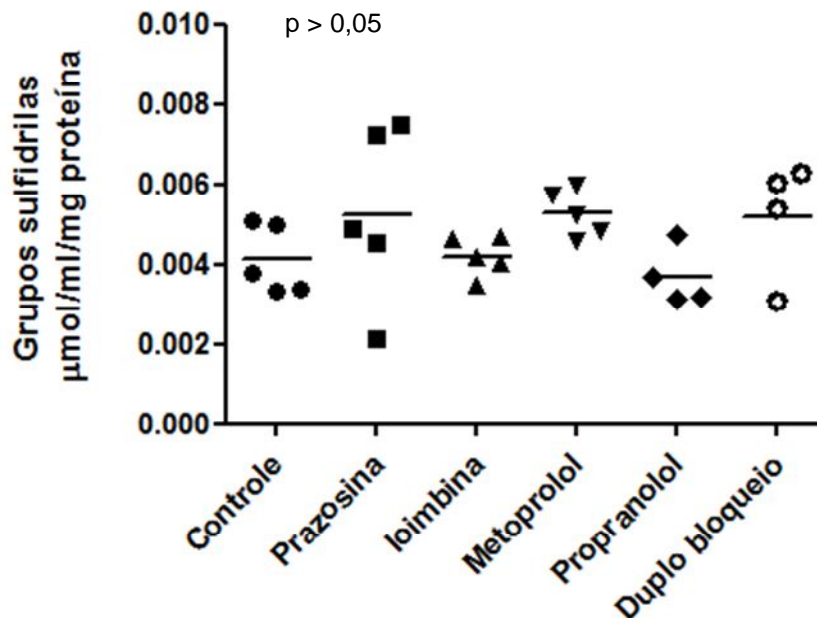
**5.17 Análise de sulfidrilas plasmáticas 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios**



**Figura 32.** Concentração de sulfidrilas plasmáticas,  $\mu\text{mol/mL/mg}$  proteína, dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina, (D) metoprolol, (E) propranolol e (F) bloqueio duplo. Por meio de ANOVA de uma via apenas o duplo bloqueio apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Apesar de observarmos discreto aumento nos valores de média dos níveis de sulfidrilas plasmáticas nas intensidades 4 % e/ou 8 %, nos grupos controle, ioimbina, metoprolol, propranolol e duplo bloqueio (fig. 32), só este último apresentou diferença estatística ( $p = 0,03$ ), sendo significativa entre o repouso e a intensidade exaustiva ( $p < 0,05$ ). Todavia, apesar desta diferença significativa acreditamos que o estresse causado pela total inibição adrenérgica associada ao impedimento das respostas regulatórias ao esforço físico, seja o principal responsável por estas alterações.

*Grupos repouso:*



**Figura 33.** Concentração da concentração de sulfidrilas plasmáticas dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,229$ ), conforme teste estatístico ANOVA de uma via.

Nesta intensidade de exercício (fig. 33), não houve alteração significativa entre os diferentes bloqueios, conforme o esperado.

Grupos 4 %:

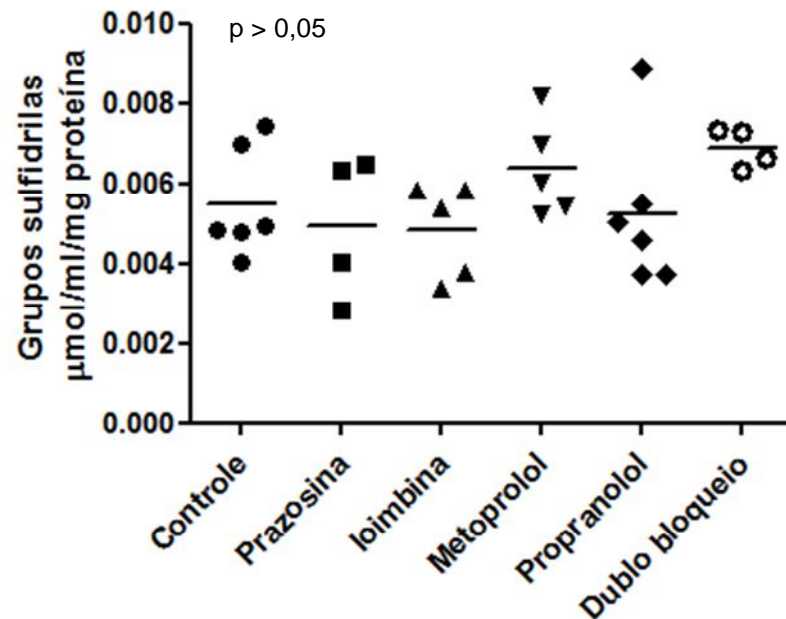


Figura 34. Concentração de sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram durante 20 minutos com intensidade de 4 % da MCT e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,237$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Nesta intensidade de exercício (fig. 34), de novo não houve diferença estatística entre os bloqueios testados.



Grupos 8 %:

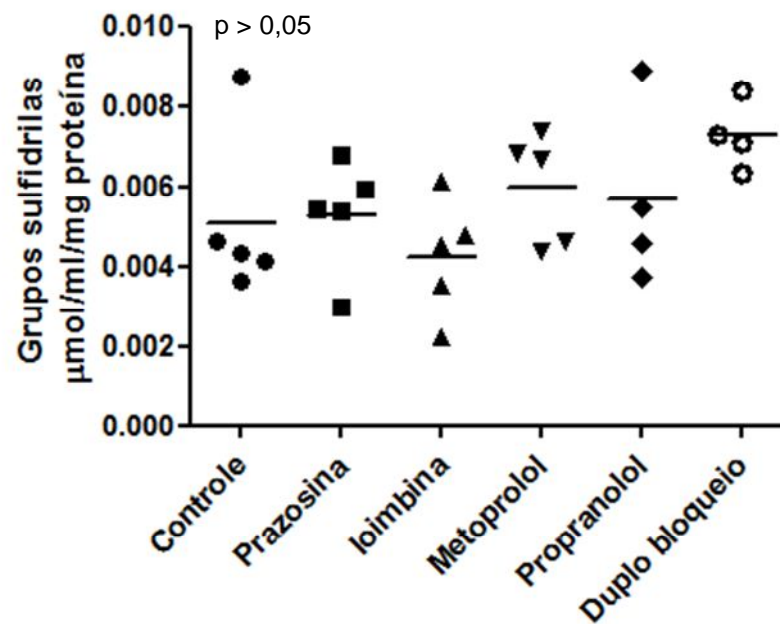
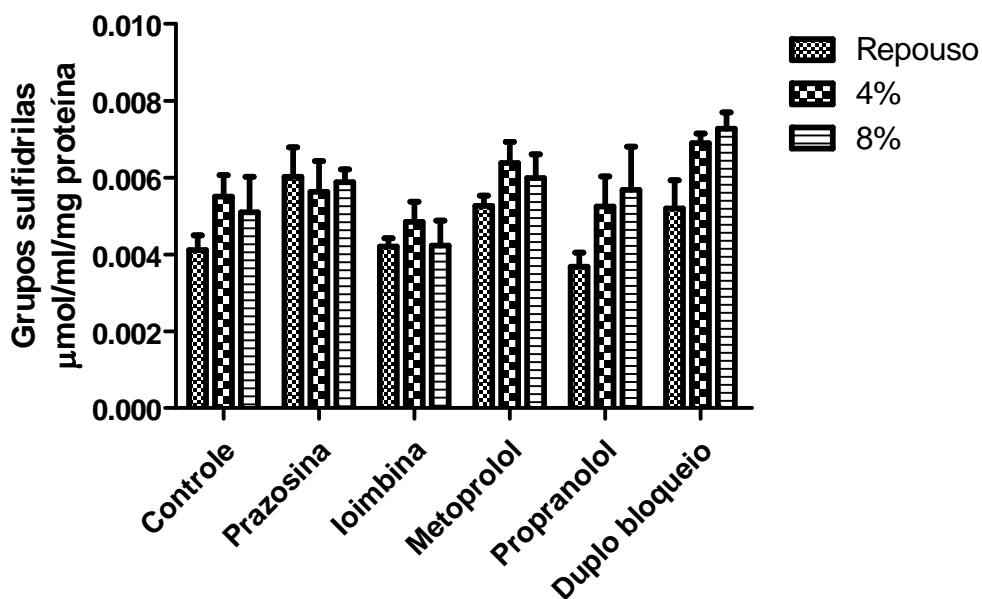


Figura 35. Concentração de sulfidrilas plasmáticas dos animais que nadaram até a exaustão com intensidade de 8 % da MCT e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,14$ ), conforme teste ANOVA de uma via.

Nesta intensidade exaustiva (fig. 35) os dados também não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 36.** Concentração de sulfidrilas plasmáticas, dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. De acordo com ANOVA de duas vias, a análise da interação ( $p = 0,76$ ) não apresentou diferença significativa, porém as variáveis efeito da intensidade do exercício ( $p = 0,011$ ) e efeito do bloqueio ( $p = 0,0013$ ) apresentaram.

Observamos que na figura 36 foi detectada robusta diferença significativa nas variáveis intensidade de exercício e bloqueio, contrariando as análises anteriores. Porém o teste estatístico de Tukey não demonstrou em qual dado houve essa alteração.

A partir deste momento as análises realizadas nos macrófagos, foram efetuadas em todas as intensidades de exercício físico, mas apenas nos grupos controle, prazosina, ioimbina e propranolol. Esta escolha decorreu-se pelo fato da restrição metodológica dos equipamentos, pois, infelizmente, tanto o PCR em tempo real como o western blotting não comportavam todas as amostras, ao mesmo tempo. Portanto, para evitar interferência interplacas ou interanálises, optou-se pelos bloqueios  $\alpha_1$ - e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, possíveis receptores chaves da estimulação adrenérgica, e inespecífico, por ser a resposta oposta aos  $\alpha$ -adrenérgicos.

### 5.18. Análise da expressão de proteínas, 6 h após o término da sessão de exercício com os diferentes bloqueios

Para detectar o conteúdo intracelular de proteínas, que estão relacionadas com o perfil inflamatório do macrófago, empregamos a técnica de western blotting. Por intermédio desta, analisamos as seguintes proteínas:

*HSP70*:

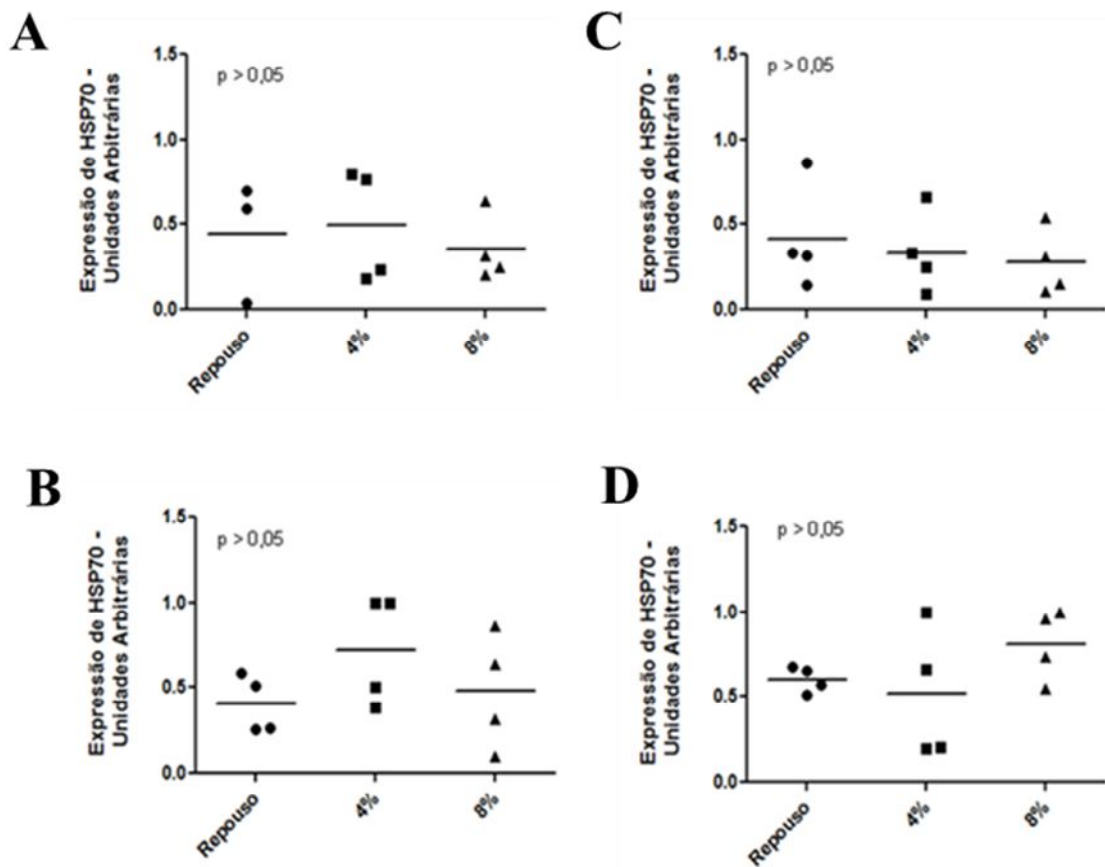
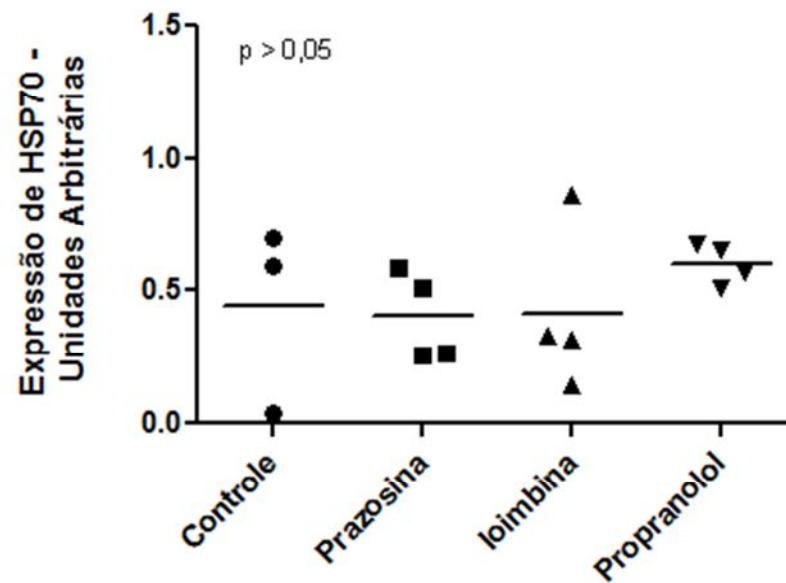


Figura 37. Conteúdo intracelular de HSP70, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. O teste ANOVA de uma via não detectou diferenças significativas nos dados analisados.

Por esta avaliação não observamos diferença estatística em nenhum dos bloqueios utilizados (fig. 37), nem mesmo nas diferentes intensidades do bloqueio com PBS que apresentaram elevadas respostas funcionais, fagocitose e produção de nitritos.

*Grupos repouso:*



**Figura 38.** Imunodeteção de HSP70, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,59$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Não houve diferença estatística entre os bloqueios na situação repouso (fig. 38), um resultado esperado.

Grupos 4%:

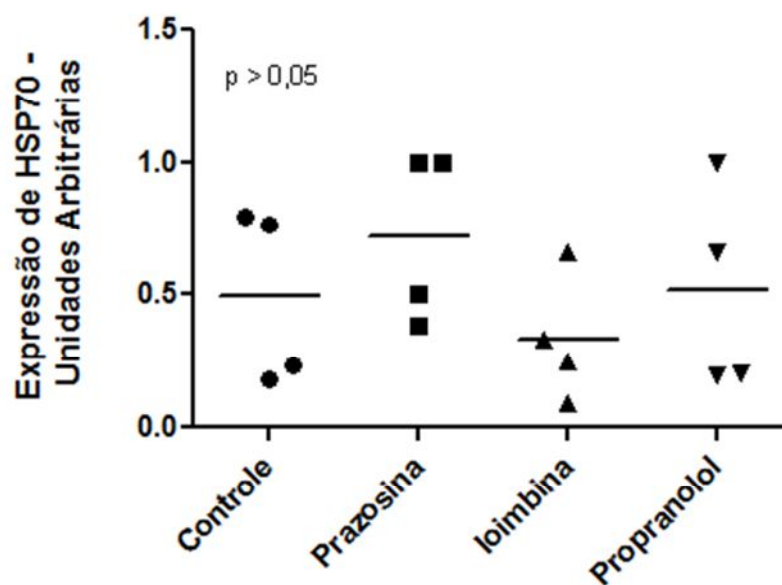
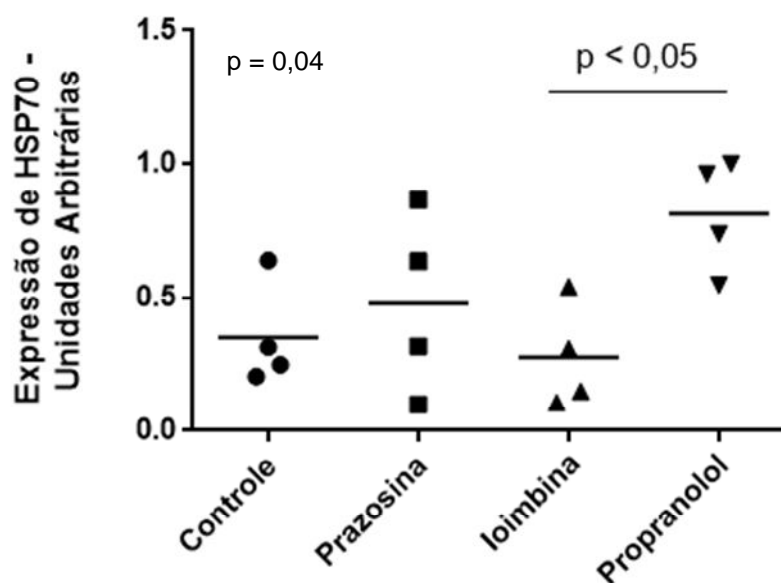


Figura 39. Imunodeteção de HSP70, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,41$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

A intensidade moderada de exercício (fig. 39) não demonstrou diferença significativa em relação aos diferentes bloqueios testados. Assim, ao que parece, esta intensidade de exercício não promoveu modificações no conteúdo de HSP70, independente do bloqueio farmacológico utilizado.

Grupos 8 %:



**Figura 40.** Imunoconteúdo de HSP70, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados apresentaram diferença significativa ( $p = 0,04$ ), por meio de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os bloqueios ioimbina e propranolol apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A intensidade mais exaustiva (fig. 40) demonstrou modificação significativa ( $p < 0,05$ ), com diferença entre o grupo ioimbina e propranolol ( $p < 0,05$ ), sem exibir alterações do conteúdo de HSP70 em relação ao grupo controle.

Esse resultado confirma o antagonismo da resposta entre os receptores  $\alpha_2$  e  $\beta$  assim como as respostas observadas para fagocitose (fig. 20), nesta mesma intensidade de exercício. Assim, em virtude da potente resposta inflamatória nas células do grupo propranolol houve a necessidade de proteção celular com indução de HSP70 ao contrário do grupo ioimbina, sem ativação celular.

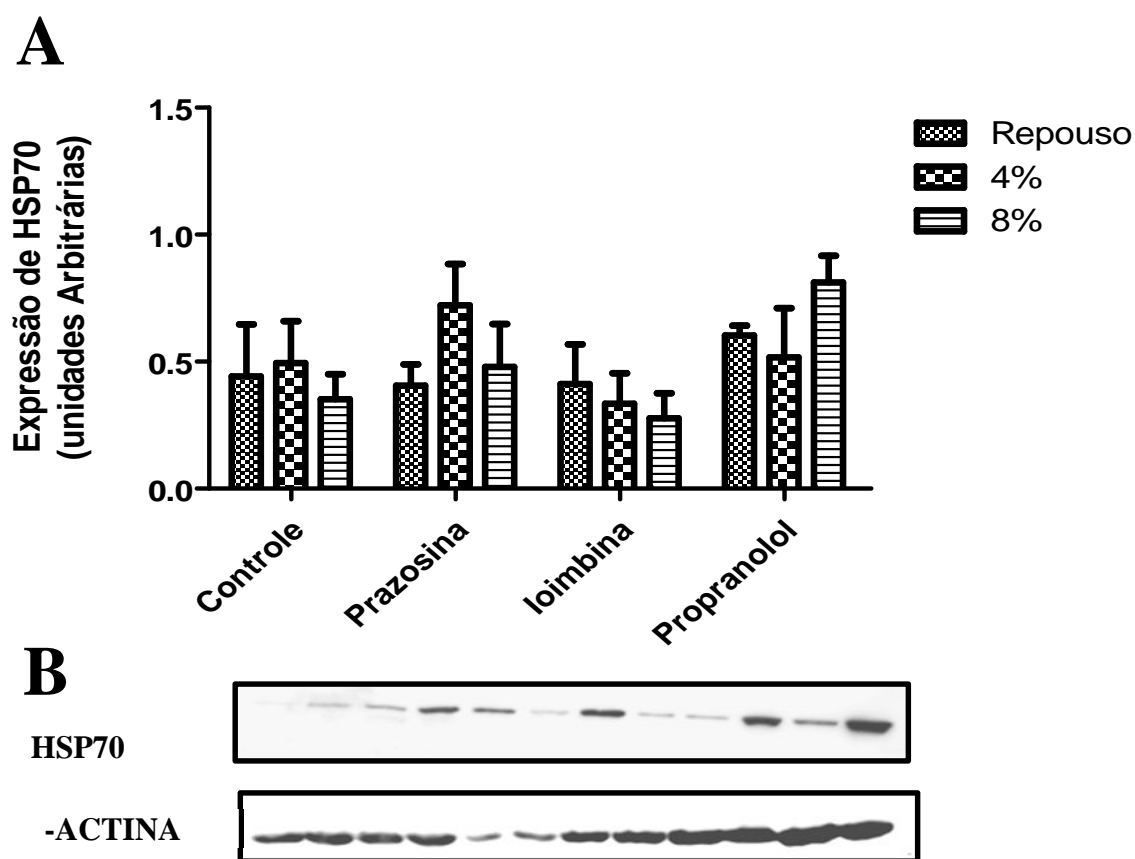
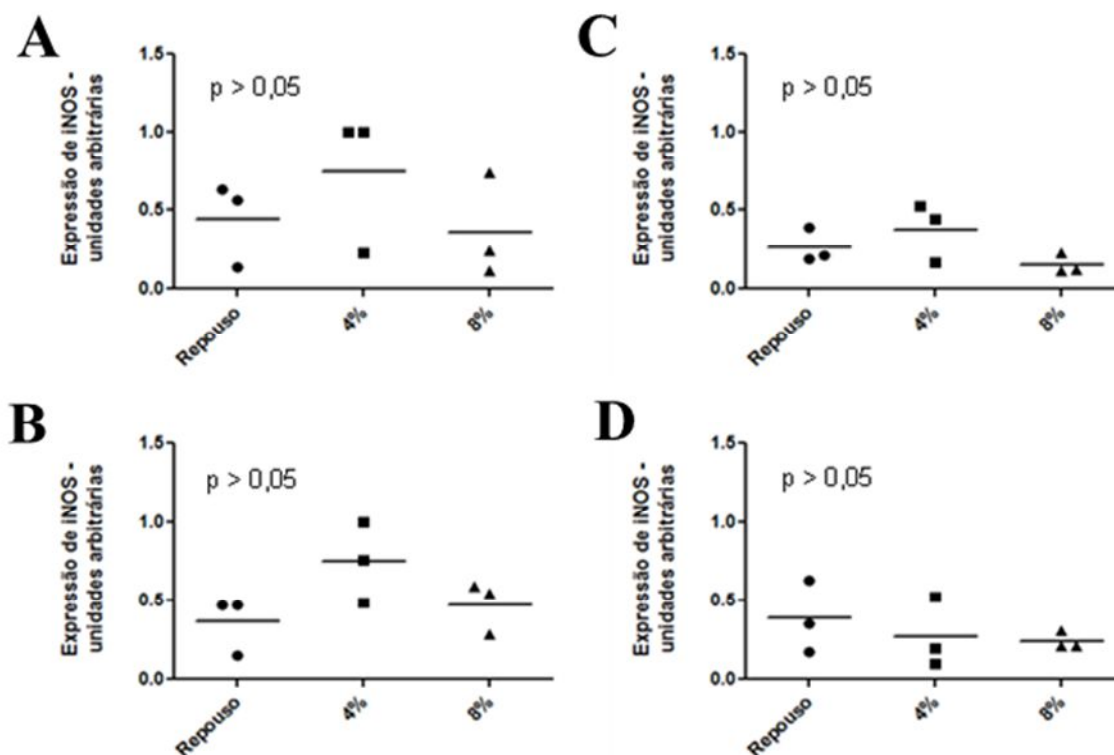


Figura 41. (A) Conteúdo intracelular de HSP70, u.a., em macrófagos peritoneais dos animais que nadaram em diferentes intensidades, além do bloqueio, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,42$ ), o efeito da intensidade do exercício ( $p = 0,86$ ) e o efeito do bloqueio ( $p = 0,058$ ) não apresentaram diferenças significativas. (B) Imagens representativas de HSP70 e -actina.

Utilizando ANOVA de duas vias não houve diferenças significativas entre os diferentes bloqueios e intensidades testadas para HSP70 (fig. 41).

Como observamos aumento na produção de NO 6 h após o exercício e por ser considerada um marcador clássico do perfil pró-inflamatório de macrófagos (Rath, Muller et al. 2014), passamos a analisar a participação de receptores adrenérgicos sobre o conteúdo intracelular de iNOS nas diferentes intensidades de exercício físico e no repouso.

*i*NOS:



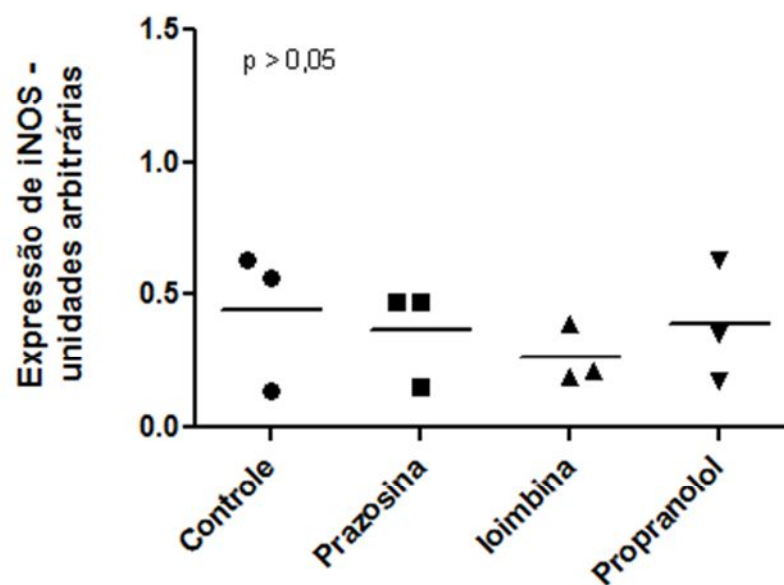
**Figura 42.** Conteúdo intracelular de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Os dados não apresentaram diferença estatística de acordo com o teste ANOVA de uma via.

Não houve diferença significativa entre as diferentes intensidades de exercício físico dentro de cada bloqueio (fig. 42).

Assim como ocorreu com a HSP70 (fig 37), iNOS não teve alteração significativa entre as diferentes intensidades de exercício no bloqueio controle, com PBS, apesar de ter ocorrido robusta produção de NO.



*Grupos repouso:*



**Figura 43.** Conteúdo de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,88$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, no repouso não houve diferença estatística entre os bloqueios (fig. 43).

Grupos 4 %:

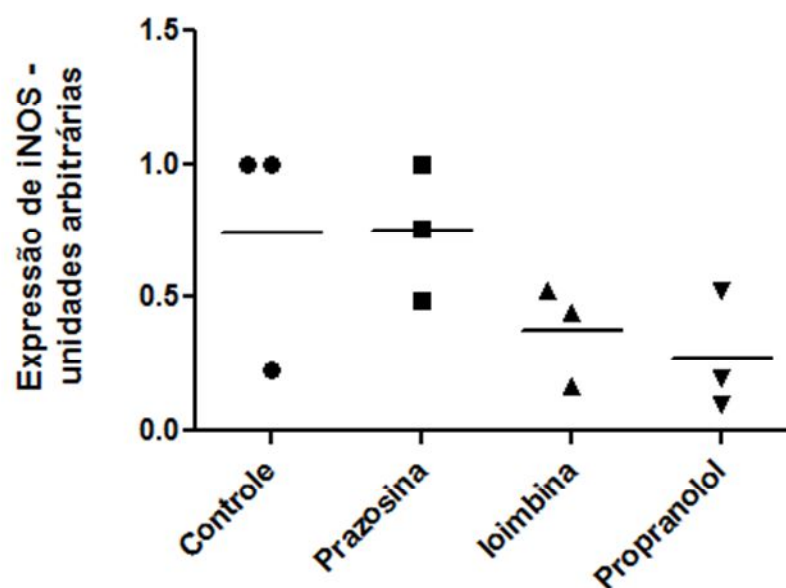
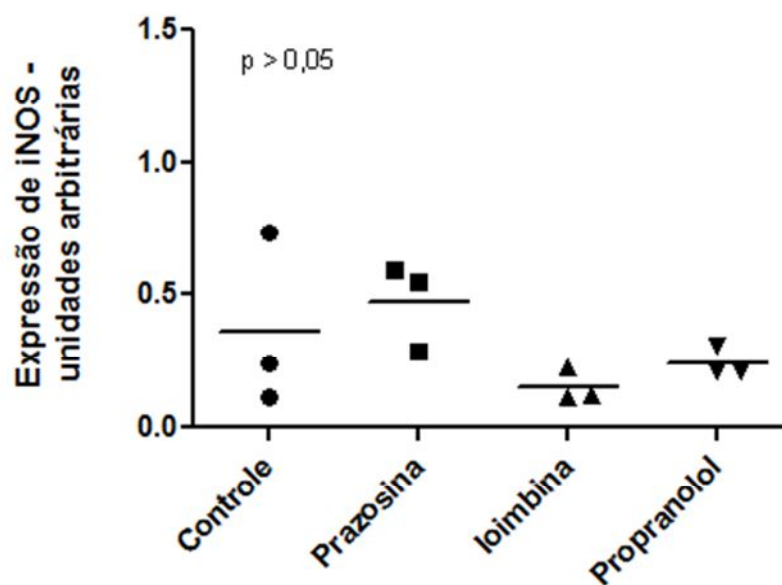


Figura 44. Conteúdo intracelular de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,18$ ), utilizando o teste de ANOVA de uma via.

Não foi possível detectar diferenças significativas entre os bloqueios testados na intensidade moderada (fig. 44).

Chama a atenção que, embora não exista diferença estatística no conteúdo da enzima iNOS entre os diferentes bloqueios (fig. 44), o NO, produto da ação de iNOS sobre L-Arginina, demonstrou-se com robusta diferença estatística nesta mesma intensidade de exercício e com os mesmos bloqueios (fig. 24)

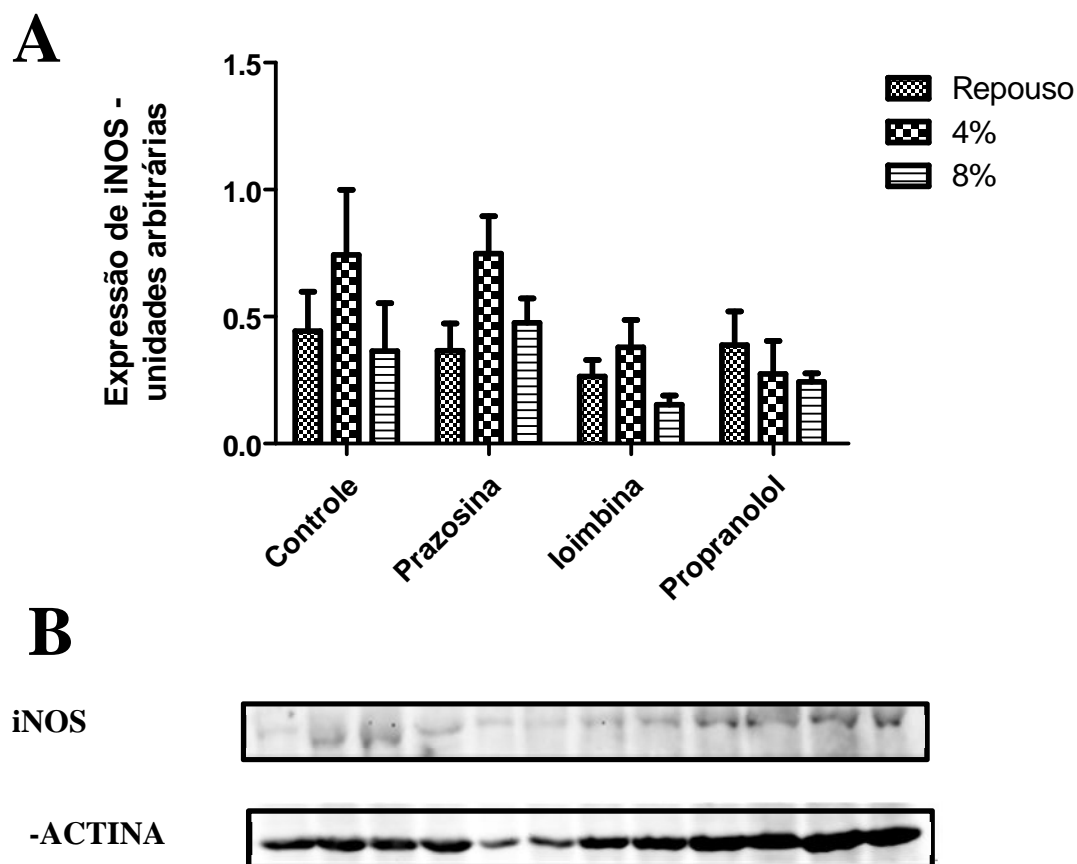
Grupos 8 %:



**Figura 45.** Conteúdo intracelular de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,24$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

Não houve diferença estatística nesta intensidade de exercício físico em relação aos diferentes bloqueadores (fig. 45).

Assim como o ocorrido na concentração de iNOS da intensidade 4 % (fig. 44), a intensidade exaustiva não demonstrou diferença significativa do conteúdo desta enzima em relação aos diferentes bloqueios testados (fig. 45), mesmo tendo sido detectadas elevadas concentrações de NO com diferenças significativas nesta mesma intensidade de exercício (fig 25).



**Fig 46. (A)** Concentração intracelular de iNOS, u.a., em macrófagos peritoneais dos animais que nadaram em diferentes intensidades, além do repouso, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,61$ ) e o efeito da intensidade do exercício ( $p = 0,06$ ) não apresentaram diferenças significativas. O efeito bloqueio apresentou diferença significativa ( $p = 0,04$ ). O pós teste de Tukey não demonstrou em quais dados ocorreram estas alterações. **(B)** Imagens representativas de iNOS e -actina.

A análise conjunta das variáveis intensidade de exercício e bloqueio revelou diferença significativa entre os bloqueios (fig. 46A). Porém, o pós teste não identificou os dados que sofreram esta alteração.

#### *Arginase I:*

Ao contrário de iNOS, a enzima arginase I, que compete com a iNOS pela disponibilidade de arginina intracelular, é conhecida por ser marcador do fenótipo anti-inflamatório do macrófago (Rath, Muller et al. 2014). Logo, também se fez necessária sua avaliação.

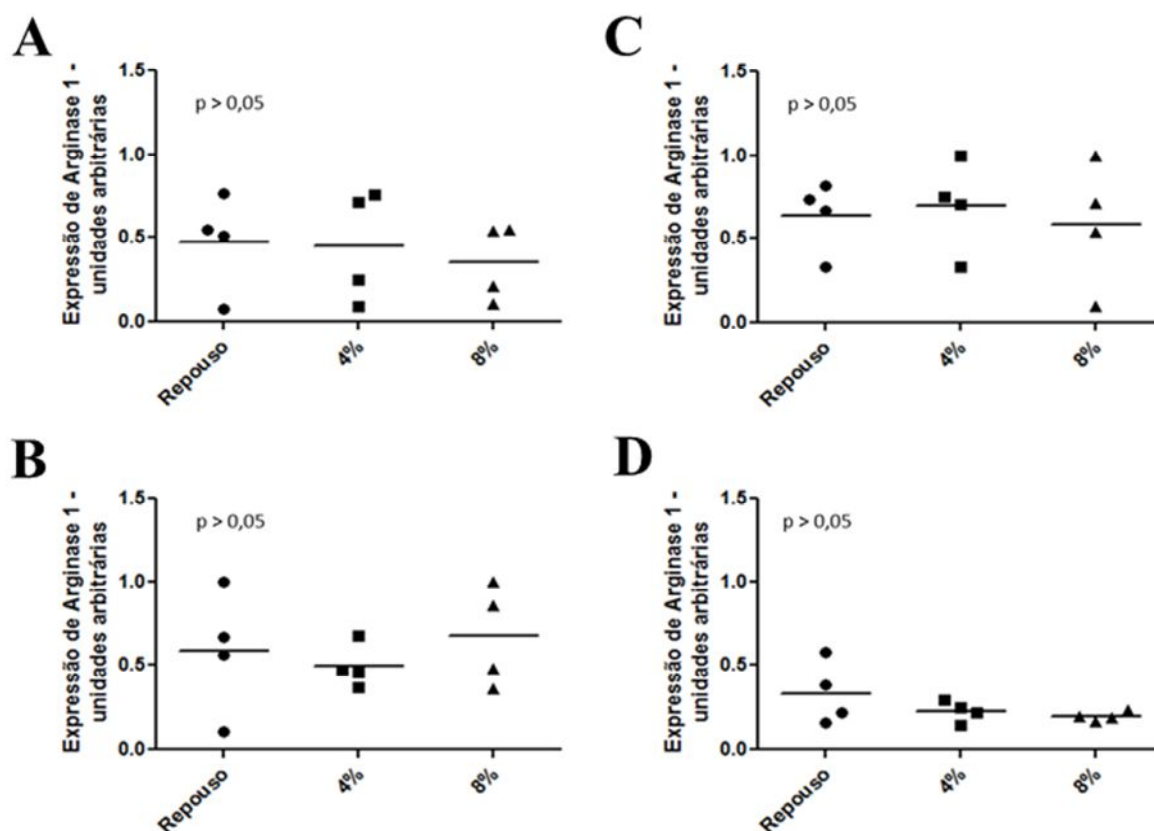


Figura 47. Conteúdo intracelular de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Pelo teste de ANOVA de uma via não houve diferenças significativas.

Conforme podemos observar, nenhum dos bloqueios apresentou diferença significativa (fig. 47). Entretanto, visualizamos considerável redução nos conteúdos desta enzima, principalmente nos grupos exercitados, do bloqueio propranolol (fig. 47D) em relação aos demais bloqueios.

Grupos repouso:

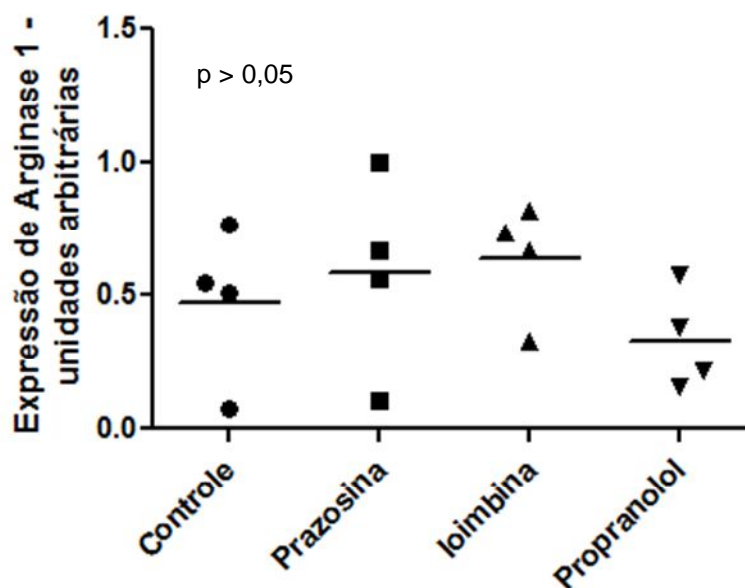
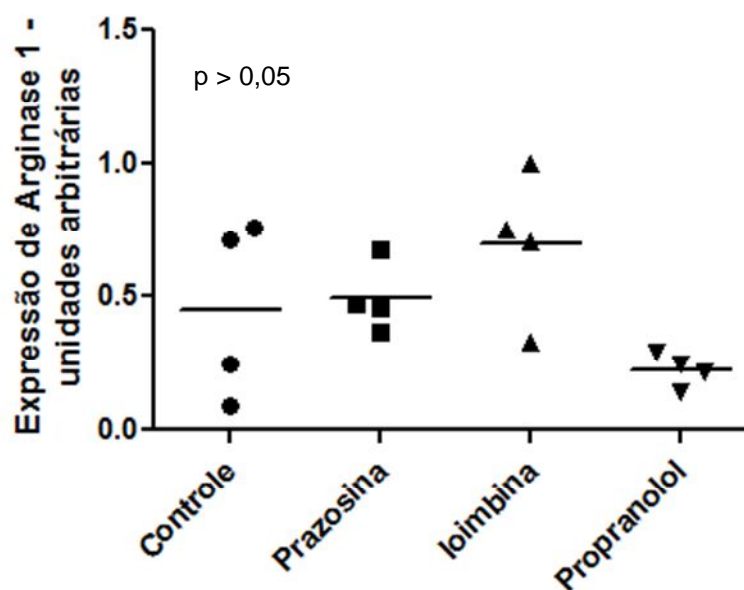


Figura 48. Imunodeteção de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,43$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, não houve diferença estatística significativa no repouso entre os diferentes bloqueios testados (fig. 48).

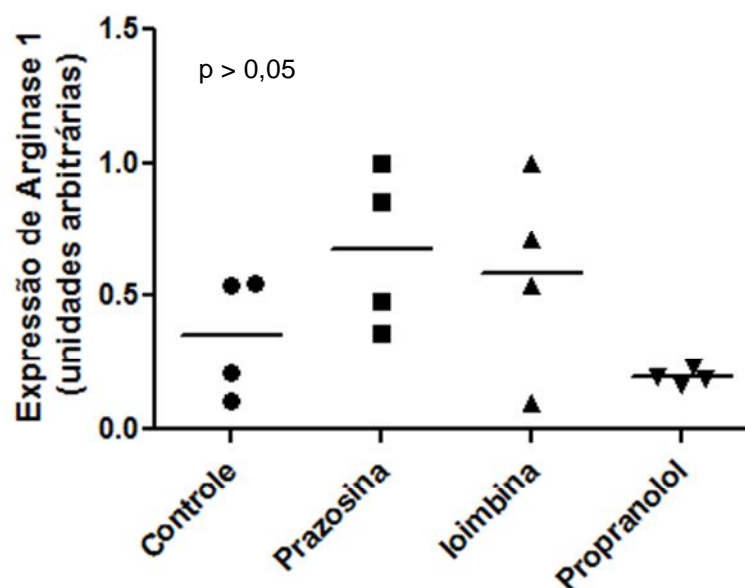
Grupos 4 %:



**Figura 49.** Conteúdo de arginase I, u.a., dos macrófagos peritoneais de animais que nadaram com sobrecarga de 4 % (MCT) e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Utilizando ANOVA de uma via, os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,08$ ).

Nesta intensidade testada, não houve diferença significativa entre os diferentes bloqueios na enzima arginase I (fig. 49), nem mesmo nos bloqueios de prazosina e ioimbina em virtude das reduzidas respostas celulares de fagocitose (fig. 19) e produção de NO (fig. 24), nesta mesma intensidade de exercício físico.

Grupos 8 %:

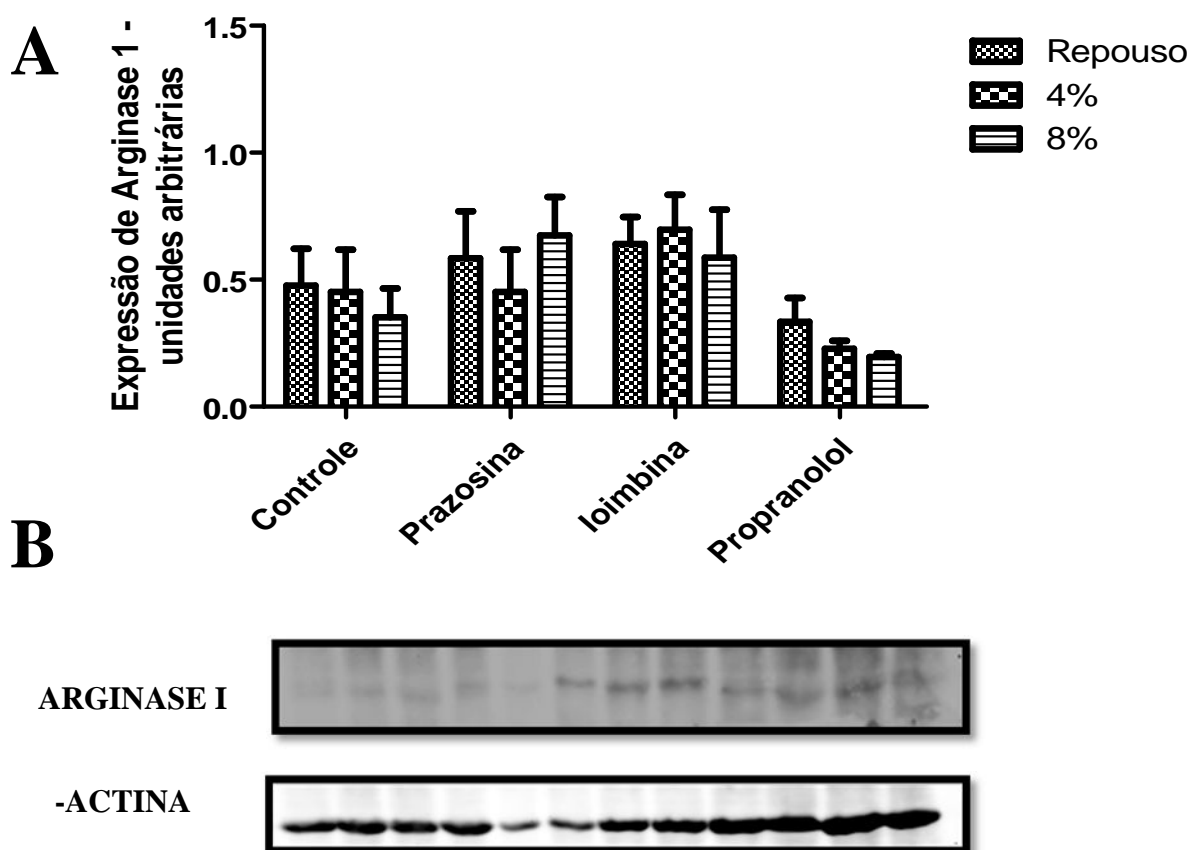


**Figura 50.** Conteúdo de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram até a exaustão com 8 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Pela ANOVA de uma via, os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,09$ ).

Outra vez, não houve diferença significativa entre os diferentes bloqueios (fig. 50).

Assim como ocorrido na intensidade moderada (fig. 49), apesar dos bloqueios prazosina e ioimbina reduzirem a resposta funcional, fagocitose (fig. 20) e produção de NO (fig. 25) nestas células, este fato não apresentou relação com aumento na concentração de arginase I na intensidade exaustiva (fig. 50).





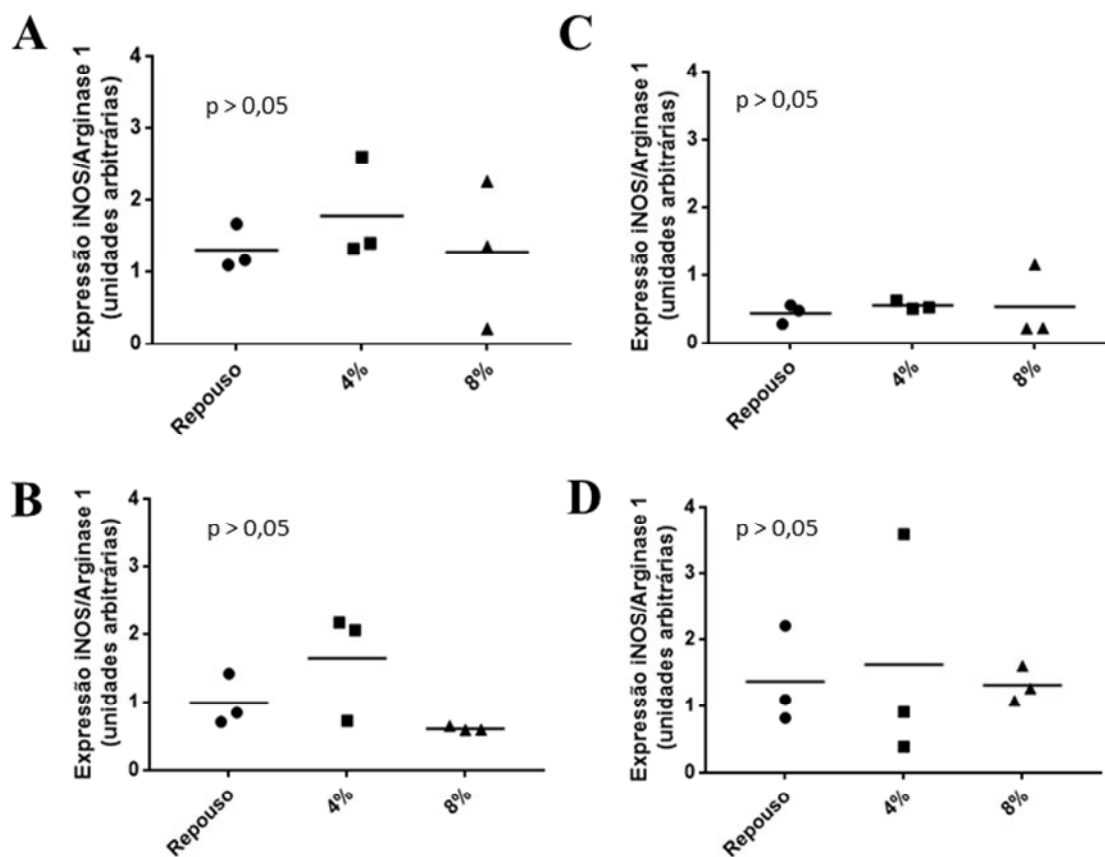
**Figura 51.** Conteúdo de arginase I, u.a., dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,88$ ) e o efeito da intensidade do exercício ( $p = 0,8$ ) não apresentaram diferenças significativas, porém a variável efeito do bloqueio ( $p = 0,0067$ ) apresentou diferença muito significativa. O post-hoc de Tukey não demonstrou os dados que apresentaram diferença.

Constatamos que as intensidades do exercício, propostas pelo estudo, aparentemente, não demonstraram interferência na quantidade de enzima disponível para o metabolismo celular, independente do bloqueio utilizado (fig. 51A). Entretanto, o teste estatístico detectou diferença significativa no efeito do bloqueio sem o pós teste indicar em quais dados houve essa modificação.

#### *Perfil inflamatório – iNOS/Arginase I*

Propusemos um perfil intracelular para indicar o estado inflamatório do macrófago (pró-inflamatório ou anti-inflamatório) utilizando uma razão entre os valores, em unidades arbitrárias, de iNOS e arginase I. Realizamos a análise gráfica entre as intensidades 4 e 8 % e

o repouso e, depois, a análise conjunta das duas variáveis, intensidade do exercício físico e bloqueio farmacológico.



**Figura 52.** Razão do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I), u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Pelo teste de ANOVA de uma via não houve diferenças significativas.

Apesar do teste estatístico não detectar diferença significativa entre os bloqueios testados (fig. 52), é possível observarmos uma redução consistente na razão iNOS/Arginase I no bloqueio ioimbina (fig. 52C).

Grupos repouso:

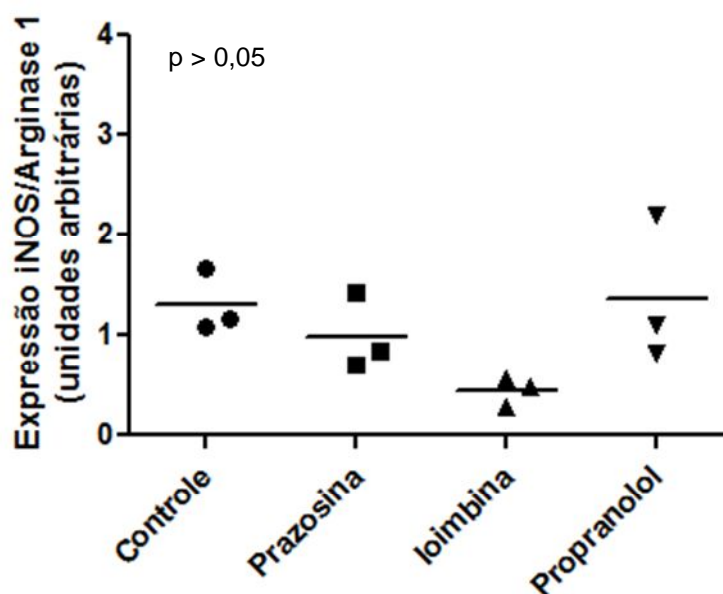


Figura 53. Razão do perfil intracelular inflamatório (iNOS/Arginase I), u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Valores descritos em média  $\pm$  EPM. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,11$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, assim como no repouso das proteínas iNOS (fig. 43) e arginase I (fig. 48), não houve diferença estatística na razão iNOS/Arginase I entre os diferentes bloqueios testados no repouso (fig. 53).

Grupos 4 %:

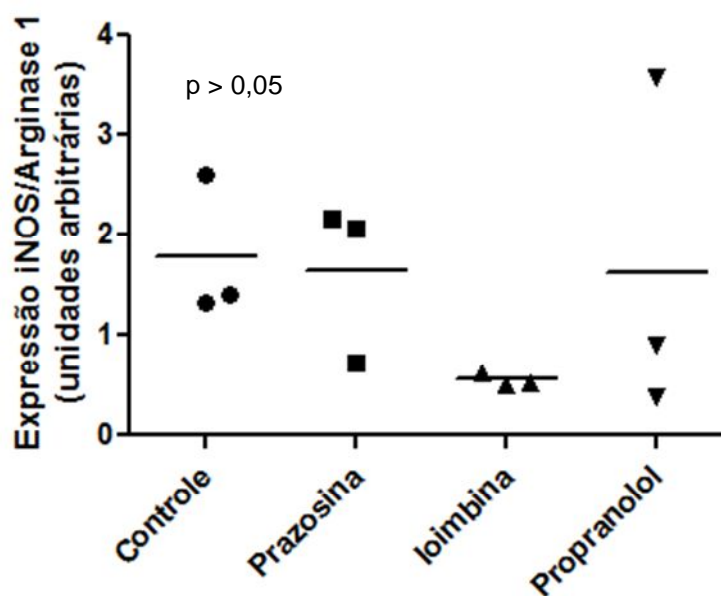


Figura 54. Razão do perfil intracelular inflamatório (iNOS/Arginase I), u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,46$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Assim como não houve diferença significativa na intensidade moderada de iNOS (fig. 44) e arginase I (fig. 49) entre os diferentes bloqueios testados, nesta mesma intensidade de exercício não houve diferença significativa na razão iNOS/Arginase I entre os bloqueios utilizados (fig. 54).

Grupos 8 %:

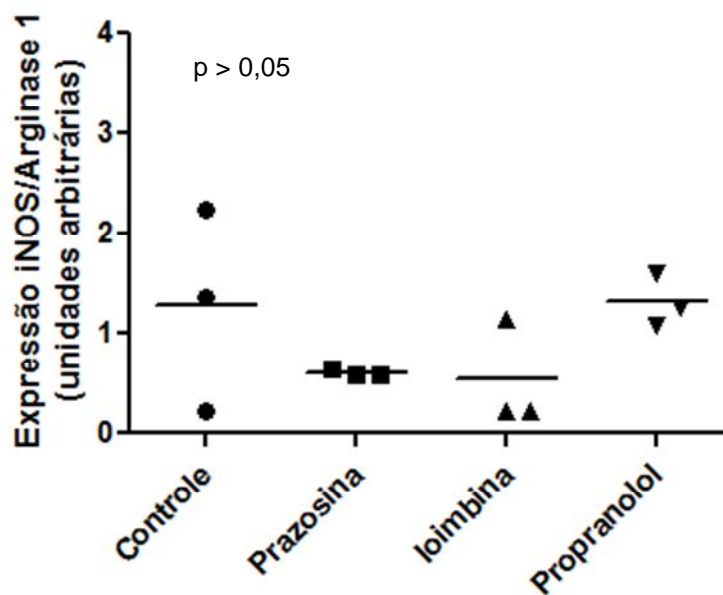
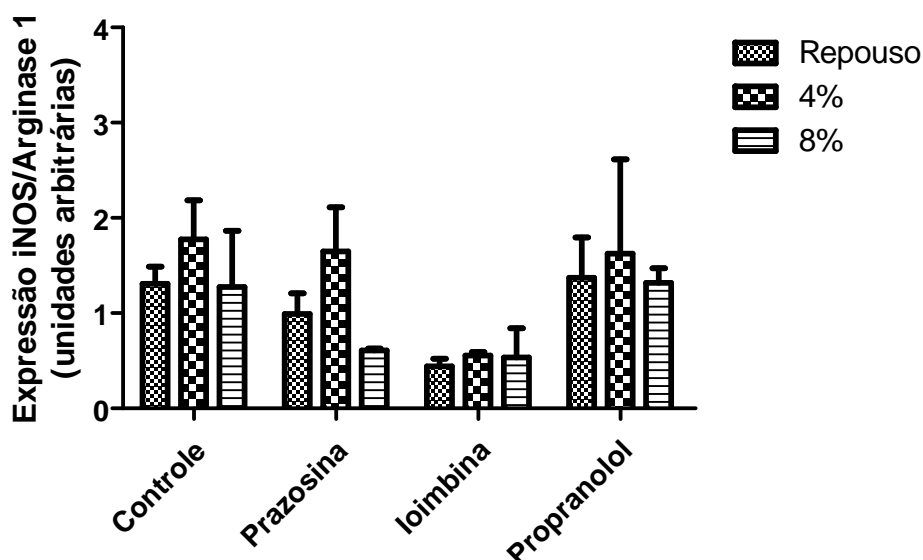


Figura 55. Razão do perfil intracelular inflamatório (iNOS/arginase I), u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram até a exaustão com 8 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Pelo teste de ANOVA de uma via os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,28$ ).

Repete-se a situação da intensidade moderada na razão iNOS/Arginase I (fig. 54), ou seja, não houve diferença significativa da intensidade exaustiva na razão iNOS/Arginase I (fig. 55), corroborando com a ausência de diferença significativa de iNOS (fig. 45) e arginase I (fig. 50) entre os diferentes bloqueios testados, nesta mesma intensidade de exercício.



**Figura 56.** Razão do perfil intracelular inflamatório (iNOS/Arginase I), u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,94$ ) e o efeito da intensidade ( $p = 0,26$ ) não apresentaram diferenças significativas, porém o efeito do bloqueio ( $p = 0,03$ ) demonstrou. O pós teste de Tukey não indicou os dados que apresentaram diferença.

A análise estatística das duas variáveis do estudo não demonstrou diferença estatística entre a interação e o efeito da intensidade, porém apresentou alteração em relação aos bloqueios testados (fig. 56).

### **5.19 Análise de PCR em tempo real, 6 h após o término da sessão de exercício físico, com os diferentes bloqueios**

#### *RNA<sub>m</sub> HSP72*

Visando analisar a proteção anti-inflamatória celular, verificamos a expressão de HSP72 nos macrófagos peritoneais dos animais que foram exercitados em diferentes intensidades e sob efeito dos diferentes bloqueadores.

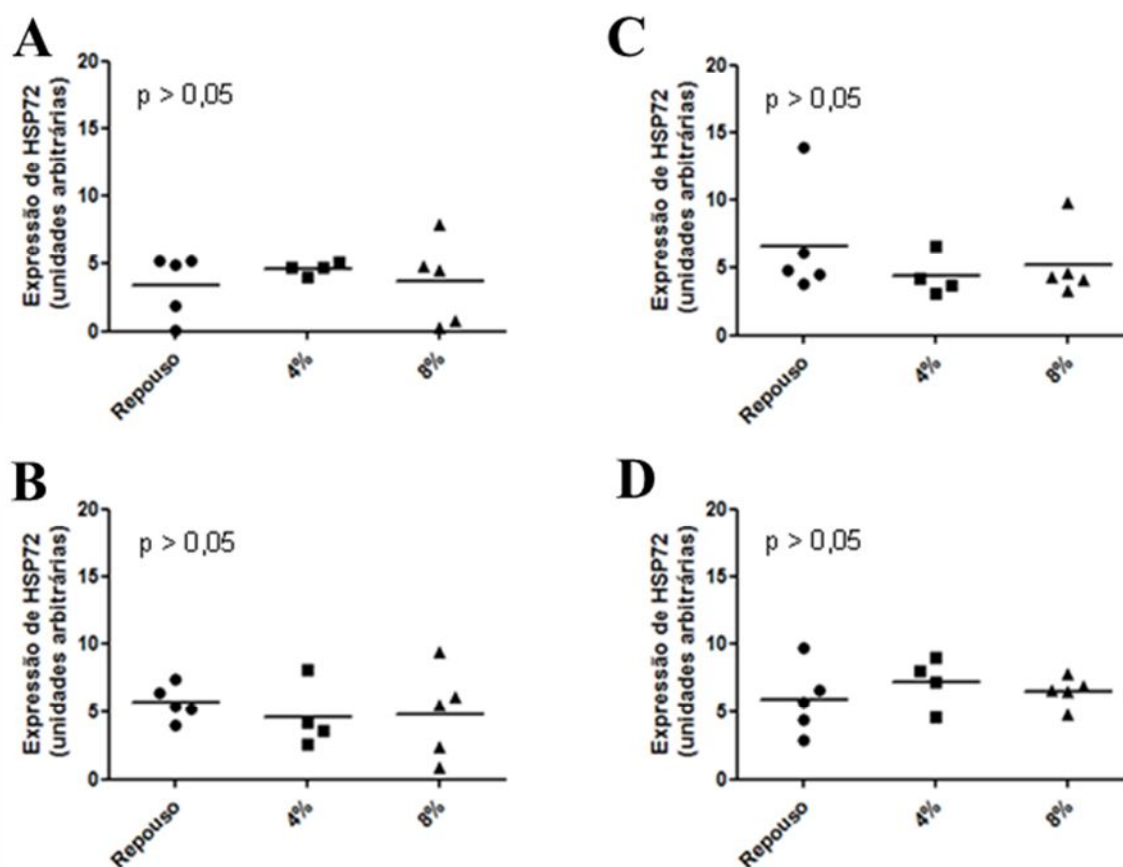


Figura 57. Expressão de HSP72, u.a. nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Foi utilizado o teste paramétrico ANOVA de uma via.

Conforme visualizamos não ocorreram diferenças estatísticas entre as intensidades de exercício físico, dentro de cada bloqueio (fig. 57). Esses dados corroboram os dados obtidos sobre o conteúdo proteico da HSP70 (fig. 37) com os mesmos bloqueios e intensidades de exercício físico.

Grupos repouso:

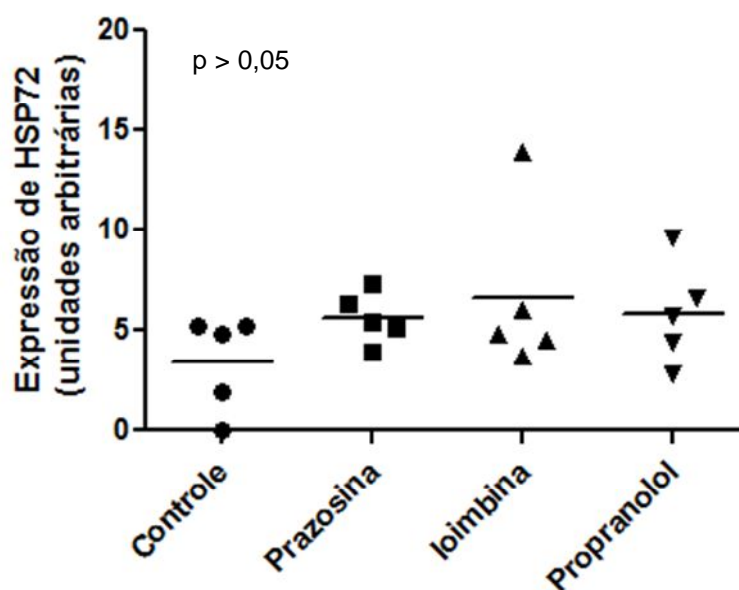
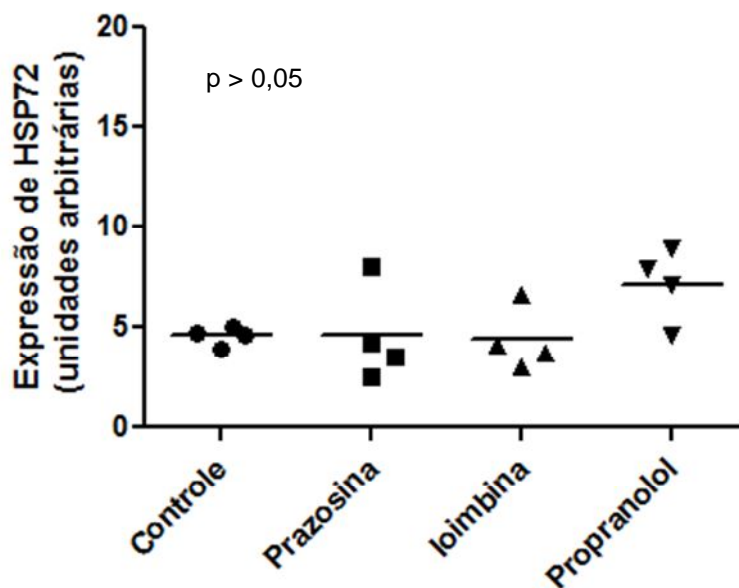


Figura 58. Expressão de RNAm de HSP72, u.a., de macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas do nado. Pelo teste de ANOVA de uma via os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,34$ ).

Conforme esperávamos não houve diferença significativa na expressão gênica de HSP72 no repouso (fig. 58), similar ao ocorrido com o conteúdo proteico de HSP70 nesta mesma situação experimental (fig. 38).



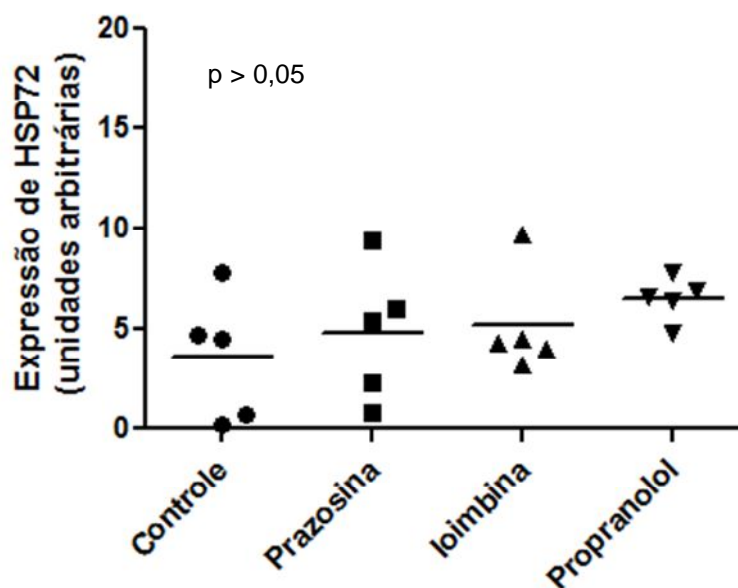
Grupos 4 %:



**Figura 59.** Expressão de RNAm de HSP72, u.a., nos macrófagos peritoneais, dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Os valores não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,12$ ) por ANOVA de uma via.

Os diferentes bloqueadores não demonstraram diferença significativa na intensidade moderada (fig. 59) assim como ocorreu com o conteúdo proteico de HSP70 (fig. 39).

Grupos 8 %:



**Figura 60.** Expressão de HSP72, u.a., nos macrófagos peritoneais, via teste de ANOVA de uma via, dos animais que nadaram com 8 % da MCT até a exaustão, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores não mostram diferença significativa ( $p = 0,43$ ).

Não houve diferença significativa na expressão gênica de HSP72 na intensidade exaustiva (fig. 60), do mesmo modo ocorrido no conteúdo proteico de HSP70 (fig. 40).

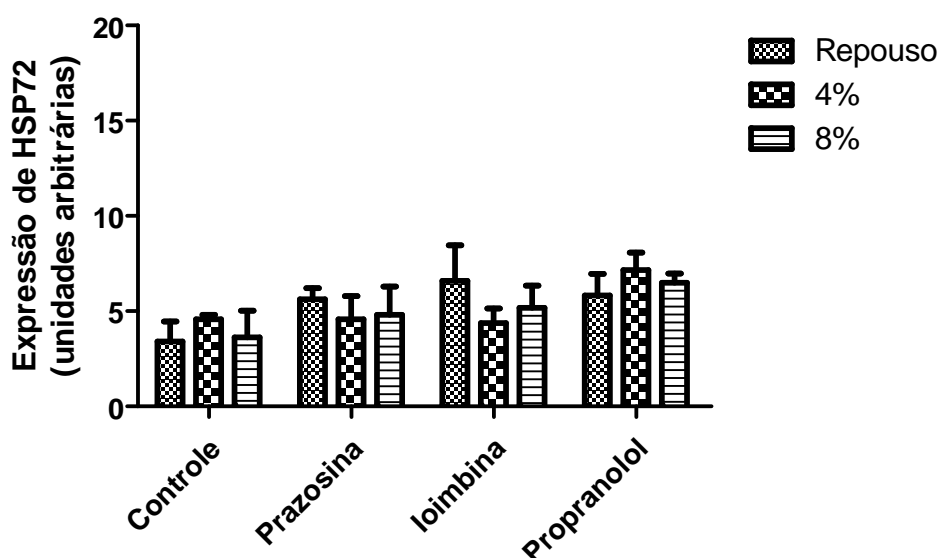


Figura 61. Expressão de HSP72, u.a., nos macrófagos peritoneais, dos animais que nadaram em diferentes intensidades além do repouso, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A interação ( $p = 0,76$ ), o efeito da intensidade ( $p = 0,90$ ) e o bloqueio ( $p = 0,06$ ) não apresentaram diferenças significativas.

Ao avaliar as duas variáveis, verificamos que intensidade e bloqueio não apresentaram diferenças significativas entre si (fig. 61). Tanto a expressão gênica como o conteúdo proteico de HSP70 não demonstraram diferenças significativas entre os bloqueios e intensidades de exercício utilizadas. Assim, no período de 6 h após o exercício físico, parece que a célula não precisou sintetizar HSP70 de modo a promover uma citoproteção.

#### *RNA<sub>m</sub> HSP73:*

Apesar da HSP73 ser caracterizada como constitutiva, foi analisada para avaliar possíveis alterações que os efeitos subagudos do exercício poderiam promover nesta proteína.

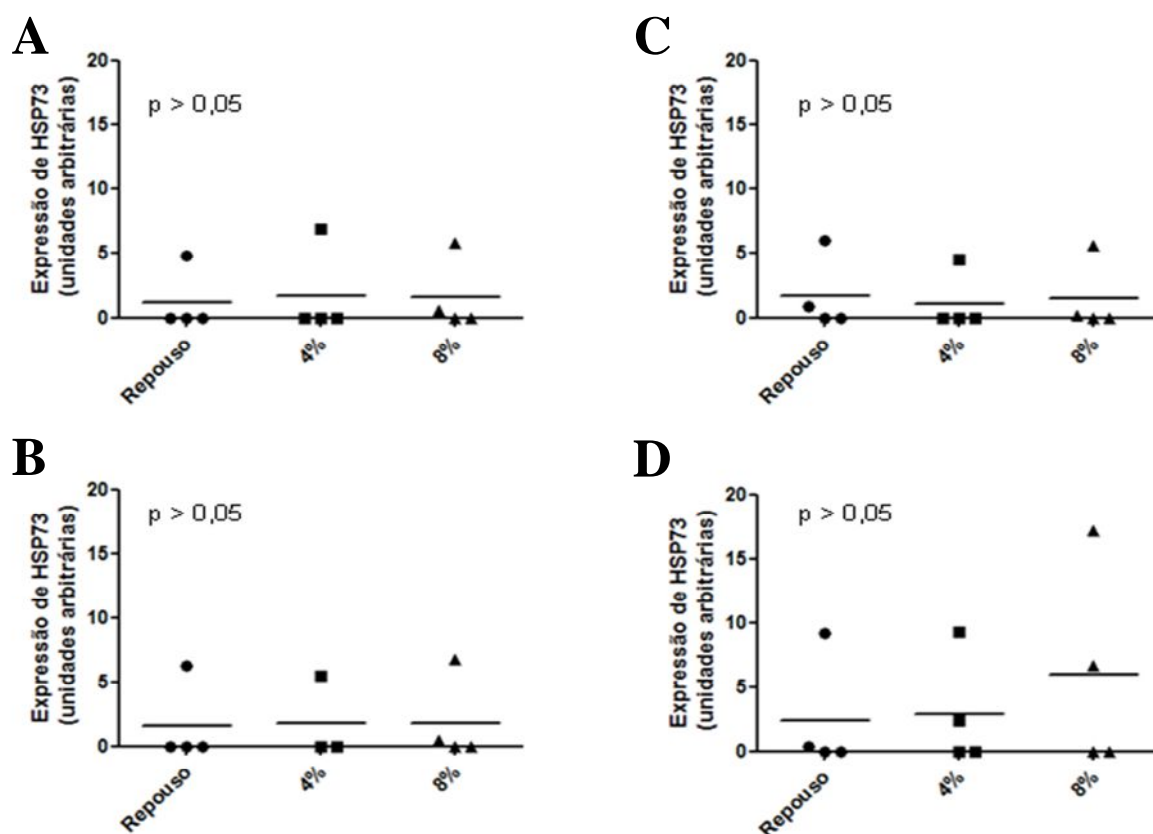


Figura 62. Expressão de RNAm de HSP73, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Teste ANOVA de uma via não detectou diferenças significativas.

De modo claro, observamos que não houve diferenças estatísticas em nenhum dos bloqueios utilizados (fig. 62) assim como ocorreu com a expressão gênica de HSP72 (fig. 57).

Grupos repouso:

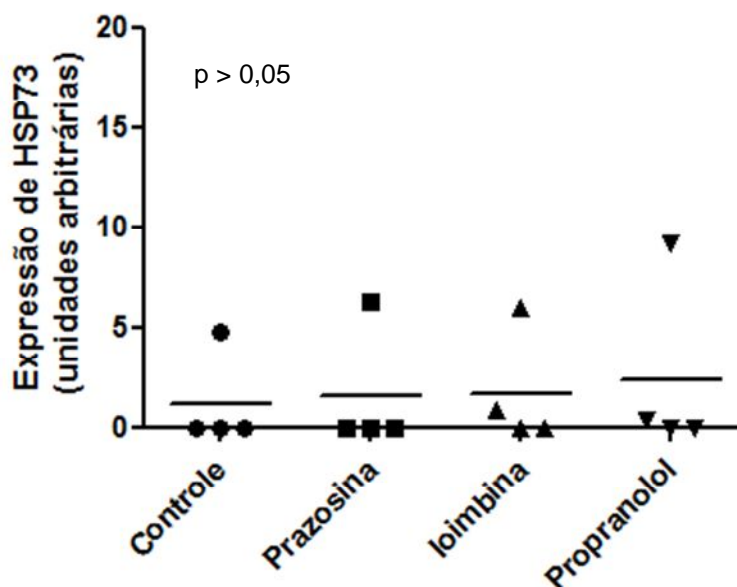
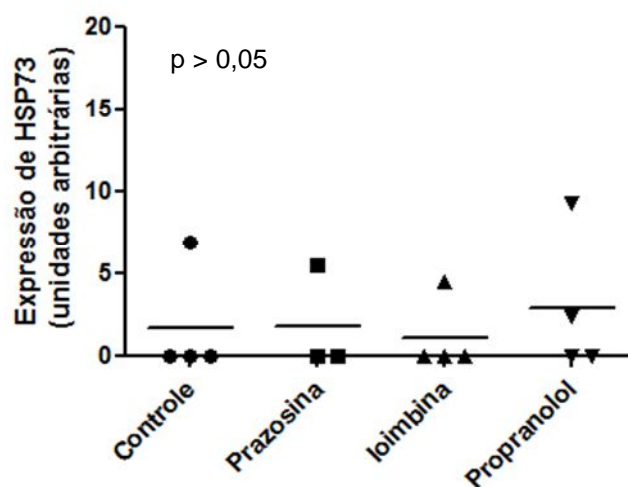


Figura 63. Expressão de RNAm de HSP73, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenergicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,96$ ), com o teste de ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, não houve diferenças significativas dos bloqueios no repouso (fig. 63) corroborando com os dados de RNAm de HSP72, também em repouso (fig. 58).

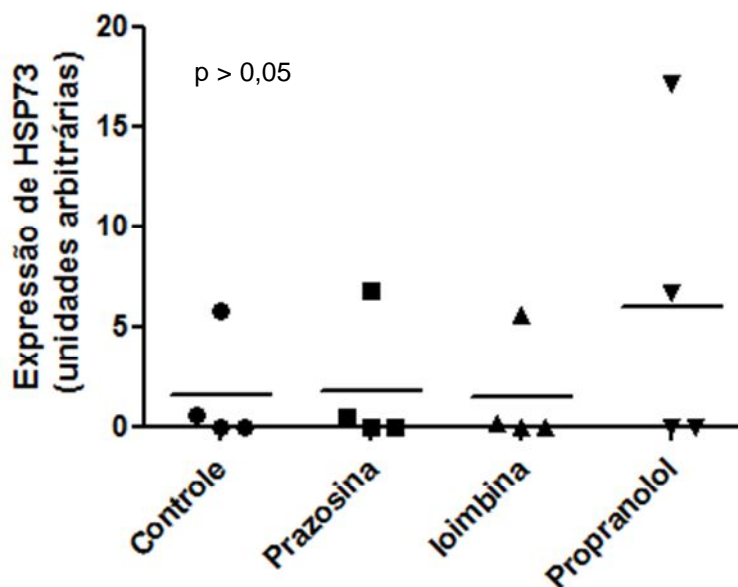
Grupos 4 %:



**Figura 64.** Expressão de RNAm de HSP73, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 4 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Por ANOVA de uma via, os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,90$ ).

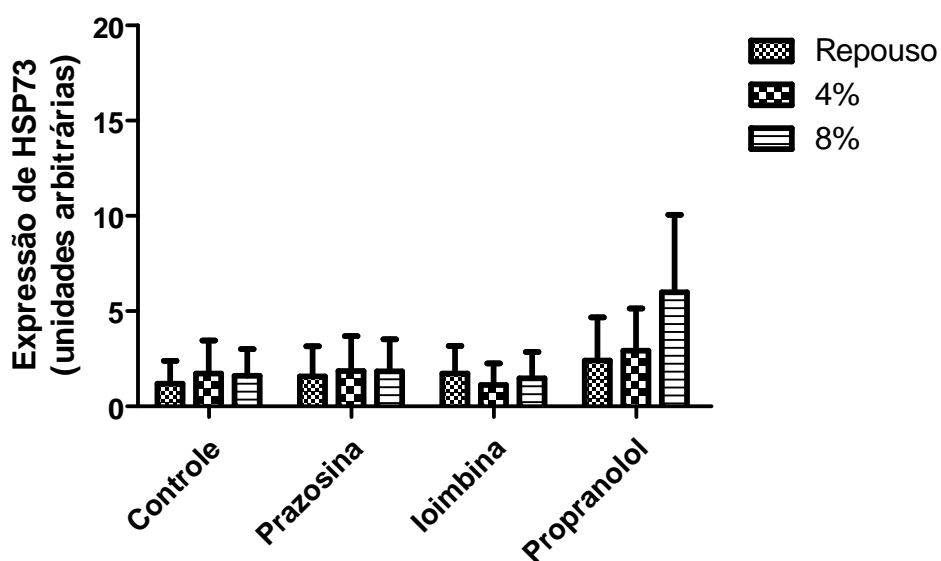
Repetindo a resposta da expressão gênica de HSP72 na intensidade moderada (fig. 59), não houve diferença estatística nos dados de RNAm de HSP73 (fig. 64).

Grupos 8 %:



**Figura 65.** Expressão de RNAm de HSP73, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com 8 % da MCT, como sobrecarga, e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Pelo teste ANOVA de uma via, os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,50$ ).

Outra vez não houve diferenças significativas dos bloqueios na intensidade exaustiva (fig. 65) assim como conforme ocorrido nos dados de RNAm de HSP72, nesta mesma intensidade (fig. 60).



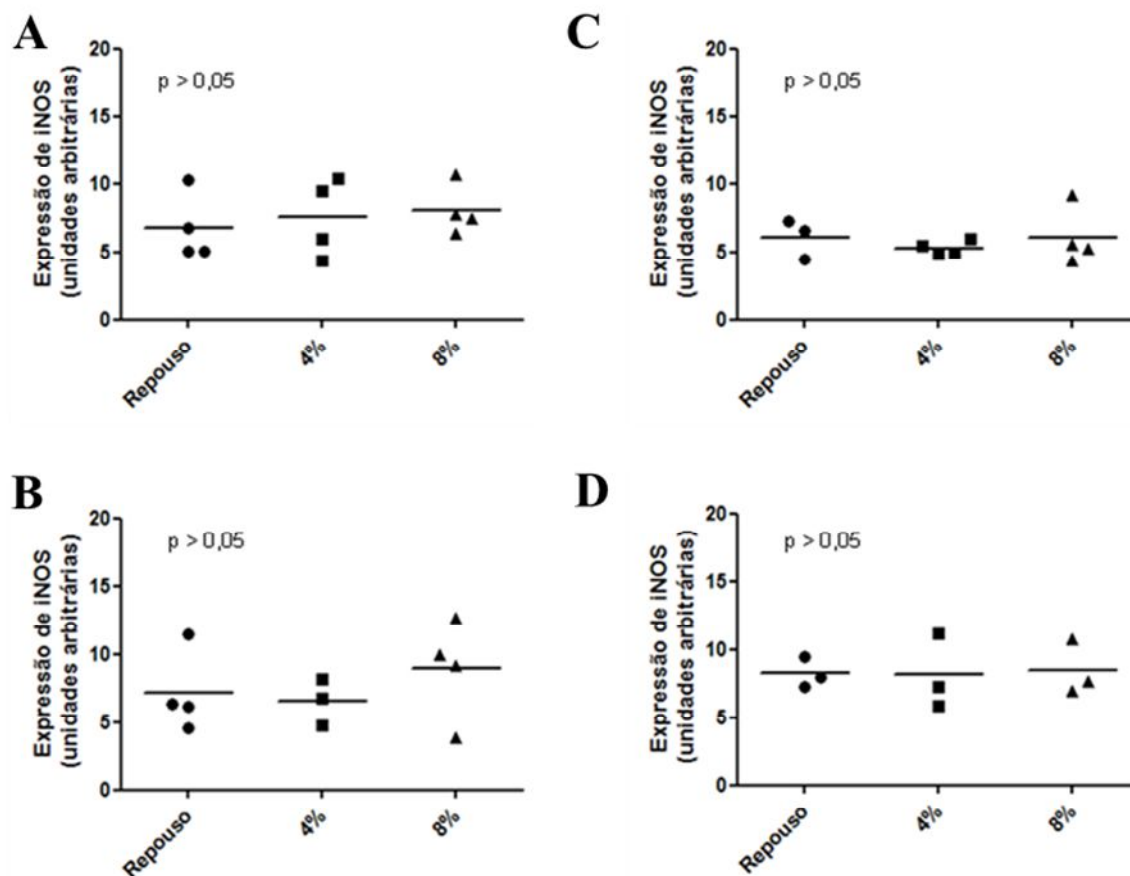
**Figura 66.** Expressão de HSP73, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. As análises da interação ( $p = 0,96$ ), efeitos da intensidade do exercício ( $p = 0,74$ ) e do bloqueio farmacológico ( $p = 0,42$ ) não apresentaram diferenças significativas.

Conforme visto nas análises anteriores (fig. 63, 64, 65), a expressão de HSP73 não sofreu alterações nos bloqueios utilizados nas diferentes intensidades de exercício físico (fig. 66).

Essa foi uma resposta esperada visto que HSP73 é considerada uma proteína constitutível, portanto não sofreu alteração frente a uma única sessão de exercício.

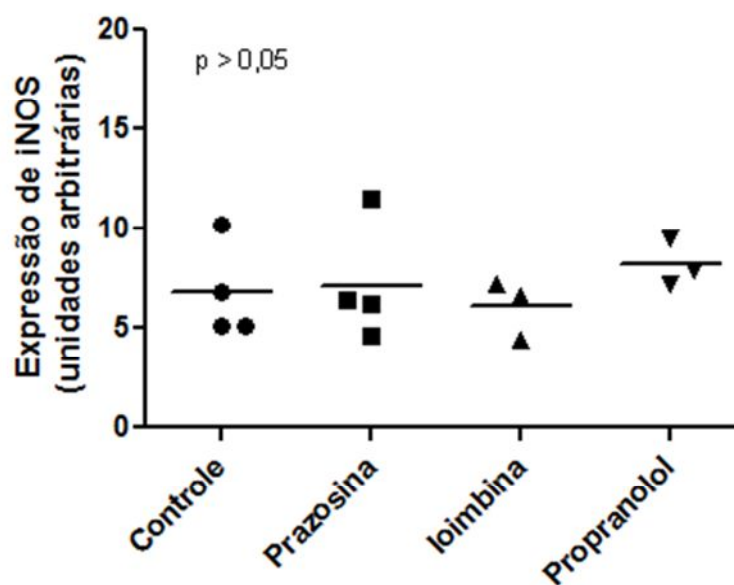


## RNAm iNOS



**Figura 67.** Expressão do RNAm de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Utilizando ANOVA de uma via os dados não demonstraram diferenças significativas.

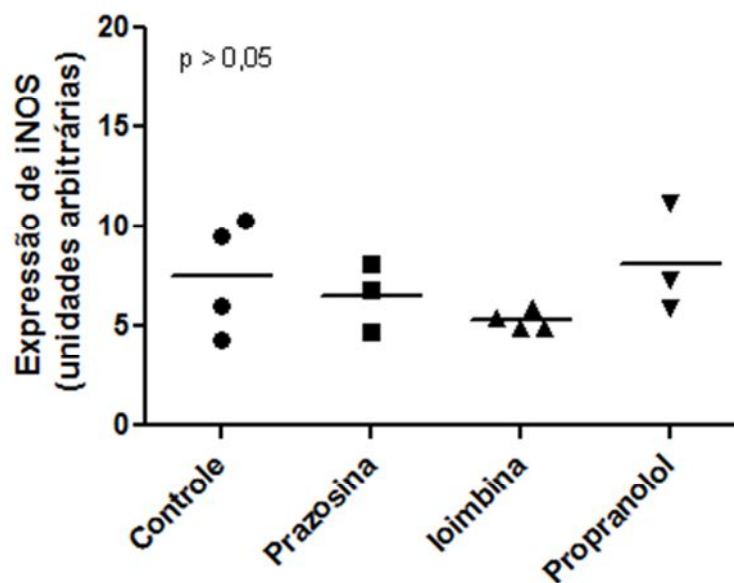
Analisando a resposta dentro de cada bloqueio (fig. 67A-D), não houve diferenças significativas entre as intensidades de exercício. Esse é um resultado semelhante ao ocorrido em relação ao conteúdo proteico desta enzima (fig. 42).

*Grupos repouso*

**Figura 68.** Expressão de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,71$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

Conforme o esperado, os dados não apresentaram diferença estatística no repouso (fig. 68), apresentando a mesma resposta no conteúdo proteico de iNOS (fig. 43).

Grupos 4 %:

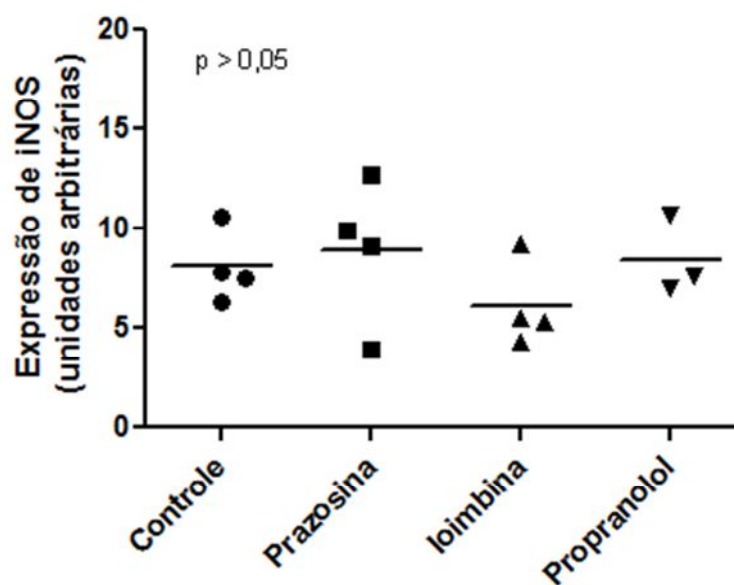


**Figura 69.** Expressão de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com sobrecarga de 4 % da MCT e com diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,35$ ), pelo teste ANOVA de uma via.

Os dados analisados não demonstraram diferença significativa na intensidade moderada (fig. 69). Assim como o ocorrido no repouso, esta resposta assemelha-se a resposta do conteúdo de iNOS na mesma intensidade de exercício físico (fig. 44).

Assim, apesar de ocorrer aumento da produção de NO na intensidade moderada de exercício (fig. 24), esta não foi sustentada por aumentos na expressão gênica de iNOS após 6 h da sessão de exercício.

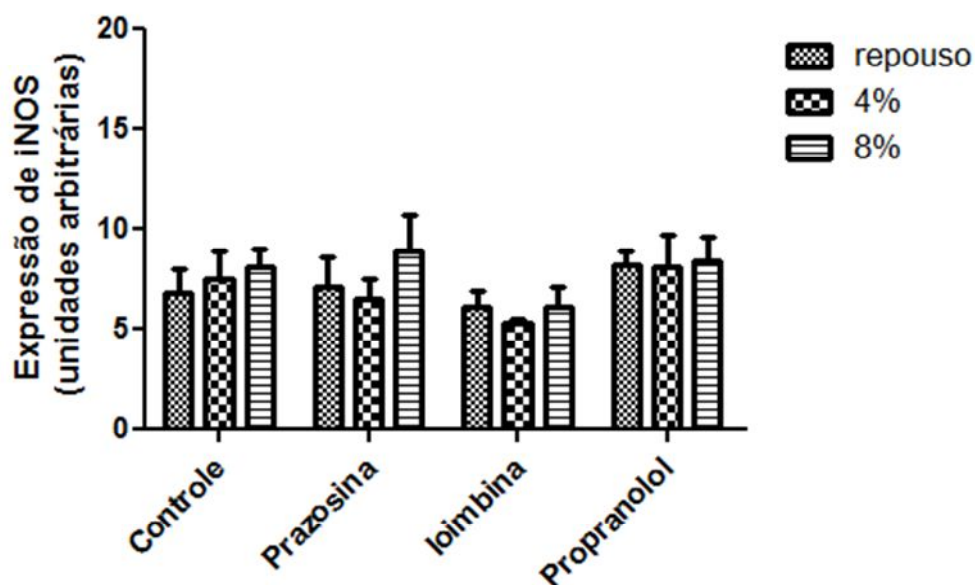
Grupos 8 %:



**Figura 70.** Expressão de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram com sobrecarga de 8 % da MCT e com diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,45$ ), pelo teste de ANOVA de uma via.

Na intensidade exaustiva os diferentes bloqueios não apresentaram diferença significativa (fig. 70). Esse é um resultado semelhante ao ocorrido em relação ao conteúdo proteico desta enzima (fig. 45).

Mais uma vez, apesar da robusta produção de NO na intensidade exaustiva do grupo bloqueado com PBS (fig. 25) esta não foi acompanhada por aumentos do RNAm de iNOS nestas células após 6 h do exercício físico.



**Figura 71.** Expressão de iNOS, u.a., nos macrófagos peritoneais, dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A análise da interação ( $p = 0,96$ ), efeitos da intensidade de exercício ( $p = 0,48$ ) e bloqueio ( $p = 0,13$ ) não apresentaram diferenças significativas.

Confirmando os dados anteriores (fig. 68, 69 e 70), a análise conjunta das variáveis intensidade de exercício físico e bloqueio adrenérgico não demonstrou diferença significativa.

Apesar das células apresentarem, dependendo do bloqueio utilizado, elevada ou reduzida produção de NO no tempo 6 h após o exercício (fig. 26), nas intensidades moderada e exaustiva, esta resposta parece não apresentar relação com o conteúdo proteico (fig. 46) e expressão de RNAm (fig. 71) dessa enzima, neste mesmo tempo e intensidades de exercício avaliadas.

## Arginase I:

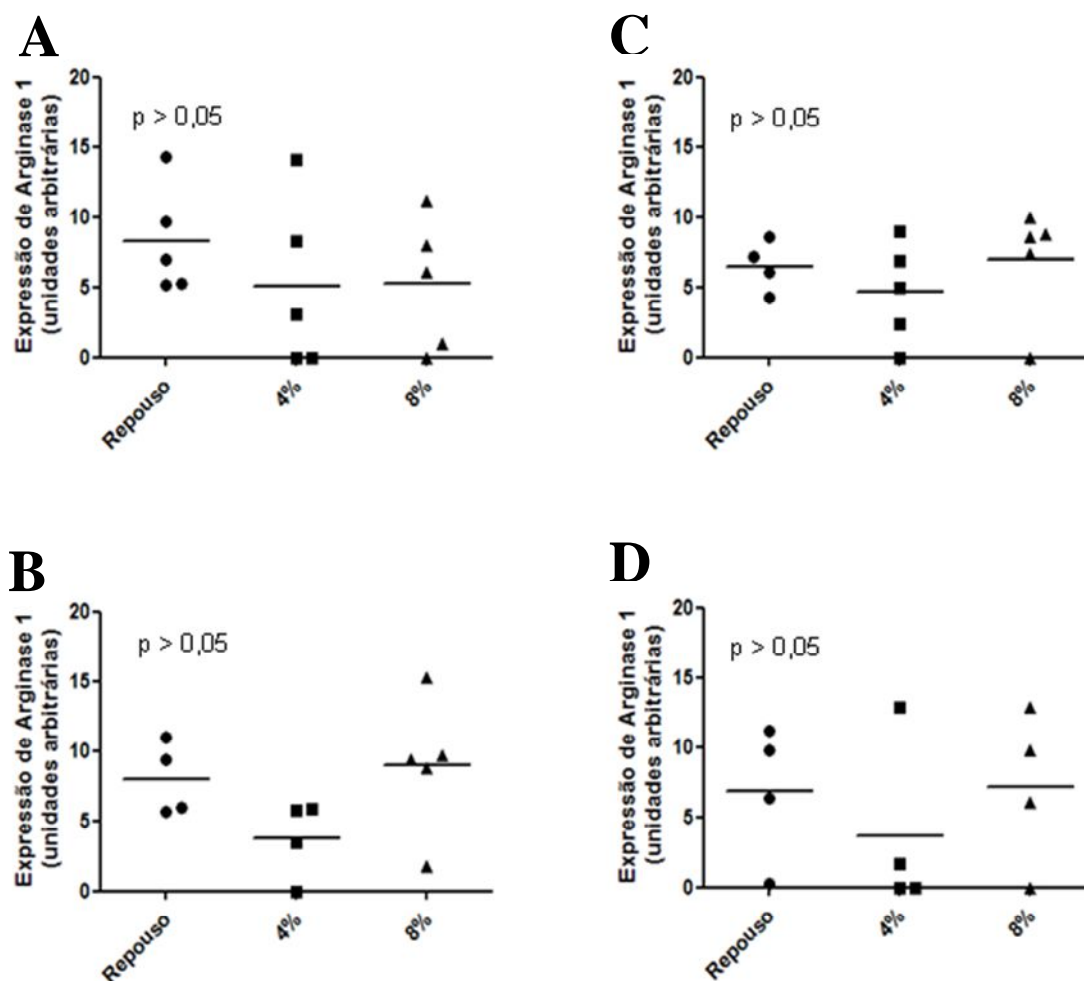
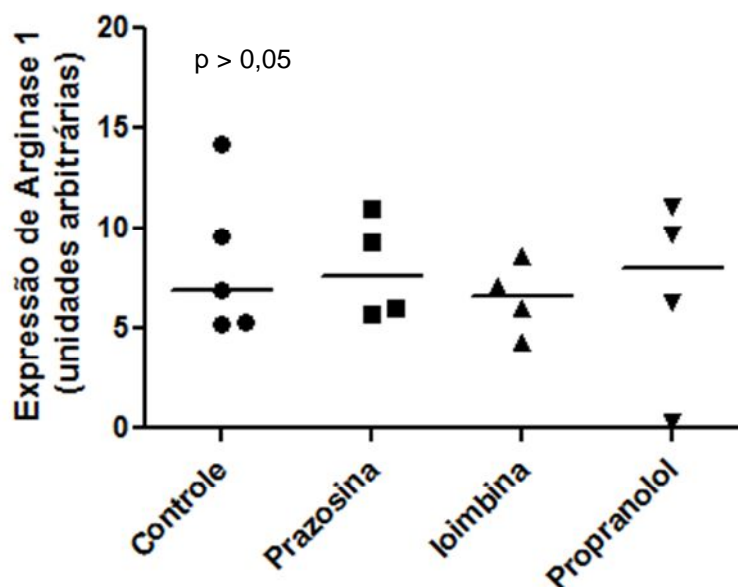


Figura 72. Expressão da expressão de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram nas diferentes intensidades de exercício físico, 4 % e 8 %, e o repouso após 6 h e com os seguintes bloqueios: (A) controle, (B) prazosina, (C) ioimbina e (D) propranolol. Os dados não apresentaram diferença significativa com o teste de ANOVA de uma via.

O teste estatístico não detectou diferença significativa entre as intensidades nos diferentes bloqueios (fig. 72).

Esses resultados, obtidos após 6 h do exercício, assemelham-se aos dados sobre o conteúdo proteico desta enzima, utilizando os mesmos bloqueios, intensidades de exercício e tempo de coleta celular pós exercício (fig 51).

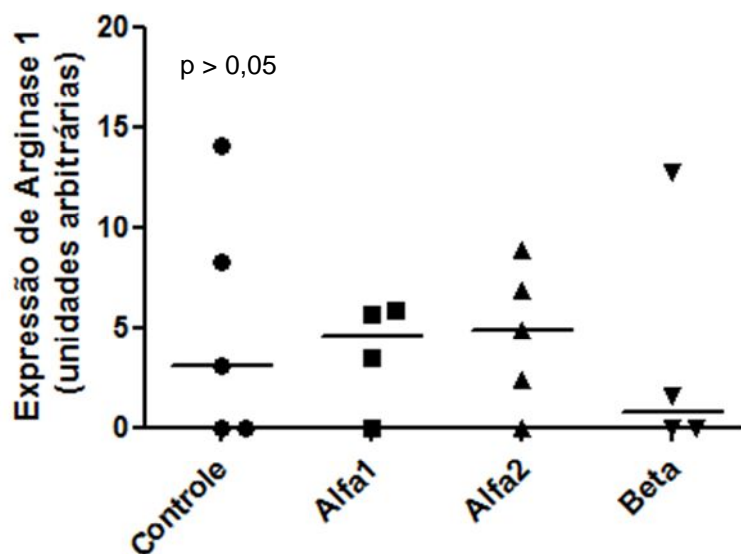
*Grupos repouso:*



**Figura 73.** Expressão de RNAm de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que permaneceram em repouso e com os diferentes bloqueios adrenergicos, após 6 horas da sessão de exercício. Os dados não apresentaram diferença significativa ( $p = 0,85$ ), com o teste de ANOVA de uma via.

Não observamos alteração significativa nas concentrações de RNAm de arginase I entre os bloqueios durante o repouso (fig. 73). Resultado esperado e que assemelha-se ao conteúdo proteico desta enzima no repouso após 6 h do exercício físico (fig. 52)

Grupos 4 %:



**Figura 74.** Expressão de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais, via teste de ANOVA de uma via, dos animais que nadaram com 4 % da MCT, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores não mostraram diferença significativa ( $p = 0,96$ ).

Nesta intensidade de exercício físico os diferentes bloqueios adrenérgicos não demonstraram diferença significativa (fig. 74). Os resultados assemelham-se aos obtidos sobre o conteúdo proteico desta enzima nesta intensidade de exercício (fig. 53).

Apesar da produção de nitritos ter sofrido redução consistente nos bloqueios prazosina e ioimbina (fig. 24), com consequente inibição do perfil M1 nestas células, esperávamos que houvesse o estabelecimento de um perfil M2 celular, com aumentos na expressão gênica e conteúdo proteico de arginase I, porém este fato não ocorreu.



Grupos 8 %:

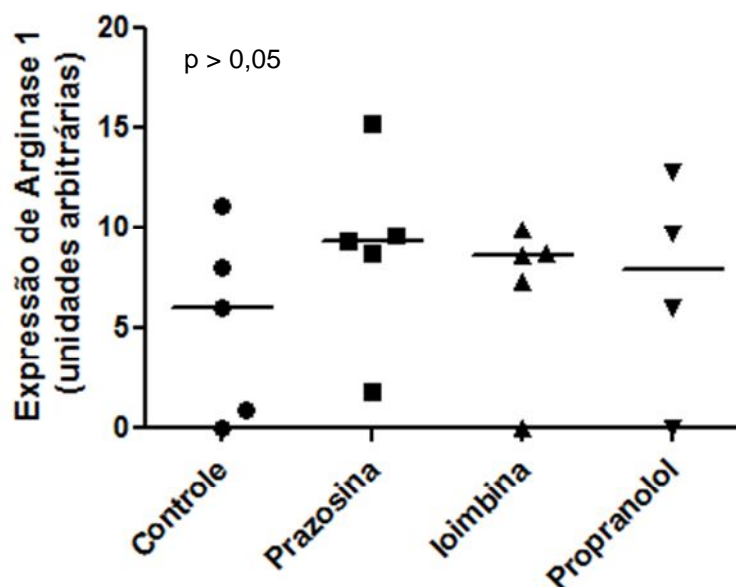
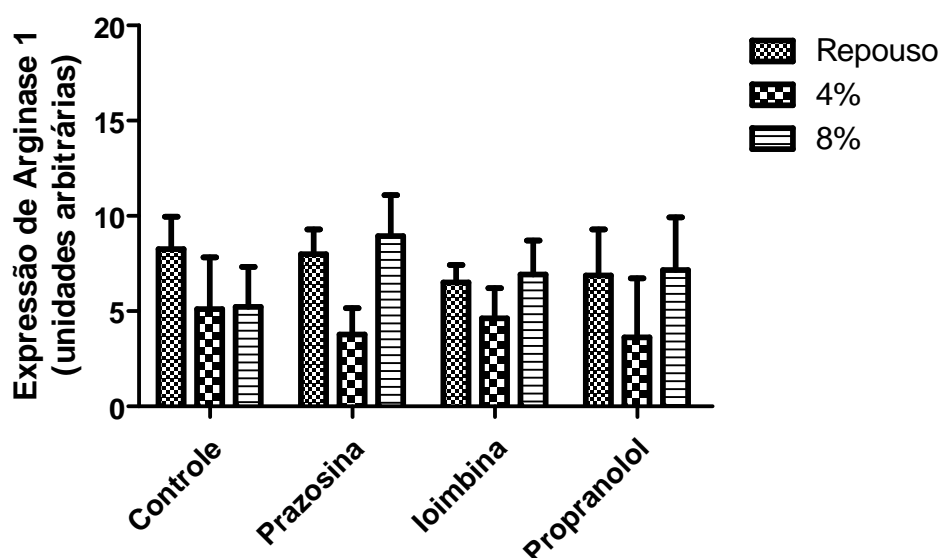


Figura 75. Expressão de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais, via teste de ANOVA de uma via, dos animais que nadaram com 8 % da MCT, após 6 horas, com os diferentes bloqueadores. Valores não mostraram diferença significativa ( $p = 0,67$ ).

Assim como ocorrido no conteúdo proteico dessa enzima nesta intensidade de exercício (fig. 50), não houve diferença significativa entre os bloqueios utilizados (fig. 75).

Mesmo com a diminuição na produção de nitritos nos bloqueios prazosina, ioimbina e propranolol (fig. 25), com consequente inibição do perfil M1 nestas células, esperávamos que houvesse o estabelecimento de um perfil M2 celular, com aumentos na expressão gênica e conteúdo proteico de arginase I, porém este fato não ocorreu.



**Figura 76.** Expressão de arginase I, u.a., nos macrófagos peritoneais dos animais que nadaram em diferentes intensidades e com os diferentes bloqueios adrenérgicos, após 6 horas. A interação ( $p = 0,90$ ), o efeito da intensidade ( $p = 0,08$ ) e o bloqueio ( $p = 0,93$ ) não apresentaram diferenças significativas.

Confirmando os dados estatísticos dos efeitos dos bloqueios e das intensidades de exercício (fig. 72, 73, 74 e 75), não houve diferença estatística na análise de variáveis associadas (fig. 76).

Portanto, tanto o conteúdo proteico (fig. 51) como a expressão de RNAm (fig. 76) de arginase I não apresentaram alterações após 6 h do exercício de diferentes intensidades e com bloqueios adrenérgicos.

Infelizmente, não conseguimos efetuar a proporção entre iNOS e arginase I, gerando o perfil inflamatório, porque alguns dados da expressão gênica resultaram em zero, não sendo possível efetuar a proporção, ocorrendo  $N = 1$  em algumas análises.

## 6 DISCUSSÃO

O exercício físico caracteriza-se como ferramenta viável e eficaz no tratamento e prevenção de diversas doenças atuais, como obesidade, diabetes, câncer, etc., nesse sentido, por estarem relacionadas com o sistema imunológico, faz-se necessário seu emprego adequado. Estudos clássicos descrevem uma atividade moderada como sendo apropriada para forjar um sistema imunológico capaz de desempenhar adequada vigilância sistêmica. Por outro lado, atividades exaustivas são consideradas inadequadas, por proporcionar imunossupressão podendo, ambas intensidades, serem moduladas por diversos hormônios, como cortisol, catecolaminas e hormônio do crescimento (Hoffman-Goetz and Pedersen 1994, Walsh, Gleeson et al. 2011).

Surpreende o fato que poucos estudos investigaram o efeito do exercício físico de intensidades moderada e exaustiva sobre populações teciduais imunológicas de macrófagos que têm extrema importância, tanto na comunicação com células e órgãos vizinhos, como na vigilância sistêmica promovida por este estímulo.

Estudos de nosso laboratório, mostraram o efeito de diferentes intensidades de exercício físico e da modulação catecolaminérgica em monócitos circulantes de ratos (da Silva Rossato, Krause et al. 2014, Scholer, Marques et al. 2016). De modo aparente, a intensidade de exercício é capaz de modular o perfil de monócitos (M1/M2) e esta, parece ser dependente da sinalização noradrenérgica. Neste contexto, buscamos estudar os efeitos de diferentes intensidades de exercício físico e da mediação adrenérgica (com diferentes bloqueios farmacológicos) sobre o perfil inflamatório de uma população tecidual residente de macrófagos, que sofre intensa influência noradrenérgica, os macrófagos peritoneais.

Dessa forma, utilizamos, além da situação de repouso, duas intensidades de exercício físico distintas, moderada e exaustiva, nas quais a literatura as enquadra, de acordo com o aumento nas concentrações catecolaminérgicas, como imunoestimulantes ou supressoras, por esta ordem (Ortega, Giraldo et al. 2007, Walsh, Gleeson et al. 2011). Logo, para comprovar o papel desses hormônios na modulação inflamatória do macrófago, fez-se necessário o emprego de uma atividade extenuante, a fim de que conseguíssemos aumentar, o máximo possível, as concentrações desses hormônios na circulação sanguínea dos animais, portanto nesse contexto, empregamos a atividade até a exaustão.

A partir de medidas de lactato e glicogênio muscular, obtivemos sucesso em caracterizar o exercício físico com 4 % da MCT como moderado e o 8 % da MCT como exaustivo. Pelo lactato, a classificação ocorreu por encontrar-se abaixo ou acima, nesta ordem, do limiar de lactato, medida muito utilizada para caracterizar o esforço físico (Billat, Sirvent et al. 2003). Pela análise do glicogênio muscular, detectamos uma queda impressionante nos níveis energéticos musculares, os quais em associação com o tempo que os animais nadaram até a exaustão, confirmaram o intenso esforço ao qual foram submetidos. Devido às elevadas concentrações de lactato alcançadas pelo grupo 8 %, associado ao intenso esforço, mesmo em curto período de tempo, é possível correlacionarmos positivamente com elevadas concentrações sanguíneas de adrenalina e noradrenalina, de acordo com estudos realizados em humanos (Kindermann, Schnabel et al. 1982, Mazzeo and Marshall 1989, de Vries, Bernardts et al. 2000).

Além disso, mesmo desempenhando esforço exaustivo, não foram detectados possíveis marcadores de lipoperoxidação ou redução de sulfidrilas no plasma dos animais, de modo que pudessem estar relacionados com alterações sistêmicas provocadas por ERONs. Ao que parece, a manutenção das concentrações de sulfidrilas plasmáticas e ausência de alterações do TBA-RS plasmático, principalmente nesta intensidade, permite-nos supor que não houve peroxidação lipídica e utilização de sulfidrilas, como redutoras de produtos oxidados, assim como estudos em humanos (Bloomer, Goldfarb et al. 2005, Fisher-Wellman and Bloomer 2009).

Portanto, ao realizarmos uma sessão de exercício físico de curta duração minimizamos os efeitos oxidantes no organismo, o qual poderia provocar nas respostas dos macrófagos peritoneais, visto que é conhecida a influência de um estado pró-oxidante nas reações das células imunológicas (Fisher-Wellman and Bloomer 2009).

Entretanto, apesar de os parâmetros caracterizadores do exercício físico comprovarem a efetividade das intensidades empregadas, não houve respostas funcionais significativas dos macrófagos peritoneais, logo após o término da sessão de natação. Ainda que a produção de nitritos tenha esboçado uma resposta, esta só foi comprovada após 6 h do exercício físico. Esta ausência de reação está de acordo com estudos utilizando macrófagos peritoneais de camundongos idosos ou ratos jovens, nos quais os animais nadaram até exaustão (40 min), sem sobrecarga (de la Fuente, Martin et al. 1990, Ferreira, Prestes et al. 2010). Contudo, outros autores utilizando camundongos e porquinhos da Índia que nadaram até a exaustão,

120 e 15 min, nessa ordem, atingiram aumentos nas respostas funcionais dessas células (Ortega, Collazos et al. 1992, Ferrandez and De la Fuente 1999).

A conhecida mobilização celular em órgãos linfoides desencadeada pelo exercício físico (Nance and Sanders 2007) afeta também macrófagos residentes ao peritônio. Durante e depois de uma sessão de exercício físico há notório aumento e transitória monocitose sanguínea, em humanos, via desprendimento do endotélio vascular e mobilização da medula óssea (Walsh, Gleeson et al. 2011, Dhabhar, Malarkey et al. 2012). Ao mesmo tempo, o conteúdo celular da cavidade abdominal mantêm-se ou, até mesmo, reduz provavelmente em virtude de uma MDR (de la Fuente, Martin et al. 1990, Ortega, Collazos et al. 1992, Cassado Ados, D'Imperio Lima et al. 2015). Após os níveis de monócitos circulantes retornarem aos valores de repouso, as células excedentes são direcionadas para os tecidos compostos de macrófagos residentes e órgãos linfoides, como o peritônio. Esse tráfego de monócitos é extremamente necessário a fim de vistoriar o corpo inteiro, para promover adequada resposta imunológica e interações célula-a-célula, assim como acontece com linfócitos (Kruger, Lechtermann et al. 2008).

Portanto, ao realizarmos uma curva tempo-resposta, detectamos em nosso modelo de exercício, um período de tempo em que os monócitos circulantes encontravam-se no peritônio e associando-se aos macrófagos teciduais residentes, responderam ao estresse provocado pelo exercício físico. Surpreende que, tanto um exercício moderado de curta duração, como um exercício intenso de brevíssimo período de tempo, foram suficientes para alterar de forma positiva as funções de macrófagos residentes ao peritônio dos animais. Além disso, ao longo de 12 e 24 h após a sessão aguda de exercício físico, os macrófagos peritoneais mantiveram suas respostas de repouso, ou seja, não houve redução em sua resposta basal, como uma situação de imunossupressão.

Dessa forma, após as 6 h do exercício ambas intensidades de exercício, considerando a resposta funcional, caracterizaram um perfil pró-inflamatório ao macrófago peritoneal. Esta é uma resposta esperada e adequada pois, frente ao estímulo do estresse faz-se necessário limpar o ambiente, esterilizando e eliminando invasores para uma possível proliferação celular, caso necessária (Mills, Thomas et al. 2014). O grau dessa resposta foi correlacionado de modo positivo com a intensidade do estresse sofrido e, possivelmente, com a quantidade de catecolaminas circulantes (Mazzeo and Marshall 1989, de Vries, Bernards et al. 2000) assim como ocorrido com monócitos circulantes de rato (Scholer, Marques et al. 2016).

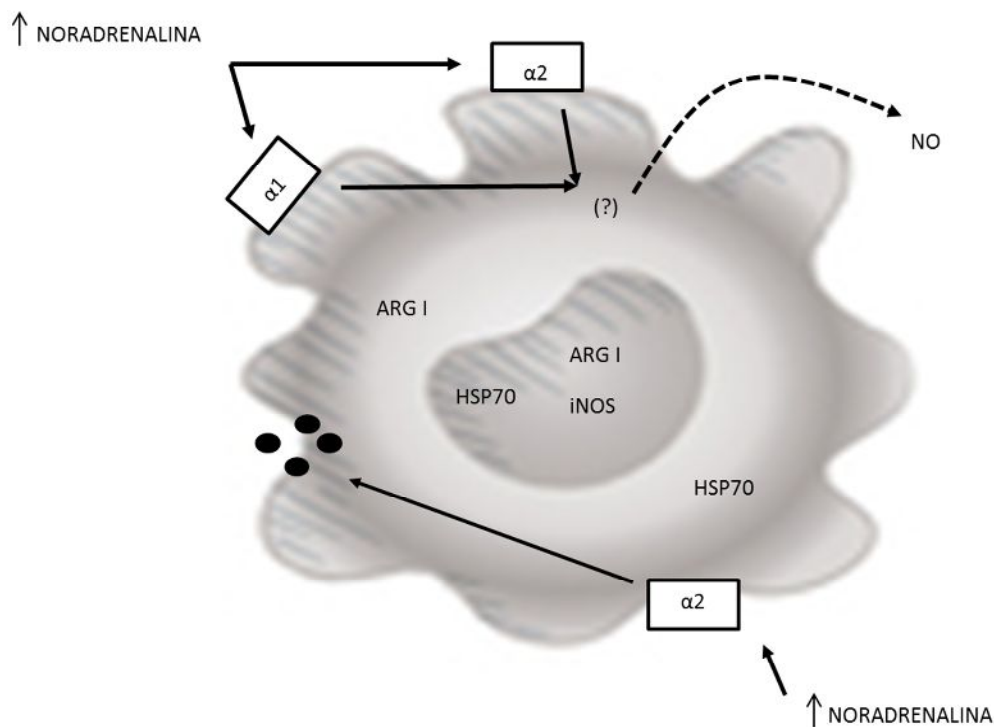
Nesse contexto, a produção de nitritos é considerada como fator de classificação do fenótipo M1 porque de modo indireto demonstra a maior ativação da enzima iNOS em relação a arginase I. Porém, quando presente e ativada dentro da célula, arginase I é capaz de direcionar o metabolismo de L-arginina para si própria, portanto diminuindo a utilização desse aminoácido pela iNOS, um perfil M2. Logo, a indução de arginase I poderia controlar a atividade de iNOS pela utilização da arginina intracelular, assim como ocorrido em células J.774A.1 incubadas com LPS (Chang, Liao et al. 1998). Entretanto, essa não foi a resposta encontrada, já que não observamos alteração nem na expressão do RNAm nem de proteína, em ambas as enzimas, o que nos leva a supor que, na verdade, o aumento na capacidade de produção de NO com o exercício seja devido a modulação da atividade de uma das duas enzimas. Essa possibilidade encontra-se em estudo em nosso laboratório atualmente.

Em relação aos bloqueios na intensidade moderada, visualizamos a inibição nas funções, fagocitose e produção de nitritos, quando os animais foram bloqueados com ioimbina, principalmente, e prazosina. Esses dados assemelham-se à inibição da produção de TNF- por macrófagos peritoneais ativados de camundongos bloqueados com ioimbina (Ignatowski, Gallant et al. 1996) e monócitos circulantes de ratos, bloqueados com propranolol e prazosina, com disponibilidade do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico aumentando as respostas dessas mesmas funções (da Silva Rossato, Krause et al. 2014).

Por outro lado, o bloqueio com propranolol libera os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, evidenciando elevadas respostas fagocítica e de produção de nitritos estabelecendo um fenótipo pró-inflamatório nestas células, assemelhando-se ao controle (Sigola and Zinyama 2000, da Silva Rossato, Krause et al. 2014). Logo, percebemos que, nessa intensidade de exercício físico, há ativação via receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, pela provável ligação de noradrenalina, devido a sua maior afinidade com estes receptores (Dimitrijevic, Pilipovic et al. 2009). Contudo, o grupo controle e os bloqueios desta intensidade moderada não apresentaram alterações em seus valores proteicos intracelulares e gênicos de HSP70, iNOS e arginase I, após 6 h da sessão de exercício, tanto entre si como em relação aos seus respectivos repousos.

Dessa forma, baseando-se nos bloqueios farmacológicos utilizados, observamos que, em intensidade moderada de exercício físico, o estabelecimento de fenótipo pró-inflamatório ocorre pela provável ligação de noradrenalina com os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, promovendo a atividade fagocítica e a produção de nitritos. Além disso, neste mesmo período houve

manutenção dos conteúdos intracelulares e gênicos de HSP70, iNOS e arginase I, apresentando as mesmas concentrações da situação repouso, conforme visualização na figura abaixo (figura 77).



**Figura 77. Modulação adrenérgica no perfil inflamatório do macrófago peritoneal após 6 h do rato ter sido submetido a sessão aguda de exercício físico de intensidade moderada. Fonte: o autor.**

Seguindo para a intensidade exaustiva, sem bloqueio, após 6 h percebemos aumentos consistentes nas funções dessas células, maiores que as respostas de monócitos circulantes de rato, coletados após ou 12 h depois do exercício físico intenso (Scholer, Marques et al. 2016). Observamos ausência na produção de nitritos quando as células foram bloqueadas por prazosina e ioimbina e redução de fagocitose nos grupos prazosina, ioimbina e, de maneira intrigante, metoprolol, ou seja, ocorrendo a ausência de resposta de outro receptor, fato não presente na intensidade moderada. Demonstrando que altas concentrações noradrenérgicas podem aumentar a afinidade com receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, ativando-os (Dimitrijevic, Pilipovic et al. 2009). Logo, frente a estímulo simpático intenso, a célula ativa de forma consistente e robusta suas funções e vias de sinalização, respondendo de modo adequado ao estímulo recebido.

Já o grupo propranolol com a disponibilidade dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos apresentou intensa resposta fagocítica associada, portanto, a um perfil pró-inflamatório. Porém, surpreendeu-nos, a sólida redução na sua produção de nitritos. É possível que, em uma célula muito ativada, a produção celular de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio deve ser precisamente balanceada, evitando a toxicidade para as próprias células e órgãos e células vizinhas da cavidade peritoneal. Assim, uma intensa resposta inflamatória inicial, com elevada produção de nitritos, pode ser direcionada para um metabolismo mais ativo da arginase I (Gotoh and Mori 1999) modulando iNOS, diminuindo a produção de nitritos e aumentando a liberação de arginase I para o meio extracelular (Gotoh and Mori 1999, Salimuddin, Nagasaki et al. 1999). Assim, arginase I é induzida no estágio final da inflamação, prevenindo uma superprodução extensa de NO e evitando apoptose celular. Em macrófagos ativados com LPS, a arginase I extracelular esgota a L-arginina do meio extracelular, inibindo a proliferação e causando citotoxicidade para possíveis microorganismos presentes (Schneider and Dy 1985, Salimuddin, Nagasaki et al. 1999, Mori, Ozaki et al. 2002). Dessa forma, o organismo permanece eficiente na eliminação de invasores, contudo sem causar danos celulares.

Além disso, nesta intensidade exaustiva tanto as células do grupo controle como dos bloqueios apresentaram, conforme ocorrido na intensidade moderada, os mesmos conteúdos proteicos intracelulares e gênicos de HSP70, iNOS e arginase I dos respectivos grupos repouso. Não houve diferenciação estabelecida após 6 h da sessão de exercício físico entre si e seus repousos.

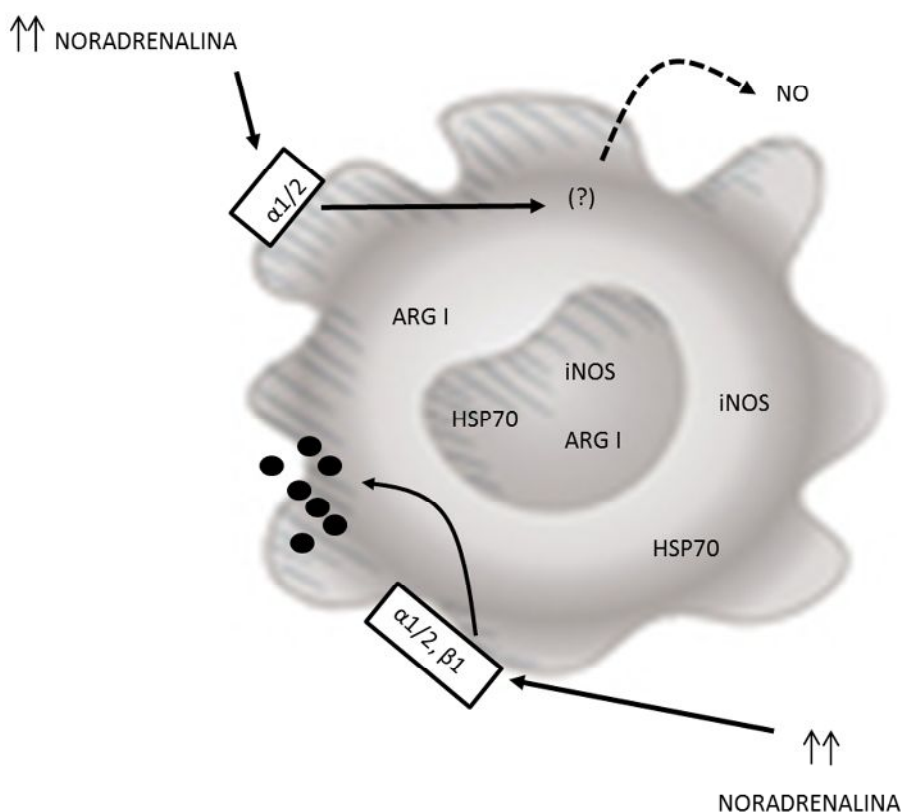
Essa ausência de alteração nos conteúdos proteicos e gênicos de iNOS, arginase I e HSP70 em relação a situação repouso e ao uso de diferentes bloqueadores adrenérgicos parece necessitar de maior tempo para a modificação nestes parâmetros, assim como o ocorrido com os dados funcionais. Estudos utilizando macrófagos peritoneais residentes obtidos de ratos Wistar, que foram incubados com LPS, o mais potente indutor da produção de óxido nítrico, demonstraram picos de óxido nítrico, expressão proteica e de RNA mensageiro de iNOS após 8 h do período de incubação (Sonoki, Nagasaki et al. 1997, Lopez-Urrutia, Alonso et al. 2000). Nestas mesmas condições celulares, arginase I apresenta de forma mais lenta sua expressão proteica e de RNA mensageiro com picos após 12 e 24 h, nesta ordem, do estímulo estressor (Sonoki, Nagasaki et al. 1997). Portanto, caso tivéssemos utilizado um tempo próximo de 8 h após a sessão de exercício, talvez teríamos modificações nas expressões das



proteínas de nosso interesse e elevada resposta funcional em ambas intensidades de exercício físico.

Além disso, nossos dados demonstraram a presença de ambas enzimas consumidoras de L-arginina em macrófagos peritoneais de rato e que, a princípio, não apresentaram reduções, independente da intensidade, até 6 h após a sessão de exercício. Discordando da literatura que considera apenas o LPS um coindutor destas enzimas (Sonoki, Nagasaki et al. 1997).

Portanto, em intensidade exaustiva de exercício físico, mesmo com poucos minutos de duração, observamos o estabelecimento de um perfil pró-inflamatório pela aparente ligação de noradrenalina com os receptores  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ -adrenérgicos, promovendo atividade fagocítica e produção de óxido nítrico, conforme figura abaixo (figura 78). Parece que a resposta pró-inflamatória encerra-se após as 6 h do esforço físico, sem influenciar negativamente as funções basais de macrófagos residentes peritoneais, confirmado pela curva tempo-resposta.



**Fig. 78. Modulação adrenérgica no perfil inflamatório do macrófago peritoneal após 6 h do rato ter sido submetido a sessão aguda de exercício físico de intensidade exaustiva. Fonte: o autor.**

Assim, independente da intensidade de exercício físico, houve a modulação de macrófagos para um perfil pró-inflamatório o qual parece envolver os receptores  $\alpha_1$ , via proteína  $G_q$ , e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, via proteína  $G_i$ , com redução do AMPc. É provável que, assim como em cultura de células permanentes, ambas utilizam a via da PLC e aumento do cálcio intracelular para ativar a via Ras-Raf, resultando na indução das proteínas ERK-1 e/ou -2. O receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico ativa essa via pela subunidade  $q$  de sua proteína  $G_q$ , enquanto o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico pelas subunidades  $i$  de sua  $G_i$ , gerando citocinas pró-inflamatórias (Della Rocca, van Biesen et al. 1997, Rouppe van der Voort, Kavelaars et al. 2000) e estabelecendo um fenótipo pró-inflamatório.

O receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico participa da ativação da fagocitose na intensidade exaustiva pela provável ligação noradrenérgica, mediada por  $G_i$  e dependente da ativação de PKA aumentando o nível de fosforilação de ERK e promovendo a ativação de ERK-1, conforme visto em células de ovário de hamster chinês. Sendo esta uma via conhecida de transdução de sinal que desencadeia a fagocitose em macrófagos (Garcia-Garcia, Rosales et al. 2002, Martin, Whalen et al. 2004).

Surpreende que, mesmo com aumentos nas respostas funcionais e possível ativação de vias de sinalização descritas acima, a produção de nitritos no grupo controle, após 6 h da sessão de exercício, não teve relação com o conteúdo proteico e de mRNA da iNOS. A clássica ativação de iNOS pelas vias AP-1, STAT-1 e NF- $\kappa$ B (Morimoto and Santoro 1998, Bogdan 2001) resultam na produção de óxido nítrico, contudo é necessário algumas horas para a expressão gênica e transdução dos constituintes de iNOS (Amatore, Arbault et al. 2006). Dessa forma, a modulação dá-se apenas por alteração da atividade enzimática da iNOS ou da arginase-I. Outra justificativa para a ausência desta enzima seria o bloqueio de sua síntese pela elevada concentração intracelular de HSP70, conhecida por inativar a fosforilação do I $\kappa$ B (Morimoto and Santoro 1998, Homem de Bittencourt and Curi 2001, Gutierrez, Maslinkiewicz et al. 2008, Chen, Wu et al. 2009), impedindo a ativação do NF- $\kappa$ B e, conseqüente, bloqueio consistente de qualquer resposta inflamatória excessiva. Contudo, assim como iNOS, HSP70 não apresentou alterações em seus conteúdos proteico e gênico. O maior conteúdo de arginase I poderia negativamente modular o conteúdo de iNOS pelo consumo de L-arginina, porém nesta enzima também não houve alterações proteica e gênica em nenhuma das intensidades propostas. A ausência destas modificações pode ser presumível

quando relacionadas ao seu tempo de expressão, pois em estudo utilizando macrófagos peritoneais incubados com LPS houve alterações proteicas e gênicas dessa enzima apenas após 12

Contudo, não nos parece lógico uma célula que necessita combater invasores, tanto externos como provenientes da microbiota intestinal, para proteger um local constituído de órgãos de extrema importância, demorar muito tempo para responder. Esta célula por ser pertencente a imunidade inata apresenta características de respostas rápidas ao estímulo estressor, sendo a velocidade desta ação determinante para a resolução da inflamação ou infecção. Assim, apesar de não termos mensurado, existe a possibilidade de maior ativação enzimática de iNOS, já macrófagos são conhecidos pela ausência de NOS constitutivas, como nNOS ou eNOS (Silveira, Rodrigues et al. 2007). Logo surgem como possíveis suspeitos do aumento da concentração de nitritos em meio de cultura de macrófagos *in vitro*

Óbvio que por serem experimentos *in vivo* é inegável a possível participação de outros hormônios, citocinas e alterações metabólicas (Walsh, Gleeson et al. 2011) que poderiam interferir nas funções celulares e, portanto nos resultados. A clássica ligação de citocinas aos TLR ou a receptores específicos ativam a via dependente de MyD88, STAT, NF- B e MAPKs para produção de diversas citocinas e óxido nítrico (Mosser and Edwards 2008, Parameswaran and Patial 2010). Além disso, citamos também a forte influência da HSP70 extracelular nessas células, pois estudo anterior de nosso laboratório com exercício físico em ratos, detectou aumentos nesta proteína, de modo intensidade-dependente, os quais correlacionavam-se positivamente com as robustas funções celulares de monócitos circulantes (Scholer, Marques et al. 2016). No meio extracelular, esta proteína destaca-se pela ligação com TLRs 2 e 4 ativando MyD88, IRAK e NF- B promovendo iNOS, produção e liberação de NO, TNF- , IL-1 e IL-6 em macrófagos (Johnson and Fleshner 2006). Entretanto, mesmo estando presente durante e imediatamente após a sessão de exercício, parece que outros fatores não foram responsáveis por alterações nas células de nosso estudo, visto que através dos diferentes bloqueios adrenérgicos estabeleciam-se diferentes respostas inflamatórias. Portanto, sendo as funções celulares dependentes de forma exclusiva da via catecolaminérgica.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados de nosso estudo permitem concluir:

- Macrófagos residentes peritoneais respondem ao estímulo agudo do exercício físico em diferentes intensidades de exercício físico, de curta duração;
- Macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma sessão aguda de exercício físico apresentaram aumentos na capacidade fagocítica e na produção de NO promovidas principalmente por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos;
- O exercício físico de curta duração moderado e exaustivo parece prolongar o fenótipo pró-inflamatório (M1) por até 6 horas em macrófagos peritoneais;
- Macrófagos peritoneais de rato não apresentaram redução em suas funções pró inflamatórias basais por até 24 h quando os animais foram submetidos a exercícios de curta duração, com intensidades moderada e exaustiva.
- Após seis horas do estímulo do exercício não houve modificações nas concentrações proteicas e gênicas de HSP70, iNOS e Arginase I em relação as diferentes intensidades de exercício físico e bloqueios adrenérgicos utilizados.

## **8 PERSPECTIVAS:**

- Avaliar, nas mesmas condições do estudo a cinética enzimática de iNOS e arginase I de macrófagos peritoneais dos ratos submetidos as mesmas intensidades e duração de exercício físico com os diferentes bloqueios;
- Conferir os mesmos parâmetros estudados, em macrófagos peritoneais isolados de rato submetidos a cultura com as concentrações de adrenalina e noradrenalina plasmáticas detectadas nessas intensidades de exercício físico e com os mesmos bloqueadores adrenérgicos;
- Averiguar um possível efeito dependente dos receptores TLR em relação aos receptores adrenérgicos, principalmente as isoformas ;
- Investigar a presença de arginase I em meios de cultura de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a exercício físico com elevada carga de trabalho;
- Verificar a participação do eixo histamina-CRH, com bloqueadores específicos, nos mesmos parâmetros estudados, em macrófagos peritoneais de rato submetidos às mesmas intensidades e durações de exercício físico;
- Avaliar a possível liberação de NO por: heme proteínas, aumento do cálcio intracelular, ativação de proteínas cinases ativadas ou não pelo cálcio intracelular.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2011). WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010. **WHO**, World Health Organization, 2011.

Aarnio, P., Lauritsen, T.; Dela, F. Insulin secretion and glucose kinetics during exercise with and without pharmacological alpha(1)- and alpha(2)-receptor blockade. **Diabetes**, v. 50, n.8, p. 1834-1843, 2001.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. **Elsevier Health Sciences**, 544 p., 2014.

Abreu, P., Mendes, S. V., Leal-Cardoso, J. H., Ceccatto, V. M. Anaerobic threshold employed on exercise training prescription and performance assessment for laboratory rodents: A short review. **Life Sci**, v. 151, p. 1-6, 2016.

Amatore, C., Arbault, S., Bouton, C., Coffi, K., Drapier, J. C., Ghandour, H., Tong, Y. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. **ChemBiochem**, v. 7, n. 4, p. 653-661, 2006.

Anand, T., Phani Kumar, G., Pandareesh, M. D., Swamy, M. S., Khanum, F., Bawa, A. S. Effect of bacoside extract from *Bacopa monniera* on physical fatigue induced by forced swimming. **Phytother Res**, v. 26, n. 4, p. 587-593, 2012.

Asea, A. Hsp72 release: mechanisms and methodologies. **Methods**, v. 43, p. 194-198, 2007.

Balestrieri, B., Hsu, V. W., Gilbert, H., Leslie, C. C., Han, W. K., Bonventre, J. V., Arm, J.P. Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. **J Biol Chem**, v. 281, n. 10, p. 6691-6698, 2006.

Bansal, V., Ochoa, J. B. Arginine availability, arginase, and the immune response. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2003.

Barnes, M. A., Carson, M. J., Nair, M. G. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 210-219, 2015.

Barth, M. W., Hendrzak, J. A., Melnicoff, M. J., Morahan, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. **J Leukoc Biol**, v. 57, n. 3, p. 361-367, 1995.

Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. **Brain Behav Immun**, v. 10, n. 2, p. 77-91, 1996.

- Billat, V. L., Sirvent, P., Py, G., Koralsztein, J. P., Mercier, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**, v. 33, n. 6, p. 407-426, 2003.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., Consitt, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. **J Strength Cond Res**, v. 19, n. 2, p. 276-285, 2005.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- Bornstein, S. R., Chrousos, G. P. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 5, p. 1729-1736, 1999.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Brau, L., Ferreira, L. D., Nikolovski, S., Raja, G., Palmer, T. N., Fournier, P. A. Regulation of glycogen synthase and phosphorylase during recovery from high-intensity exercise in the rat. **Biochem J**, v. 322, Pt 1, p. 303-308, 1997.
- Brown, E. T., Umino, Y., Loi, T., Solessio, E., Barlow, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Vis Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 615-618, 2005.
- Brown, S. W., Meyers, R. T., Brennan, K. M., Rumble, J. M., Narasimhachari, N., Perozzi, E. F., Ryan, J. J., Stewart, J. K., Fischer-Stenger, K. Catecholamines in a macrophage cell line. **J Neuroimmunol**, v. 135, n. 1-2, p. 47-55, 2003.
- Calderwood, S. K., Theriault, J., Gray, P. J., Gong, J. Cell surface receptors for molecular chaperones. **Methods**, v. 43, n. 3, p. 199-206, 2007.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M. "Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. **Toxicol In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 561-566, 2003.
- Cao, C., Lawrence, D. A., Strickland, D. K., Zhang, L. A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3234-3241, 2005.
- Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M. R., Bortoluci, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. **Front Immunol**, v. 6, p. 225, 2015.
- Chang, C. I., Liao, J.C., Kuo, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am J Physiol**, v. 274, n. 1, Pt 2, p. H342-348, 1998.
- Chang, Y., Chen, T. L., Sheu, J. R., Chen, R. M. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, n. 1, p. 27-35, 2005.
- Chen, Z. C., Wu, W. S., Lin, M. T., Hsu, C. C. Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. **BMC Neurosci**, v. 10, p. 111, 2009.

- Chi, D. S., Qui, M., Krishnaswamy, G., Li, C., Stone, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide**, v. 8, n. 2, p. 127-132, 2003.
- Christensen, N. J., Galbo, H. Sympathetic nervous activity during exercise. **Annu Rev Physiol**, n. 45, p. 139-153, 1983.
- Connolly, P. H., Caiozzo, V. J., Zaldivar, F., Nemet, D., Larson, J., Hung, S. P., Heck, J. D., Hatfield, G. W., Cooper, D. M. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **J Appl Physiol**, v. 97, n. 4, p. 1461-1469, 2004.
- Covarrubias, A. J., Aksoylar, H.I., Horng, T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. **Semin Immunol**, v. 27, n. 4, p. 286-296, 2015.
- da Silva Rossato, J., Krause, M., Fernandes, A. J., Fernandes, J. R., Seibt, I. L., Rech, A., Homem de Bittencourt Jr, P. I. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. **J Physiol Biochem**, v. 70, n. 2, p. 363-374, 2014.
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.
- Davies, L. C., Rosas, M., Smith, P. J., Fraser, D. J., Jones, S. A., Taylor, P. R. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 8, p. 2155-2164, 2011.
- de Araujo, G. G., Papoti, M., Manchado, F. de B., de Mello, M. A., Gobatto, C. A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats." **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 148, n. 4, p. 888-892, 2007.
- De Boer, S. F., Van der Gugten, J. Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. **Physiol Behav**, v. 40, n. 3, p. 323-328, 1987.
- de la Fuente, M., Martin, M. I., Ortega, E. Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 4, p. 189-198, 1990.
- de Montmollin, E., Aboab, J., Mansart, A., Annane, D. Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis. **Crit Care** v. 13, n. 5, p. 230, 2009.
- de Vries, W. R., Bernards, N. T., de Rooij, M. H., Koppeschaar, H. P. Dynamic exercise discloses different time-related responses in stress hormones. **Psychosom Med** v. 62, n. 6, p. 866-872, 2000.
- Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D. K., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase." **J Biol Chem**, v. 272, n. 31, p. 19125-19132, 1997.



Dhabhar, F. S., Malarkey, W. B., Neri, E. McEwen, B.S. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner." **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 9, p.1345-1368, 2012.

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **J Appl Toxicol** v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

Dimitrijevic, M., Pilipovic, I., Stanojevic, S., Mitic, K., Radojevic, K., Pesic, V., Laposavic, G. Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide." **J Neuroimmunol**, v. 211, n. 1-2, p. 56-65, 2009.

Elenkov, I. J., Chrousos, G. P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. **Trends Endocrinol Metab**, v. 10, n. 9, p. 359-368, 1999.

Elfellah, M. S., Turnbull, M. J. Effect of pretreatment with bronchodilator drugs on in vitro responsiveness of guinea pig lung adenylate cyclase. **Eur J Pharmacol**, v. 51, n. 3, p. 211-217, 1978.

Farmer, P., Pugin, J. Beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway." **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.279, n. 4, p. L675-682, 2000.

Fehrenbach, E., Schneider, M.E. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. **Sports Med**, v. 36, n. 5, p. 373-384, 2006.

Feng, W. G., Wang, Y. B., Zhang, J. S., Wang, X. Y., Li, C. L., Chang, Z. L. cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages. **Cell Res**, v, 12, n. 5-6, p. 331-337, 2002.

Ferrandez, M. D., De la Fuente, M. "Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiol Scand**, v. 166, n. 1, p. 47-53, 1999.

Ferreira, C. K., Prestes, J., Donatto, F. F., Verlengia, R., Navalta, J. W., Cavaglieri, C. R. Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 11, p. 1167-1173, 2010.

Fisher-Wellman, K., Bloomer, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dyn Med**, v. 8, n. 1, 2009.

Flavahan, N. A., McGrath, J. C. Blockage by yohimbine of prazosin-resistant pressor effects of adrenaline in the pithed rat. **Br J Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 355-357, 1980.

Flierl, M. A., Rittirsch, D., Nadeau, B. A., Sarma, J. V., Day, D. E., Lentsch, A. B., Huber-Lang, M. S., Ward, P. A. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4414, 2009.

Ganeshan, K., Chawla, A. Metabolic regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 609-634, 2014.

Garcia-Garcia, E., Rosales, R., Rosales, C. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 1, p. 107-114, 2002.

Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. **Am J Physiol**, v. 241, n. 5, R330-335, 1981.

Ghosn, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., Bortoluci, K. R., Almeida, S. R., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

Gobatto, C. A., de Mello, M. A., Sibuya, C. Y., de Azevedo, J. R., dos Santos, L. A., Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

Goldim, J. R. (1995). **Pesquisa em Saúde: Leis Normas e Diretrizes**. Porto Alegre, HCPA.

Gosain, A., Muthu, K., Gamelli, R. L., DiPietro, L. A. Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. **Surgery**, v. 142, n. 2, p. 170-179, 2007.

Gotoh, T., Mori, M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. **J Cell Biol**, v. 144, n. 3, p. 427-434, 1999.

Grisanti, L. A., Woster, A. P., Dahlman, J., Sauter, E. R., Combs, C. K., Porter, J. E. Alpha1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 648-657, 2001.

Gutierrez, L. L., Maslinkiewicz, A., Curi, R., de Bittencourt, Jr, P.I. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 12, p. 2245-2262, 2008.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., Van Rooijen, N., Garcia-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S., Merad, M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013.

Hasko, G., Shanley, T. P., Egnaczyk, G., Nemeth, Z. H., Salzman, A. L., Vizi, E. S., Szabo, C. Exogenous and endogenous catecholamines inhibit the production of macrophage inflammatory protein (MIP) 1 alpha via a beta adrenoceptor mediated mechanism. **Br J Pharmacol**, v. 125, n. 6, p. 1297-1303, 1998.

Heimbach, J. K., Reznikov, L. L., Calkins, C. M., Robinson, T. N., Dinarello, C. A., Harken, A. H., Meng, X. TNF receptor I is required for induction of macrophage heat shock protein 70. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 1, p. C241-247, 2001.

Henricks, P. A., Van Esch, B., Nijkamp, F. P. Beta-agonists can depress oxidative metabolism of alveolar macrophages. **Agents Actions**, v. 19, n. 5-6, p. 353-354, 1986.

Hespeel, P., Richter, E. A. Mechanism linking glycogen concentration and glycogenolytic rate in perfused contracting rat skeletal muscle. **Biochem J**, v. 284, n. 3, p. 777-780, 1992.

Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMennamin, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney Int**, v. 58, n. 6, p. 2571-2578, 2000.

Hishikawa, T., Cheung, J. Y., Yelamarty, R. V., Knutson, D. W. Calcium transients during Fc receptor-mediated and nonspecific phagocytosis by murine peritoneal macrophages. **J Cell Biol**, v. 115, n. 1, p. 59-66, 1991.

Hocht, C., Di Verniero, C., Opezzo, J. A., Taira, C. A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic properties of metoprolol in chronic aortic coarctated rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 370, n. 1, p. 1-8, 2004.

Hoffman-Goetz, L., Pedersen, B. K. Exercise and the immune system: a model of the stress response? **Immunol Today**, v. 15, n. 8, p. 382-387, 1994.

Homem de Bittencourt, P. I., Jr., Curi, R. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS-X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 7, p. 811-819, 2001.

Ignatowski, T. A., Gallant, S., Spengler, R. N. Temporal regulation by adrenergic receptor stimulation of macrophage (M phi)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post-LPS challenge. **J Neuroimmunol**, v. 65, n. 2, p. 107-117, 1996.

Ignatowski, T. A., Kunkel, S. L., Spengler, R. N. Interactions between the alpha(2)-adrenergic and the prostaglandin response in the regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor. **Clin Immunol**, v. 96, n. 1, p. 44-51, 2000.

Jakob, A., Diem, S. Metabolic responses of perfused rat livers to alpha- and beta-adrenergic agonists, glucagon and cyclic AMP. **Biochim Biophys Acta**, v. 404, n. 1, p. 57-66, 1975.

Johnson, J. D., Fleshner, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 3, p. 425-434, 2006.

Johnston, R. B., Jr., Godzik, C. A., Cohn, Z. A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. **J Exp Med**, v. 148, n. 1, p. 115-127, 1978.

Josefsson, E., Bergquist, J., Ekman, R., Tarkowski, A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. **Immunology**, v. 88, n. 1, p. 140-146, 1996.

Khan, A., Rayner, G. D. Robustness to Non-Normality of Common Tests for the Many-Sample Location Problem. **Journal of Applied Mathematics and Decision Science**, v. 7, n. 4, p. 187-206, 2003.

- Kim, J. G., Keshava, C., Murphy, A. A., Pitas, R. E., Parthasarathy, S. Fresh mouse peritoneal macrophages have low scavenger receptor activity. **J Lipid Res**, v. 38, n. 11, p. 2207-2215, 1997.
- Kindermann, W., Schnabel, A., Schmitt, W. M., Biro, G., Cassens, J., Weber, F. Catecholamines, growth hormone, cortisol, insulin, and sex hormones in anaerobic and aerobic exercise. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 49, n. 3, p. 389-399, 1982.
- King, Y. T., Lin, C. S., Lin, J. H., Lee, W. C. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of heat shock protein 70 in mice. **J Exp Biol**, v. 205, n. 2, p. 273-278, 2002
- Kizaki, T., Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J. E., Oh-ishi, S., Matsuoka, T., Izawa, T., Imaizumi, K., Haga, S., Ohno, H. Beta2-adrenergic receptor regulate Toll-like receptor 4-induced late-phase NF-kappaB activation. **Mol Immunol**, v. 46, n. 6, p. 1195-1203, 2009.
- Kizaki, T., Takemasa, T., Sakurai, T., Izawa, T., Hanawa, T., Kamiya, S., Haga, S., Imaizumi, K., Ohno, H. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, n. 1, p. 152-156, 2008.
- Kohut, M. L., Davis, J. M., Jackson, D. A., Colbert, L. H., Strasner, A., Essig, D. A., Pate, R. R., Ghaffar, A., Mayer, E. P. The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar macrophage antiviral function. **J Neuroimmunol**, v. 81, n. 1-2, p. 193-200, 1998.
- Kondomerkos, D. J., Kalamidas, S. A., Kotoulas, O. B. Effects of cyclic AMP-elevating hormones and autacoids on LPS-activated rat peritoneal, bronchoalveolar and hepatic (Kupffer) macrophages. **Cell Biochem Funct**, v. 24, n. 3, p. 245-256, 2006.
- Kovalchin, J. T., Wang, R., Wagh, M. S., Azoulay, J., Sanders, M., Chandawarkar, R. Y. In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. **Wound Repair Regen**, v. 14, n. 2, p. 129-137, 2006.
- Kregel, K., Allen, A., Booth, F., Fleshner, M., Henriksen, E., Musch, T., O'leary, D., Parks, C., Poole, D., Ra'anan, A., Sheriff, D., Sturek, M., Toth, L. (2006). **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**. AJP.
- Kruger, K., Lechtermann, A., Fobker, M., Volker, K., Mooren, F. C. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 3, p. 324-338, 2008.
- Krzywinski, M., Altman, N. Points of significance: Nonparametric tests. **Nat Methods**, v. 11, n. 5, p. 467-468, 2014.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- Lancaster, G. I., Febbraio, M. A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. **Trends Immunol**, v. 35, n. 6, p. 262-269, 2014.

Leandro, C. G., de Castro, R. M., Nascimento, E. Pithon.-Curi, T.C., Curi, R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológicos em resposta ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 5, p. 311e-316e, 2007.

Lima, F. D., Stamm, D. N., Della-Pace, I. D., Dobrachinski, F., de Carvalho, N. R., Royes, L. F., Soares, F. A., Rocha, J. B., Gonzalez-Gallego, J., Bresciani, G. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55668, 2013.

Lopez-Urrutia, L., Alonso, A., Nieto, M. L., Bayon, Y., Orduna, A., Sanchez Crespo, M. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1740-1745, 2000.

Maes, M., Lin, A., Kenis, G., Egyed, B., Bosmans, E. The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products. **Psychiatry Res**, v. 96, n. 3, 245-253, 2000.

Malm, C., Nyberg, P., Engstrom, M., Sjodin, B., Lenkei, R., Ekblom, B., Lundberg, I. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. **J Physiol**, v. 529, n. 1, p.: 243-262, 2000.

Martin, N. P., Whalen, E. J., Zamah, M. A., Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J. PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. **Cell Signal**, v. 16, n. 12, p. 1397-1403, 2004.

Mastorakos, G., Pavlatou, M., Diamanti-Kandarakis, E., Chrousos, G. P. Exercise and the stress system. **Hormones (Athens)**, v. 4, n. 2, p. 73-89, 2005.

Mazzeo, R. S., Marshall, P. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 67, n. 4, p. 1319-1322, 1989.

Miksa, M., Das, P., Zhou, M., Wu, R., Dong, W., Ji, Y., Goyert, S. M., Ravikumar, T. S., Wang, P. Pivotal role of the alpha(2A)-adrenoceptor in producing inflammation and organ injury in a rat model of sepsis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5504, 2009.

Mills, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. **Crit Rev Immunol**, v. 21, n. 5, p. 399-425, 2001.

Mills, C. D., Thomas, A. C., Lenz L. L., Munder, M. Macrophage: SHIP of Immunity. **Front Immunol**, v. 5, n. 620, 2014.

Morgan, N. G., Blackmore, P. F., Exton, J. H. Age-related changes in the control of hepatic cyclic AMP levels by alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors in male rats. **J Biol Chem**, v. 258, n. 8, p. 5103-5109, 1983.

Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., Tanaka, J. Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1026-1034, 2002.

Mori, M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. **J Nutr**, v. 137, n. 6, Suppl 2, p. 1616S-1620S, 2007.

Morimoto, R. I., Santoro, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 833-838, 1998.

Mosser, D. M., Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

Munder, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.

Munder, M., Eichmann, K., Moran, J. M., Centeno, F., Soler, G., Modolell, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999.

Muthu, K., He, L. K., Szilagy, A., Strotmon, P., Gamelli, R. L., Shankar, R. ss-adrenergic stimulation increases macrophage CD14 expression and E. coli phagocytosis through PKA signaling mechanisms. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 4, p. 715-724, 2010.

Nakamura, A., Johns, E. J., Imaizumi, A., Yanagawa, Y., Kohsaka, T. Modulation of interleukin-6 by beta2-adrenoceptor in endotoxin-stimulated renal macrophage cells. **Kidney Int**, v. 56, n. 3, p. 839-849, 1999.

Nance, D. M., Sanders, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.

Natale, V. M., Brenner, I. K., Moldoveanu, A. I., Vasiliou, P., Shek, P., Shephard, R. J. "Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. **Sao Paulo Med J**, v. 121, n. 1, p. 9-14, 2003.

Nieman, D. C. Immune response to heavy exertion. **J Appl Physiol**, v. 82, n. 5, p. 1385-1394, 1997.

Niess, A. M., Dickhuth, H. H., Northoff, H., Fehrenbach, E. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. **Exerc Immunol Rev**, v. 5, p. 22-56, 1999.

Norman, G. Likert scales, levels of measurement and the "laws" of statistics. **Adv Health Sci Educ Theory Pract**, v. 15, n. 5, p. 625-632, 2010.

Nozaki, S., Mizuma, H., Tanaka, M., Jin, G., Tahara, T., Mizuno, K., Yamato, M., Okuyama, K., Eguchi, A., Akimoto, K., Kitayoshi, T., Mochizuki-Oda, N., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide improves energy metabolism and physical performance during physical-fatigue loading in rats. **Nutr Res**, v. 29, n. 12, p. 867-872, 2009.

Nussler, A. K., Billiar, T. R., Liu, Z. Z., Morris, Jr, S. M. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. **J Biol Chem**, v. 269, n. 2, p. 1257-1261, 1994.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

Okabe, Y., Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 832-844, 2014.

Opie, L. H. Effect of beta-adrenergic blockade on biochemical and metabolic response to exercise. **Am J Cardiol**, v. 55, n. 10, p. 95D-100D, 1985.

Ortega, E., Collazos, M. E., Barriga, C., De la Fuente, M. Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 64, n. 4, p. 323-327, 1992.

Ortega, E., Giraldo, E., Hinchado, M. D., Martin, L., Garcia, J. J., De la Fuente, M. Neuroimmunomodulation during exercise: role of catecholamines as 'stress mediator' and/or 'danger signal' for the innate immune response. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 206-212, 2007.

Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., Pedersen, B. K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515, n. 1, p. 287-291, 1999.

Padmini, E., Uthra, V., Lavanya, S. HSP70 overexpression in response to ureaplasma urealyticum-mediated oxidative stress in preeclamptic placenta. **Hypertens Pregnancy**, v. 30, n. 2, p. 133-143, 2011.

Parameswaran, N., Patial, S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 2, p. 87-103., 2010.

Pearce, E. L., Pearce, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633-643, 2013.

Rath, M., Muller, I., Kropf, P., Closs, E. I., Munder, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Front Immunol**, v. 5, p. 532, 2014.

Rhind, S. G., Gannon, G. A., Shek, P. N., Brenner, I. K., Severs, Y., Zamecnik, J., Buguet, A., Natale, V. M., Shephard, R. J., Radomski, M. W. Contribution of exertional hyperthermia to sympathoadrenal-mediated lymphocyte subset redistribution. **J Appl Physiol (1985)**, v. 87, n. 3, p. 1178-1185, 1999.

Rodriguez-Prados, J. C., Traves, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., Bosca, L. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 605-614, 2010.

Roupe van der Voort, C., Kavelaars, A., van de Pol, M., Heijnen, C. J. Noradrenaline induces phosphorylation of ERK-2 in human peripheral blood mononuclear cells after induction of alpha(1)-adrenergic receptors. **J Neuroimmunol**, v. 108, n. 1-2, p. 82-91, 2000.

Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K., Jakubowski, J.A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 230, n. 10, p. 777-784, 2005.

Salimuddin, A., Nagasaki, T., Gotoh, H., Isobe, Mori, M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. **Am J Physiol**, v. 277, n. 1, Pt 1, p. E110-117, 1999.

Scheurink, A. J., Steffens, A. B. Central and peripheral control of sympathoadrenal activity and energy metabolism in rats. **Physiol Behav**, v. 48, n. 6, p. 909-920, 1990.

Schneider, E., Dy, M. The role of arginase in the immune response. **Immunol Today**, v. 6, n. 4, p. 136-140, 1985.

Scholer, C. M., Marques, C. V., da Silva, G. S., Heck, T. G., de Oliveira Junior, L. P., Homem de Bittencourt, Jr, P. I. Modulation of rat monocyte/macrophage innate functions by increasing intensities of swimming exercise is associated with heat shock protein status. **Mol Cell Biochem**, v. 421, n. 1-2, p. 111-125, 2016.

Shephard, R. J. Sepsis and mechanisms of inflammatory response: is exercise a good model? **Br J Sports Med**, v. 35, n. 4, p. 223-230, 2001.

Sigola, L. B., Zinyama, R. B. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. **Immunology**, v. 100, n. 3, p. 359-363, 2000.

Silveira, E. M., Rodrigues, M. F., Krause, M. S., Vianna, D. R., Almeida, B. S., Rossato, J. S., Oliveira, Jr. L. P., Curi, R., de Bittencourt, Jr, P. I. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. **Cell Biochem Funct**, v. 25, n. 1, p. 63-73, 2007.

Simar, D., Malatesta, D., Koechlin, C., Cristol, J. P., Vendrell, J. P., Caillaud, C. Effect of age on Hsp72 expression in leukocytes of healthy active people. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 10, p. 1467-1474, 2004.

Sonoki, T., Nagasaki, A., Gotoh, T., Takiguchi, M., Takeya, M., Matsuzaki, H., Mori, M. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. **J Biol Chem**, v. 272, n. 6, p. 3689-3693, 1997.

Soudi, S., Zavaran-Hosseini, A., Muhammad Hassan, Z., Soleimani, M., Jamshidi Adegani, F., Hashemi, S. M. Comparative study of the effect of LPS on the function of BALB/c and C57BL/6 peritoneal macrophages. **Cell J**, v. 15, n. 1, p. 45-54, 2013.

Starkie, R. L., Rolland, J., Febbraio, M. A. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 4, p. C1233-1240, 2001.

Straub, R. H., Mayer, M., Kreutz, M., Leeb, S., Scholmerich, J., Falk, W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 4, p. 553-558, 2000.



Su, S. H., Chen, H. I., Jen, C. J. Severe exercise enhances phagocytosis by murine bronchoalveolar macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 1, p. 75-80, 2001.

Sugiura, H., Sugiura, H., Nishida, H., Inaba, R., Mirbod, S. M., Iwata, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J Appl Physiol (1985)**, v. 90, n. 3, p. 789-794, 2001.

Tan, H. Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

Tan, K. S., Nackley, A. G., Satterfield, K., Maixner, W., Diatchenko, L., Flood, P. M. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. **Cell Signal**, v. 19, n. 2, p. 251-260, 2007.

Tanaka, M., Baba, Y., Kataoka, Y., Kinbara, N., Sagesaka, Y. M., Kakuda, T., Watanabe, Y. Effects of (-)-epigallocatechin gallate in liver of an animal model of combined (physical and mental) fatigue. **Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 599-603, 2008.

Thomas, D. D., Miranda, K. M., Colton, C. A., Citrin, D., Espey, M. G., Wink, D. A. Heme proteins and nitric oxide (NO): the neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 3, p. 307-317, 2003.

Van Handel, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Anal Biochem**, v. 11, n. 2, p. 256-265, 1965.

Varol, C., Mildner, A., Jung, S. Macrophages: development and tissue specialization. **Annu Rev Immunol**, v. 33, p. 643-675, 2015.

Vassilakopoulos, T., Zakyntinos, S., Roussos, C. Strenuous resistive breathing induces proinflammatory cytokines and stimulates the HPA axis in humans. **Am J Physiol**, v. 277, n. 4, Pt 2, p. R1013-1019, 1999.

Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Gleeson, M., Woods, J. A., Bishop, N. C., Fleshner, M., Green, C., Pedersen, B. K., Hoffman-Goetz, L., Rogers, C. J., Northoff, H., Abbasi, A., Simon, P. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011.

Weinberg, S. E., Sena, L. A., Chandel, N. S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 406-417, 2015.

Woods, J., Lu, Q., Ceddia, M. A., Lowder, T. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunol Cell Biol**, v. 78, n. 5, p. 545-553, 2000.

Wu, G., Morris, Jr, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, n. 1, p. 1-17, 1998.

Yano, H., Kinoshita, K., Kira, K. Effects of acute moderate exercise on the phagocytosis of Kupffer cells in rats. **Acta Physiol Scand**, v. **182**, n. 2, p. 151-160, 2004.

Zaldivar, F., Wang-Rodriguez, J., Nemet, D., Schwindt, C., Galassetti, P., Mills, P. J., Wilson, L. D., Cooper, D. M. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **J Appl Physiol**, v. 100, n. 4, p. 1124-1133, 2006.

Zhang, B., Crankshaw, W., Nesemeier, R., Patel, J., Nweze, I., Lakshmanan, J., Harbrecht, B. G. Calcium-mediated signaling and calmodulin-dependent kinase regulate hepatocyte-inducible nitric oxide synthase expression. **J Surg Res**, v. 193, n. 2, p. 795-801, 2015.

Zhu, H., Naito, M., Umezu, H., Moriyama, H., Takatsuka, H., Takahashi, K., Shultz, L. D. Macrophage differentiation and expression of macrophage colony-stimulating factor in murine milky spots and omentum after macrophage elimination. **J Leukoc Biol**, v. 61, n. 4, p. 436-444, 1997.

Zinyama, R. B., Bancroft, G. B., Sigola, L. B. Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. **Immunology**, v. 104, n. 4, p. 439-446, 2001.