



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

JULIANE DA SILVA ROSSATO

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO SOBRE
METABOLISMO E NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE
MONÓCITOS CIRCULANTES DE RATOS DURANTE O
EXERCÍCIO AGUDO DE INTENSIDADE MODERADA
(NATAÇÃO)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Professor Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior - UFRGS.

Porto Alegre, Agosto de 2009

JULIANE DA SILVA ROSSATO

**PAPÉL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO SOBRE
METABOLISMO E NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE
MONÓCITOS CIRCULANTES DE RATOS DURANTE O
EXERCÍCIO AGUDO DE INTENSIDADE MODERADA
(NATAÇÃO)**

Documento apresentado como requisito
parcial para a obtenção de grau de Mestre em
Ciências do Movimento Humano,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Programa de Pós-graduação em Ciências do
Movimento Humano.

Orientador: Professor Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior - UFRGS

Porto Alegre, Agosto 2009

R823p Rossato, Juliane da Silva

Papel do sistema nervoso simpático sobre metabolismo e na resposta imunológica de monócitos circulantes de ratos durante o exercício agudo de intensidade moderada (natação). / Juliane da Silva Rossato. - Porto Alegre: Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

123 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Sistema imunológico. 2. Sistema nervoso simpático. 3. Exercício físico. I. Título. II. Bittencourt Júnior, Paulo Ivo Homem, orientador.

CDU: 796.012:612

“Ao vencedor as batatas”
(Machado de Assis - Quincas Borba)

Agradecimentos

Agradeço a minha família, que mesmo não entendendo a minha fixação pelo Laboratório, sempre me apoiou em todos os momentos. Especialmente a minha mãe e minha tia que nunca mediram esforços para que eu realizasse todos os meus objetivos, mesmo diante de todas as dificuldades. Obrigada por toda dedicação, paciência, carinho, amor e pelos maravilhosos lanches que nos sustentaram nas madrugadas de experimento.

Os agradecimentos que tenho a fazer não são apenas pelos dois anos que fiz o mestrado, e sim por todos os anos e todas as pessoas amigas com quem eu convivi desde 2002.

Ao professor Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior pela oportunidade de aprendizado e convivência durante esses anos.

Aos meus queridos amigos de outros tempos do laboratório Bibiana, Elza, Daiane, Mariana, Damiana, Alexandre, Gustavo, Lucila e Lino. Um agradecimento à Ângela Kolberg por ter me adotado quando eu nem sabia o que fazer em um laboratório, pois aprendi com você a importância da dedicação ao trabalho.

Especialmente aqueles que alegraram meus dias e permitiram que o período de mestrado fosse um momento feliz. As pessoas que acordaram cedo e deixaram seus compromissos para que eu vencesse meus prazos.

João, não vejo minha vida longe de tanta exuberância; Isis, você é uma mulher forte e dedicada de quem me orgulho muito; Anderson, seu futuro é brilhante, admiro sua responsabilidade apesar de ainda ser uma criança; Joli, sempre com seu “vocabulário polido” para alegrar nossos dias; Max, obrigada pela paciência e companheirismo. E Mauricio, eu agradeço por dividir seu conhecimento e amizade durante todos esses anos.

Para vocês meu eterno agradecimento e amizade.

Resumo

O exercício físico de intensidade moderada tem apresentado um papel como potencial indutor na modulação da resposta imunológica. Estudos recentes de nosso grupo demonstraram que uma sessão de exercício moderado pode promover um incremento da resposta imunológica de células como monócitos/macrófagos, estimulando uma resposta inflamatória através da ativação do fator nuclear NF- κ B. Diante desses resultados, investigamos a possibilidade de o sistema nervoso simpático periférico, através da liberação local de catecolaminas, estar participando desse mecanismo. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos adultos (3/grupo) aos quais foram administrados i.p (100 μ L/100g) de Salina (PBS), Prazosina (antagonista α_1 , 2mg/kg), fentolamina (α não seletivo, 10mg/kg), propranolol (β não seletivo, 10mg/kg) e duplo bloqueio, sendo esses subdivididos em grupos controle e exercício (natação por 1 hora com peso equivalente a 5% do peso do animal no peito). Parâmetros como lactocemia, glicemia, trigliceridemia, lipoperoxídeos plasmáticos e relação GSSG/GSH em eritrócitos circulantes foram dosados, sendo que houve um aumento dos níveis de lactato e redução da glicemia nos animais com fentolamina. Como o bloqueio α_2 promove um aumento da secreção de insulina, gerando um estado de hipoglicemia e aumento de lactato, que levava os animais a fadiga, a prazosina foi o fármaco de escolha a fim de minimizar os efeitos metabólicos que poderiam influenciar na resposta imunológica. No exercício, os monócitos/macrófagos apresentaram um aumento da capacidade fagocítica, produção de nitritos, que são fatores que demonstram um estado de ativação da resposta imunológica. O mesmo comportamento foi observado quando realizado um bloqueio β . No entanto, os animais com administração de um antagonista α_1 demonstraram um aumento expressivo na fagocitose, na produção de nitritos, assim como também a imunodeteção de NOS2 e HSP72 (após 6 horas do exercício). Esses fatores têm sua expressão condicionada à ativação do fator nuclear NF- κ B. Da mesma forma, o bloqueio duplo (α_1 e β) demonstrou uma resposta de monócitos/macrófagos semelhante ao bloqueio por α_1 . O bloqueio α_1 aumentou a fagocitose e a produção de NO, além de comprovar a ativação do NF κ B pela expressão da NOS2 e da HSP72, independentemente da realização do exercício, ou seja pela maior disponibilidade de catecolaminas circulantes. Podendo indicar um efeito inibitório tônico produzido por receptores α_1 periféricamente, que quando bloqueados gerariam um aumento da responsividade de monócitos/macrófagos. Mecanismos envolvendo a estimulação de α_2 e β receptores devem ainda ser investigados. Da mesma forma, podem ser sugeridos outros participantes dessa imunomodulação periférica, como o eixo CRH periférico-histamina e a própria HSP70 extracelular (eHSP70) produzida pelas células imunológicas.

Abstract

Previous studies from our laboratory have demonstrated that a single session of moderate exercise induces many changes in immune system, such as increased phagocytic capacity, production of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide, though NF κ B pathway. In this work, we investigated the relationship between immune system and peripheral sympathetic nervous system in NF κ B activation-related changes, during the exercise. Adults male Wistar rats were i.p. administered (100 μ l/100g) with specific adrenergic antagonists 30 min before exercise protocol: Saline (PBS), phentolamine (α_1, α_2 antagonist, 10mg/kg), prazosin (α_1 antagonist 2mg/kg), propranolol (β_1, β_2 antagonist 10mg/kg) and double blockade (α and β). The protocol consisted in a single session of moderate (5% body weight overload on the chest) exercise (swimming) for 60 minutes. We tested blood lactate, glucose, triglycerides, lipoperoxidation and the systemic oxidative stress and the results showed an increase of the lactate levels and glucose reduction in the animals with phentolamine blockade. Since an α_2 antagonist promote an increase in the insulin secretion, resulting in hypoglycemic status, increase lactate levels and taking fatigue, we chose prazosin as the pharmacologic α_1 blocker, excluding metabolic changes that could influence in the immunological analysis. After exercise, monocytes/macrophages showed an increase in phagocytic capacity and NO production, thus suggesting activation of an immune response. The same behavior was observed after β blockade. However, administration of α_1 antagonist prazosin, as well as the double blockade, increased the phagocytic capacity, NO production, and the NOS2 and HSP72 immunodetection (6 hours after exercise session), with suggests some physiological alteration on monocyte/macrophage NF κ B activation, exercise independent. We suggested a peripheral α_1 adrenoreceptor inhibitory tonus, and that the α_1 antagonism could reverse this mechanism, resulting in increase in the monocyte/macrophage responsiveness. However, we need to further investigate α_2 and β adrenoreceptors stimulation, as well as CRH-histamine peripheral axis and the endogenous HSP72, other mechanisms that could be involved in the immunological response.

Lista de abreviaturas

ACTH.....	Hormônio estimulante da corticotropina
AMP.....	monofosfato de adenosina
cAMP.....	monofosfato de adenosina cíclico
APC.....	célula apresentadora de antígeno
ATP.....	trifosfato de adenosina
ATPase.....	adenosina trifosfato
AVP.....	arginina-vasopressina
BHT.....	hidroxibutiltolueno
BSA.....	albumina sérica
CAT.....	catalase
CD.....	<i>cluster of differentiation</i>
COX-2.....	ciclooxigenase-2
CRH.....	Hormônio liberador da corticotropina
DTNB.....	ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT.....	ditiotreitól
ECL.....	do inglês, <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA.....	ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA.....	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
eNOS.....	óxido nítrico sintase endotelial
ERK.....	Extracelular signal-regulated kinase
GS-conjugado.....	S-conjugados de glutationa
GSH.....	glutationa (forma reduzida)
GSRd.....	glutationa redutase
GPx.....	glutationa peroxidase
GSSG.....	dissulfeto de glutationa
GST.....	glutationa S-transferase
GS-X.....	bomba de glutationa
γ -GCS.....	γ -glutamilcisteínasintetase

H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
HSC70.....	proteína de choque térmico, constitutiva de 73 kDa
HSE.....	elemento de ligação dos HSF ao DNA
HSF	fator de transcrição para HSP
HSP70	proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP72	proteína de choque térmico de 72 kDa
HSP73	proteína de choque térmico, constitutiva de 73 kDa
IL.....	interleucina
IL-1ra	antagonista da interleucina 1
INF- γ	interferon-gama
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
I κ B	proteína inibitória do NF- κ B
IKK	quinase da I κ B
IRF-1	interferon regulatory factor
JNK.....	c-Jun quinase
kDa.....	quilodaltons
LC-NA	neurônios autonômicos do <i>locus ceruleus</i>
LPS.....	lipopolissacarídeo
MAPK.....	mitogen- activated protein kinase
MDA.....	malondialdeído
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal, do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>
MPA.....	ácido metafosfórico
MOPS.....	morfolinopropanossulfônico
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NEM.....	N-etilmaleimida
NFκB.....	fator nuclear kappa B (do ingles, nuclear factor-κB)
NK.....	natural killer
nNOS	óxido nítrico sintase
NO.....	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NO _x ⁻	nitrito + nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	superóxido
OH ⁻	hidroxila
PBS	salina tamponada com fosfato
PIPES	ácido piperazina N-N'-bis-(etanossulfônico)
PKC.....	proteína C kinase
PMSF	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
RNS.....	espécies reativas do nitrogênio
ROS.....	espécies reativas do oxigênio
SDS.....	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SNS.....	Sistema nervoso simpático
SOD	superóxido dismutase
sTNFR.....	receptor de TNF-α solúvel
TBHP	hidroperóxido de <i>t</i> -butila
TNB	ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TPP.....	trifenilfosfina
VO ₂ máx.....	Consumo máximo de oxigênio
XO.....	xilenol laranja

Lista de Figuras

Figura 1- Hipótese de exercício moderado	30
Figura 2- Hipótese de exercício extenuante	36
Figura 3- O papel da arginina e da glutamina no diabetes <i>mellitus</i> tipo1 (T1DM)	45
Figura 4- Hipótese de ação conjunta da L-arginina/glutamina em células- β secretoras de insulina	46
Figura 5- Comparação entre os valores de lactato PBS, fentolamina, propranolol e fentolamina + propranolol	66
Figura 6- Comparação entre os valores de lactato fentolamina e fentolamina + propranolol, controle e exercício	68
Figura 7- Comparação entre os valores de glicose fentolamina e fentolamina + propranolol, controle e exercício	70
Figura 8- Comparação entre os valores de glicose PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol no exercício	71
Tabela 1- Dosagem de lactato	71
Figura 9- Comparação entre os valores de triglicerídeos fentolamina e prazosina no exercício	73
Figura 10- Lipoperóxidos PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol	74
Figura 11- Lipoperóxidos PBS, prazosina e fentolamina	75
Figura 12- Conteúdo de Glutaciona Total PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol	77
Figura 13- Conteúdo de dissulfeto de Glutaciona PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol	78
Figura 14- Conteúdo de Glutaciona reduzida PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol	79
Figura 15- Relação dissulfeto de Glutaciona e Glutaciona (GSSG/GSH) PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol	80
Figura 16- Conteúdo de Glutaciona Total PBS, prazosina, fentolamina	81
Figura 17- Conteúdo de dissulfeto de Glutaciona PBS, prazosina, fentolamina	82
Figura 18- Conteúdo de Glutaciona reduzida PBS, prazosina, fentolamina	83

Figura 19- Relação dissulfeto de Glutathione e Glutathione (GSSG/GSH) PBS, prazosina, fentolamina	84
Figura 20- Fagocitose de zimosan PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol.	86
Figura 21- Fagocitose de zimosan PBS, fentolamina, propranolol, fentolamina + propranolol.....	87
Figura 22- Produção de nitritos por macrófagos PBS, prazosina, propranolol, prazosina + propranolol.....	88
Figura 23- Produção de nitritos por macrófagos PBS, fentolamina, propranolol, fentolamina + propranolol.....	89
Figura 24- Imunodeteção da Óxido Nítrico Sintase Induzível (NOS2).....	91
Figura 25- Imunodeteção da Heat Shock Protein 72 (HSP72)	92
Figura 26- Mecanismos envolvidos na resposta imunológica a uma sessão de exercício físico (natação) por 1 hora	104

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras	9
Introdução	14
2. Referencial Teórico	18
2.1 Exercício como estratégia terapêutica	18
2.2 Exercício Físico, estresse oxidativo e ativação da resposta inflamatória	20
2.3 Participação do óxido nítrico na resposta imunológica	22
2.4 A influência da glutamina na resposta imunológica	24
2.5 Indução de proteínas de choque térmico durante o exercício	26
2.6 Mecanismos da resposta imunológica celular	28
2.7 Resposta Imunológica mediada por citocinas	32
2.8 Influência da resposta do sistema nervoso simpático no sistema imunológico durante o exercício	36
2.9 Relação do Sistema Nervoso Simpático e do Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal com o Sistema Imunológico	40
2.10 Efeitos do Eixo Simpático-CRH periférico-histamina	43
3. Objetivo Geral	48
3.1 Objetivos específicos	48
4. Material e Métodos	50
4.1 Caracterização da pesquisa	50
4.2 Animais	50
4.3 Ortotanásia	50
4.4 Aplicação de Bloqueadores Farmacológicos	51
4.5 Protocolo de adaptação	51
4.6 Protocolo de exercício	52
4.8 Sangue: coleta e preparo	53
4.9 Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG	54
4.10 Xilenol Laranja (Lipoperoxidação em microplacas)	56
4.11 Avaliação funcional de monócitos/macrófagos: fagocitose de zimosan	58
4.12 Estimativa da capacidade produção de NO por monócitos/macrófagos incubados: determinação de nitritos nos meios de incubação.	59
4.13. Imunodeteção de Proteínas de Choque Térmico 72 (HSP72) e Óxido Nítrico Sintase Indutível (NOS2)	61
4.14 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas	63
4.15 Análise estatística	63
5. Resultados	65
5.1 Determinação da dosagem de lactato, glicose sanguíneos	65

5.2 Dosagem de triglicerídeos	72
5.3 Lipoperoxidação	73
5.4 Dosagem de GSSG/GSH	75
5.5 Fagocitose de zimosan	84
5.6 Produção de nitritos por monócitos /macrófagos	87
5.7 Imunodeteção de Óxido Nítrico Sintase induzível (NOS2) em monócitos/ macrófagos	90
5.8 Imunodeteção de Heat shock Protein 72 HSP72 em monócitos/ macrófagos	91
6. Discussão	93
7. Conclusões	108
8. Referências.....	112

Introdução

A relação entre o exercício e o sistema imunológico é multifatorial, incluindo fatores neuroendocrinológicos, como a adrenalina, noradrenalina, hormônio do crescimento, cortisol, e β -endorfina². Em adultos saudáveis, uma única sessão de exercício físico agudo exaustivo ativa o sistema imunológico causando leucocitose, neutrofilia e linfopenia, assim como são registrados o aumento da capacidade fagocitária de neutrófilos e monócitos após exercícios aeróbicos de alta intensidade³. Então, exercício agudo é responsável por provocar uma monocitose transitória que é decorrente da ação das catecolaminas, enquanto o exercício exaustivo, durante a inflamação, diminui o número de macrófagos recrutados para o sítio inflamatório⁴, gerando um efeito imunossupressor.

Por outro lado, exercícios de alta intensidade causam danos teciduais, produção de hormônios do estresse e alterações na quantidade e na qualidade da função de diversas células do sistema imunológico. Algumas patologias, como trauma muscular e sepse apresentam uma resposta hormonal e inflamatória similar à do exercício, como a resposta de fase aguda, mobilização e ativação de leucócitos, liberação de mediadores inflamatórios (citocinas), dano tecidual e infiltração celular, produção de radicais livres, ativação do complemento, coagulação e vias fibrinolíticas⁵.

O exercício físico também está associado com um aumento da produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio pela musculatura esquelética. No entanto, as células musculares possuem mecanismos adaptativos ao estresse oxidativo, como o aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase⁶. Outra resposta, é a indução de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins, HSP*), principalmente HSP70, que são componentes essenciais da resposta citoprotetora ao estresse oxidativo, promovendo o reparo de injúrias teciduais⁷. Assim, durante o exercício físico, ocorre aumento de proteínas de choque térmico, sendo que os estudos mostram uma relação de dependência entre a intensidade de exercício e expressão de HSP⁸.

A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos macrófagos é um processo dependente da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), sendo que a ativação das vias intracelulares do NF- κ B ocorre através de dois eventos : ligantes de receptores de membrana

(como fator de necrose tumoral α e interleucinas) ou o estresse oxidativo, através da alteração do estado redox intracelular que modifica a atividade das I κ B quinases (IKKs), enzimas que fosforilam o inibidor do NF- κ B. Estudos recentes de nosso laboratório sugerem que sessões de exercício agudo moderado em ratos (natação, 1 h com sobrecarga de 5% do peso na cauda) não levam a um quadro de estresse oxidativo sistêmico, que é um dos mecanismos de ativação do NF κ B. Também não se observou desbalanço redox intracelular em monócitos circulantes, embora estas células apresentem grande aumento na atividade da iNOS depois do exercício. Considerando-se que o sistema nervoso simpático é fortemente recrutado durante o exercício, é possível que mediadores liberados pelo simpático periférico, como catecolaminas, ou indiretamente, como o TNF- α ⁹ possam participar da ativação imunológica após o exercício. Como já foi demonstrado por nosso laboratório e outros grupos de pesquisa⁹⁻¹⁰, o exercício físico é indutor da ativação da HSP70 em células imunológicas promovendo uma ação citoprotetora, além do que, as HSP70 bloqueiam a ativação do NF- κ B, que é um fator nuclear envolvido com a transcrição de uma seqüência de genes relacionados ao processo inflamatório. Na verdade, a ativação do NF- κ B, que participa do processo de replicação viral do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), também pode ser considerada como alvo da ação do exercício físico, visto que o exercício é indutor de HSPs.

Apesar de o exercício físico constituir-se em poderoso agente estressante, uma vasta quantidade de evidências suportam a noção de que o exercício, tanto agudo quanto crônico (treinamento físico) pode ser extremamente benéfico para o sistema imunológico de indivíduos que o praticam. Embora assumam-se que o estresse tenda a estimular o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) levando à produção maciça de cortisol, que é sabidamente imunossupressor, esta é uma verdade apenas parcial. O cortisol comporta-se com agente imunossupressor quando cronicamente produzido. Surpreendentemente, no entanto, situações agudas de estresse, em que a produção de cortisol é desprezível quando comparada com estresses crônicos, levam à ativação do eixo Simpático-CRH Periférico-Histamina (SCPH). Na verdade, nesses casos, o CRH (hormônio ou fator liberador da corticotropina) e a histamina produzida periféricamente em resposta ao primeiro agem como agentes imunoestimulantes e pró-inflamatórios.

Por essas razões, o entendimento do papel do Sistema Nervoso Simpático sobre a resposta inflamatória de monócitos/macrófagos durante sessões agudas de exercício pode ajudar na compreensão dos mecanismos benéficos do exercício para o indivíduo, além de servir de base

para que se tenha uma real medida de que carga de exercício pode ser considerada moderada e imunoestimulante.

2. Referencial Teórico

2.1 Exercício como estratégia terapêutica

Doenças crônicas como patologias cardiovasculares e pulmonares, câncer e diabetes são as maiores causas de invalidez e morte na atualidade, fato que promove um impacto tanto econômico quanto social¹¹. As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no Brasil, enquanto o câncer ocupa o segundo lugar. Apesar da tendência a estabilização dos números de óbitos ocasionados por doenças cardiovasculares, esta continua apresentando valores elevados, pois está associada a fatores de risco como obesidade, tabagismo, inatividade física, diabetes e hipertensão¹². No Brasil, podem ser observados que os maiores índices de obesidade tem ocorrência coincidente com as regiões de maior desenvolvimento econômico do país, como São Paulo (41%), Rio de Janeiro (46%) e Porto Alegre (43%) que apresentam esses valores quanto ao percentual de excesso de peso¹³. Assim, a busca de hábitos saudáveis representa uma meta para a sociedade na promoção da qualidade de vida. A prática regular de exercícios físicos tem sido reconhecida como uma alternativa para prevenir ou minimizar os efeitos causados por diversas alterações patológicas¹⁴, pois a inatividade física está associada com cerca de 10 a 16% dos casos de desenvolvimento de diabetes e câncer de mama, e também 22% das doenças isquêmicas do coração¹⁵.

O impacto positivo do exercício no metabolismo protéico e os benefícios cardiorrespiratórios resultantes da atividade física regular, estão associados com a regulação do sistema neuroendócrino, promovendo, assim, um aumento da sobrevida e incrementa da qualidade de vida¹⁶. Dessa forma, o exercício físico pode ser uma importante estratégia terapêutica no tratamento de patologias como doenças cardiovasculares, câncer, doenças auto-imunes e HIV.

A aterosclerose, doença inflamatória crônica, que promove a ocorrência de desfechos como infarto cerebral e do miocárdio¹⁷, apresenta como principais fatores de risco para a formação do quadro dessa doença a obesidade, a hipertensão, a diabetes e a inatividade física¹¹. Pesquisas recentes revelam que a obesidade representa um estado crônico, de inflamação e nutrição excessiva associado com a infiltração do tecido adiposo por células

inflamatórias. Assim, células imunológicas, como macrófagos do tecido adiposo, devem contribuir significativamente para a inflamação na obesidade e também com relação à ocorrência do processo de resistência a insulina¹⁸. Processos de inflamação crônica e casos de desregulação metabólica que estão associados a doenças como diabetes, doenças cardiovasculares e caquexia levam a permanente sinalização de vias que respondem a esse estresse patológico¹⁹.

O desenvolvimento de diabetes *mellitus* pode envolver fatores imunorregulatórios como as citocinas, que parecem estar relacionadas diretamente com a ocorrência das diversas complicações crônicas nesses indivíduos, inclusive quanto a lesões neurológicas e vasculares. As citocinas são um grupo de proteínas que possuem um papel importante ao mediar a resposta imunológica frente a patógenos e a injúria tecidual²⁰. A capacidade de resposta do sistema imunológico de indivíduos com diabetes apresenta-se prejudicada, assim eles se tornam um grupo mais suscetível a ocorrência de infecções²¹. O exercício físico pode surgir como uma alternativa terapêutica em casos de diabetes *mellitus* tipo 1, devido à relação existente entre o exercício e a regulação de fatores imunológicos envolvidos no processo inflamatório. Assim, o exercício físico de intensidade moderada praticado com regularidade pode promover uma resposta capaz de gerar, inclusive, um efeito protetor sobre as células β do pâncreas, através da produção de citocinas antiinflamatórias¹.

Com relação ao câncer, principalmente em casos de câncer de mama, o exercício físico moderado parece proteger contra os efeitos malignos ocasionados pela doença, enquanto o exercício exaustivo aumenta o risco de desenvolvimento de câncer, gerando um agravamento do quadro devido ao decréscimo dos níveis de estrogênio².

Segundo Firman e Wesslén (2000)²² estudos realizados com indivíduos HIV positivos, que realizam de 3 a 4 sessões de exercícios por semana, tiveram um relativo retardo na evolução para AIDS, se comparados com um grupo controle sedentário. O exercício pode ser considerado um importante agente terapêutico para os pacientes com HIV/AIDS²³.

Diante desse quadro de doenças crônicas, o exercício físico é o tipo de estresse fisiológico que promove um expressivo efeito nas células do sistema imunológico²⁴. Observa-se que no exercício moderado (50% do VO_2) não ocorre o decréscimo nos valores de leucócitos, principalmente com relação a uma linfopenia, no período posterior ao exercício físico⁷. Assim, exercícios de intensidade moderada, praticados com regularidade, tem

demonstrado que podem contribuir para a resposta imunológica, enquanto os exercícios de alta intensidade provocam um estado de imunossupressão ⁴.

A proposta da realização de exercício físico agudo de intensidade moderada, apresentando benefícios para a musculatura, na regulação da homeostase da glicose, no metabolismo lipídico e quanto à sensibilidade a insulina¹⁹, pode ser associada também com o incremento na resposta imunológica, gerando uma modulação positiva em numerosas funções dos macrófagos, como a quimiotaxia, fagocitose e produção de mediadores inflamatórios. Assim, prática de exercício moderado tem sido apontada como uma estratégia terapêutica, particularmente em doenças crônicas, que envolvem disfunções imunes ⁹.

2.2 Exercício Físico, estresse oxidativo e ativação da resposta inflamatória

Durante o processo de evolução, os organismos aeróbios desenvolveram uma seqüência de mecanismos de adaptação para manter a homeostase do oxigênio. Pois, este elemento é o substrato da fosforilação oxidativa, processo pelo qual é obtido o ATP (adenosina trifosfato) ²⁵, sendo este um carreador celular de energia química.

O oxigênio atua como acceptor de elétrons em organismos aeróbios que utilizam carboidratos, lipídios e proteínas como alimento. Durante o catabolismo celular pode ocorrer a produção de radicais livres de oxigênio (RLO) como ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH). Os metabólitos gerados a partir do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), possuem uma elevada reatividade com biomoléculas, sendo também designados como espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses EROs possuem uma tendência de extrair elétrons de outras moléculas a fim de estabilizar a sua estrutura, no entanto esse processo causa danos oxidativos a diversos componentes celulares. O exercício físico agudo, em função do incremento do consumo de oxigênio, promove o aumento da formação de radicais livres de oxigênio (RLO), como ânion superóxido e o radical hidroxila ^{26,27}.

Nas células de mamíferos o estado redox é basicamente determinado pela glutathiona (GSH), que tem sua síntese catalisada pelas enzimas γ - glutamylcisteína sintetase (γ -GCS, também conhecida como glutamato-cisteína ligase) e glutathiona sintetase. A GSH através da glutathiona peroxidase (GSPx) é convertida em sua forma oxidada de dissulfeto de glutathiona (GSSG) ²⁵.

Agentes estressantes alteram a homeostase celular, pois induzem o estresse oxidativo, através do aumento do conteúdo intracelular de glutathiona oxidada (GSSG) e a diminuição da glutathiona reduzida (GSH). O exercício aeróbio é genericamente classificado como um estímulo estressante⁴, no entanto, exercícios de média intensidade estão associados com a diminuição de episódios de infecção, fato que promove uma relação positiva entre sistema imunológico e exercício. Um organismo encontra-se em estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes. Assim, a célula possui mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, que permitem a manutenção de seu estado redox. Os processos enzimáticos estão relacionados com as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSPx). A CAT e a GSPx evitam o acúmulo de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio para que não haja formação do radical hidroxila, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa. O sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros^{26,27}.

Eventos como a redução do conteúdo de glutathiona (GSH) intracelular e a desnaturação protéica resultam na síntese de proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat Shock Protein*). Alterações no estado redox intracelular, resultam na ativação HSF1 (HSF, do inglês *Heat Shock Factor*), fator de transcrição das HSP, e responsável pela sinalização à síntese dessas proteínas. Todavia um ambiente celular reduzido promove a inibição dessa resposta. Assim, surge a hipótese de que a desnaturação protéica e a ativação do HSF podem ser resultado de modificações em proteínas gerando uma conformação não nativa causada pela alteração do estado redox²⁸. Após o exercício físico existe ativação do NFκB, que é um fator de transcrição sensível a alterações no estado redox celular^{9,29}.

Por sua vez, o fator nuclear NF-κB (*nuclear factor kappa B*) é considerado um mediador imediato da resposta inflamatória e imune e está envolvido em diversos eventos patológicos³⁰, promovendo a transcrição de diversos fatores da resposta imunológica como a interleucina 2 (IL-2), Fator de necrose tumoral - α (TNF-α) e complexo de histocompatibilidade principal (MHC)²⁹. Embora várias alterações estressantes levem à ativação do NF-κB no exercício físico, os mecanismos exatos ainda permanecem obscuros.

Na maioria das células o NF- κ B existe como um complexo citoplasmático inativo, sendo a forma predominante a de um heterodímero composto por subunidades p50 e p65, ligadas a uma família de proteínas inibitórias I κ B, geralmente I κ B α , que são ativadas como resposta a estímulos patogênicos. A estimulação por fosforilação e degradação da I κ B α resulta na translocação do NF- κ B para o núcleo, onde ele se liga a sítios κ B específicos no DNA, iniciando rapidamente a sinalização de genes que irão codificar uma variedade de proteínas³¹. O NF- κ B está relacionado com a regulação da expressão de aproximadamente 200 genes da resposta imunológica, proliferação celular e mecanismo de inflamação³². Dentre estes genes estão o da NO sintase induzível (iNOS), da ciclooxigenase induzível (COX-2), citocinas quimiotáticas e inflamatórias, receptores de citocinas, moléculas de adesão celular e genes virais^{19,33}. Uma das formas de ativação deste fator nuclear é o estresse oxidativo, característico do exercício de alta intensidade.

O exercício físico potencializa também a ativação das vias das proteínas quinase ativadas por mitógenos ou MAP quinases (pelo inglês, MAPK: *mitogen- activated protein kinase*) e do NF κ B no músculo esquelético. As MAPKs são proteínas quinases serina/treonina que são responsáveis pela transdução de sinais originados no meio extracelular, que via receptores de membrana, podem regular a resposta celular³⁴. A MAPK é uma família de proteínas que está relacionada com o crescimento e a diferenciação celular, sendo composta pela ERK 1 e 2, p38 MAPK, c-Jun NH2- terminal quinases (JNK) e pela ERK5^{19,35}. As ERKs são ativadas por mitógenos enquanto a JNK e a p38 são induzidas a partir de agentes estressores ou por citocinas pró-inflamatórias.

A p38 é uma MAPK ativada por lipopolissacarídeos (LPS) em monócitos, responsável por regular a síntese de citocinas como TNF- α e IL-1 β , mas também está relacionada com outras respostas celulares como a produção de IL-10, de prostaglandinas (PGs) e de IL-6. Assim, estímulos como TNF- α e IL-1 β , ativam a p38 MAPK em monócitos, sinalizando através da expressão de receptores membrana CD14 e a ativação de uma série de mediadores, como tirosina quinases, proteína quinase C, MAPK, p38, p42/44 (ERK) p54 (JNK)^{34, 36,37}.

2.3 Participação do óxido nítrico na resposta imunológica

Um importante marcador da função imune dos macrófagos é a produção de óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre gasoso, pequeno e relativamente estável, que prontamente se difunde nas células, onde reage com alvos moleculares, sendo produzido em grandes quantidades durante a contração do músculo esquelético. O NO é um mediador de diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo neurotransmissão e a inflamação, sendo produzido por pelo menos três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a conversão de L- arginina em NO e L-citrulina. Os macrófagos quando são ativados expressam a forma induzida da NOS (iNOS). Existem dois importantes sítios de ligação que se localizam na região promotora do gene da iNOS, regulando, assim, sua transcrição: o sítio de ligação do NFκB e um sítio de ligação IRF-1 (*interferon regulatory factor*). Os LPS ativam o NFκB, enquanto o IFN-γ induz o sítio IRF-1^{34, 35, 38}.

A enzima NOS existe em três isoformas conhecidas, neuronal (nNOS ou NOS-1), indutível (iNOS, ou NOS-2) e endotelial (eNOS, ou NOS-3) e em muitos tecidos ocorre a expressão de uma ou mais dessas isoformas. A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente, mas sua atividade é regulada pela concentração intracelular de cálcio³⁹. A expressão da iNOS é dependente da ativação do NF-κB e é estimulada pela combinação de IFN- γ, TNF - α, IL - 1β, enquanto a IL- 6 e IL - 8 teriam um efeito mais inibitório⁴⁰. Conseqüentemente, a isoforma iNOS tem sua expressão induzida nos macrófagos após a estimulação por citocinas, LPS e outros agentes imunológicos relevantes e tem seus níveis de transcrição regulados por vias de sinalização que envolvem agentes relacionados com a resposta do NFκB ao estado redox⁴¹.

Em macrófagos estimulados com LPS existe produção de óxido nítrico. Ao realizar um tratamento com quercetina, antioxidante flavanóide, esta função é inibida através da regulação da iNOS, pois existe uma inibição da indução do NO pelo IFN- γ. Assim como, a quercetina suprime a liberação do NFκB impedindo a degradação da IκB α e IκB β⁴². Da mesma maneira, o arsenito de sódio (SA) inibe a expressão da iNOS e causa redução da produção de NO em culturas de macrófagos estimuladas por LPS, promovendo a inibição do NFκB⁴³.

A síntese de NO pela iNOS pode ser bloqueada pela enzima arginase, pois ambas competem pelo substrato L-arginina, que é requisitado para produção de NO. Os macrófagos, do tipo M2 que tem ação antiinflamatória, participam do bloqueio à resposta inflamatória e

promovem reparo tecidual. A polarização de M2 ocorre inclusive na ausência de IL-4 e IL-13, citocinas antiinflamatórias, sugerindo que podem existir outros fatores contribuem para o estímulo desse tipo celular, a produzir uma resposta antiinflamatória^{18,44}. Podemos relacionar que, animais controle quando comparados com obesos apresentam um aumento dos níveis de arginase em macrófagos do tecido adiposo. Fato que proporciona uma diminuição da produção de NO pela inibição da iNOS, permitindo a manutenção da função dos adipócitos e o reparo tecidual. Esse controle também apresenta diferenças quanto a expressão de IL-10, que é uma citocina importante para regular a homeostase da sensibilidade celular a insulina¹⁸.

2.4 A influência da glutamina na resposta imunológica

A glutamina compõe cerca de 20% do total de aminoácidos plasmáticos, sendo considerado o aminoácido mais abundante no meio extracelular. Assim, quando o indivíduo encontra-se sob condições patológicas, a glutamina pode ser produzida por diferentes órgãos, como fígado, rins, pulmões e músculo esquelético^{16,45,46}. A glutamina é considerada um aminoácido “condicionalmente essencial” pois apresenta um papel importante em processos inflamatórios⁴⁷⁻⁴⁹, sendo também precursora de neurotransmissores e moléculas essenciais, mostrando-se indispensável para a proliferação celular, função imunológica e balanço ácido-base. A glutamina parece estar envolvida no processo de regulação da expressão gênica e da ativação da MAP quinase, via responsável pelo crescimento e diferenciação celular. Para manutenção da homeostase, portanto, é fundamental que os níveis de glutamina sejam mantidos constantes⁴⁷.

O músculo esquelético é o maior produtor de glutamina, por isso nesse tecido, em células do fígado e astrócitos, ocorre uma combinação entre o glutamato e a glutamina, que através da glutamina sintetase, produzem glutamina e essa pode ser exportada pra outros tipos celulares pela corrente sanguínea^{16,50,51}. Nos rins, a glutamina fornece amônia (NH₃), assim quando esse aminoácido é convertido a glutamato, pela glutaminase fosfato-dependente, libera NH₃ que ao se combinar ao H⁺, proveniente da dissociação do ácido carbônico, produz amônio (NH₄) que será excretado do organismo⁴⁸. De acordo com esse mecanismo existe a eliminação de substâncias tóxicas, como a NH₃, e a manutenção do tamponamento com a utilização do H⁺, permitindo um equilíbrio ácido-base sanguíneo adequado, mantendo o pH. No fígado, a glutamina é substrato para a produção de glicose, através da gliconeogênese. No

entanto, esse aminoácido é essencial para o ciclo da uréia, através da liberação de NH_3 e conseqüente formação de ornitina. A ornitina será convertida a citrulina pela carbamoil fosfato, seguido da formação de arginina, que será substrato para a produção de uréia e ornitina através da ação da arginase ¹⁶.

A demanda de glutamina durante processos como exercício intenso e exaustivo, ou em situações patológicas como após cirurgias, traumas, sepse, acaba forçando um débito de glutamina, fato que irá afetar temporariamente as funções do sistema imunológico. Assim, existe a “Hipótese da glutamina” em que o exercício físico intenso provoca um aumento da utilização de glutamina pelos músculos e pelos demais órgãos, gerando um déficit de glutamina no sistema imunológico, afetando seriamente as funções das células imunes ¹⁶⁻⁵⁰.

A glutamina parece estar envolvida em diversos parâmetros funcionais das células imunológicas, como na proliferação de linfócitos T, diferenciação de linfócitos B, fagocitose de macrófagos, apresentação de antígenos, produção de citocinas, e produção de superóxido pelos neutrófilos. Essas células imunológicas apresentam uma intensa atividade da glutaminase, enzima que converte glutamina em glutamato, sendo este essencial para a produção de ornitina. Essa pode dar origem a duas vias dependendo das necessidades celulares, primeiro sendo convertida em uréia pela enzima arginase ou então, a produção de óxido nítrico (NO) através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A produção de NO é fundamental para a realização de funções de defesa do organismo por leucócitos. Durante o processo inflamatório, os macrófagos utilizam nitrogênio proveniente da glutamina e da arginina intracelular para a produção de óxido nítrico. No entanto, os macrófagos secretam a enzima arginase, e assim depletam o suprimento extracelular de arginina. Esse fato diminui a concentração extracelular da arginina impedindo que ela seja utilizada como substrato pelo macrófago para a produção de NO. Dessa forma então, a glutamina surge como substrato para produção de arginina intracelular e conseqüente conversão em NO ^{47,48}.

O glutamato também tem uma relação importante com a manutenção do estado redox, pois serve como precursor na síntese de GSH, promovendo o aumento das defesas antioxidantes nas células imunológicas ^{46,48}. O GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, que desempenha funções celulares relacionadas com o balanço de oxidação e redução intracelular, protegendo as células dos danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio ⁵². Assim, glutamina é substrato para a síntese de glutathione, atuando no

balanço redox celular e na preservação da integridade celular através da geração de proteínas de choque térmico ⁵³ .

2.5 Indução de proteínas de choque térmico durante o exercício

O estresse oxidativo aumenta os níveis intracelulares de proteínas não nativas o que exige um aumento da atividade de chaperonas para a manutenção da homeostase celular. Chaperonas moleculares são proteínas que ajudam na formação correta das proteínas, sendo responsáveis pela síntese, dobramento e degradação protéica ⁵⁴ .

Ritosa e colaboradores (1962) descobriram que células das glândulas salivares de *Drosophila busckii* quando expostas ao calor induziam a ativação de um gene específico. Essas células submetidas ao estresse produziam, em grande quantidade, uma determinada classe de proteínas⁵⁵ , que em 1974 foram identificadas como *Heat Shock Protein* (HSP) ⁵⁶ .

As HSP são proteínas de choque térmico que atuam principalmente como chaperonas moleculares, sendo responsáveis pela prevenção da desnaturação e desagregação protéica ⁵⁴ . Nas células eucarióticas, tanto a família HSP60 quanto a HSP70 possuem afinidade pelas regiões hidrofóbicas expostas por proteínas com um dobramento incorreto. As proteínas de choque térmico se ligam às proteínas com conformação não nativas, modificando a estrutura protéica e dando a oportunidade de um novo dobramento. Por ter essa função na estabilização protéica, as HSP participam de uma variedade de processos fisiológicos celulares como controle do ciclo celular, regulação do estado redox celular e apresentação de antígenos ⁵⁷ .

As Heat Shock Protein são uma classe de proteínas altamente conservadas filogeneticamente ⁵⁸ , podendo ser agrupadas em famílias de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares, em quilodaltons (kDa) ⁵⁵ .

Nas células, a família das HSP70 apresentam duas formas: HSC70 (*Heat Shock Cognate*) e HSP70 induzível. A HSC (73KDa) é expressa constitutivamente, ou seja, independe das condições de estresse, portanto, também ocorre nas células no repouso ⁵⁵ . Enquanto que a HSP70 (72KDa) é induzida, em grandes quantidades, por diversos agentes como aumento de temperatura, estresse oxidativo, depleção de energia celular, concentrações iônicas extremas, gases e presença de substâncias tóxicas ⁵⁹ .

As situações estressantes causam dobramento incorreto e/ou agregação de proteínas, fazendo com que ocorra uma resposta através da indução de um fator de transcrição para proteínas de choque térmico, o fator de choque térmico ou HSF, para restabelecer o balanço entre síntese, arranjo e desagregação protéica. Quatro HSFs foram identificados nos vertebrados, dos quais HSF1 e HSF2 são mais expressos e conservados. Nos vertebrados, o principal HSF envolvido na resposta fisiológica e ambiental ao estresse é HSF1⁶⁰. Em estado de repouso, esse fator de transcrição está presente no citoplasma na forma latente de molécula monomérica que não ligante ao DNA. Em condições de estresse, o HSF é hiperfosforilado convertendo-se a um estado trimérico que é ativo, ou seja capaz de se ligar ao DNA. A regulação da transcrição do gene da HSP é mediada pela interação do HSF com HSE (*Heat Shock Element*) nas regiões promotoras do gene de proteínas de choque térmico⁵⁴.

A resposta ao estresse é somente transiente, pois o prolongamento e inapropriada presença de moléculas protéicas ligantes poderiam influenciar adversamente na homeostase protéica e numa variedade de funções intracelulares. Um mecanismo pelo qual a atividade da HSF1 é regulada negativamente, é pela ligação da HSP70 ao fator de transcrição, o que resulta na repressão do gene de transcrição das proteínas de choque térmico. Pois, com o aumento da síntese de HSP, estas se deslocam para o núcleo, ligando-se ao domínio ativador de transcrição dos HSF1 e reprimindo o processo de transcrição de genes HSP⁶¹. Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- α podem induzir a ativação do HSF-1, assim como as prostaglandinas ciclopentenônicas do tipo A e do tipo J, metabólitos da ciclooxigenase-2 (COX2) que contribuem para a resolução do processo inflamatório, também promovem a síntese de HSP70⁶².

As proteínas de choque térmico podem ser um importante regulador na produção de citocinas, pois a HSP70 promove um decréscimo nos níveis de TNF- α ⁶³. Esse fato deve estar diretamente relacionado com a função inibitória que a HSP70 exerce sobre o NF κ B, fator que induz a resposta inflamatória, inclusive do TNF- α . O estresse fisiológico gerado pelo exercício físico promove uma elevação da temperatura corpórea que resulta na síntese de proteínas de choque térmico, que é um marcador de estresse celular. Assim, quando o organismo é submetido a situações estressantes as HSP são utilizadas no processo de reparo de diferentes tipos de injúria^{30,55}.

2.6 Mecanismos da resposta imunológica celular

O exercício físico gera diversos efeitos benéficos à saúde dos indivíduos, pois aprimora a capacidade cardiorrespiratória, antropométrica e muscular, além contribuir para a melhoria do estado psicológico ²³. Pode ser mencionado que a prática de exercícios também influencia a resposta imunológica mediada por células como linfócitos (T,B e NK), monócitos e neutrófilos. Foi demonstrado que indivíduos após a realização de trinta minutos de exercício moderado, apresentam um aumento dos níveis de glóbulos brancos, juntamente com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias ⁶⁴.

As células do sistema imunológico são distribuídas regularmente pelo corpo, ou seja de forma homogênea, mas em casos de infecção, existe a necessidade da mobilização dessas células para um sítio da infecção. Esse processo é denominado inflamação e inclui o aumento do fluxo sanguíneo para a área infectada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, promovendo a diapedese dos leucócitos e a exsudação do plasma com mediadores imunológicos solúveis. A migração dos leucócitos se dá por um processo de atração química denominado quimiotaxia, executado por citocinas. As células que participam da reação inflamatória são monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e linfócitos, sendo que todos são atraídos do sangue para o sítio inflamatório. Assim como, células locais como células endoteliais, mastócitos, fibroblastos, macrófagos residentes, também assessoram na resposta imune ^{2,65,66}.

A atividade imunológica envolve dois tipos diferentes de resposta, a inata (não específica), a qual faz o reconhecimento do patógeno, e a adaptativa (específica), que promove uma reação contra o mesmo. A resposta imune inata envolve as células apresentadoras de antígenos (APC), como monócitos/ macrófagos e células dendríticas, assim como fagócitos celulares. A resposta imune adquirida é representada por linfócitos T auxiliares ou também denominados “*helper*”, que são células classificadas em TH1 e TH2 que secretam citocinas durante o processo de defesa do organismo ⁶⁷⁻⁷⁰.

A resposta inata consiste na primeira linha de defesa de reconhecimento do patógeno por células fagocíticas, como monócitos/macrófagos e neutrófilos, que irão internalizar os microrganismos e através de enzimas líticas, conseguem eliminar o patógeno. A produção de

citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da infecção permite o maior influxo das células imunológicas, responsáveis pela defesa do organismo, para o sítio inflamatório ⁷¹.

Células da resposta imune inata são responsáveis por influenciar a diferenciação de precursores de linfócitos T em TH1 ou TH2. A IL-12 produzida por monócitos ou outras células apresentadoras de antígenos (APC) é o maior indutor da diferenciação em TH1, e conseqüentemente da imunidade celular. Essa citocina age conjuntamente com o interferon- γ (INF- γ) produzido pelas células natural killer (NK), promovendo um aumento da resposta TH1. As citocinas IL-12, TNF- α e INF- γ estimulam a síntese de óxido nítrico (NO) e outros mediadores inflamatórios que promovem uma resposta inflamatória crônica ^{72, 69}.

Os linfócitos são células participantes da resposta imunológica que possuem distribuição homogênea com relação aos tecidos e a circulação sanguínea. Essas células podem ser subdivididas de acordo com seus marcadores de superfície, reações a estímulos externos, migração e tempo de vida ⁴⁷. Os Linfócitos T e B são os componentes centrais da resposta imune adaptativa, pois promovem um reconhecimento específico do patógeno. As células B combatem patógenos extracelulares e seus produtos, com anticorpos, que são específicos para os antígenos determinados. Um grupo de linfócitos T exerce um efeito regulatório sobre as células B, estimulando sua divisão, diferenciação e produção de anticorpos ^{65,73}. Os linfócitos T podem ser diferenciados em células auxiliares, caracterizadas por marcadores de superfície celular CD4, sendo capazes de produzir citocinas e estimular outras células do sistema imunológico como linfócitos B e monócitos/macrófagos. Assim como, as células T também podem apresentar a molécula CD8, caracterizando um tipo de linfócito denominado citotóxico, pois este é capaz de eliminar células infectadas por patógenos intracelulares quando estas apresentam-lhe o complexo de histocompatibilidade principal I (MHC I) ^{2,60}.

As células NK são pertencentes à linhagem linfocítica, tendo a função de reconhecer células infectadas por vírus ou que tenham alguma variedade de tumor. As NK destroem as células infectadas utilizando um sistema de reconhecimento não específico e assim como os monócitos/macrófagos, as células NK identificam e destroem células que estão envoltas por anticorpos (imunoglobulinas) ^{66,69,70}. Pode ser observado que, após o exercício físico, ocorre um aumento de linfócitos TCD4 e TCD8 circulantes, provavelmente devido a uma maior redistribuição dessas células na circulação, contudo a resposta mais intensa ao exercício é

verificada em células NK, pois estas são recrutadas durante o exercício, independentemente do tipo, intensidade ou duração do mesmo ².

Outro tipo celular que tem papel fundamental na resposta imunológica são os monócitos, estes quando passam do sangue para os tecidos, diferencia-se em macrófagos, que são responsáveis por secretar citocinas, fagocitar patógenos ao organismo e células residentes em estado de apoptose. Os monócitos também possuem a capacidade de apresentar aos linfócitos, partículas de patógenos associados ao Complexo de Histocompatibilidade Principal II (MHC classe II) ^{48,74}.

Uma vez recrutados para os tecidos, monócitos diferenciam-se em macrófagos, células que apresentam uma grande heterogeneidade de funções, assim como fatores ambientais modulam suas propriedades e estados de ativação. Estímulos variados ativam os monócitos/macrófagos a expressar diferentes citocinas, receptores de membrana, e enzimas metabólicas, fato que permite a função do macrófago tanto de liberar substâncias pró-inflamatórias como de substâncias antiinflamatórias ¹⁸. O processo de fagocitose, realizado por neutrófilos e monócitos/macrófagos, é a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos, fazendo parte assim, da resposta inata. Neutrófilos constituem 60% dos leucócitos circulantes, sendo que essas células têm a função de promover a fagocitose de patógenos externos, no entanto essas células não são capazes de realizar a apresentação de antígenos, assim como os monócitos/macrófagos ^{2,48}. Durante o exercício físico ocorre uma leucocitose, ou seja, existe uma intensa neutrofilia e linfocitose, mas esse aumento no número de células pode ser transiente, sendo o resultado da mobilização destes tipos celulares do pool marginal para sítios inflamatórios. Esse fato pode ser observado quando após uma corrida de 5 km praticada por atletas, ocorre uma leucocitose, mas a alteração desaparece num período de 24 horas ^{2,75}.

Para a realização da fagocitose ocorre uma série de diferentes processos celulares, incluindo motilidade (com emissão de pseudópodos), aumento da respiração celular, secreção de enzimas citoplasmáticas e de componentes imunomodulatórios, como citocinas. O aumento da respiração celular é caracterizado pela ativação da enzima NADPH oxidase, enzima que está envolvida com o estímulo ao metabolismo mitocondrial não-oxidativo, composta por seis hetero-subunidades que formam um complexo enzimático ativo, resultando assim, na produção do ânion superóxido e de espécies reativas de oxigênio relacionadas. A

combinação desses processos promove a eliminação e digestão de bactérias e o desenvolvimento de um processo inflamatório^{47,76}.

Durante o exercício intenso ocorre aumento da função fagocítica dos neutrófilos como resultado da modulação por hormônios do estresse, como a adrenalina e a noradrenalina. Apenas uma sessão de exercício (único turno), é capaz de estimular a atividade fagocítica de neutrófilos⁷⁷. De forma similar, estudos realizados em nosso laboratório também demonstraram que o exercício moderado agudo pode aumentar a atividade de monócitos/macrófagos tanto através da fagocitose quanto pela capacidade de produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Figura 1)⁹.

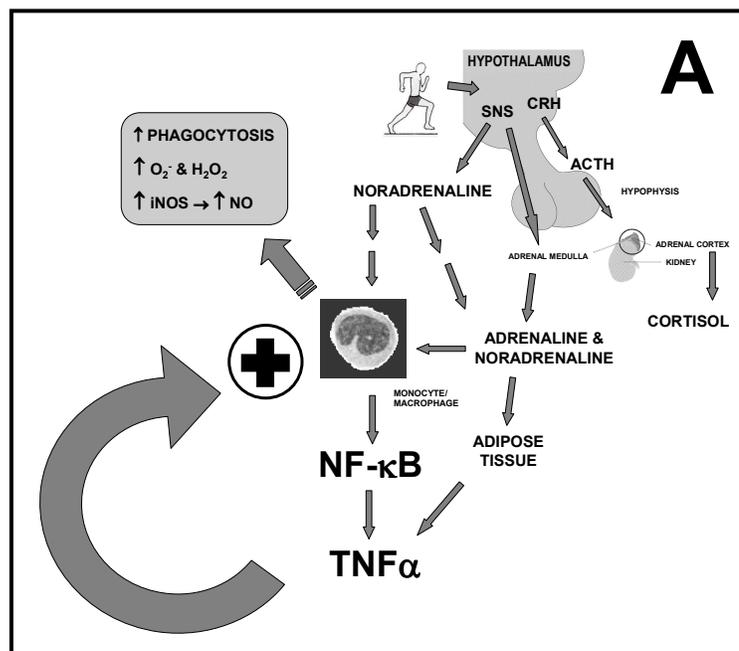


Figura 1: Via hipotética de ativação da função imunológicas do macrófago em resposta ao exercício físico. Após uma sessão aguda de exercício de intensidade moderada, ocorre ativação do sistema nervoso simpático, que estimula monócitos/macrófagos via receptores β - adrenérgicos, a promover a ativação do NF κ B. Esse processo ocorre pela cascata da Ras/ERK com concomitante atividade de NADPH oxidase e geração de espécies reativas de oxigênio. O NF κ B induz a produção e liberação de mediadores inflamatórios, assim como o TNF- α ⁹.

2.7 Resposta Imunológica mediada por citocinas

O exercício físico induz uma resposta imune inflamatória mediada por citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6⁷⁸. Essa cascata de citocinas pró e antiinflamatórias promove alterações no número de células imunológicas circulantes e as mobilizam para a realização de suas funções em determinados sítios afetados.

As citocinas tipo 1, como a IL-12, TNF- α , INF- γ são consideradas as maiores citocinas pró-inflamatórias, pois estimulam a síntese de óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios, desencadeando uma resposta crônica. Citocinas tipo 2 como IL-4 e IL-10 inibem a resposta TH1, contudo são capazes de estimular linfócitos TH2 a promover a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, que são células ativadas secretoras de anticorpos. Assim, além de promover a imunidade humoral, as citocinas tipo 2 estimulam o crescimento e a ativação de mastócitos, eosinófilos. A IL-4 e IL-10, portanto, são consideradas as maiores citocinas antiinflamatórias, pois inibem a ativação de macrófagos, a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas inflamatórias^{1,79}.

A interleucina 1 (IL-1) apresenta diferentes seqüências de aminoácidos com relação a suas duas isoformas, IL-1 α e IL-1 β , sendo que ambas interagem com um receptor para IL-1 tipo I. Contudo, as duas isoformas da IL-1 apresentam diferentes graus de afinidade⁸⁰. Essa citocina possui um inibidor biológico a IL-1ra, um antagonista do receptor da IL-1, que aumenta durante a realização de exercício físico, apresentando uma característica pró-inflamatória⁷¹.

Da mesma forma, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina que se origina de células hematopoéticas como linfócitos, monócitos e mastócitos³⁵. Assim, essa citocina é sintetizada por populações de monócitos/macrófagos estimulados por uma rede de comunicações celulares, fazendo com que o TNF- α esteja envolvido tanto na manutenção da homeostase quanto na resposta imune inflamatória, pois isso a atividade dessa citocina parece depender de sua concentração ser local ou sistêmica⁸¹. O TNF- α é uma citocina identificada inicialmente como uma proteína tumoricida, contudo ela também está envolvida no controle do crescimento, diferenciação e metabolismo de células e tecido normais. O TNF- α é responsável por depletar o estoque de triglicerídeos e promover a lipólise⁸² Essa citocina diminui a síntese e a atividade de muitas proteínas essenciais para a lipogênese e acúmulo de

triacilgliceróis pelos adipócitos, incluindo enzimas como a lipase lipoprotéica, acetil-coenzima A carboxilase, acil-coenzima A sintetase, esteatoril coenzima A dessaturase e transportador de glicose sensível à insulina⁸². O TNF- α é um agente de fase aguda da inflamação que também contribui para o mecanismo de resistência a insulina por inibir a atividade do receptor de tirosina kinase e por produzir uma diminuição da regulação de genes do transportador de glicose²¹.

A IL-6 caracteriza-se por ser uma citocina pleiotrópica, ou seja, apresenta-se tanto com propriedades inflamatórias quanto antiinflamatórias^{64,83}. Essa citocina é demonstrada como componente pró-inflamatório quando se apresenta envolvida no desenvolvimento de doenças vasculares. O estresse mecânico pode iniciar uma cascata de sinalização levando as células endoteliais a um ciclo de estresse, no entanto a resposta inflamatória induzida por essa citocina é pouco conhecida. O endotélio quando tratado com inibidores do NF κ B, como pirrolidineditiocarbamato e SN50 (peptídeo que age interrompendo a translocação do NF κ B para o núcleo), além de inibir a atividade do NF κ B, resulta numa inibição da IL-6 em 50%. Outros achados demonstraram que a expressão de IL-6 induzida pelo estresse mecânico envolve vias como a Ras/Rac/p38 MARK/ NF κ B / NF-IL6, sendo essas vias negativamente reguladas pela Proteína C quinase (PKC), sugerindo que a modulação deste evento contribui para a patogênese da aterosclerose, sendo essa uma doença inflamatória⁸⁴.

No entanto, a IL-6 apresenta-se como reguladora do TNF- α através da liberação de receptores TNF- α , assim como estimula a produção de IL-1ra e IL-10, gerando efeitos antiinflamatórios. Durante o exercício, a IL-6 pode ser liberada não somente por monócitos, mas também pelo tecido adiposo e cérebro^{11,85,86}. A IL-6 quando produzida pelos músculos pode gerar um efeito benéfico ao inibir o TNF- α , pois essa citocina pró-inflamatória contribui para o processo de resistência a insulina¹¹. Assim, a IL-6 seria uma citocina que responde ao processo inflamatório, contudo ela parece não induzir a inflamação⁷¹.

No músculo esquelético a expressão gênica de IL-6 aparece regulada pela IL-1 β durante o exercício, sendo que este efeito é mediado pelas vias da MAPK e do NF κ B. Foi observado por Liu e colaboradores (2003)⁸⁷ que o promotor do gene da IL-6 é regulado por fatores de transcrição, como o NF κ B, pois uma mutação no sítio de ligação do NF κ B no DNA comprovou-se capaz de inibir a expressão de IL-6 em miócitos estimulados por IL-1 β .

A estimulação de uma resposta antiinflamatória que promova a inibição da secreção de mediadores inflamatórios por monócitos/macrófagos, pode ocorrer através da IL-10. Assim, essa citocina é responsável por diminuir a estimulação de células T, inibir TNF- α pelo aumento da expressão do receptor TNF solúvel (sTNFR) e estimular a produção de IL-1R, o antagonista da IL-1. O estímulo a produção de IL-10 por monócitos/macrófagos ocorre em resposta ao aumento dos níveis de TNF- α , como por exemplo acontece quando há uma indução por LPS ³⁶. Em experimentos realizados com linfócitos peritoneais de camundongos ⁸⁸, foi observado um aumento dos níveis de TNF- α após uma sessão aguda de exercício, seguido de um aumento de IL-10, isso sugere uma resposta com a finalidade de compensar o desequilíbrio gerado entre fatores pró-inflamatórios e antiinflamatórios.

Citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e o TNF- α promovem uma resposta de linfócitos T *helper* 1 (TH1), ou seja a imunidade celular, através da secreção de citocinas como INF- γ , IL-2, o próprio TNF- α . No entanto a IL-10 suprime a atividade de TH1 e estimula T *helper* 2 (TH2), que por sua vez, promove uma resposta humoral via secreção de IL-4, IL-10 e IL-13. Mediadores neuroendócrinos poderiam estar envolvidos no balanço IL-12 e TNF- α /IL-10, fato que conseqüentemente afetaria TH1 e TH2. Os glicocorticóides agem nas células apresentadoras de antígenos, como os monócitos/macrófagos, suprimindo a resposta a IL-12. Essa citocina, que é extremamente potente por aumentar o INF- γ e inibir IL-4, afeta o balanço entre TH1/TH2. No entanto, a presença de glicocorticóides parece não interferir na produção da citocina antiinflamatória IL-10 por monócitos. Os glicocorticóides e as catecolaminas medeiam a ação de TH2 por suprimir tanto células apresentadoras de antígenos quanto TH1, e por aumentar a produção de citocinas antiinflamatórias por linfócitos TH2 ⁸⁹.

Contudo, ainda não está claro de que forma hormônios de estresse, como catecolaminas e glicocorticóides, influenciam nesse balanço pró e antiinflamatório da produção de citocinas por monócitos/macrófagos. Assim como, são relatadas divergências de resultados em amostras *in vivo* e *in vitro*, quanto à produção de citocinas por esse celular. Starkie *et al* (2000) ⁹⁰ observou que após o exercício físico, os indivíduos estudados apresentavam uma diminuição dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α produzidos por monócitos. Enquanto Rhind *et al.* (2001) ⁹¹ encontrou resultados contrários quanto a produção dessas citocinas, demonstrando um aumento nos níveis, fato que o estudo considera estar relacionado

com a ativação do sistema nervoso simpático pelo exercício. Dessa forma, ainda não são conhecidos quais os mecanismos que induzem as diferentes respostas imunológicas quanto à produção de citocinas por monócitos.

Essa relação entre mecanismos pró e antiinflamatórios são importantes pelo fato de algumas doenças auto-imunes se caracterizarem por apresentar alterações no balanço de TH1/TH2, sendo um reflexo da regulação de citocinas. Na artrite reumatóide, esclerose múltipla, diabetes tipo I e doença auto-imune da tireóide, o balanço pende para o lado da produção de TH1 e excesso de IL-12 e TNF- α , enquanto a atividade de TH2 e a produção de IL-10 é deficiente. Esses achados são fatores críticos determinantes para resposta auto-reativa dessas doenças, com a proliferação e diferenciação de TH1 ^{65,73,92}.

Macrófagos M1, ou macrófagos ativados são induzidos por mediadores pró-inflamatórios como LPS e INF- γ , assim estão relacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12), apresentação de antígenos e geram espécies reativas de oxigênio e também a via de ativação do óxido nítrico pela INOS. O M2 é considerado um macrófago alternativamente ativado, pois quando exposto a IL-4 e IL-13, é capaz de gerar altos níveis de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e IL-1 Ra. Nesses macrófagos de fenótipo M2 há uma produção aumentada de arginase. Enquanto que em macrófagos M1 o metabolismo da arginina está direcionado para a síntese de óxido nítrico devido aos níveis elevados da iNOS, em macrófagos M2 predomina a via da arginase, gerando ornitina e poliaminas ^{44,93}.

Na obesidade existe um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e essa informação é consistente com a hipótese de que balanço entre fatores pró e antiinflamatórios governam a função dos adipócitos. Sendo que a IL-10, que se apresenta diminuída em obesos, não poderá promover uma ação protetora contra a resistência à insulina induzida pelo TNF- α ¹⁸.

Assim, a compreensão dos mecanismos de ativação da resposta inflamatória de monócitos/macrófagos pode trazer importantes informações sobre o exato grau de intensidade de exercício necessário para a correta ativação do sistema imunológico em diferentes situações.

2.8 Influência da resposta do sistema nervoso simpático no sistema imunológico durante o exercício

Atividade física é qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos e que resulta em dispêndio de energia, podendo incluir tanto a atividade física ocupacional como aquela desenvolvida nas horas de lazer. O exercício físico, por outro lado, é considerado uma subclasse da atividade física, sendo definido como o movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo, executado com a finalidade de melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física ⁹⁴.

Diversos estudos sugerem que o exercício se constitui em um estresse capaz de debilitar o sistema imunológico, enquanto outros sugerem que ele contribui para a resposta imune ⁹⁵. O estresse agudo induzido pela natação (15 minutos de natação em tanques a 22°C) pode suprimir tanto a resposta inata quanto a resposta adaptativa em roedores, gerando um aumento de IL-10 e reduzindo IL-1 e TNF- α . Esse quadro característico de imunossupressão seria resultado da ativação do sistema nervoso simpático e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, com a consequente produção de catecolaminas e glicocorticóides ⁹⁶. No entanto, foi observado que ratos submetidos à natação, considerando um exercício agudo moderado e com temperatura adequada (uma hora em tanques à 30°C) ^{10,97} existe melhora da função imunológica ⁹.

A natação foi usada como modelo de exercício por Coppes et al. (1994) ⁹⁸, para estudar a resposta adrenérgica ao exercício físico, pois este tipo de exercício promove a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Da mesma forma, esse efeito, de aumento dos níveis de catecolaminas, também pode ser observado quando adrenorreceptores inibitórios (receptores α_2 adrenérgicos) estão bloqueados.

Depois de uma sessão aguda de exercícios moderados, a ativação do sistema nervoso simpático, poderia, via estimulação β - adrenérgica, levar a estimulação de monócitos/macrófagos e posterior ativação do fator nuclear κ B. O NF κ B induz a produção e liberação de mediadores pró- inflamatórios, incluindo o TNF- α que pode promover uma estimulação autócrina em monócitos/macrófagos ⁹.

Em um exercício extenuante, como durante uma corrida de aproximadamente quatro horas ⁷¹, observa-se um aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , assim

como da IL-6, uma citocina que responde a inflamação. Para balancear esse processo pró-inflamatório ocorre a liberação de inibidores de citocinas (IL-1ra, sTNF-r1 e TNF-r2) e também da citocina antiinflamatória IL-10. Assim, observa-se que em sessões de exercícios prolongados ou após exercício extenuante, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal libera na circulação o cortisol que é responsável por um potente efeito inibitório ao NFκB. Da mesma forma que a musculatura esquelética em resposta ao exercício extenuante libera IL-6, que juntamente com a produção de IL-10, também irá bloquear a ativação do NFκB. Esse efeito irá diminuir a ativação TNF- α e por consequência a estimulação autócrina do monócito/macrófago (Figura 2) ^{9,64,71,75}.

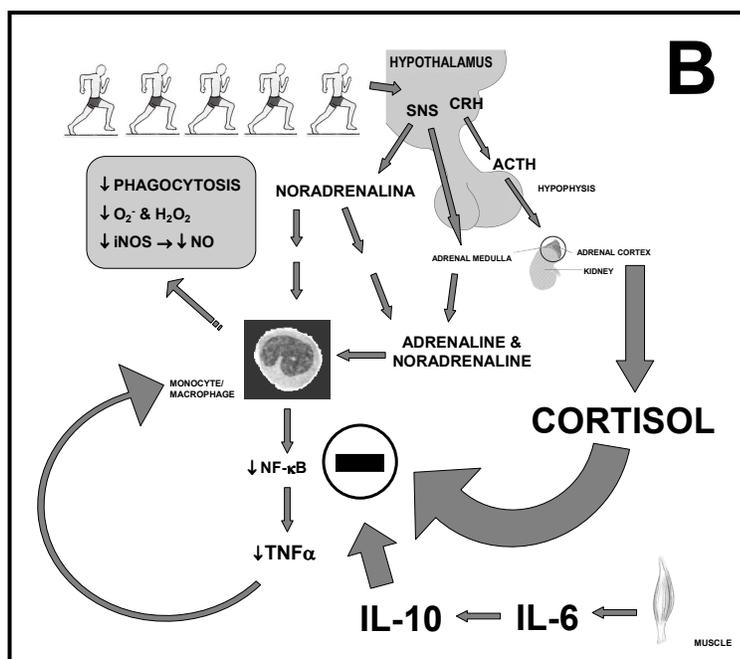


Figura 2: No caso de exercícios extenuantes, o cortisol (potente inibidor do NFκB) é liberado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Assim, o cortisol associado ao estímulo gerado pela IL-6 e IL-10 (citocinas antiinflamatórias) fazem com que a ativação do NFκB seja bloqueada ⁹.

As catecolaminas podem regular, através de receptores $\beta 2$ e $\beta 3$, a produção de interleucina-6 em adipócitos humanos. A IL-6 é o maior indutor da produção de PCR (proteína C reativa) pelo fígado, sendo que essa atividade é influenciada por glicocorticóides e

catecolaminas, que aumentam essa indução em maior ou menor extensão ⁷⁹. Dessa forma a IL-6 é o maior mediador da resposta de fase aguda e tem muitas ações diabetogênicas incluindo a estimulação de hormônio corticotrópico (ACTH) ²¹.

Observando esses diferentes estudos podemos verificar que a intensidade do exercício parece ter um papel relevante no tipo de resposta do sistema imunológico. Exercícios de intensidade moderada, praticados com regularidade, aprimoram a resposta imunológica, enquanto os exercícios de alta intensidade provocam um estado de imunossupressão ⁴. O exercício físico moderado beneficia o sistema imunológico, pois estimula a funcionalidade das células imunes, pois promove a estimulação de linfócitos, principalmente as células natural killer (NK), assim como células responsáveis pela fagocitose de patógenos, macrófagos e neutrófilos ⁷⁷.

Um estresse fisiológico agudo provoca um aumento transiente no número de linfócitos, sendo que as representantes de maior expressão dessa linhagem são as células NK (CD16, CD56, CD57). De forma análoga, a infusão de adrenalina tem maior influência sobre as células NK, ocasionando um aumento em torno de 50 % no número destas com relação aos valores basais. Quanto aos linfócitos que expressam CD8, existe um aumento moderado dos níveis, no entanto este pode estar diretamente ligado a células NK que co-expressam CD8 ao invés de serem efetivamente células T citotóxicas (TCD8) ⁹⁹.

Os hormônios de estresse, como catecolaminas e cortisol, estão relacionados com a funcionalidade e o número de células imunológicas durante o exercício físico. Os receptores adrenérgicos podem ser classificados em quatro categorias α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , baseando-se nos diferentes graus de sensibilidade ao agonista, nesse caso adrenalina. Receptores β_2 foram identificados em diferentes subpopulações de linfócitos, assim, quando estimulados pelo agonista causam a ativação da adenilil ciclase, via proteína G, com um aumento conseqüente de cAMP. Receptores α_1 produzem seus efeitos a partir da ativação da fosfolipase C, enquanto que α_2 receptores promovem a inibição da adenilil ciclase, via proteína G, gerando por conseqüência um decréscimo de cAMP ^{99,100}.

A noradrenalina apresenta um maior estímulo a receptores α_1 e β_1 adrenérgicos, enquanto que em β_2 receptores age fracamente. A adrenalina apresenta uma ação potente como estimulador de β receptores. Experimentos realizados por Gader 1974, demonstraram

que utilização de um β - bloqueador adrenérgico, como o propranolol, não permitiu o aumento de linfócitos, promovendo uma inibição da ação da adrenalina, comprovando que essa resposta pode ser mediada por β_2 receptores. Gader e Cash 1975, realizaram outro experimento com o uso de agonistas β , como salbutamol e isoprenalina. A administração de adrenalina e noradrenalina promoveu um aumento tanto de granulócitos quanto de linfócitos, enquanto salbutamol e isoprenalina apenas aumentaram os valores da linhagem linfocítica. Esse fato comprova a ação estimulatória de agonistas β - adrenérgicos sobre receptores β , demonstrando que linfócitos devem apresentar predominância de receptores β ¹⁰⁰.

A noradrenalina através do estímulo de α e β -adrenoceptores associados, promove o aumento do cAMP intracelular, estimulando a fagocitose tanto de neutrófilos quanto de macrófagos em resposta ao exercício físico moderado ⁷⁷. No entanto, pode ser observado em outro estudo que a noradrenalina tem um efeito imunorregulatório negativo, aumentando a produção de IL-10, através da estimulação de β -receptores. Dessa forma, monócitos têm a produção de citocinas inflamatórias diminuída, com a IL-10 suprimindo a produção de TNF- α e IL-1 β , porém os dados quanto a relação entre a estimulação por noradrenalina e os níveis de TNF e IL-6 ainda são considerados inconsistentes ¹⁰¹.

O uso de β - bloqueadores adrenérgicos, permite relacionar o sistema nervoso simpático e sistema imunológico, assim medicamentos como metoprolol (β_1 -bloqueador) e propranolol (Bloqueador β_1 e β_2) foram administrados a vinte voluntários saudáveis que realizaram exercício dinâmico exaustivo, então, após o tratamento, os indivíduos para os quais foram administrados propranolol, apresentaram uma diminuição de linfócitos, das linhagens NK e TCD8. Isso se deve ao fato, dessas células apresentarem um número elevado de receptores β_2 - adrenérgicos. No entanto, os indivíduos que tiveram tratamento com metanolol mantiveram a linfocitose induzida pelo exercício, demonstrando que este antagonista β_1 - adrenérgico não apresentou efeito semelhante ao do propranolol sobre os linfócitos ¹⁰².

A estimulação da capacidade fagocítica induzida pela adrenalina desaparece quando são adicionados propranolol (antagonista β - adrenérgico não-seletivo) e fentolamina (antagonista α - adrenérgico não-seletivo) , sugerindo a participação de α e β adrenoceptores no processo de fagocitose. Quando um patógeno é fagocitado, o próximo passo é a destruição do mesmo. Assim, na presença de um estímulo, os macrófagos iniciam

um aumento respiratório, no qual a NADPH oxidase é ativada, catalisando a reação de produção do ânion superóxido (O_2^-). Alguns estudos não encontraram modificações nos níveis intracelulares de superóxido quando incubados com noradrenalina, pois ela estimula a fagocitose do macrófago, mas é necessário uma alta concentração dessa catecolamina (10^{-5} M) para induzir quimiotaxia¹⁰³.

Considerando agonistas de receptores α_2 adrenérgicos, como a clonidina, quando sensibilizam macrófago, resulta na supressão do cAMP intracelular. Pois nos macrófagos parece existir um mecanismo no qual há correlação negativa entre os níveis de cAMP e os níveis de citocinas inflamatórias, assim como, existe correlação positiva entre o cAMP e os níveis de citocinas antiinflamatórias. A supressão de cAMP, portanto, promove o aumento de TNF- α e a diminuição de IL-10^{100,104}. Assim, pode ser sugerida uma ação inibitória da adrenalina ao processo inflamatório através do aumento do cAMP intracelular, que conseqüentemente inibe TNF- α e estimula uma resposta de IL-10. A IL-10 tem, portanto, uma ação antiinflamatória através da inibição da ativação monócitos/macrófagos, proliferação de TH1, produção de citocinas pró-inflamatórias^{105,106,107}.

Durante o estresse agudo, como o causado por um patógeno, ocorre produção de adrenalina liberada devido à estimulação do SNS, de forma que citocinas envolvidas com a resposta imunológica, como IL-1 e IL-6, podem aumentar os níveis de catecolaminas. Esse estímulo ocorre em casos de septicemia, em que aumentam as catecolaminas circulantes em resposta aos LPS produzidos pelo agente infeccioso¹⁰⁵. Assim, a adrenalina é o tratamento indicado em casos de choque séptico, pois promove uma diminuição do processo inflamatório. O principal agente envolvido na patogênese da sepse é o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), componente essencial da membrana celular de bactérias gram-negativas. O desenvolvimento de terapias para a sepse depende do entendimento de mecanismos básicos da doença. O LPS tem efeitos tóxicos que potencializam a atividade de macrófagos e de células endoteliais, induzindo a expressão de citocinas inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e a interleucina- 6 (IL- 6)¹⁰⁸.

2.9 Relação do Sistema Nervoso Simpático e do Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal com o Sistema Imunológico

Agentes estressores emocionais e físicos tendem a romper com a estabilidade mantida pelo organismo, promovendo um conjunto de respostas adaptativas, geradas pela associação entre sistema nervoso central e sistema imunológico, que irão permitir o retorno ao equilíbrio homeostático. Dessa forma, somam-se evidências que demonstram a influência do Sistema Nervoso Central sobre a resposta imunológica, pois as catecolaminas influenciam diretamente a produção de mediadores inflamatórios realizada por monócitos/macrófagos¹⁰⁴.

A relação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico pode ocorrer através de duas vias, pelo eixo hipotálamo-hipófise e pelo sistema nervoso autônomo¹⁰⁹. Sendo que os efetores da resposta adaptativa são o CRH (hormônio liberador da corticotropina) e o LC-NA (locus cerúleo de neurônio autonômicos), estes regulam as atividades periféricas do eixo hipotálamo-hipófise – adrenal e do sistema nervoso simpático (SNS), respectivamente. Então a manutenção da homeostase resulta da estimulação da liberação de glicocorticóides e catecolaminas, por essas vias^{67,92}.

O sistema nervoso simpático é o componente do SNA que parece estar relacionado com a função imunológica, pois inerva os órgãos imunes primários e secundários, sendo assim responsável pela liberação de catecolaminas que comprovadamente apresentam uma ação no sistema imunológico^{65,102,109}. Sendo que a presença de receptores para hormônios e o contato anatômico entre sistema nervoso e órgãos linfóides reforçam a existência de interações entre esses dois sistemas.

A inervação noradrenérgica de tecidos linfóides parece ser regional e específica, geralmente nas zonas de linfócitos T, macrófagos são ricas em inervação, enquanto as zonas nodular e folicular, onde as células B maturam, são pobremente innervadas⁷⁰.

As catecolaminas e as drogas adrenérgicas influenciam as células do sistema imunológico tanto diretamente através de receptores adrenérgicos expressos tanto em macrófagos quanto nas demais células imunológicas competentes. Mas também age indiretamente através de alterações dos níveis de noradrenalina endógena por influência da atividade de liberação e regulação de alfa-2 adrenoceptores localizados na fenda pré-sináptica. Assim, a administração de antagonistas seletivos α -2 adrenérgicos diminui a resposta do TNF- α quando induzidos por LPS (em camundongos)¹⁰⁰.

A relação de nervos aferentes do sistema autonômico gerando efeitos metabólicos diretos no sistema imunológico, que envolvem produção de hormônios e citocinas, tem o

hipotálamo como agente integrador. Fato que permite lhe colocar com um papel importante na resposta ao estresse e ao treinamento ¹¹⁰.

A resposta do sistema nervoso central através do eixo hipotálamo – hipófise ocorre através do hormônio liberador da corticotropina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP). A secreção de CRH estimula a produção do hormônio corticotrópico (ACTH) pela hipófise anterior. Assim, a cada hora os neurônios parvoventriculares secretam de 2 a 3 pulsos de CRH e AVP para o interior do sistema porta-hipofisário. Sendo que, os picos destes pulsos ocorrem durante os primeiros horários da manhã, de forma que influencia o aumento dos níveis de ACTH e de cortisol neste período. Nas circunstâncias de estresse agudo, os picos de ACTH e cortisol têm sua frequência aumentada, provavelmente por consequência de um estímulo proveniente da ação sinérgica de CRH e AVP. Assim, em situações estressantes que promovem um desequilíbrio homeostático, ocorre um aumento na liberação de CRH e AVP, fato que consequentemente promove um aumento da produção de ACTH, seguido de aumento do cortisol. O cortisol é um glicocorticóide que ao se ligar a seus receptores, é translocado para o núcleo onde interage com elementos responsivos específicos de glicocorticóides (GREs). A ativação genética pelos glicocorticóides, promove interações protéicas capazes de inibir fatores de transcrição como o NFκB e c- jun/ c-fos. Ambos fatores relacionados com a transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório ¹¹¹.

Durante a resposta imune inflamatória ocorre ativação do eixo hipotálamo – hipófise – adrenal pela IL-6 e pelo TNF-α. Essas citocinas aumentam a liberação de CRH do hipotálamo, aumentando a liberação de ACTH. Consequentemente ocorre um aumento na secreção de glicocorticóides pelo do córtex adrenal. Durante um estresse crônico não foi demonstrado uma relação direta entre as concentrações plasmáticas de ACTH e a liberação de glicocorticóides ¹¹².

A ação da IL-1 sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é dependente da forma de administração desta citocina. Por exemplo, injeção intravenosa pode causar um aumento rápido de ACTH e corticosteróides no plasma de ratos e camundongos, e essa resposta é afetada por inibidores da ciclooxigenase (COX), que possuem potencial antiinflamatório. No entanto, a IL-6 apresenta uma resposta do eixo HPA muito mais rápida se comparada a estimulação realizada pela IL-1. Assim, o aumento de IL-6 no plasma aumenta as concentrações de ACTH circulante, sendo que a IL-6 não é sensível a inibidores da COX ⁸⁰.

Os glicocorticóides e as catecolaminas atuam sobre o balanço TH1/ TH2, mediando a ação supressora de TH2 sobre as células apresentadoras de antígenos (APC) e sobre TH1. Isso ocorre pelo aumento de citocinas, como IL-4 e IL-10, estimuladas por linfócitos TH2. Então, as células apresentadoras de antígenos têm a produção de IL-12 suprimida, de maneira que esta interleucina não irá induzir uma resposta TH1 de proliferação e produção de citocinas pró-inflamatórias. A IL-12, produzida por monócitos/macrófagos, é o maior indutor da diferenciação de T0 (células precursoras de linfócitos T helper) em TH1^{67,79,113}. Por outro lado, as catecolaminas também são capazes de potencializar a produção de IL-8 por monócitos, que promove o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório⁷⁹.

A histamina apresenta um efeito semelhante ao das catecolaminas nas células do sistema imunológico, sendo que o hormônio liberador da corticotropina (CRH) induz a desgranulação de mastócitos e a liberação de histamina. Os mastócitos são células que participam da resposta imune inata e possuem grânulos de histamina em seu conteúdo citoplasmático. A histamina é uma substância mediadora do processo de inflamação aguda e das reações alérgicas. A ativação de receptores de histamina H1 promove a ocorrência de vasodilatação, aumento da permeabilidade da parede vascular, edema e broncoconstrição nos pulmões^{67,114}. O CRH ativa os mastócitos via CRH receptor dependente tipo 1, liberando a histamina em grânulos contidos nos mastócitos, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e outras manifestações do processo inflamatório. Monócitos possuem receptores de histamina H2, que quando estimulados pela histamina aumentam o cAMP intracelular, promovendo a inibição da produção de IL-12 e estimulando a síntese de IL-10. Assim, a histamina, através de receptores H2, é capaz de inibir a produção de TNF- α por monócitos e de INF- γ por linfócitos TH1. No entanto a histamina parece não alterar os níveis de IL-4 produzida por células TH2, sugerindo que estas não possuem receptores H2^{113, 65, 115}.

2.10 Efeitos do Eixo Simpático-CRH periférico-histamina

Muitas condições estressantes, incluindo o estresse psicológico, estão associadas a desbalanços da função imunológica que podem levar a doenças auto-imunes, como o diabetes tipo I^{116,117}. Na verdade, recentemente, foi mostrado que situações de vida extremamente estressantes e disfunções psicológicas estão fortemente associadas à incidência de diabetes tipo I em crianças e adolescentes¹¹⁸. Tais situações incluem perda de emprego dos pais,

acidentes graves, hospitalização ou morte de amigos muito próximos, brigas entre os pais, guerras, *quasi*-afogamento, quedas de precipícios, participar de um acidente de trânsito com mortes, conflitos entre parentes, professores, vizinhos e pais, ficar perdido no meio da multidão, sofrer agressões físicas, perdas em competições, sofrer penalidades, estresse com exames escolares, morte de animais de estimação, presenciar a queda de um raio, perda de moradia e problemas de aprendizado.

Em geral, o estresse é considerado imunossupressor. Surpreendentemente, entretanto, evidências recentes sugerem fortemente que o **estresse agudo** possa agir como um **estímulo pró-inflamatório** através da produção do hormônio (ou fator) liberador da corticotropina (CRH) por terminações nervosas simpáticas periféricas⁶⁶. O CRH estimula a proliferação de linfócitos^{119,120} e a secreção de interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2) por células mononucleares periféricas de voluntários saudáveis¹²¹. Periféricamente, o CRH exerce efeito pró-inflamatório em doenças auto-imunes promovendo um seletivo aumento nas respostas de células Th1 (linfócitos T auxiliares do subtipo 1), através da ativação de vias ligadas ao NF- κ B¹²². Além disso, é possível que, em condições de estresse, o CRH periférico ative mastócitos a secretarem histamina que, por sua vez, através da ligação a receptores H1 induz inflamação local (183). E, de fato, em situações que precipitam o diabetes tipo 1, observa-se um aumento na atividade do eixo hipotálamo-hipófise adrenal e deficiente responsividade ao estresse¹²³. Assim, é possível que o estresse psicológico seletivamente ative linfócitos Th1 que medeiam a expressão de iNOS induzida por citocinas do tipo 1 (inflamatórias) exacerbando a produção de NO com conseqüente indução de citotoxicidade nas células β do pâncreas. O aumento da atividade das células TH1, por sua vez, leva a um aumento na utilização de glutamina por estas células com conseqüente desvio do metabolismo do glutamato: da síntese de GSH para a produção de NO, conforme ilustrado na Figura (Figura 3). Assim, a possibilidade de que o eixo SCPH medeie um desbalanço na utilização de glutamina e arginina é uma das principais hipóteses a serem testadas no presente trabalho.

Tomados como um todo, esses achados sugerem que o estresse psicológico possa ter um papel dual e de potenciação cruzada em doenças auto-imunes como o diabetes tipo 1: um imunoinflamatório e outro metabólico. Em favor desta hipótese, tem-se que a administração oral de L-arginina melhora sensivelmente o estado de pacientes portadores de uma série de disfunções imunológicas^{124,125}. Curiosamente, a injeção intraperitoneal de L-arginina, quando

o acoplamento fisiológico glutamina/arginina (Figura 4) é contornado, NÃO melhora o estado de ratos diabéticos. Ao contrário, piora¹²⁶, enquanto que a administração oral de L-arginina a ratos tratados com aloxana restabelece a glicemia e os níveis de insulina plasmática¹²⁷. A administração oral de L-arginina também melhora, embora não completamente, a sensibilidade hepática e periférica à insulina em indivíduos diabéticos do tipo II¹²⁸ onde o estresse oxidativo^{129, 130, 131} e a superprodução de NO^{132, 129} também estão envolvidos. Por essa razão, o manejo nutricional da glutamina e/ou L-arginina, por via enteral para promover o restabelecimento do acoplamento glutamina-arginina⁵³, pode vir a ser um importante aliado na recuperação do estado redox de células β no princípio das manifestação do diabetes tipo I. Por outro lado, o músculo esquelético é o maior sítio de produção de glutamina em humanos e contém cerca de 90% de toda a glutamina corpórea. Estudos quantitativos⁴⁸ em humanos mostraram que, no estado pós-absortivo, aproximadamente 60% de todo o aminoácido liberado pela musculatura esquelética consiste de alanina e glutamina (Figura 4). Assim, o exercício físico moderado, que sabidamente acelera a taxa de produção e liberação de glutamina para a circulação, pode ser de grande valia para proteger o acoplamento arginina-glutamina entre o intestino delgado e outros tecidos muito sensíveis a alterações redox.

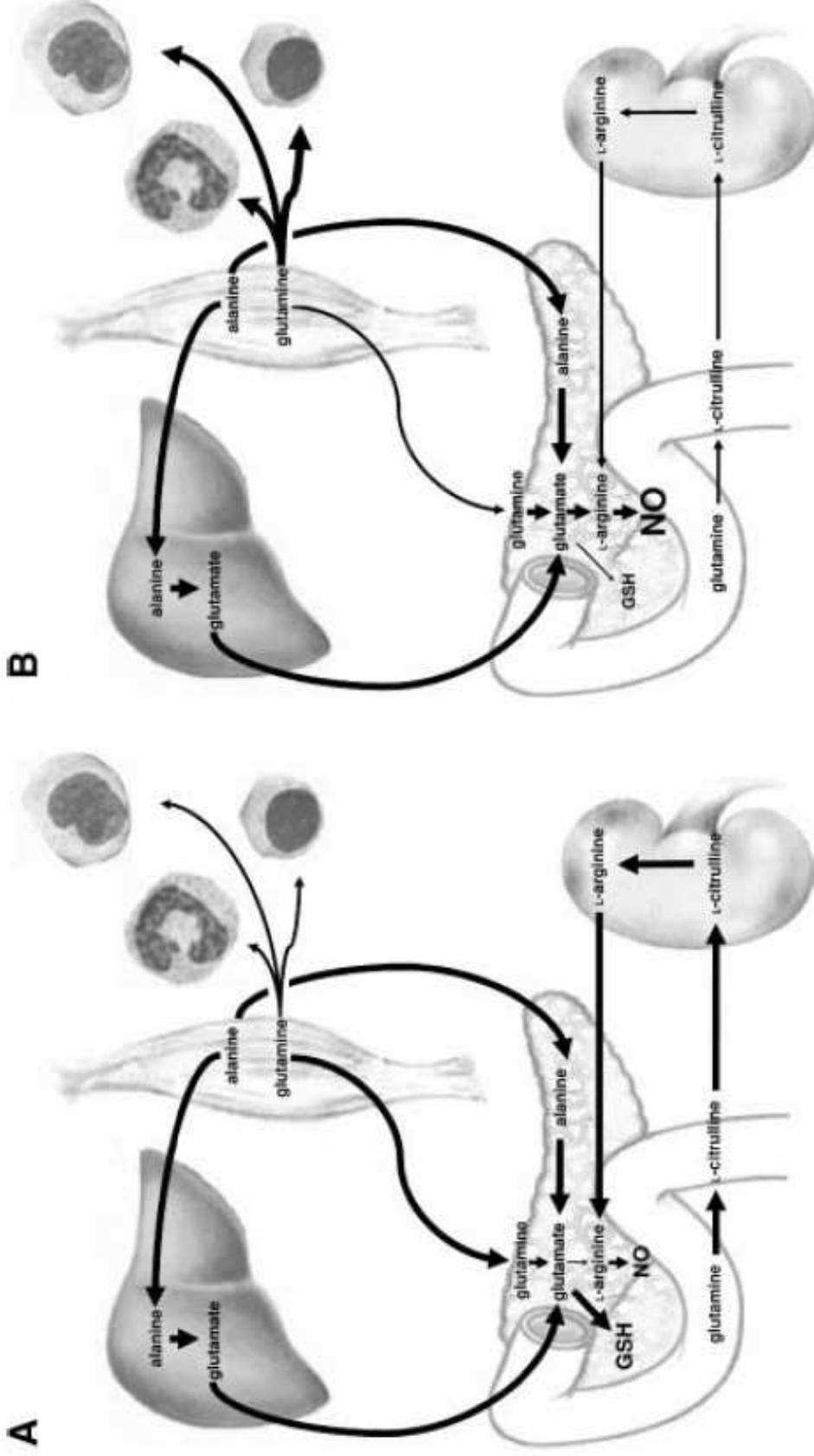


Figura 4. Hipótese de ação conjunta da L-arginina/glutamina em células-β secretoras de insulina. (A) As células-β das ilhotas pancreáticas utilizam L-arginina para a biossíntese de NO e glutamato para a geração de GSH, durante o processo de secreção de insulina. A glutamina do músculo esquelético é substrato para a manutenção do metabolismo da GSH nas células-β, mas a rápida proliferação celular das células do intestino e as células imunológicas competem com as células-β pela utilização de glutamina. Este é o caso também de situações de estresse psicológico, que promove reações inflamatórias que poderiam estar relacionadas com a ativação do sistema Simpático-CRH-Histamina, conduzindo, assim, a uma resposta imunológica TH1 que aumenta a utilização de glutamina. Então, o desbalanço de glutamina, em virtude do suprimento deficiente de L-arginina para o pâncreas, desvia o metabolismo da síntese de GSH e NO, levando ao estado de estresse oxidativo, prejudicando a secreção de insulina e levando a uma insulinite. Esse processo inflamatório contínuo incrementa o metabolismo do NO, com um aumento do consumo de glutamina, perpetuando essa condição cíclica que leva ao T1DM (B). O exercício físico, por outro lado, pode melhorar o suprimento de glutamina a partir do músculo esquelético, contendo a inflamação mediada por TH1 através da produção de citocina tipo 2, como a IL-6. A ação imunomodulatória do exercício pode também envolver a produção de proteínas de choque térmico e outros mediadores antiinflamatórios¹

3. Objetivo Geral

Estabelecer a participação do Sistema Nervoso Simpático, através do uso de bloqueadores farmacológicos alfa e beta adrenérgicos na atividade funcional de monócitos circulantes de ratos submetidos à sessão de natação de 1 hora (exercício agudo moderado) *in vivo* (administração em animais).

3.1 Objetivos específicos

Os animais foram divididos em controle e exercício, nos quais foram aplicados bloqueadores farmacológicos de acordo com o protocolo estabelecido (abaixo). Os animais do grupo exercício realizaram um exercício agudo moderado pelo período de 1 hora, enquanto o grupo controle ficou parcialmente coberto pela água. Assim, torna-se possível relacionar a influência do Sistema Nervoso Simpático durante o exercício físico com imunomodulação de células da resposta imunológica, como os monócitos/macrófagos. De forma que realizamos a avaliação de parâmetros bioquímicos e imunológicos como:

- ❑ A atividade dos monócitos/macrófagos através da avaliação da sua capacidade fagocitária, da produção de NO através da medida de nitratos e nitritos pelos macrófagos.
- ❑ Análise do estado redox celular através do conteúdo de glutatona nos eritrócitos, inferido pela dosagem de GSSG/GSH.
- ❑ Observação, em monócitos, a influência do exercício e do tratamento com bloqueadores farmacológicos na expressão de proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Protein*), enfocando a HSP70, pois esta é um indicativo de estresse celular.
- ❑ A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que retrata a produção de óxido nítrico em monócitos, refletindo sua capacidade de

produção de NO (que é bactericida) dependente de NF- κ B pelas células durante o processo inflamatório.

- Relacionar esses parâmetros analisados com ativação do NF κ B (em monócitos), fator de transcrição que atua no processo inflamatório, induzindo citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

- Avaliar a ativação do fator NF- κ B em todas as situações experimentais acima descritas.

4. Material e Métodos

4.1 Caracterização da pesquisa

Este estudo se caracteriza por ser experimental, com grupos controle e exercício para as diferentes drogas aplicadas.

4.2 Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), adultos (3 a 4 meses), machos, provenientes do biotério do ICBS da UFRGS. Os animais são mantidos sob um ciclo de claro/escuro 12h/12h e temperatura ambiente a 23°C, recebendo, *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos e tendo livre acesso à água. O bebedouro do animal contém água da torneira que é trocada com frequência para impedir o desenvolvimento de microorganismos. Foram utilizados 3 animais por grupo experimental, num número total de 66 animais, conforme Silveira *et al.* (2007), seguindo os protocolos experimentais amplamente utilizados em nosso laboratório^{9,10}. Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética, cadastrado no CEP/UFRGS com o nº 2008003.

4.3 Ortotanásia

Foi utilizado o método de decapitação, com guilhotina, por ser rápido e eficaz. Induz perda imediata do reflexo palpebral, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Não foi injetado nenhum anestésico nos animais para impedir a interferência na coleta de sangue periférico para as análises celulares e bioquímicas.

O descarte de materiais biológicos, como os animais mortos e tecidos foram acondicionados em sacos de cor branca com a indicação de lixo biológico e infectante, fornecido pelo Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Esse material foi encaminhado para o Biotério do ICBS para incineração. Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagens apropriadas para cada material, contendo rótulo e a

indicação da periculosidade, segundo a classificação da ABNT NBR 10004. Esse material é encaminhado ao departamento de química, em dias específicos estabelecidos pela Universidade, para um descarte adequado e seguro.

4.4 Aplicação de Bloqueadores Farmacológicos

Para a observação da participação do Sistema Nervoso Simpático utilizamos bloqueadores alfa e beta adrenérgicos como: prazosina (antagonista α_1 , 2mg/kg), fentolamina (α_1 e α_2 inespecífico, 10mg/kg) e propranolol (β_1 e β_2 inespecífico, 10mg/kg). Assim como a associação entre fentolamina e propranolol e prazosina e propranolol gerando um efeito de duplo bloqueio. Os fármacos foram aplicados apenas no dia do experimento, 30 minutos antes da sessão de exercício^{133,134}.

Os animais foram separados em grupos:

Controle	Exercício
1. PBS	5. PBS
2. Fentolamina	6. Fentolamina
3. Prazosina	7. Prazosina
4. Propranolol	8. Propranolol
5. Fentolamina + Propranolol	9. Fentolamina + Propranolol
6. Prazosina + Propranolol	10. Prazosina + Propranolol

4.5 Protocolo de adaptação

Os animais foram aclimatados ao protocolo de natação^{9,10} durante o período de três dias, com a finalidade de minimizar a interferência de uma resposta ao estresse nos dados a serem analisados⁸⁸. A adaptação consistiu na permanência dos animais nos tanques individualizados de água aquecida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10, 15 e 20 minutos por três dias consecutivos que antecederam o dia da realização do exercício agudo. Durante a adaptação não foram colocados pesos no animal.

4.6 Protocolo de exercício

O protocolo realizado foi a natação por 1 hora em tanques aquecidos para avaliar as alterações agudas promovidas pelo exercício moderado sobre a funcionalidade dos monócitos/macrófagos^{9,10}. Os animais foram pesados e separados aleatoriamente em grupos.

A escolha deste exercício se deve ao fato de a natação ser uma habilidade natural do rato e não haver custos excessivos para realização desta atividade, além do que é possível, controlando-se a carga de exercício com sobrepeso no peito, impor-se uma atividade física moderada.

O protocolo de exercício compreendeu 1 hora de natação em caixas plásticas (400 mm de altura, 362 mm de comprimento e 270 mm de largura) com capacidade para 20 litros, contendo água a uma temperatura entre 31 ± 1 °C. Esta temperatura é escolhida por ser considerada neutra para o animal⁹⁷ evitando, assim, que a imersão em água fria amenize a elevação da temperatura que acompanha o exercício ou que o estresse térmico possa interferir nos resultados, caso a temperatura da água for elevada acima do valor escolhido, conforme já verificado em outros estudos⁴⁰. Para impedir que os animais flutuem, fixou-se, ao peito, um peso correspondente a 5% do peso corporal deste¹³⁵.

Estudos prévios de nosso laboratório¹³⁶ mostraram que, sob as condições experimentais aqui descritas, a “carga de exercício” imposta aos animais pode ser considerada como moderada, tanto em termos de intensidade quanto de duração: as concentrações plasmáticas de lactato elevam-se para valores 3,5 vezes os basais, enquanto que a quantidade de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho caiu cerca de 50%.

4.7 Dosagem de lactato, glicose e triglicerídeos.

Para a verificação dos níveis de lactato, glicose e triglicerídeos foi utilizado como equipamento de medição o Accutrend Plus®, da Roche. Um monitor portátil para a medida quantitativa, no qual é possível observar a medição desses parâmetros na faixa de: lactato: 0.8 - 22mmol/l; glicose: 20-600 mg/dl; triglicerídeos: 70-600 mg/dl. Sendo que o tempo de medição: lactato: 60s, glicose: 12s; triglicerídeos: 180s. O volume de sangue de cada

amostra é de um mínimo de 15µl e um máximo de 50µl. A calibração é automática através de tira reagente específica para cada determinação.

O sangue foi obtido através de uma cisão na cauda, com bisturi, na quantidade suficiente designada pelo equipamento. Os intervalos de medida variaram de acordo com os experimentos realizados. Para a dosagem da glicemia, os animais foram deixados em jejum por duas horas.

4.8 Sangue: coleta e preparo

A heparina, um mucopolissacarídeo natural existente nos mastócitos, foi utilizada como anticoagulante. A administração prévia de heparina a ratos em experimentos onde se pretende coletar todo o sangue circulante deve-se ao fato de que a capacidade de coagulação do sangue destes animais é muito maior que a de humanos. Por isso, a simples heparinização dos tubos e funis de coleta não é suficiente para evitar a perda de material por coagulação. Assim, além de o sangue ser obtido de animais heparinizados, foram adicionados, aos tubos de coleta (Falcon, 50 mL), 25 UI de heparina contida em 50 µL de solução a 500 UI/mL em PBS.

Após a decapitação do animal com guilhotina, o sangue (aproximadamente 10mL) foi coletado diretamente em tubos heparinizados para posterior separação das frações sangüíneas. Assim após a coleta, o sangue foi imediatamente processado para a separação do plasma (para análises bioquímicas) e para a obtenção de monócitos circulantes com Histopaque.

A quantidade de monócitos circulantes em ratos é de cerca de $5,0 \times 10^5$ células/mL de sangue. Por esta razão, em todos os experimentos, os animais foram completamente exsanguinados, o que forneceu cerca de $5,0 \times 10^5$ monócitos/rato.

Adicionou-se Histopaque (Sigma, densidade 1,077 g/mL) em tubos Falcon de 15 mL a 1:2. Após o sangue foi retirado e colocado em tubos de 50 ml previamente heparinizados, a seguir passou-se esse sangue para um tubo contendo histopaque despejando a um ângulo de 45°, sem misturar, com auxílio de um pipetador automático motorizado.

Depois de realizado este procedimento, o sangue foi centrifugado a 400 x g por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi coletada a camada opaca que contém os mononucleares (essencialmente linfócitos e monócitos), que se localiza entre a camada de plasma (superior) e a de histopaque (média), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico (para evitar adesão dos monócitos). Os mononucleares foram, então, transferidos para um tubo Falcon de 15 ml e a suspensão diluída com PBS, centrifugou-se a para um volume de 10 vezes o volume de mononucleares a 250 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitar as células. Essa etapa foi repetida por 3 vezes.

Os monócitos foram semeados em microplacas de poliestireno (Corning) com 96, 24, 6 ou 4 micropoços (*wells*) conforme a demanda, ficando em estufa de CO₂ à 37°C por uma hora, tempo suficiente para que as células adiram à superfície das placas. No entanto, a exemplo do que acontece *in vivo*, a adesão celular é mediada por receptores de superfície dos monócitos e o processo adesivo leva a profundas alterações nas características dos monócitos, o que rapidamente diferencia-os em células mais ativadas, semelhantes aos macrófagos teciduais encontrados *in vivo*¹³⁷. Por essas razões, neste texto, o termo monócito/macrófago será utilizado todas as vezes que se fizer referências aos monócitos circulantes obtidos pelas técnicas acima descritas e incubados até que se comportassem como macrófagos (aderidos, com incremento na produção de EROs, com alta atividade fagocitária).

4.9 Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG

As quantidades de GSH e GSSG intracelulares, bem como a relação entre as concentrações desses dois metabólitos fornecem o índice do estado redox intracelular¹³⁸. Sendo os eritrócitos células que circulam por todos os territórios teciduais, o perfil do metabolismo da glutatona nestas células fornece boas evidências a respeito do estado redox tecidual geral do organismo. Foram realizadas medidas de GSH e GSSG, nos eritrócitos obtidos do sangue periférico dos animais exercitados e seus controles logo após as sessões de exercício. Para estas determinações, foi utilizada uma técnica adaptada daquela descrita em KOLBERG et al. (2006)¹³⁹ para determinação em leitora de microplacas a 415 nm. Eritrócitos coletados de amostras de sangue periférico foram lavados duas vezes em PBS (4 ° C) e imediatamente rompidos em 1:8 de ácido metafosfórico 5% (m/v) com

homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (=DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985) ¹⁴⁰. A rápida homogeneização das células em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 ^{138,140}. Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais ¹³⁸. A primeira parte do ensaio consiste na determinação do conteúdo de glutatona "total" (GSH+GSSG) medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Alternativamente, poderia ser monitorada a taxa de consumo de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou fluorimetricamente (excitação a 366 nm/emissão de 400-3000 nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reprodutível. Contudo, como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH+GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, podem levar, invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ser utilizada sempre uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, são efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras separadamente. O ensaio inicia pela adição de 10 μL de amostra (em MPA 5%), 75 μL de DTNB 14,1 mM (concentração final no ensaio 9,87 mM) em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5) e 10 μL de NADPH 1,7 mM em NaHCO_3 0,5% (concentração final 0,17mM). A reação tem início com a adição de 10 μL de GSRd (atividade final na cubeta de

0,5 U/mL) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 415 nm por cerca de 3 min num volume final 105 μ L em microplacas de 96 wells (0,232 cm de caminho óptico) a 37°C, em leitora termostaticada (Bio-Rad mod. Benchmark, USA) com aquisição direta e processamento cinético automático.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 μ L das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em Akerboom & Sies (1981)¹³⁸. Adicionou-se, então, 35 μ L de NEM 200 mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 μ L de KOH 2M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (=PIPES, Boehringer, pKa= 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10 μ M inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% foi efetuado por extração com 500 μ L de acetato de etila 3 vezes, o excesso de solvente foi evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 10 μ L de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as amostras que foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, adicionou-se o DTNB, e as leituras, a 415 nm (produção de TNB) foram acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e GSSG fornece os valores dos conteúdos de GSH procurados:

$$[\text{GSH}] = \text{GSH total} - 2[\text{GSSG}]$$

4.10 Xilenol Laranja (Lipoperoxidação em microplacas)

A oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} na presença de hidroperóxidos lipídicos (lipoperóxidos) e formação de complexos de Fe^{3+} com xilenol laranja (*xylenol orange*, XO) segundo a técnica descrita originalmente por Jiang et al. (1991)¹⁴¹ e adaptada para plasma e soro por

Arab & Steghens (2004)¹⁴². A versão com blanks de ROOH reduzidos com trifenilfosfina (TPP) é de Södergren et al (1998)¹⁴³., na qual são preparados blanks para cada amostra contendo a amostra mais TPP (que reduz especificamente os hidroperóxidos) e os valores obtidos são descontados das demais leituras.

O sangue total (1mL) deve ser centrifugado a 2000g por 10 minutos. Retira-se o plasma, que será separado em Eppendorfs, nos quais foi adicionado BHT (0,01%, 20mM). Essas amostras devem ser colocadas imediatamente em gelo, a fim de evitar a ocorrência de interferentes.

As amostras de plasma e soro devem ser dosadas diretamente, após a determinação da concentração de proteínas¹⁴⁴. Foram realizadas diluições seriadas para a correta análise dos ensaios. Assim segue-se a preparação do reagente de trabalho para a dosagem de lipoperóxidos através do ensaio com xilenol laranja.

O reagente de trabalho (RT-XO) é composto por MeOH (metanol) 90% (v/v), Xilenol laranja (2mM, ácido *o*-cresolsulfonoftaleína-3,3'-*bis*-metilimino-diacético, sal tetrossódico), ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M, BHT 40 mM, e (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6 H₂O (sulfato ferroso amoniacal) 10 mM.

As amostras foram separadas em dois grupos, um que se adicionou metanol absoluto e no outro no qual foi colocado trifenilfosfina 1mM (TPP). Ambos grupos incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período as amostras (10µL) foram pipetadas em placas com 96 wells com o reagente de trabalho (90µL) e a placa é incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Para o branco utiliza-se o RT-XO. A seguir é realizada a leitura a 560nm.

Para fins de cálculo, são considerados valores de absorbância (abs) utilizados para os cálculos são: **abs** = **abs**_{ROOH-total} - **abs**_{TPP}, isto é, os valores a serem utilizados nos cálculos já devem vir descontados dos blanks com TPP. O valor médio do coeficiente de absorção aparente (ϵ) para amostras puras de H₂O₂, hidroperóxido de cumeno e *t*-butil-hidroperóxido é de $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 43 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Considerando-se um volume final de 110 µL nas placas, o caminho óptico será de 0,2431 cm. Desta forma, tem-se $\epsilon_{560\text{nm}} = 10,4533 \text{ mM}^{-1}$. Ou seja, para cada 10,4533 unidades de absorbância na leitora, tem-se 1 mM de concentração de lipoperóxidos já descontados os artefatos (já foi descontado o valor de cada blank com TPP). Logo, para soros e plasmas, o resultado é direto: $c \text{ (mM)} =$

$\mu\text{mol/mL}$) = $[\text{abs}/10,4533] \times 11$ (diluição de 10 μL em 110 μL finais na placa); ou c (μM = nmol/mL) = $[\text{abs}/0,0104533] \times 11$ (diluição) = $[\text{abs}/0,00104533]$. Para o estabelecimento da correta relação entre as amostras podemos considerar o cálculo incluindo a dosagem de proteínas $[\text{abs}/0,9503]/\text{conc. prot.} = \mu\text{mol/mg}$ de proteína ou $[\text{abs}/0,00104533]/\text{conc-prot}$ em nmol/mg de proteína.

4.11 Avaliação funcional de monócitos/macrófagos: fagocitose de zimosan

Uma importante ferramenta de avaliação da capacidade imunológica de macrófagos é a medida da fagocitose de zimosan. Trata-se da contagem visual do número de partículas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas (zimosan) ao microscópio óptico. Para tanto os *S. cerevisiae* são preparados de maneira que seus conteúdos intracelulares são hidrolisados e retirados quimicamente, de sorte que as partículas de zimosan são fagocitadas como “fantasmas” contendo apenas as membranas plasmáticas. Entretanto, a fagocitose destas partículas, tal como aconteceria numa resposta imunológica, depende de que as mesmas estejam opsonizadas com as proteínas do sistema complemento, motivo pelo qual, o primeiro passo nesse experimento é a preparação e opsonização dos *S. cerevisiae* com soro do próprio rato cujos monócitos/macrófagos foram estudados.

Antes de se realizar o experimento, o zimosan tem que ser preparado, diluindo-se, em 100 mL de PBS, 50 mg de zimosan (Sigma). Após, é fervido por 30 minutos, agitando de vez em quando, e lavado por 3 vezes, por 15 minutos cada 1000 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante é descartado e o precipitado reservado e ressuspensão com PBS numa concentração de 40 vezes a concentração inicial .

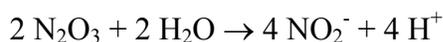
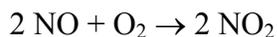
Para opsonização com o complemento (presente no soro do próprio rato), 0,5 mL de suspensão de partículas de zimosan (a 20 mg/mL) foram misturados em partes iguais com soro homólogo e incubado por 30 minutos a 37°C em banho-maria com agitação; foi realizada centrifugação por 10 segundos a 15.000x g. O precipitado foi lavado por 3 vezes com PBS e ressuspensão em meio de HBSS contendo BSA deslipídado a 2% m/v (20 mg/mL finais em termos de BSA).

Para o ensaio de fagocitose, as células (5×10^5 monócitos/macrófagos em 2 mL de suspensão fresca) foram plaqueados sobre lamínulas de vidro para microscópio (20 x 20

mm) e deixadas por 30 min em estufa incubadora a 37 °C em meio RPMI1640 contendo SFB a 10% (v/v) para aderirem ao vidro. Após a adesão dos monócitos/macrófagos, o meio é aspirado e substituído por 1 mL de HBSS pré-aquecido contendo BSA deslipídada a 2% (m/v) para iniciar o ensaio da fagocitose. Adicionou-se, então a preparação de zimosan opsonizado (pré-aquecido por 10 min a 37°C) num volume equivalente a 10% do volume de meio presente nas placas (no caso, 200 µL para 2 mL de meio contendo BSA deslipídado) que foi misturada com o meio contendo as células (pré-aquecidas por 10 min a 37°C). O conjunto foi incubado por 30 min a 37 °C sob agitação. A fagocitose é interrompida colocando-se as placas de cultura (contendo as células) em gelo por 10 min e, depois, contando-se as partículas fagocitadas. A visualização das partículas fagocitadas foi realizada diretamente nas placas em microscópio óptico com aumento de 400 X sem nenhum corante, embora a visualização possa também ser realizada com o auxílio de solução de violeta cristal a 2% seguida de observação das lamínulas com objetiva de imersão (1000 X). Foram realizadas contagens do número total de células que fagocitaram alguma partícula de zimosan sobre um total de 100 células observadas aleatoriamente por campo.^{145, 146, 147, 148,149}

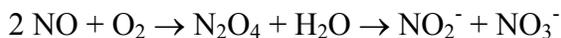
4.12 Estimativa da capacidade produção de NO por monócitos/macrófagos incubados: determinação de nitritos nos meios de incubação.

Óxido nítrico (NO) é produzido em pequenas quantidades por vários tipos celulares gerando nitratos e nitritos através das seguintes reações:



Outras reações envolvem:





O NO, além de se autooxidar, gerando nitritos (NO_2^-), reage prontamente, na circulação, com oxi-hemeproteínas, gerando nitratos (NO_3^-). Também, os NO_2^- reagem estequiometricamente com a oxi-hemoglobina formando NO_3^- . Quantidades significativas de NO_2^- acumulam em fluidos biológicos, como fluido cerebrospinal, fluidos sinoviais, exsudatos pleurais, pericárdicos e peritoneais, além de serem produzidos em altas quantidades por células imunológicas ativadas, como macrófagos e neutrófilos. Já na circulação, praticamente todo o NO_2^- gerado a partir do NO é convertido em NO_3^- . Desta forma, as avaliações da produção de NO in vivo podem ser estimadas pela medida de NO_3^- e NO_2^- . Assim, espera-se sempre um acúmulo maior de NO_2^- em tecidos livres de heme-proteínas e meios de incubação e cultivo celulares, e acúmulo de NO_3^- em plasma e tecidos que apresentem fontes de heme-proteínas. No presente trabalho, foram determinadas as concentrações de NO_2^- nos meios de incubação de monócitos/macrófagos obtidos dos animais. Neste caso, será medida a taxa de produção através da determinação do acúmulo destas espécies a partir dos sobrenadantes de células incubadas por 1 hora.

Sobrenadantes de meios de incubação de monócitos/macrófagos (incubação direta) foram processados diretamente nas placas de incubação (de 96 micropoços), após o período de pré-incubação para adesão das células de 30 min. Para tanto, as preparações de monócitos foram ressuspensas em meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de SFB em volume, que contém todos os fatores necessários para que as células possam estar vivas e produzindo NO. As células foram contadas e plaqueadas ($2-5 \times 10^5$ células por poço num volume de 100 μL) para depois serem incubadas a 37°C em estufa incubadora de CO_2 por 30 min para a adesão das células ao fundo das placas de ELISA. Em seguida, as células foram lavadas com tampão HBSS contendo glicose e tampão HEPES pois as concentrações de fosfato (inibidor da nitrato redutase quando acima de 50 mM) giram em torno de 0,8 mM em muitos meios de cultura. Depois do preparo, o meio HBSS foi mantido a 37°C e, após a incubação inicial das células nas placas, os meios foram aspirados cuidadosamente e as células (já aderidas) lavadas 3 vezes com volumes de 200 μL cada de PBS para a retirada

de qualquer traço de meio de cultura (que contém nitratos/nitritos e interferem nas análises).

Adicionou-se 80 μ L de meio HBSS pré-aquecido para incubar as células por 1 hora (esta incubação tem o objetivo de permitir que as células produzam NO, espontaneamente, que foi convertido a nitratos e nitritos na ausência de qualquer estimulante celular, como PMA).

Nos micropoços contendo as células após as incubações de 1h, foram acrescentados 50 μ L de reagente de Griess I (SULFA), seguido de mais 50 μ L de reagente de Griess II (NEDD). Agita-se e incuba-se na própria leitora à temperatura ambiente (25 °C) por 10 min, fazendo-se, em seguida, a leitura a 540 nm. A concentração de nitritos foi determinada com base nas curvas-padrão previamente pipetadas nas placas, conforme descrito em GRANGER et al. (1995)^{150, 149}.

4.13. Imunodeteção de Proteínas de Choque Térmico 72 (HSP72) e Óxido Nítrico Sintase Induzível (NOS2)

Para análise da expressão de HSP72 e da NOS2, os monócitos foram coletados com Histopaque citada anteriormente, após 6 horas do término do exercício físico (período necessário para indução da expressão gênica máxima da HSP70). Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteínas (cerca de 30 μ g, determinada pelo método de Bradford¹⁴⁴) foram separadas durante 2 horas e 45 minutos (a 60 mA/ gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3 usando-se 1cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Santoro et al. (1989)¹⁵¹. Como marcador de peso molecular foi utilizado a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (Amersham ou

Invitrogen) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase b (92,5 kDa), BSA (69kDa), ovalbumina(46kDa), anidrase carbônica (30kDa) e lisozima (14kDa).

As amostras contidas no gel foram destinadas ao processamento por Western blotting, como descrito em ELIA & SANTORO (1994)¹⁵², sendo transferidas diretamente para membrana de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V por 90 minutos. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas foram evidenciadas pela coloração com vermelho Ponceau S, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4 EDTA 5 mM, NaCl 150 mM). Antes da imunodeteção, os filtros de nitrocelulose foram imersos em tampão de bloqueio a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houver transferência de proteínas, promovendo-se então bloqueio de ligação inespecífica de anticorpos ao filtro. Para o *Western blotting* das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 h sob agitação enérgica em tampão de bloqueio – *bloto* (leite em pó a 5%)¹³⁹, após este procedimento a membrana foi lavada por 3 vezes com 10 ml de TEN-Tween 20 sob agitação.

Adicionou-se o primeiro anticorpo, monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham) , que reage especificamente com o polipeptídeo de 72 kDa (HSP70, ou HSP induzível) e com o de 73 kDa (HSP73, também chamado de HSC70 ou HSP70 constitutiva), diluído a 1:1000 em solução de bloqueio. Depois disso, os filtros foram lavados 3 vezes sob agitação por 10 min com 10 ml de TEN-Tween20 e incubados por 2 h com 5 mL de solução contendo o segundo anticorpo, IgG (molécula inteira contra imunoglobulinas de camundongo, Sigma) em tampão de bloqueio sob agitação.

A revelação é realizada pela técnica do ECL (Amersham) conforme descrito abaixo para a NOS2. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas são registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas para os cálculos posteriores.

Para verificar a expressão das NO sintase (EC 1.14.13.39) induzível (iNOS2 ou NOS-2), foi utilizada a mesma técnica acima, porém foram adicionados anticorpos (Sigma)

específicos para essa proteína em diferentes experimentos e a revelação foi realizada pela técnica de ECL (Enhanced Chemiluminescence).

A técnica realizada de revelação por ECL é feita na câmara escura, pois o cassete de exposição e o filme de raios X (Hyperfilm, Amersham) são fotossensíveis. Foram utilizados Luminol (3-aminophthalhydrazide = 3-aminoftalidrazida) grau QL (Fluka, cód. 09153) e ácido p-coumárico (Fluka, cód 28200) que são misturados em 5 mL de tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,8. Esta mistura reage com peróxido de hidrogênio 30% (Fluka) também diluído em Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 que marcam as bandas das amostras¹⁵³.

A membrana é mergulhada nas soluções citadas acima, sob agitação por 3 minutos, a fim de visualizar o aparecimento das bandas, em seguida retirada das soluções e envolvida por um papel filme de PVC. A membrana é colocada sobre o cassete de exposição juntamente com o filme de RX. Após a exposição e revelação (conforme instruções do fabricante, Amersham), os filmes foram quantificados em VDS, como procedido para HSP70.

4.14 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

Na determinação de proteínas nas amostras, foi utilizado o método de BRADFORD (1976)¹⁴⁴. O padrão de referência são soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). O método de Bradford é baseado na ligação do Azul Coomassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5 % (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm. Amostras de plasma, foram diluídas 1:10 enquanto que as preparações celulares são rompidas em solução de SDS a 0,1% contendo PMSF e leupeptina como inibidores de protease, conforme descrito em ELIA & SANTORO (1994)¹⁵².

4.15 Análise estatística

Os dados foram analisados através de procedimentos estatísticos descritivo e inferencial. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média sendo que o número de observações está mostrado nas legendas das figuras. As comparações entre os vários parâmetros entre os grupos controle e exercício foram realizadas por ANOVA de

duas vias, procedendo-se aos pós-testes complementares de Tukey. O nível de significância para a probabilidade α de erros do tipo I no teste de hipóteses foi fixado em, no mínimo, $P < 0,05$. Os cálculos serão efetuados através do Software GraphPad InStat3 para Windows.

5. Resultados

5.1. Determinação da dosagem de lactato e glicose sanguínea

O exercício físico praticado com regularidade apresenta benefícios que promovem o aprimoramento da aptidão física, e principalmente quando realizado em uma intensidade moderada, tem um papel como potencial indutor na modulação da resposta imunológica ^{9,77,154}.

A dosagem de lactato é um parâmetro analisado durante o exercício para confirmar a intensidade a ser realizada pelo animal, pois o lactato é um metabólito da via glicolítica cuja produção (citossólica) aumenta sempre que a capacidade de oxidação intramitocondrial de moléculas de NADH está reduzida, situação que pode ser observada quando a demanda energética por trabalho muscular é maior que a capacidade celular de geração de energia ¹⁵⁵. Nesses casos, o excedente de equivalentes redutores (NADH) acaba por forçar a redução das moléculas do piruvato (que não conseguem ser oxidadas na mitocôndria) até lactato. Por isso, a concentração plasmática de lactato (lacticemia) é intermediário do metabolismo glicolítico que é amplamente utilizado como um marcador de intensidade de esforço ^{134,135,156}. Optamos pelo exercício moderado, a fim de observar a influência da atividade física praticada pela maioria das pessoas que realizam exercício físico sobre parâmetros imunológicos, com foco na função de monócitos circulantes. Estudos recentes de nosso grupo demonstraram que uma sessão aguda de exercício físico moderado pode promover um incremento da resposta imunológica de células como monócitos/macrófagos, verificada pela atividade fagocítica dessa célula, com aumento da capacidade de fagocitose e pela maior produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio ⁹.

Assim, foi feita a dosagem de lactato nos tempos zero (antes do exercício), após 30 e 60 minutos de exercício de natação. Todos os animais foram pesados, afim de estabelecer a dosagem do fármaco a ser aplicada nos animais e, para o cálculo do peso a ser colocado no peito do animal para um exercício de intensidade moderada, que deve ser o equivalente a 5% do peso corporal ¹³⁵. Primeiro, foi verificado se todos os grupos partiriam de valores de lactato semelhantes, antes de iniciar a sessão de exercício (**Fig.5**). Assim, no tempo zero, não encontramos diferença significativa entre os grupos PBS ($3,0 \pm 0,3$ mmol/l),

Fentolamina ($2,2 \pm 0,2$ mmo/l), Propranolol ($2,8 \pm 0,5$ mmo/l) e Fentolamina + Propranolol ($2,6 \pm 0,5$ mmo/l).

Após 30 minutos de natação, os animais foram retirados dos tanques para uma nova dosagem de lactato, quando foi obtido como resultados PBS ($5,4 \pm 1,3$ mmo/l), Fentolamina ($7,8 \pm 1,8$ mmo/l), Propranolol ($5,7 \pm 1,2$ mmo/l), Fentolamina + Propranolol ($10,0 \pm 0,4$ mmo/l). Houve diferença significativa do grupo Fentolamina + Propranolol ($p < 0,001$) tanto com relação ao grupo PBS quanto Propranolol. Nota-se, nos primeiros 30 minutos exercício, uma tendência de aumento nos níveis de lactato dos animais tanto com bloqueio α quanto com bloqueio α e β .

Ao final do exercício, ou seja uma sessão de 60 minutos, confirmou-se à tendência ao aumento da concentração de lactato nos grupos com bloqueio α e duplo α e β . Então, Fentolamina ($8,8 \pm 0,8$ mmo/l) e Fentolamina + Propranolol ($11,2 \pm 2,5$ mmo/l) demonstraram um aumento de 400 % e 430% com relação à dosagem antes do exercício (zero). Assim como em 30 minutos, após 60 minutos de natação, houve um aumento significativo do grupo Fentolamina + Propranolol tanto em relação ao grupo PBS ($6,5 \pm 0,4$ mmo/l; $p > 0,05$) quanto Propranolol ($5,0 \pm 0,3$ mmo/l; $p < 0,01$). Em 60 minutos, o grupo fentolamina também demonstrou valores aumentados de lactato com relação aos grupos PBS e Propranolol, no entanto houve diferença significativa somente com relação ao último fármaco ($p < 0,05$).

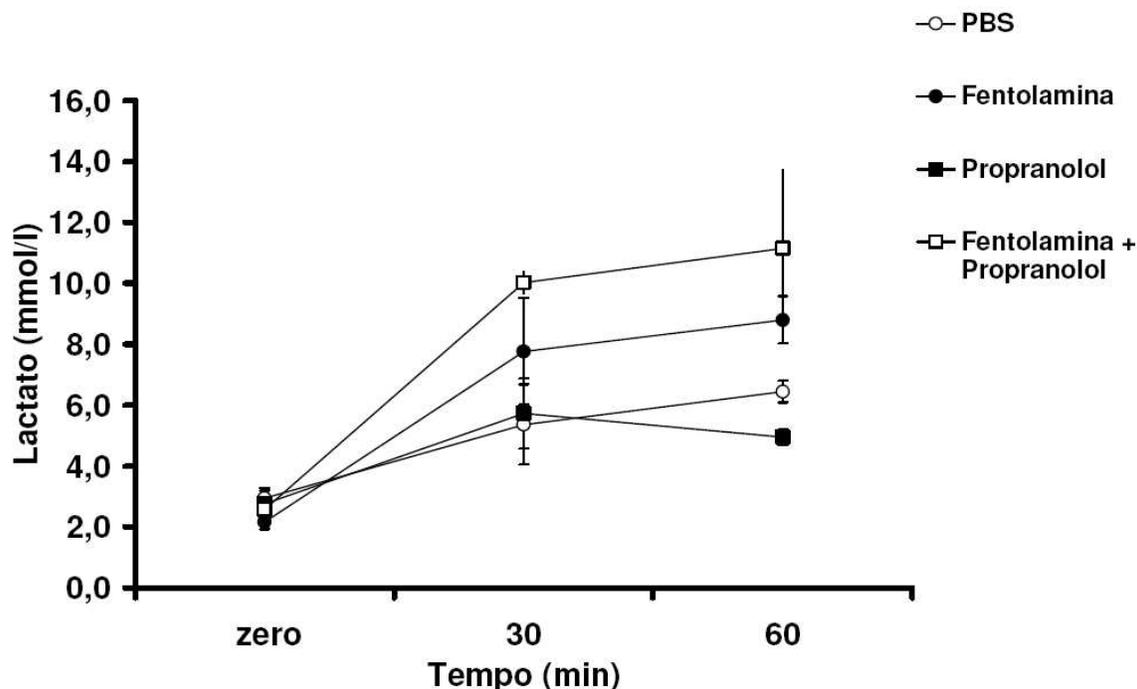


Figura 5. Comparação entre os valores de lactato dos grupos PBS, Fentolamina, Propranolol e Fentolamina + Propranolol, dosado na cauda do animal, durante o exercício de 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

PBS 30 – Fentolamina + Propranolol 30 $p < 0,001$; PBS 60 – Fentolamina + Propranolol 60 $p < 0,001$; Fentolamina zero – Fentolamina 30 e 60 $p < 0,001$; Fentolamina + Propranolol zero – Fentolamina + Propranolol 30 e 60 $p < 0,001$.

Diante desses valores, os grupos Fentolamina e Fentolamina + Propranolol apresentaram dosagem de muito lactato elevada, após 60 minutos de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal, assim, o que não condiz com os valores apresentados de exercício moderado descritos na literatura¹³⁵. No exercício de intensidade moderada, a taxa de produção de lactato deve ser similar a de sua remoção/metabolização, e, conseqüentemente, não apresentando aumentos significativos nos níveis plasmáticos deste metabólito¹³⁵.

Por isso optamos por investigar as concentrações de lactato nestes grupos com bloqueio α e α e β nas mesmas condições experimentais verificadas protocolo experimental acima, antes do exercício, 30 e 60 minutos de natação. No entanto, o peso no peito do animal foi reduzido para o equivalente a 2,5% do peso corporal, com a intenção de reduzir o esforço do animal na realização do exercício. Assim como, foram introduzidos dois

grupos controle, que receberam os bloqueadores (Fentolamina e Fentolamina + Propranolol) e tiveram os mesmos tempos de coleta do exercício, sendo mantidos em tanques com água cobrindo parcialmente corpo do animal. Inicialmente, os animais em experimento, controle e exercício, não apresentaram variação significativa na dosagem de lactato feita antes do exercício (**Fig. 6**). Os animais controle não demonstraram variação nas suas concentrações de lactato longo dos 60 minutos analisados, sendo os valores de Fentolamina e Fentolamina + Propranolol, respectivamente, $2,4 \pm 0,4$ mmo/l e $2,5 \pm 0,5$ mmo/l em zero, $2,2 \pm 0,4$ mmo/l e $2,4 \pm 0,4$ mmo/l em 30, $2,4 \pm 0,1$ mmo/l e $2,5 \pm 0,3$ mmo/l em 60 minutos de natação. Esse resultado pode confirmar que apenas a aplicação intraperitoneal desses bloqueados não interfere nas concentrações de lactato.

Nos grupos submetidos ao exercício (2,5% de carga **Fig. 6**) com bloqueio de Fentolamina e de Fentolamina + Propranolol, foram observados dados semelhantes aos apresentados anteriormente com 5% de carga (**Fig. 5**). Os resultados demonstraram uma tendência de aumento em ambos os grupos analisados durante os tempos zero, 30 minutos e 60 minutos após o exercício, com valores de $2,7 \pm 0,4$ mmo/l, $6,9 \pm 0,9$ mmo/l e $10,1 \pm 1,1$ mmo/l para Fentolamina e $2,8 \pm 0,2$ mmo/l, $9,3 \pm 1,2$ mmo/l, $12,8 \pm 0,5$ mmo/l para Fentolamina + Propranolol. Dessa forma, a aplicação dos fármacos não induziu um aumento de lactato sanguíneo, mas durante o exercício, com um maior aporte de catecolaminas, existe uma maior concentração de lactato, independente da carga imposta durante o exercício.

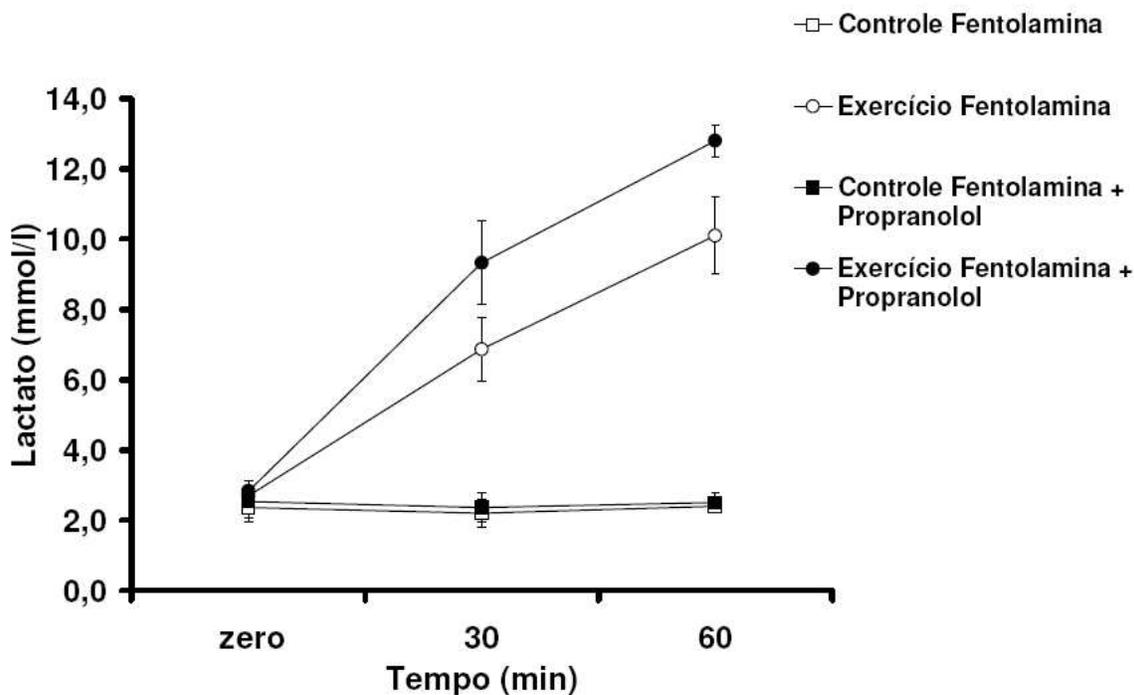


Figura 6. Comparação entre os valores de lactato dos grupos Controle Fentolamina, Controle Fentolamina, Exercício Fentolamina e Exercício Fentolamina + Propranolol, dosado na cauda do animal. Os animais dos grupos exercício, realizaram 1h de natação com peso equivalente a 2,5% do peso corporal do animal .

Controle Fentolamina 30 – Exercício Fentolamina 30 $p < 0,001$; Controle Fentolamina 60 – Exercício Fentolamina 60 $p < 0,001$; Controle Fentolamina + Propranolol 30 - Exercício Fentolamina + Propranolol 30 $p < 0,001$; Controle Fentolamina + Propranolol 60 – Exercício Fentolamina + Propranolol 60 $p < 0,001$; Exercício Fentolamina zero – Exercício Fentolamina 30 e 60 $p < 0,001$; Exercício Fentolamina + Propranolol zero – Exercício Fentolamina + Propranolol 30 e 60 $p < 0,001$.

Como a fentolamina foi o fármaco de escolha, antagonista α não seletivo, para a realização de experimentos sobre a influência do Sistema Nervoso Simpático durante uma sessão aguda de exercício moderado, estudou-se de que maneira esse bloqueador poderia estar atuando no metabolismo e assim interferindo nas análises imunológicas. Na literatura, foi relatado que a noradrenalina, em uma ação cooperava com o Neuropeptídeo Y¹⁵⁷, inibe a secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Assim, um antagonista α -não seletivo, como a Fentolamina, é capaz de reverter essa ação inibitória via bloqueio α_2 , promovendo o aumento da secreção de insulina. Por isso acreditamos que estes animais estivessem sofrendo modificações na glicemia (hipoglicemia) durante o exercício, fato que levaria a

uma modulação imunológica alterada, mascarando os resultados do bloqueio sobre os monócitos/ macrófagos.

A dosagem de glicose sanguínea (**Fig.7**), nos animais bloqueados com Fentolamina e Fentolamina + Propranolol, tanto no exercício quanto no controle, foram feitas nos momentos de repouso (antes da aplicação dos fármacos), zero (antes do exercício), 30 e 60 minutos de natação. A ração e a água foram retiradas cerca de duas horas antes do início da aplicação dos fármacos.

Durante o repouso, assim como no tempo zero não houve diferença significativa nos valores de glicemia entre os grupos analisados de $81,7 \pm 6,7$ mg/dL e $72,3 \pm 4,2$ mg/dL para controle Fentolamina; $81,5 \pm 9,2$ mg/dL e $77,0 \pm 2,8$ mg/dL para controle Fentolamina + Propranolol; $86,3 \pm 6,8$ mg/dL e $78,0 \pm 3,0$ mg/dL para exercício Fentolamina; $86,3 \pm 5,1$ mg/dL e $76,3 \pm 0,6$ mg/dL para exercício Fentolamina + Propranolol. Assim, todos os grupos estudados partiram de valores de glicemia semelhantes no repouso, apresentando uma leve queda nos valores com a simples aplicação dos bloqueadores, o que apesar de não demonstrar significância estatística, está indicando uma tendência de redução da glicemia.

Esse achado pode ser claramente notado após 30 minutos de natação (5% de carga, **Fig. 7**), demonstrando uma diminuição acentuada nos valores de glicose tanto para o grupo Fentolamina ($30,3 \pm 2,5$ mg/dL) quanto para o grupo Fentolamina + Propranolol ($27,0 \pm 3,5$ mg/dL). No entanto, os grupos controle não apresentaram variação significativa ($69,7 \pm 5,9$ mg/dL e $65,0 \pm 0,01$ mg/dL). Essa redução nos valores de glicose sanguínea foi mantida ao longo dos 60 minutos de exercício, com Fentolamina $19,3 \pm 5,1$ mg/dL e Fentolamina + Propranolol $16,3 \pm 2,5$ mg/dL. Os grupos controle Fentolamina e Fentolamina + Propranolol apresentaram uma diminuição nos valores em 60 minutos ($70,7 \pm 3,1$ mg/dL e $59,5 \pm 0,7$ mg/dL respectivamente), mas não tão significativa quando as apresentadas no exercício.

Corroborando as proposições de outros grupos de pesquisa ^{134,157}, um bloqueio α adrenérgico não seletivo, com Fentolamina, além de impedir a eficiente remoção do lactato sanguíneo, também influencia na manutenção da glicemia durante o exercício, através do aumento da secreção de insulina e conseqüentemente gerando um estado de hipoglicemia que interfere nas análises realizadas no estudo.

Diversos estudos utilizam a Fentolamina na análise da influência sistema nervoso simpático, tanto em modelos de exercício quanto de estresse psicológico, no entanto a maioria dos estudos é realizada *in vitro*, ou seja, sem interferência sistêmica^{77,154}.

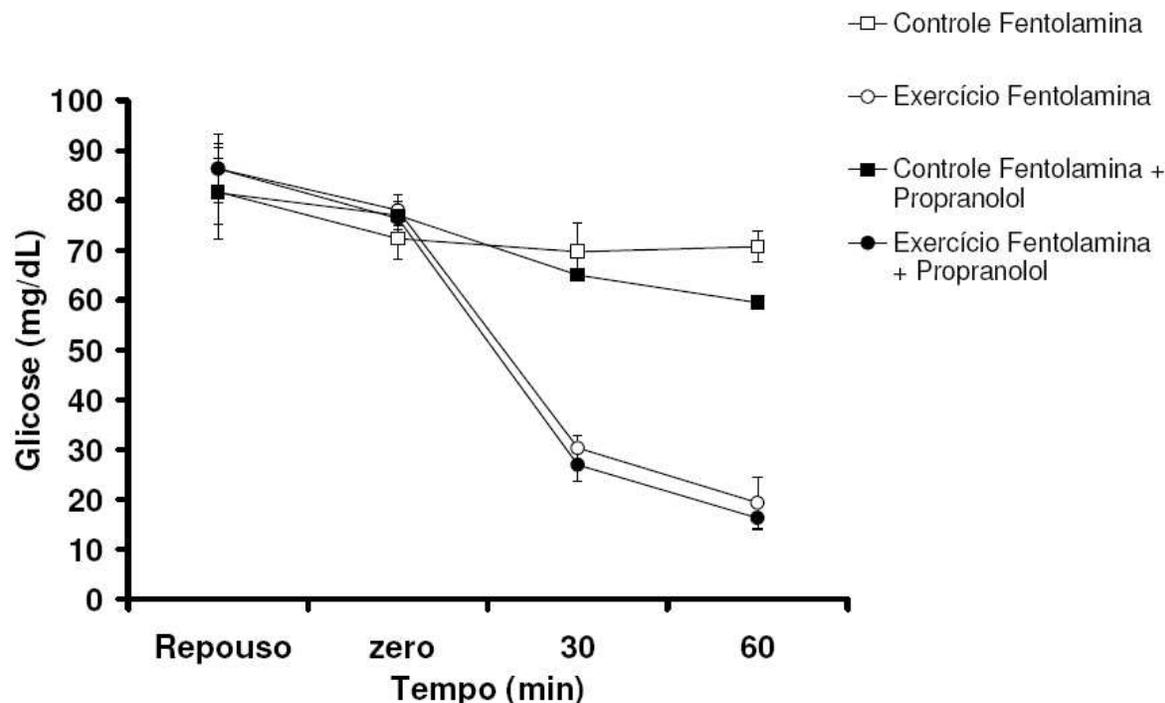


Figura 7. Comparação entre os valores de glicose dos grupos Controle Fentolamina, Controle Fentolamina, Exercício Fentolamina e Exercício Fentolamina + Propranolol, dosado na cauda do animal. Os animais dos grupos exercício, realizaram 1h de natação com peso equivalente a 2,5% do peso corporal do animal.

Controle Fentolamina 30 – Exercício Fentolamina 30 $p < 0,001$; Controle Fentolamina + Propranolol 30 – Exercício Fentolamina + Propranolol 30 $p < 0,001$; Controle Fentolamina 60 – Exercício Fentolamina 60 $p < 0,001$; Controle Fentolamina + Propranolol 60 – Exercício Fentolamina + Propranolol 60 $p < 0,001$;

Exercício Fentolamina zero – Exercício Fentolamina 30 e 60 $p < 0,001$; Exercício Fentolamina + Propranolol zero – Exercício Fentolamina + Propranolol 30 e 60 $p < 0,001$.

Com a confirmação do estado hipoglicêmico pelos valores apresentados acima, optamos por substituir a Fentolamina (antagonista α -não seletivo) pela Prazosina (antagonista α_1), assim poderíamos minimizar a interferência metabólica na resposta imunológica, pois o controle da secreção de insulina modulado por receptores α_2 seria restabelecido¹³⁴.

Com essas análises realizadas (**Fig. 8**), apenas foram confirmados os valores de glicemia no repouso e após o término do exercício (60 minutos) dos grupos PBS ($78,3 \pm 4,93$ mg/dL e $78,2 \pm 2,1$ mg/dL), Prazosina ($86,7 \pm 11,72$ mg/dL e $93,0 \pm 6,1$ mg/dL), Propranolol ($69,3 \pm 8,5$ mg/dL e $67,3 \pm 12,6$ mg/dL) e Prazosina + Propranolol ($72,0 \pm 3,61$ mg/dL e $77,0 \pm 7,5$ mg/dL). Não houve variações significativas na glicemia dos grupos analisados. Foram escolhidos dois tempos (repouso e 60 minutos), a fim de minimizar os efeitos que o estresse da coleta poderia causar aos animais, se fosse realizada uma curva. O lactato foi dosado após os 60 minutos de exercício conforme a Tabela 1, sendo que os valores confirmaram a realização de exercício moderado (com carga de 5%) pelos animais.

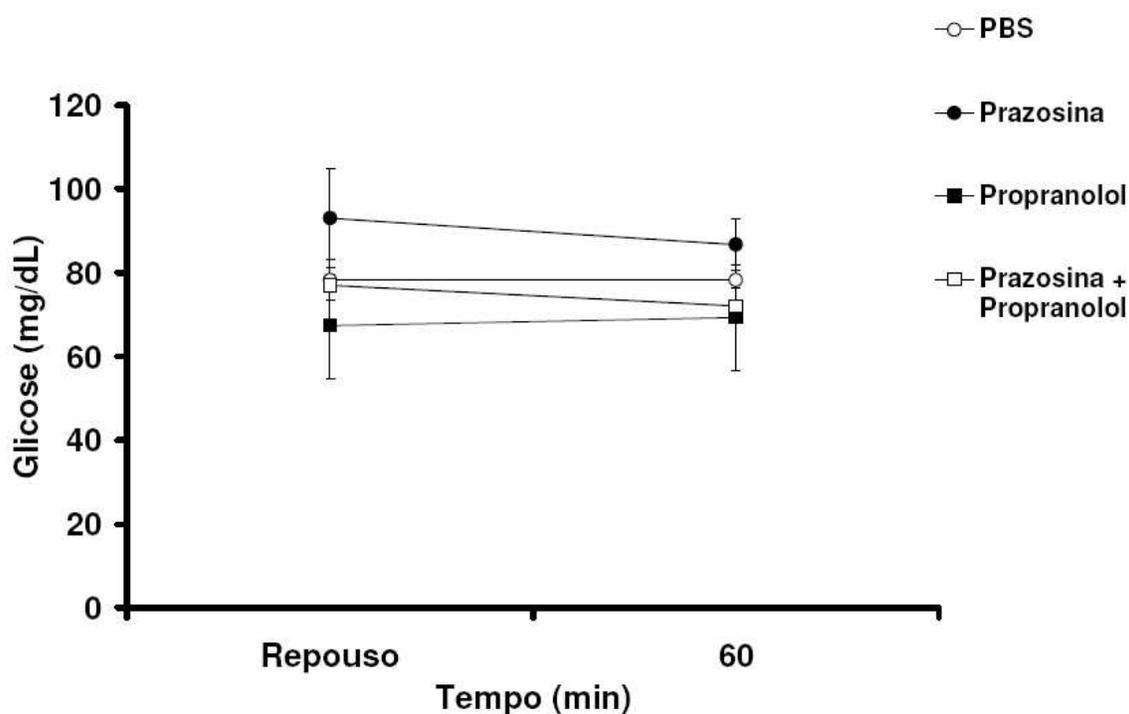


Figura 8. Comparação entre os valores de glicose dos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, dosado na cauda do animal. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal.

Prazosina 60 – Propranolol 60 $p < 0,05$.

<i>60 minutos de exercício</i>	<i>Lactato (mmol/l)</i>
PBS	$4,6 \pm 0,1$
Prazosina	$3,6 \pm 0,6$
Propranolol	$4,0 \pm 0,2$
Prazosina + Propranolol	$3,4 \pm 0,3$

Tabela 1. Dosagem de lactato após a realização de 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

5.2 Dosagem de triacilgliceróis

A atividade lipolítica, em humanos, é um fator que também está sujeito a uma regulação pela noradrenalina, via receptores α_2 e β - adrenérgicos¹³⁴. Dessa forma, seria esperado que um bloqueio α_2 pudesse resultar em um aumento de ácidos graxos livres e glicerol circulantes. A dosagem de triacilgliceróis foi realizada, apenas nos animais que receberam Fentolamina e Prazosina, observando-os durante o exercício com carga de 5%.

Foram analisados quatro momentos, no repouso, zero, 30 e 60 minutos, num mesmo modelo dos experimentos de glicose e lactato realizados anteriormente (**Fig. 9**). Nos primeiros trinta minutos de exercício o grupo Prazosina não apresentou variação significativa, de $107,3 \pm 11,2$ mg/dL para $108,3 \pm 11,6$ mg/dL, assim como o grupo Fentolamina que variou para $157,3 \pm 13,5$ mg/dL.

Após 60 minutos de natação, os animais que receberam Prazosina demonstraram um aumento significativo ($p < 0,01$) para $150,7 \pm 15,0$ mg/dL, com relação à medida anterior. Contudo, no grupo fentolamina, tanto entre zero e 60 minutos (de $139,3 \pm 6,7$ mg/dL para $209 \pm 13,7$ mg/dL), quanto entre 30 e 60 minutos, houve um aumento significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Ao realizar a comparação entre a aplicação dos fármacos Prazosina e Fentolamina, verificou-se que no tempo de 30 minutos de exercício, Prazosina apresentou valores inferiores ao de Fentolamina ($p < 0,01$), comportamento que foi acentuado após uma hora de natação com diferença de $150,7$ mg/dL \pm $15,0$ de Prazosina para $209,0$ mg/dL \pm $13,7$ do grupo Fentolamina ($p < 0,001$).

Os animais, aos quais foi administrada Fentolamina, já partiram de uma concentração de triglicerídeos mais elevada que os do grupo Prazosina, desde o repouso. Pois, na comparação entre os dois fármacos, houve valores aumentados no grupo Fentolamina, resultados que diferem do descrito na literatura¹³⁴. Justifica-se este resultado pelas diferentes épocas do ano que foram realizados os estudos, assim como pelo aumento do peso dos animais, apesar da faixa etária ter sido mantida de 3 a 4 meses.

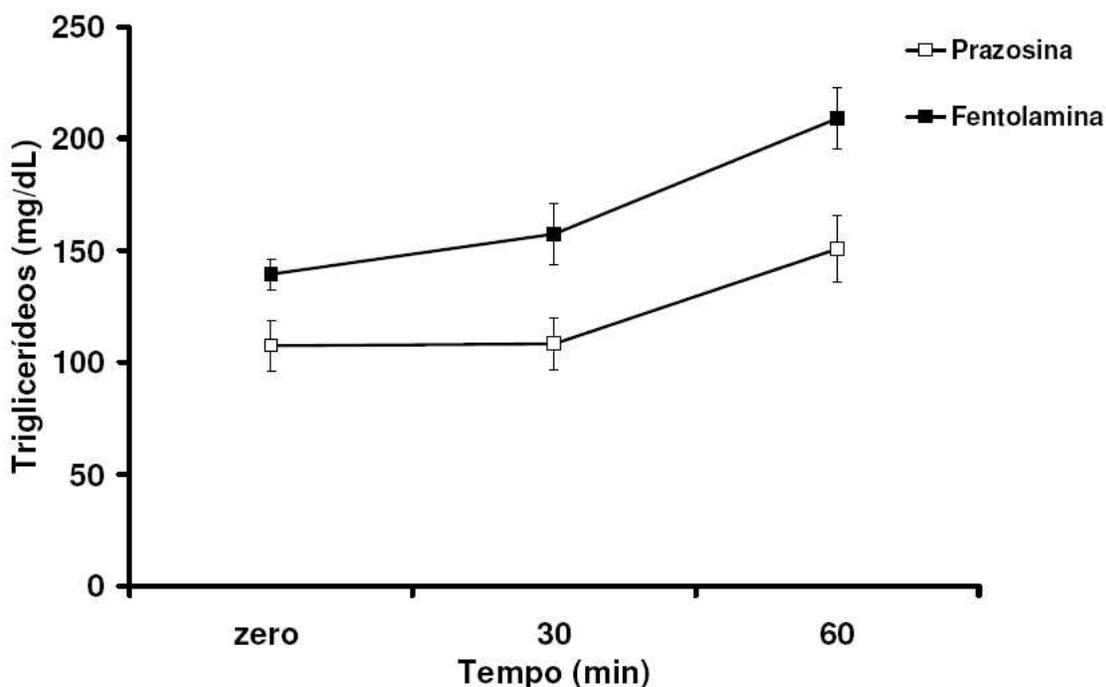


Figura 9. Comparação entre os valores de triglicerídeos dos grupos Exercício Fentolamina, Exercício Prazosina, dosado na cauda do animal. Os animais dos grupos exercício, realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal.

Prazosina zero – Prazosina 60 $p < 0,01$; Fentolamina zero – Fentolamina 60 $p < 0,001$; Fentolamina 30 – Fentolamina 60 $p < 0,01$; Fentolamina 30 – Prazosina 30 $p < 0,01$; Fentolamina 60 – Prazosina 60 $p < 0,001$.

5.3 Lipoperoxidação

No estudo realizado anteriormente por Silveira *et al.*, 2006, não foi observado aumento significativo na lipoperoxidação dos animais submetidos a uma sessão aguda exercício moderado durante uma hora. Contudo, nesses experimentos a produção de lipoperóxidos foi avaliada pela determinação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). No presente estudo, optamos por uma técnica mais sensível para a obtenção da dosagem de lipoperóxidos em amostras de plasma, o ensaio de xilenol laranja. Procedeu-se à coleta do sangue, após 60 minutos de natação, seguida à decapitação do animal e retirada do sangue em tubos heparinizados, que foram imediatamente centrifugados sob refrigeração, sendo armazenados segundo a metodologia descrita^{141,158}.

Entre os animais controles (**Fig.10**), com o corpo parcialmente submerso na água, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados os diferentes tratamentos PBS ($3,6 \pm 0,3$ nmol/mg proteína), Prazosina ($4,2 \pm 1,0$ nmol/mg proteína), Propranolol ($4,4$

$\pm 0,7$ nmol/mg proteína), Prazosina + Propranolol ($3,4 \pm 0,9$ nmol/mg proteína). No entanto, após 60 minutos de natação (**Fig. 10**) os animais do grupo Exercício PBS ($7,4 \pm 0,9$ nmol/mg proteína) apresentou um aumento de 105% ($p < 0,001$) quando comparado ao Controle PBS. Esse aumento não ocorreu nos demais grupos Exercício Prazosina ($5,4 \pm 0,1$ nmol/mg proteína), Propranolol ($4,0 \pm 0,5$ nmol/mg proteína), Prazosina + Propranolol ($4,1 \pm 0,01$ nmol/mg proteína) quando comparados aos seus respectivos controles. Resultado que pode sugerir uma participação da noradrenalina no aumento da lipoperoxidação, mas o aumento da disponibilidade de catecolaminas, induzida pelo exercício, aparentemente não modifica o comportamento dos grupos que receberam um bloqueio farmacológico.

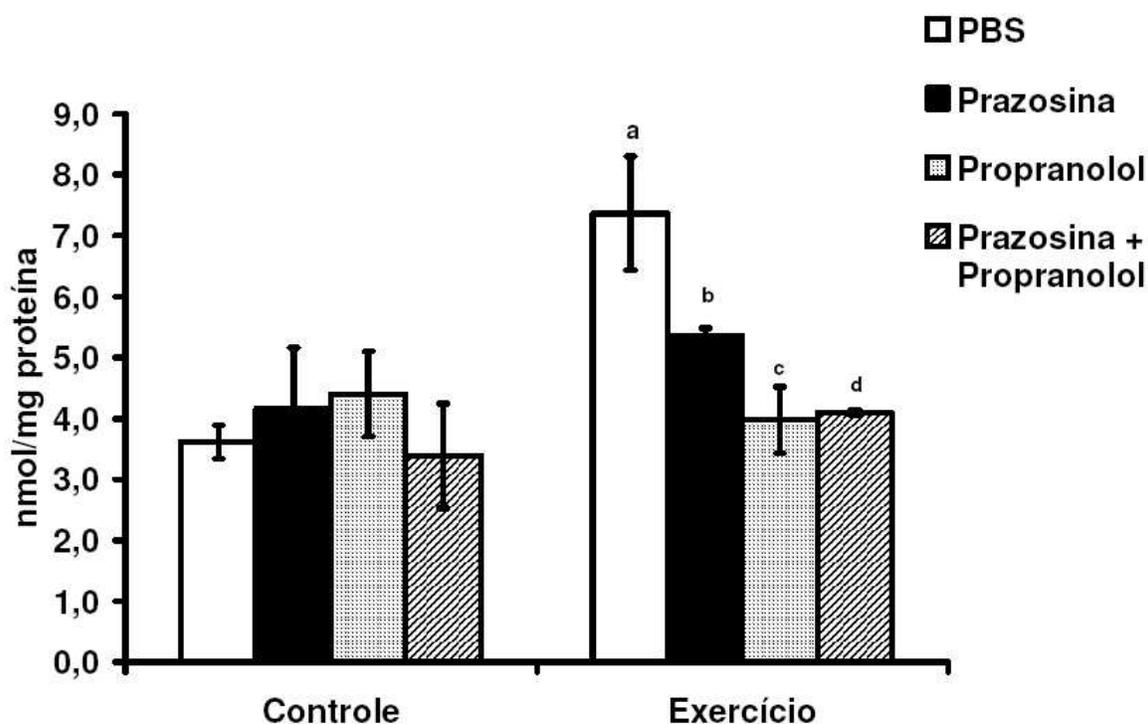


Figura 10. Dosagem de lipoperóxidos pela técnica de xilenol laranja nos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0.001$; b. $p < 0.05$; c. $p < 0.001$; d. $p < 0.001$

Devido ao aspecto metabólico diferenciado dos animais aos quais foi administrada fentolamina (α bloqueador não seletivo), também verificada a dosagem de lipoperóxidos para estabelecer uma comparação com o grupo ao qual foi administrada prazosina ($\alpha 1$ bloqueador). Sendo que os dados do PBS e Prazosina, tanto do controle quanto do

exercício, são semelhantes aos relatados acima (**Fig. 10**). O grupo Controle Fentolamina ($6,39 \pm 0,7$ nmol/mg proteína) obteve valores superiores ao Controle PBS e ao Controle Prazosina (**Fig.11**), demonstrando uma diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Esse comportamento é acentuado nos animais que realizam natação, com valores no grupo Fentolamina de $9,2 \pm 0,08$ nmol/mg proteína, superiores ao PBS que foi de $7,4 \pm 0,9$ nmol/mg proteína ($p < 0,05$) e ao Prazosina de $5,4 \pm 0,1$ nmol/mg proteína ($p < 0,001$). Os dados sugerem que um bloqueio α não seletivo pode aumentar o processo de lipoperoxidação apenas pela aplicação do fármaco, sendo acentuados no exercício com elevação do aporte de catecolaminas. Cabe salientar que esses animais possuem uma hipoglicemia acentuada e valores de lactato elevados, que modificam o estado metabólico do animal que pode estar sujeito a uma situação de pseudo-hipóxia nessas circunstâncias.

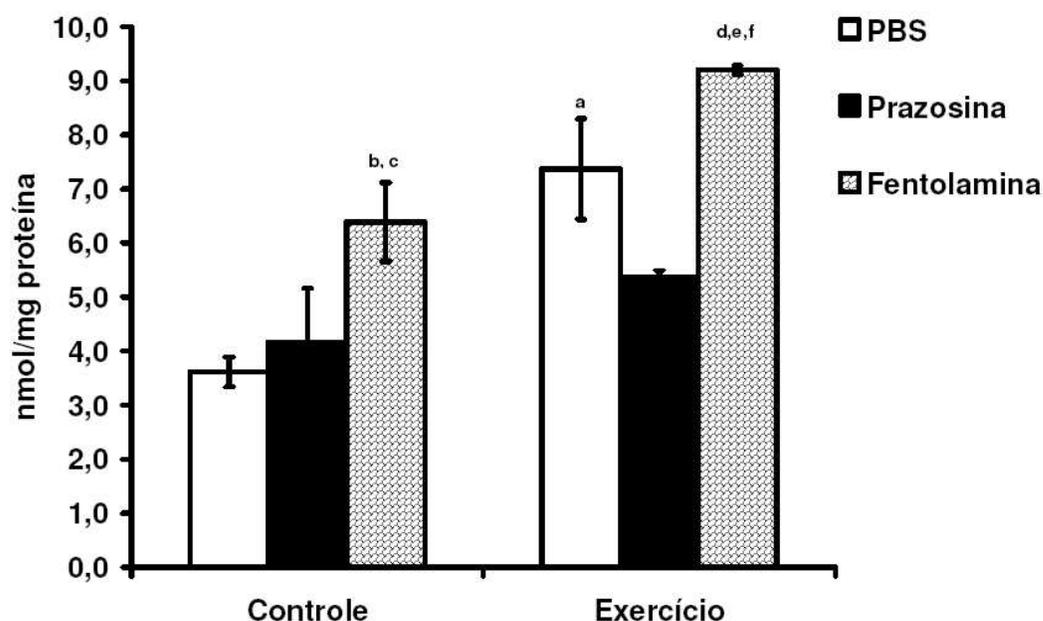


Figura 11. Dosagem de lipoperóxidos pela técnica de xilenol laranja nos grupos PBS, Prazosina e Fentolamina tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal.

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,01$; c. $p < 0,05$; d. $p < 0,01$; e. $p < 0,05$; f. $p < 0,001$.

5.4 Dosagem da relação GSSG/ GSH

O exercício moderado é capaz de desencadear uma resposta inflamatória através da ativação do fator nuclear NF κ B, um fator de transcrição responsável pela produção de

mediadores inflamatórios, como o TNF- α . Resultados prévios de nosso laboratório ⁹ mostraram que sessões agudas de exercício moderado, não induzem estresse oxidativo sistêmico, que seria uma forma de ativação do NF κ B. Por isso, o exercício necessariamente pode disparar outra via de regulação do NF κ B que poderia modular a resposta inflamatória. Assim, consideramos a possibilidade de que fatores neuroendócrinos (como catecolaminas) pudessem estar envolvidos nesse mecanismo ⁹.

Em nossos estudos, costumeiramente avaliamos o estado redox sistêmico através da determinação dos conteúdos intracelulares de GSH e GSSG em eritrócitos circulantes, uma vez que estas células transitam por todos os territórios e seu balanço redox reflete o balanço do estado redox sistêmico, reagindo com substância redox-ativas em todos os territórios do organismo ^{159,160 160}.

Para tanto, foi realizada a análise do estado redox sistêmico nos mesmos grupos PBS, Prazosina, Propranolol e Prazosina + Propranolol, do controle e do grupo que fez natação por uma hora, a fim de confirmar se não haveria estresse oxidativo.

Na dosagem de glutathiona total (**Fig.12**), os grupos Controle Prazosina ($2,8 \pm 0,12$ nmol/mL de sangue) e Controle Prazosina + Propranolol ($5,3 \pm 0,04$ nmol/mL de sangue) aumentaram de 75% e 231% respectivamente ($p < 0,001$), em comparação ao o grupo Controle PBS ($1,6 \pm 0,12$ nmol/mL de sangue). Apenas o Controle Propranolol com $1,4 \pm 0,11$ nmol/mL de sangue não apresentou variação com relação ao Controle PBS.

Para o mesmo parâmetro, o grupo Exercício PBS ($3,5 \pm 0,15$ nmol/mL de sangue) apresentou um valor significativamente maior ($p < 0,001$) quando comparado aos grupos exercício Prazosina ($2,1 \pm 0,16$ nmol/mL de sangue), Propranolol ($1,0 \pm 0,07$ nmol/mL de sangue) e Prazosina + Propranolol ($1,9 \pm 0,19$ nmol/mL de sangue).

Dos animais que nadaram, apenas grupo Exercício PBS apresentou um aumento com relação ao seu controle ($p < 0,001$), pois tanto Exercício Prazosina ($p < 0,001$), quanto Exercício Propranolol ($p < 0,05$) e Exercício Prazosina + Propranolol ($p < 0,001$) tiveram os valores de glutathiona total diminuídos, em comparação com seus respectivos controles.

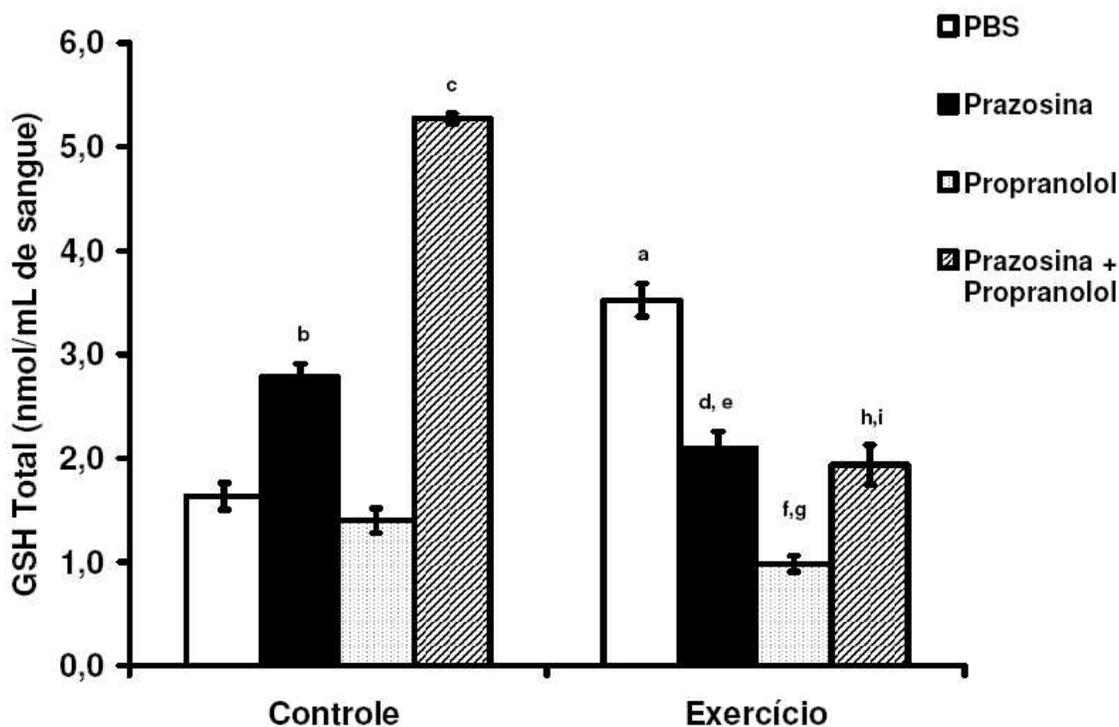


Figura 12. Dosagem do conteúdo de Glutationa Total nos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$; d. $p < 0,001$; e. $p < 0,001$; f. $p < 0,001$; g. $p < 0,05$; h. $p < 0,001$; i. $p < 0,001$.

Para a correta análise do estado redox sistêmico avaliamos as frações da glutaciona total, para estabelecer uma relação entre o dissulfeto de glutaciona (GSSG) e o conteúdo de glutaciona reduzida (GSH).

Quanto ao conteúdo de GSSG (**Fig.13**) os grupos controle Prazosina ($0,44 \pm 0,01$ nmol/mL de sangue) e Propranolol ($0,36 \pm 0,03$ nmol/mL de sangue) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando comparado ao grupo Controle PBS ($0,19 \pm 0,05$ nmol/mL de sangue). Apenas o grupo Prazosina + Propranolol ($0,28 \pm 0,02$ nmol/mL de sangue) não obteve diferença significativa em relação ao Controle PBS.

O mesmo aspecto foi observado nos animais que nadaram pois os grupos Prazosina ($0,4 \pm 0,04$ nmol/mL de sangue), Propranolol ($0,37 \pm 0,05$ nmol/mL de sangue) e Prazosina + Propranolol ($0,27 \pm 0,05$ nmol/mL de sangue) não tiveram variação com relação aos valores dos respectivos grupos controle. Somente o grupo Exercício PBS ($0,51$

$\pm 0,03$ nmol/mL de sangue) apresentou um aumento com relação ao seu controle ($p < 0,001$), assim como também obteve valores maiores com relação aos demais grupos exercitados com diferença significativa de $p < 0,05$ para Propranolol e $p < 0,001$ pra Prazosina + Propranolol.

Esses dados demonstram que a simples aplicação intraperitoneal do fármaco pode induzir uma variação nos valores de GSSG, independentemente da concentração de catecolaminas circulantes.

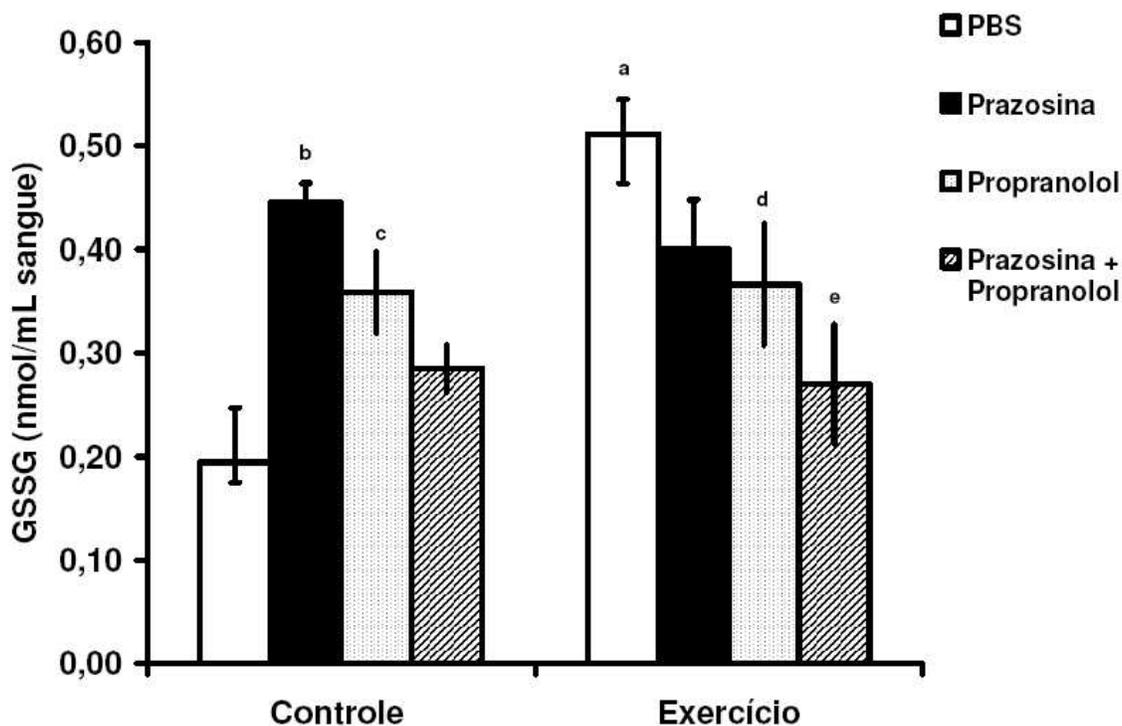


Figura 13. Dosagem do conteúdo de dissulfeto de Glutaciona nos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$.

Os valores de glutaciona reduzida (GSH), são obtidos através de um cálculo da glutaciona total e do dissulfeto de glutaciona (conforme descrito na sessão de métodos), e quando estabelecida uma proporção com GSSG pode ser inferido o estado redox, já que a relação GSSG/GSH é considerada índice do estado redox intracelular^{138,161} (Fig.14). O grupo Controle Prazosina ($1,6 \pm 0,07$ nmol/mL de sangue) e o grupo Prazosina + Propranolol ($4,5 \pm 0,17$ nmol/mL de sangue) tiveram um aumento significativo ($p < 0,01$ e

$p < 0,001$) quando comparados ao Controle PBS ($1,3 \pm 0,02$ nmol/mL de sangue). Apenas o grupo Controle Propranolol teve uma diminuição em seus valores se comparado ao PBS ($p < 0,001$). O valor de GSH do grupo com bloqueio α e β aumentou 2,8 vezes com relação ao controle PBS, fato que explica os níveis aumentados do conteúdo de glutathiona total demonstrados na **Fig. 9**.

Apenas o grupo Exercício PBS ($2,4 \pm 0,09$ nmol/mL de sangue) aumentou em 84% o conteúdo de glutathiona reduzida comparado ao seu controle ($p < 0,001$). Os demais grupos Exercício Prazosina ($1,3 \pm 0,09$ nmol/mL de sangue; $p < 0,05$), Exercício Propranolol ($0,24 \pm 0,06$ nmol/mL de sangue; $p < 0,01$) e Exercício Prazosina + Propranolol ($1,3 \pm 0,07$ nmol/mL de sangue; $p < 0,001$) demonstraram valores menores que seus controles, assim como com relação ao Exercício PBS ($p < 0,001$).

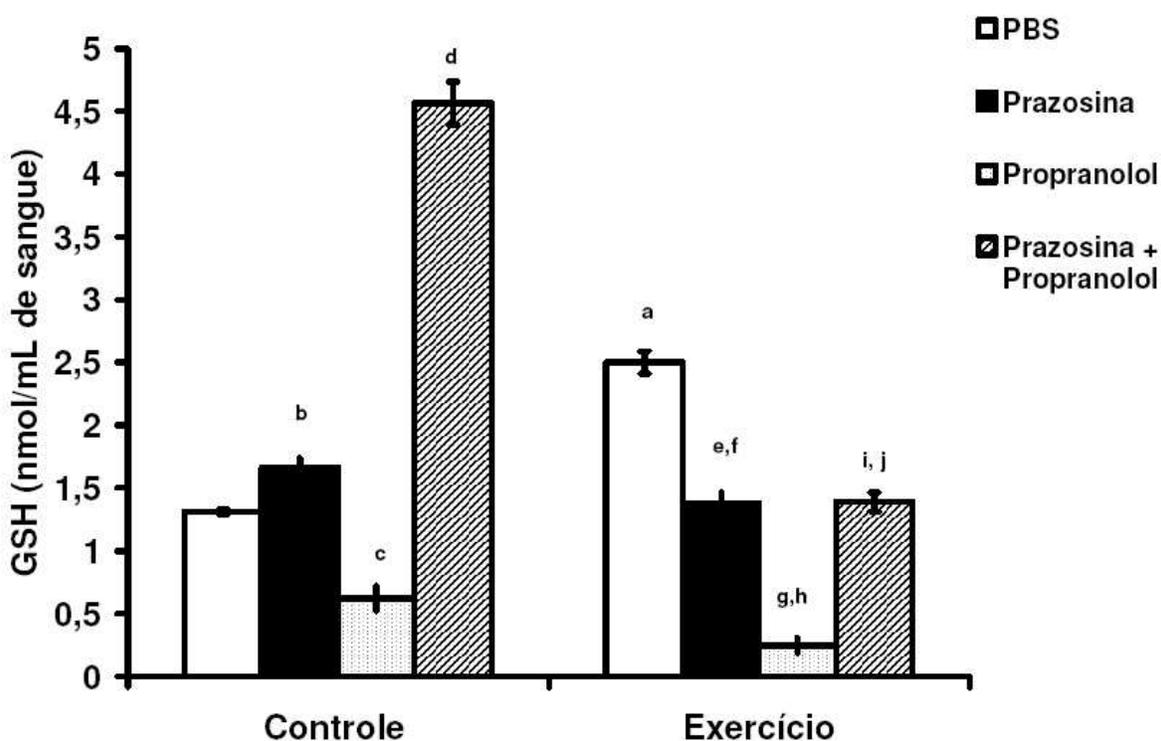


Figura 14. Dosagem do conteúdo de Glutathiona reduzida, obtida pela subtração dos valores de dissulfeto de glutathiona da glutathiona total, nos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,01$; c. $p < 0,001$; d. $p < 0,001$; e. $p < 0,05$; f. $p < 0,001$; g. $p < 0,01$; h. $p < 0,001$; i. $p < 0,001$; j. $p < 0,001$.

A relação de GSSG/ GSH (**Fig.15**) representa o estado redox celular, no qual o aumento do potencial oxidante é representado por valores aumentados na relação. O grupo Controle Propranolol ($0,63 \pm 0,12$ u.a; $p < 0,001$) foi o único que apresentou um valor aumentado com relação ao Controle PBS ($0,12 \pm 0,05$ u.a; $p < 0,001$), assim como com o grupo Exercício Propranolol. O comportamento se repete no grupo Exercício Propranolol ($1,22 \pm 0,22$) quando comparado com Exercício PBS ($0,23 \pm 0,05$ u.a; $p < 0,001$).

Os grupos Controle Prazosina ($0,29 \pm 0,09$ u.a) e Controle Prazosina + Propranolol ($0,08 \pm 0,03$ u.a) não apresentaram diferença significativa nem quanto ao Controle PBS, nem quando comparados aos grupos Exercício Prazosina ($0,26 \pm 0,02$ u.a) e Exercício Prazosina + Propranolol ($0,2 \pm 0,02$ u.a).

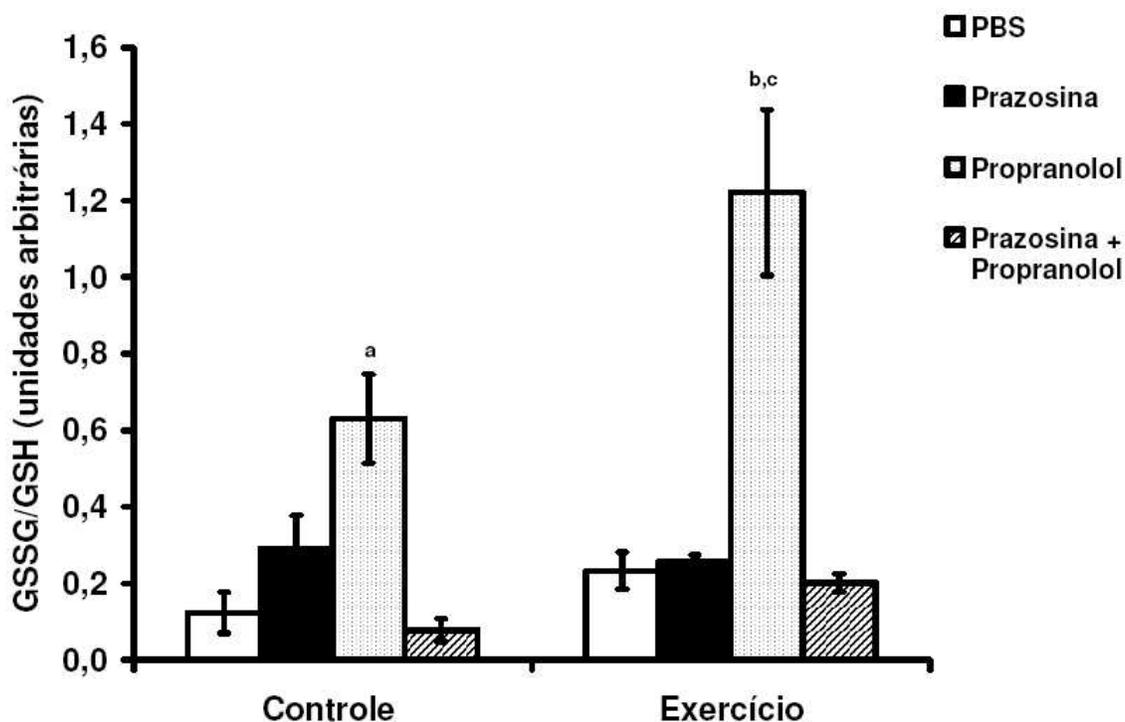


Figura 15. Relação dissulfeto de Glutathione e Glutathione (GSSG/GSH) nos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$.

Os mesmos parâmetros também foram analisados nos animais aos quais foi administrada Fentolamina, a fim de realizar a comparação com o grupo PBS e com Prazosina, e observar se há variação no estado redox quando ocorre um bloqueio α não seletivo.

Quanto ao conteúdo de glutatona total (**Fig.16**) o Controle Fentolamina ($2,7 \pm 0,19$ nmol/mL de sangue) apresentou valores superiores ao Controle PBS ($1,6 \pm 0,12$ nmol/mL de sangue, com $p < 0,001$), no entanto os animais que foram submetidos ao exercício de uma hora de natação e receberam Fentolamina ($1,98 \pm 0,27$ nmol/mL de sangue) tiveram seu conteúdo de glutatona total reduzido se comparados ao seu controle ($p < 0,01$).

O grupo Controle Fentolamina e Exercício Fentolamina não apresentaram diferença significativa em relação ao Controle Prazosina ($2,7 \pm 0,12$ nmol/mL de sangue) e Exercício Prazosina ($2,1 \pm 0,16$ nmol/mL de sangue) demonstrando um comportamento semelhante.

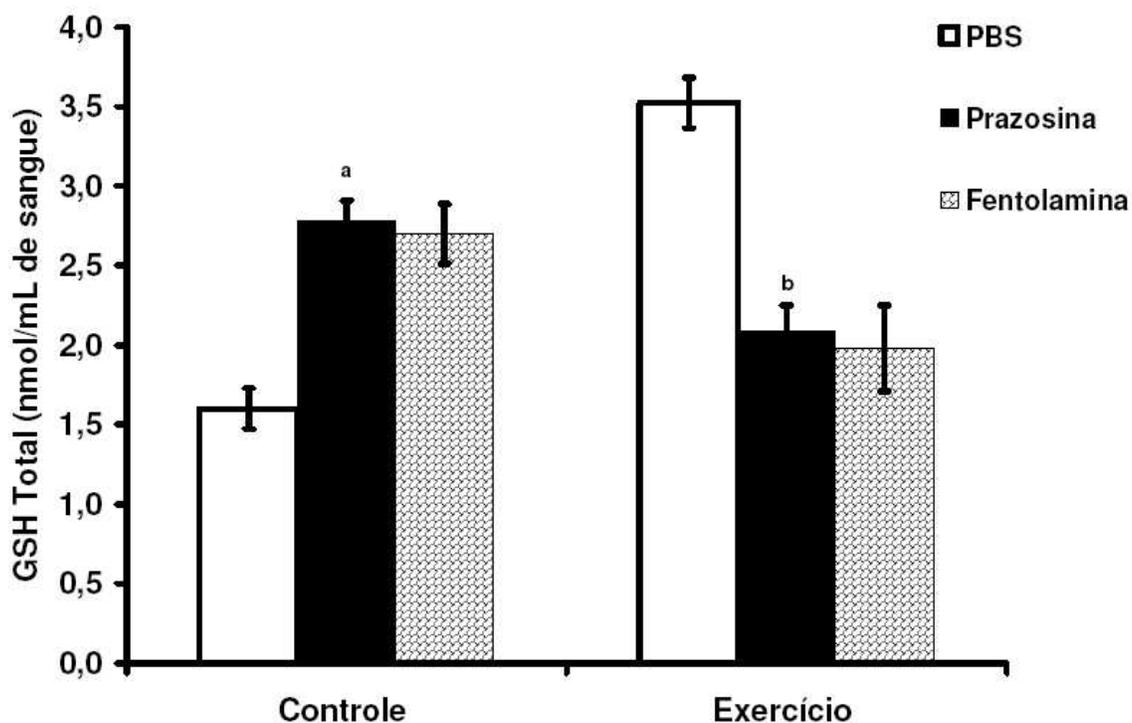


Figura 16. Dosagem do conteúdo de Glutaciona Total nos grupos PBS, Prazosina, Fentolamina, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,01$.

Quanto ao dissulfeto de glutathione (GSSG, **Fig.17**) o Controle Fentolamina ($0,54 \pm 0,078$ nmol/mL de sangue) apresentou-se 2,8 vezes maior que o Controle PBS ($0,19 \pm 0,05$ nmol/mL de sangue), mas quando comparado com o Exercício Fentolamina ($0,392 \pm 0,089$ nmol/mL de sangue) não apresentou diferença significativa. Da mesma forma que Controle Fentolamina e Exercício Fentolamina variação com relação ao Controle Prazosina ($0,44 \pm 0,01$ nmol/mL de sangue) e Exercício Prazosina ($0,4 \pm 0,04$ nmol/mL de sangue), respectivamente.

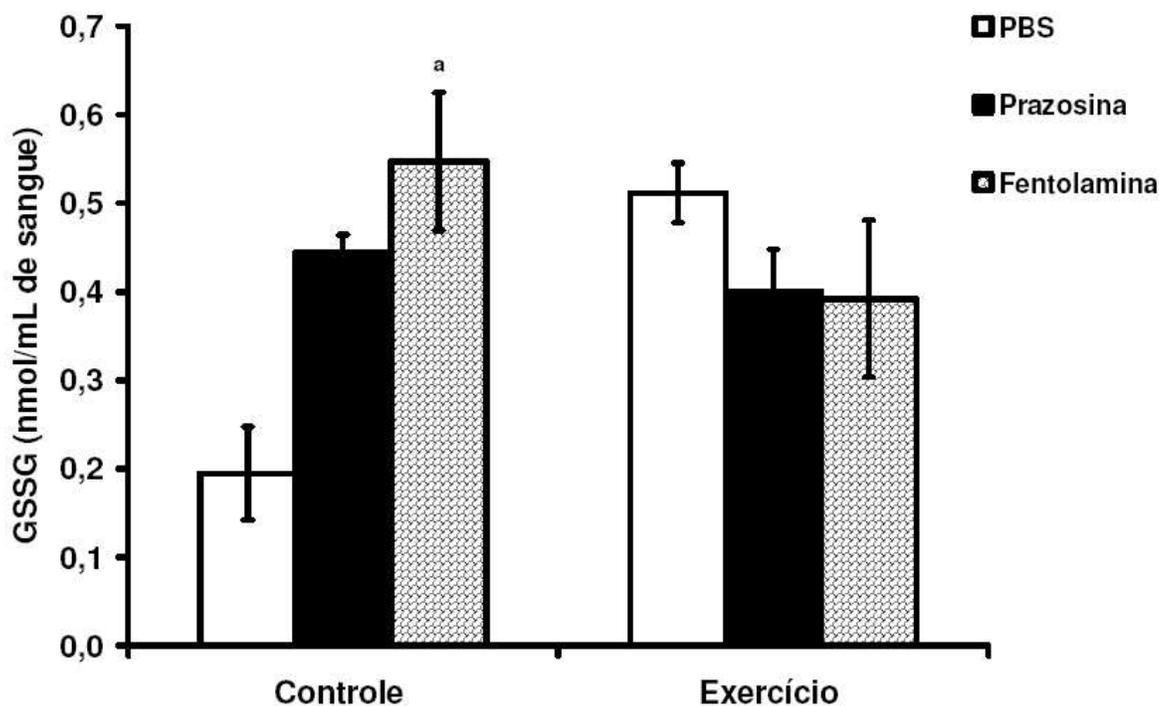


Figura 17. Dosagem do conteúdo de dissulfeto de Glutathione nos grupos PBS, Prazosina, Fentolamina tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal.

a. $p < 0,001$.

Os valores de glutathione reduzida (**Fig.18**) no grupo Controle Fentolamina ($1,72 \pm 0,12$ nmol/mL de sangue) foram superiores aos do Controle PBS ($p < 0,05$), no entanto o Exercício Fentolamina apresentou uma diminuição para $1,19 \pm 0,23$ nmol/mL de sangue se comparados ao controle ($p < 0,01$). Os grupos Fentolamina não apresentaram diferença significativa nos valores nem quanto ao Controle Prazosina ($1,66 \pm 0,07$ nmol/mL de

sangue) nem quanto ao Exercício Prazosina ($1,37 \pm 0,09$ nmol/mL de sangue), respectivamente.

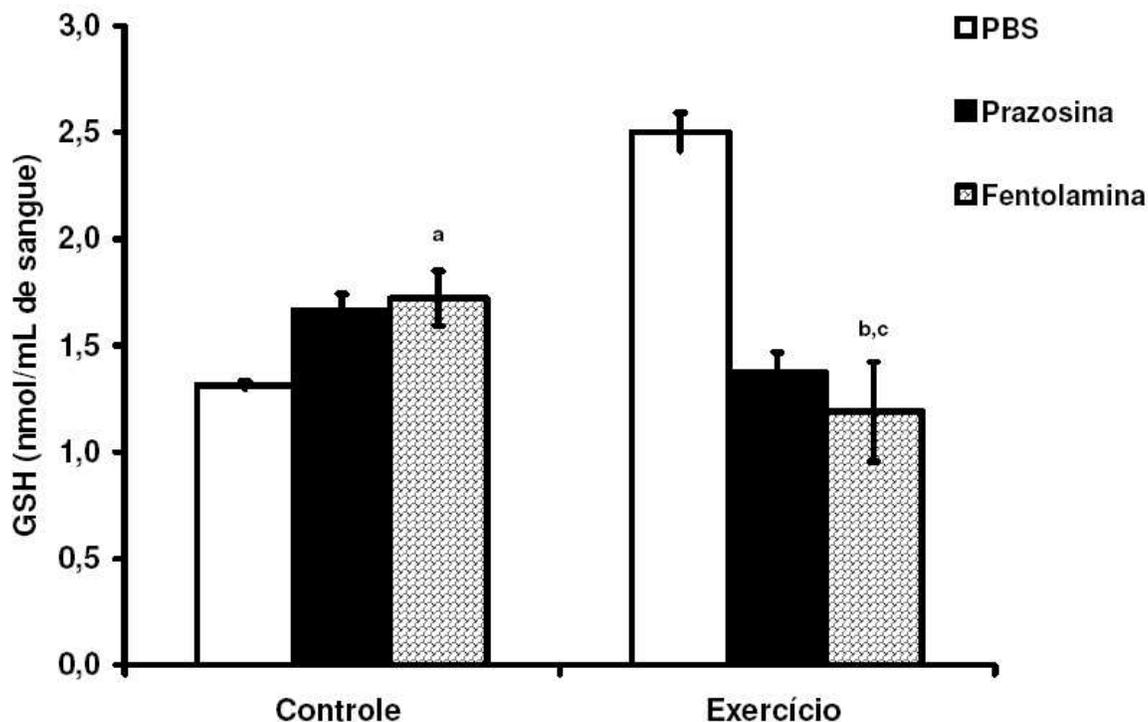


Figura 18. Dosagem do conteúdo de Glutaciona reduzida, obtida pela subtração dos valores de dissulfeto de glutaciona da glutaciona total, nos grupos PBS, Prazosina, Fentolamina tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,05$; b. $p < 0,01$; c. $p < 0,001$.

Na relação GSSG/GSH (**Fig.19**), apenas o Controle Fentolamina ($0,31 \pm 0,06$ u.a.) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) com relação ao Controle PBS ($0,12 \pm 0,05$ u.a.). Não houve diferença na comparação entre o grupo Exercício Fentolamina ($0,33 \pm 0,1$ u.a.) e Exercício Prazosina ($0,25 \pm 0,01$ u.a.). Demonstrando que um bloqueio α adrenérgico não interfere no estado redox sistêmico durante a realização de uma sessão de exercício moderado.

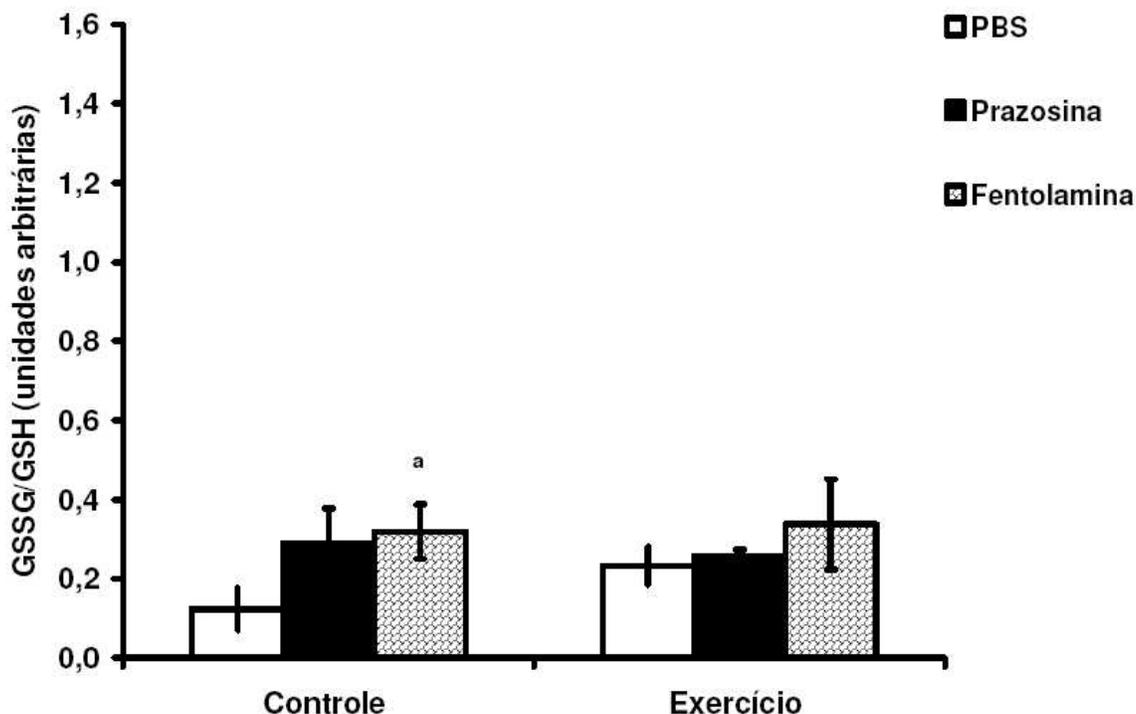


Figura 19. Relação dissulfeto de Glutathione e Glutathione (GSSG/GSH) nos grupos PBS, Prazosina, Fentolamina tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,05$.

5.5 Fagocitose de zimosan

Como já mencionado anteriormente, uma sessão de exercício físico moderado pode promover um incremento da resposta imunológica de células como monócitos/macrófagos, que pode ser verificada pela atividade fagocítica dessa célula^{9,154}.

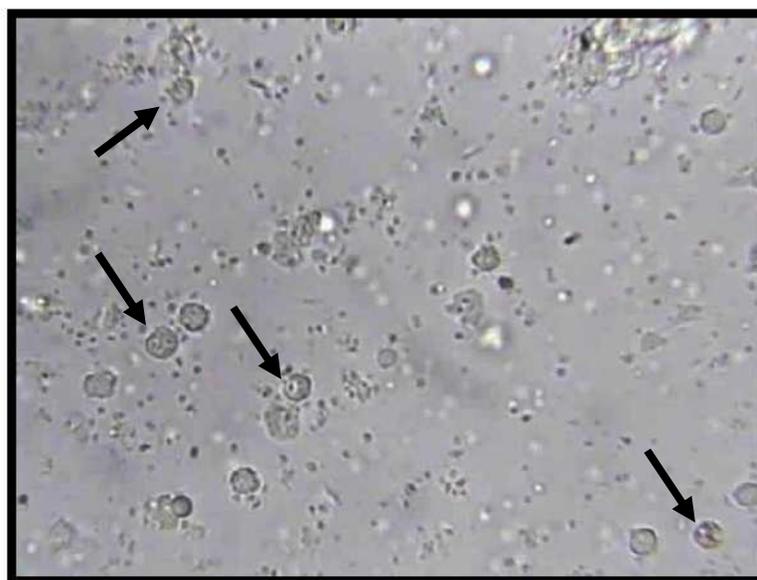
A fagocitose de zimosan é uma técnica na qual é contabilizada a quantidade total de partículas (em porcentagem) de *Saccharomyces cerevisiae* (opsonizadas com soro do próprio rato) que podem ser engolfadas pelos monócitos/macrófagos durante o ensaio (**Fig. 20 A**). Os animais foram decapitados imediatamente após o término do exercício, sendo o sangue separado com histopaque para obtenção de células mononucleares. O grupo Exercício PBS ($39,3 \pm 1,2\%$) quando comparado com o grupo Controle PBS ($25,3 \pm 3,5\%$)

demonstrou valores aumentados ($p < 0,01$, **Fig. 20B**), mesmo resultado obtido em Silveira *et al.*, 2006.

Os grupos controle Prazosina ($59,3 \pm 4,2\%$) e Prazosina + Propranolol ($45,7 \pm 5,1\%$) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) na atividade fagocítica de monócitos/macrófagos quando comparados ao Controle PBS. No entanto, não houve diferença significativa entre Controle PBS ($25,3 \pm 3,5\%$) e Controle Propranolol ($29,7 \pm 1,5\%$).

Nos grupos que realizaram exercício quando comparados PBS ($39,3 \pm 1,2\%$) com Prazosina ($49,3 \pm 4,7\%$) e com Propranolol ($38,7 \pm 2,5\%$) não há diferença significativa entre esses grupos ($p > 0,05$). O grupo exercício Prazosina + Propranolol ($56,3 \pm 4,2\%$) apresentou um aumento significativo com relação ao Exercício PBS ($p < 0,001$).

Os resultados de um bloqueio α_1 demonstraram claramente uma ativação da capacidade fagocítica de monócitos/macrófagos, mesmo sem a realização de exercício. O grupo Exercício Prazosina + Propranolol ($56,3 \pm 4,2\%$) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) com relação ao respectivo grupo controle, apresentando um comportamento semelhante ao do bloqueio α_1 apenas. Não houve diferença significativa entre os grupos Exercício Prazosina e Exercício Propranolol e seus respectivos grupos controle.

A

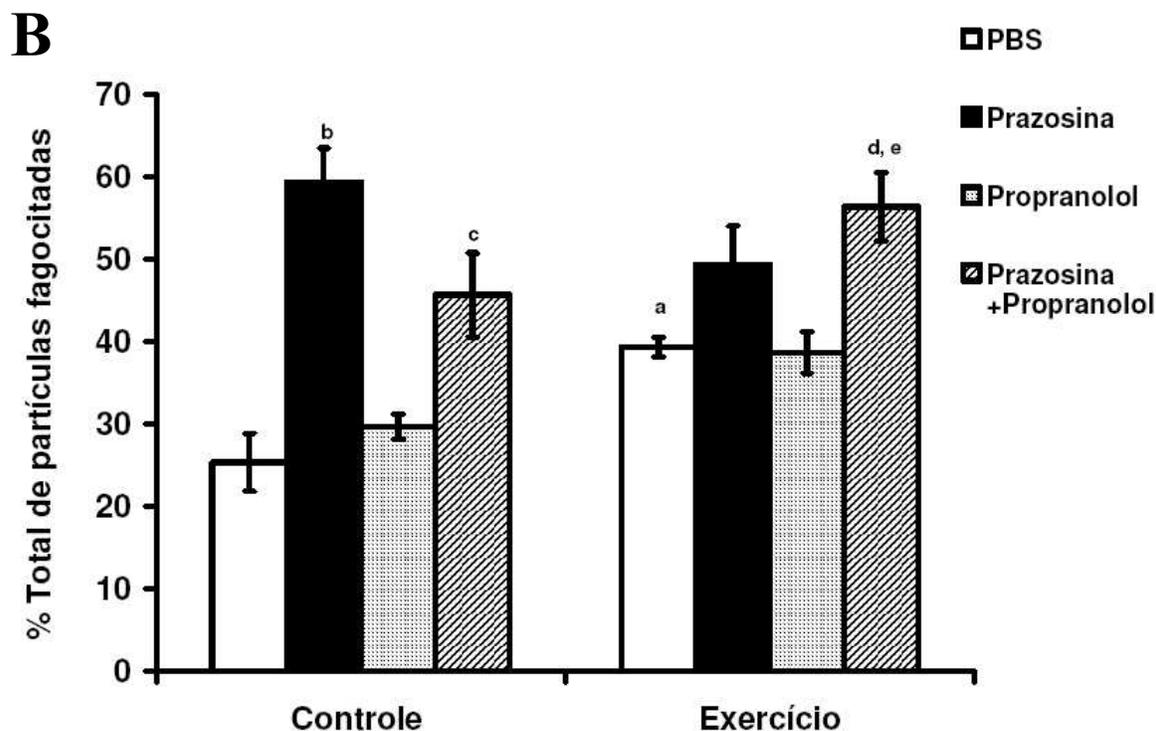


Figura 20. Valores de fagocitose de zimosan dos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal. (A) Microscopia (aumento de 400X) demonstrando macrófago contendo partículas fagocitadas sem coloração. (B) Histograma demonstrando em porcentagem a quantidade total de partículas fagocitadas.

a. $p < 0,01$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$; d. $p < 0,001$; e. $p < 0,05$.

Também foi analisada a capacidade fagocítica de monócitos/macrófagos em animais com bloqueio α não seletivo, com fentolamina (**Fig.21**), lembrando que esse fármaco causa intensas modificações metabólicas na manutenção da glicemia, como demonstrado anteriormente.

O grupo Controle Fentolamina ($35,3 \pm 1,2\%$) demonstrou um leve aumento com relação ao Controle PBS ($29,2 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$). Quanto aos demais grupos Controle Propranolol ($28,6 \pm 1,1\%$) e Controle Fentolamina + Propranolol ($31,4 \pm 1,8\%$) não houve diferença significativa quando comparados ao PBS.

Dentre as amostras do grupo exercício, houve um aumento significativo apenas no grupo Exercício Propranolol ($41,0 \pm 1,1\%$) com relação ao grupo Exercício PBS ($34,4 \pm$

1,7%), da mesma forma como nos dados anteriores. Os demais grupos exercício Fentolamina ($38,4 \pm 1,2\%$) e Exercício Fentolamina + Propranolol ($30,8 \pm 4,2\%$) não houve diferença significativa.

Apesar de um aumento na fagocitose observado nos grupos Fentolamina, esse é muito menos expressivo que o representado pelo bloqueio α_1 seletivo da Prazosina.

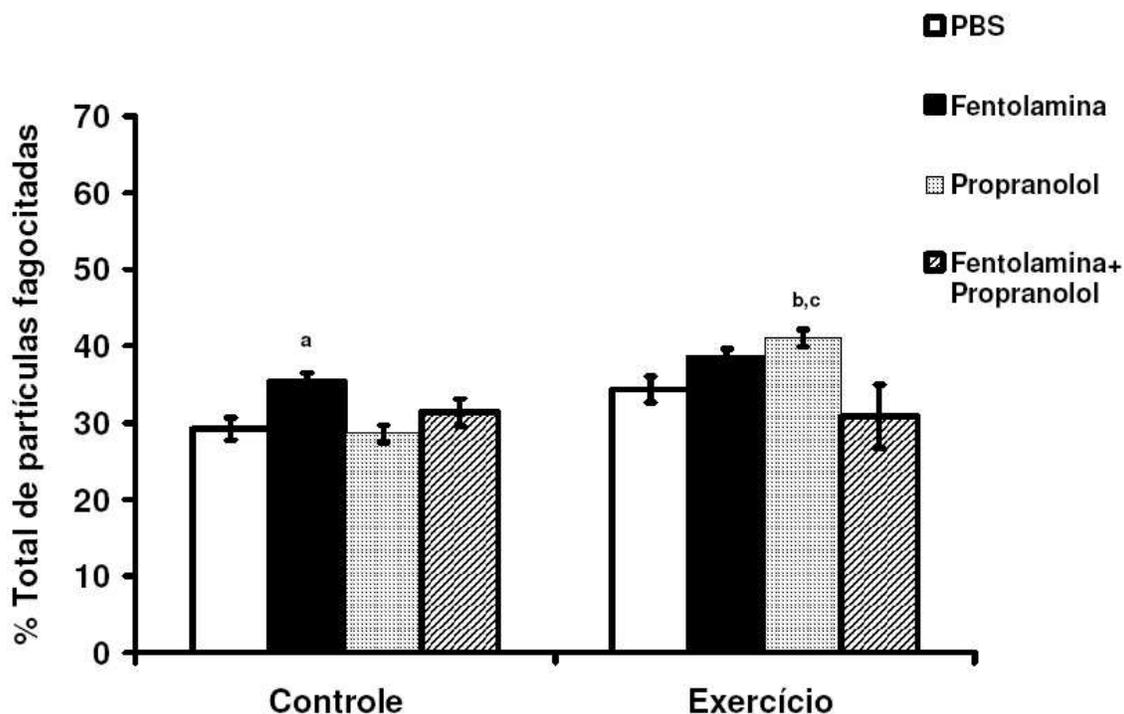


Figura 21. Valores de fagocitose de zimosan dos grupos PBS, Fentolamina, Propranolol, Fentolamina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,05$; b. $p < 0,05$; c. $p < 0,001$.

5.6 Produção de nitritos por monócitos/macrófagos

Outro fato que poderia confirmar a ativação da resposta imunológica de monócitos/macrófagos é dado pela análise da produção de óxido nítrico que pode ser inferida pela concentração de nitritos em meio de cultura com macrófagos. Foram realizadas dosagens de produção espontânea de nitritos por uma hora de macrófagos em meio HBSS (Fig.22). O grupo Controle Prazosina ($1,06 \pm 0,23 \text{ nmol} / 10^5$) apresentou um aumento expressivo ($p < 0,001$) com relação ao Controle PBS ($0,24 \pm 0,02 \text{ nmol} / 10^5$).

Tanto o grupo Controle Propranolol ($0,25 \pm 0,06 \text{ nmol} / 10^5$) quanto o Controle Prazosina + Propranolol ($0,45 \pm 0,03 \text{ nmol} / 10^5$) não demonstraram variação se comparados ao grupo Controle PBS.

O grupo Exercício PBS ($1,27 \pm 0,07 \text{ nmol} / 10^5$) apresentou valores aumentados (com, $p < 0,001$), para com o grupo Controle PBS, Exercício Prazosina ($0,59 \pm 0,09 \text{ nmol} / 10^5$), Exercício Propranolol ($0,17 \pm 0,04 \text{ nmol} / 10^5$), Exercício Prazosina + Propranolol ($0,22 \pm 0,04 \text{ nmol} / 10^5$). Apenas o grupo Controle Prazosina apresentou uma diminuição com relação ao seu respectivo grupo Exercício ($p < 0,001$).

Assim, como na avaliação da capacidade fagocítica, o grupo com bloqueio α_1 seletivo da Prazosina, demonstrou um aumento da produção de nitritos, independente da realização de exercício.

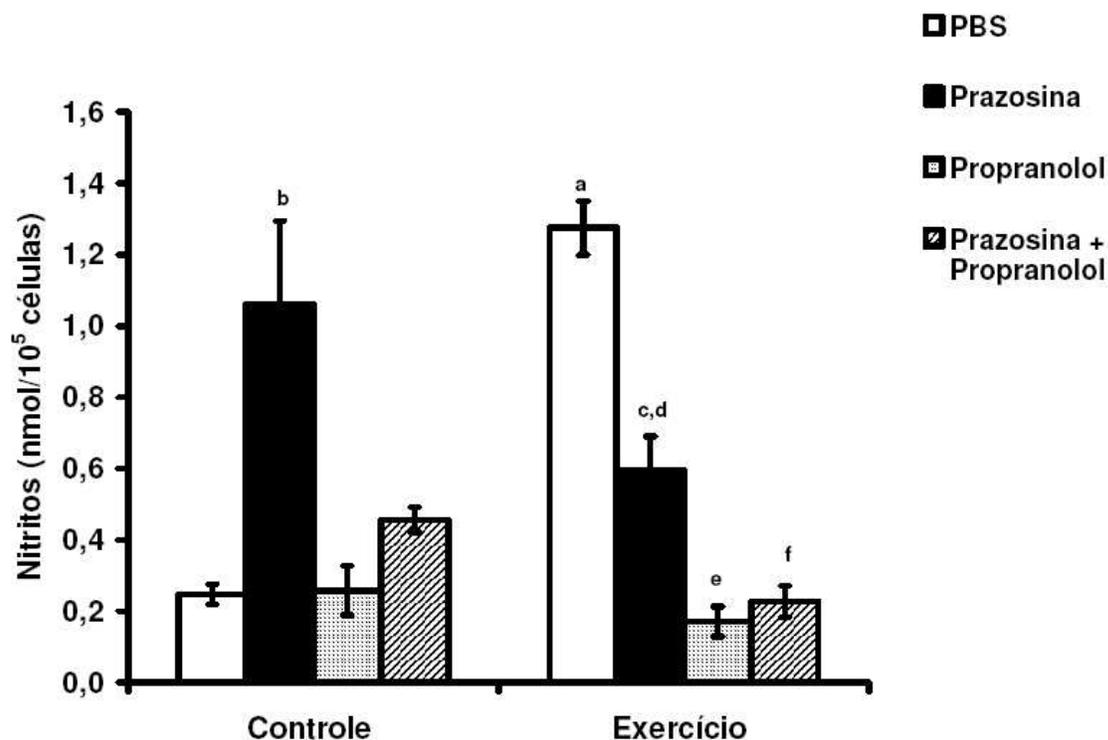


Figura 22. Dosagem da produção de nitritos por macrófagos pelos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal.

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$; d. $p < 0,001$; e. $p < 0,001$; f. $p < 0,001$.

Analisamos a produção de nitritos nos grupos com bloqueio α não seletivo da Fentolamina, para verificar uma possível alteração (**Fig.23**).

Os animais controle PBS ($0,23 \pm 0,06$ nmol / 10^5), Fentolamina ($0,29 \pm 0,03$ nmol / 10^5), Propranolol ($0,30 \pm 0,06$ nmol / 10^5) e Fentolamina + Propranolol ($0,10 \pm 0,002$ nmol / 10^5) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados seus valores. O grupo Exercício PBS ($0,76 \pm 0,07$ nmol / 10^5) apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) na produção de nitritos quando comparada ao grupo Controle PBS. Que não demonstrou ser tão expressa como no dado anterior, apesar das mesmas condições experimentais. Com relação aos grupos exercício houve diferença significativa entre Exercício PBS e Exercício Propranolol ($0,27 \pm 0,02$ nmol / 10^5).

Os grupos Exercício Fentolamina ($0,61 \pm 0,09$ nmol / 10^5) e Fentolamina + Propranolol ($0,68 \pm 0,06$ nmol / 10^5) não demonstraram alterações em comparação com o Exercício PBS. Tanto o grupo Exercício Fentolamina quando Exercício Fentolamina + Propranolol apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) se comparados aos seus respectivos grupos controle.

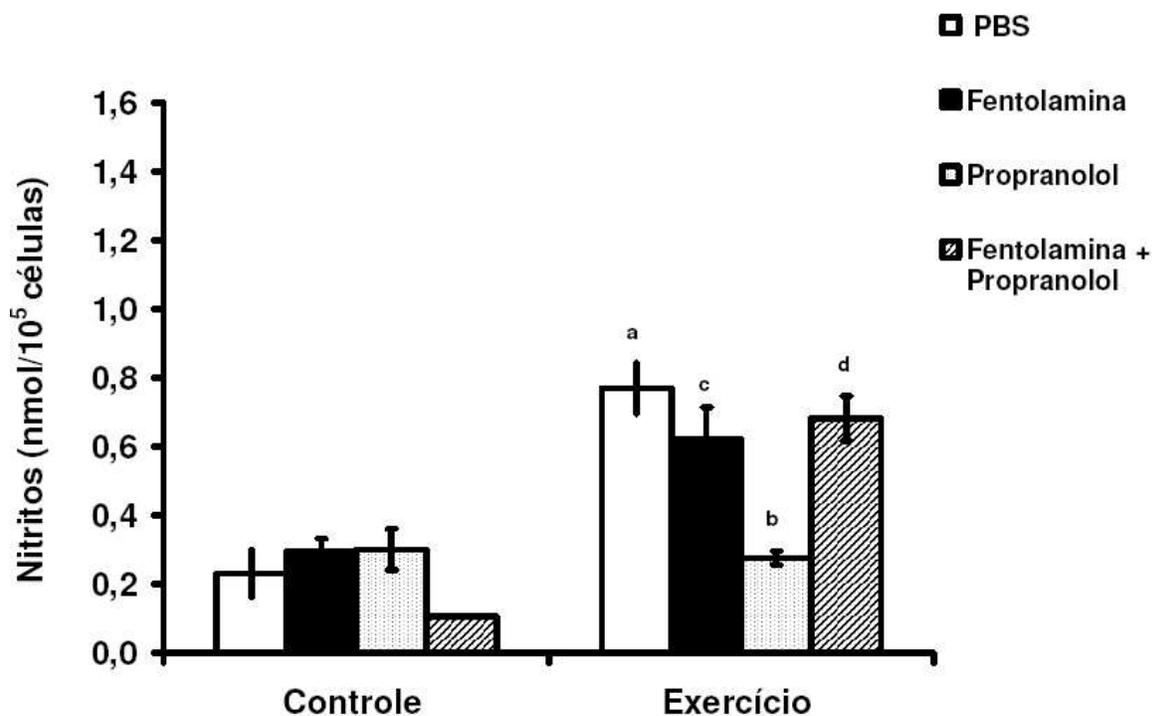


Figura 23. Dosagem da produção de nitritos por macrófagos pelos grupos PBS, Fentolamina, Propranolol, Fentolamina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal .

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,001$; c. $p < 0,001$; d. $p < 0,001$.

5.7 Imunodeteccção de Óxido Nítrico Sintase induzível (NOS2) em monócitos/macrófagos

Para confirmar o envolvimento da via de ativação do NF κ B como mediador dessa resposta imunológica em monócitos/macrófagos, realizamos a medida da expressão da NOS2, uma enzima responsável pela conversão de L-arginina em NO nos monócitos/macrófagos, induzida por esse fator de transcrição. A expressão dessa enzima é mensurada seis horas após a sessão de natação, para permitir que, nesse tempo, exista quantidade imunodetectável da proteína.

O Controle PBS ($0,66 \pm 0,15$ u.a., **Fig.24 A**) apresentou uma expressão menor quando comparada com os demais grupos controle Prazosina ($1,8 \pm 0,3$ u.a., $p < 0,001$), Propranolol ($1,5 \pm 0,2$ u.a., $p < 0,01$) e Prazosina + Propranolol ($1,4 \pm 0,2$ u.a., $p < 0,01$). No entanto, não houve diferença significativa com relação ao Exercício PBS ($1,0 \pm 0,1$ u.a.).

Entre os grupos exercício, Prazosina ($2,1 \pm 0,1$ u.a., $p < 0,001$) e Prazosina + Propranolol ($1,9 \pm 0,06$ u.a., $p < 0,01$) obtiveram uma expressão de NOS2 maior que o PBS. O Exercício Prazosina quando comparado ao seu controle demonstrou uma expressão semelhante, enquanto o Exercício Propranolol ($0,79 \pm 0,21$ u.a.) teve uma expressão diminuída em relação ao Controle Propranolol ($p < 0,05$).

Assim, novamente os dados demonstram que um bloqueio α_1 seletivo da Prazosina promove um aumento da capacidade fagocítica, da produção de nitritos e na expressão de NOS2, possivelmente via ativação do NF κ B.

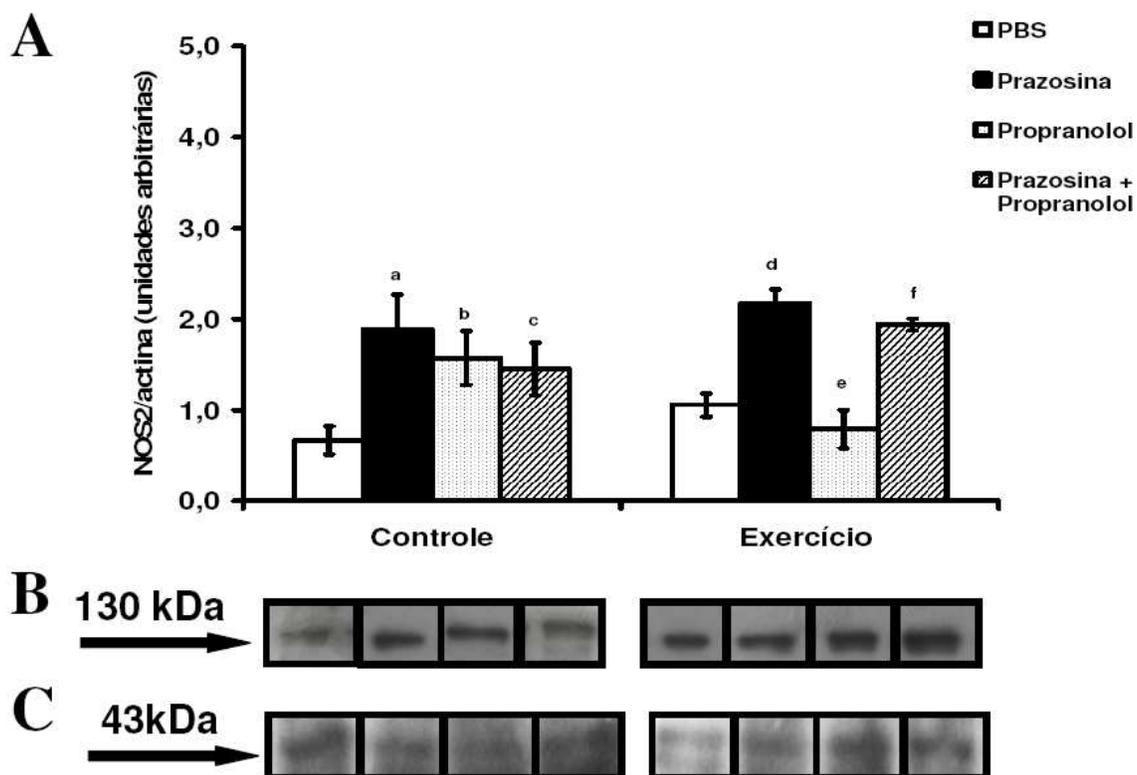


Figura 24. Imunodeteção da Óxido Nítrico Sintase Induzível (NOS2) dos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício, 6 horas após a sessão. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal. (A) Histograma demonstrando a expressão de NOS2 normalizado pelos valores de actina em unidades arbitrárias (u.a.). (B) Filme representativo da expressão de NOS2 (130 kDa). (C) Filme representativo da expressão da actina (43 kDa).

a. $p < 0,001$; b. $p < 0,01$; c. $p < 0,01$; d. $p < 0,001$; e. $p < 0,05$; f. $p < 0,01$.

5.8 Imunodeteção de Heat Shock Protein 72 (HSP72) em monócitos/macrófagos

As proteínas de choque térmico são chaperonas moleculares que desempenham um papel citoprotetor. Assim, foi analisada a expressão protéica da HSP72, após 6 horas da sessão de exercício. Como resultados (**Fig.25A**), apenas o Controle Prazosina ($1,05 \pm 0,08$ u.a.) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) com relação ao Controle PBS ($0,74 \pm 0,05$ u.a.), os demais grupos Controle Propranolol ($0,69 \pm 0,18$ u.a.) e Controle Prazosina +

Propranolol ($0,98 \pm 0,07$ u.a.) não demonstraram diferença de expressão. O Exercício Prazosina ($1,26 \pm 0,15$ u.a.) teve uma expressão aumentada ($p < 0,001$) com relação ao Exercício PBS ($0,71 \pm 0,12$ u.a.). Os demais grupos exercício Propranolol ($0,76 \pm 0,1$ u.a) e Prazosina + Propranolol ($1,08 \pm 0,09$ u.a) não demonstraram diferença significativa nem com relação ao PBS, nem quanto aos seus respectivos controles.

A HSP72 tem sua expressão induzida pela ativação do NF κ B, assim os valores obtidos confirmam o fato de que um bloqueio α_1 seletivo promova resposta imunológica observada nos monócitos/macrófagos estudados.

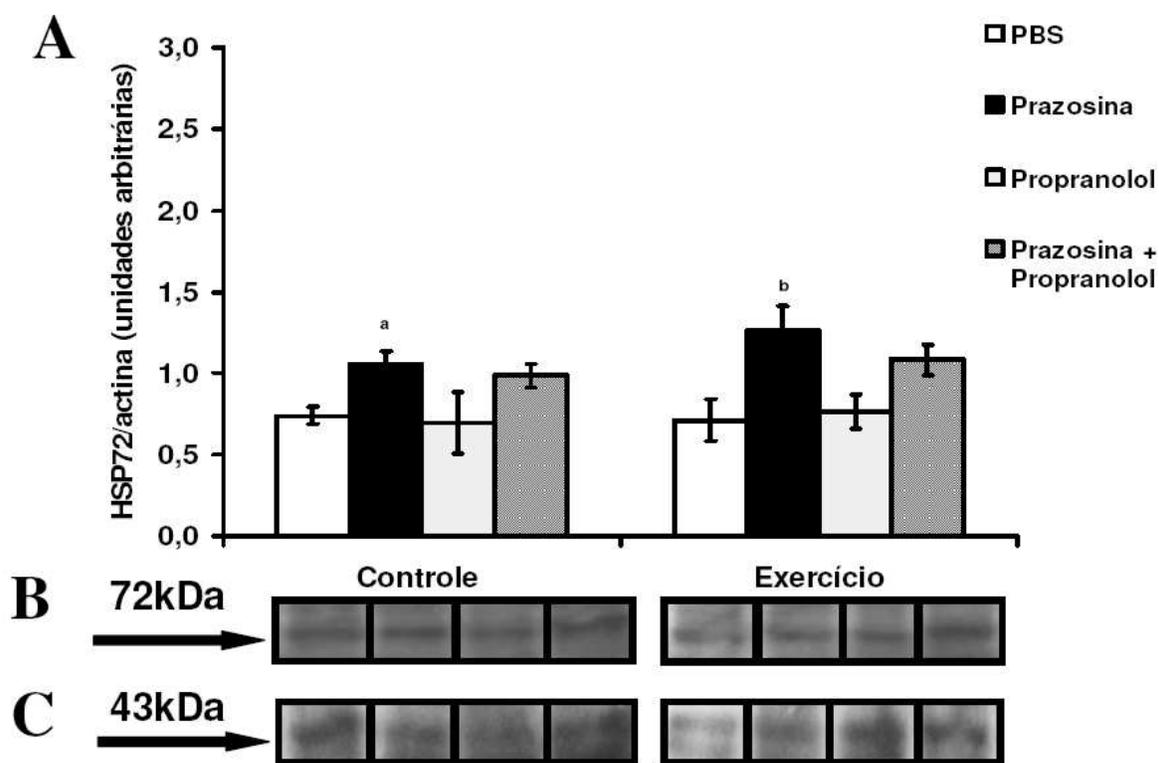


Figura 25. Imunodeteção da Heat Shock Protein 72 (HSP72) dos grupos PBS, Prazosina, Propranolol, Prazosina + Propranolol, tanto do grupo controle quanto do grupo exercício, 6 horas após a sessão. Os animais realizaram 1h de natação com peso equivalente a 5% do peso corporal do animal. (A) Histograma demonstrando a expressão de HSP72 normalizado pelos valores de actina em unidades arbitrárias (u.a.). (B) Filme representativo da expressão de HSP72 (72kDa). (C) Filme representativo da expressão da actina (43 kDa).

a. $p < 0,05$; b. $p < 0,001$.

6. Discussão

O Sistema imunológico apresenta mecanismos que proporcionam a capacidade de reconhecer e eliminar agentes patogênicos ao organismo. Uma resposta celular, ou seja mediada por células imunológicas como linfócitos T (T *helper*, como CD4+ e CD8+) e fagócitos profissionais (monócitos e neutrófilos), ou ainda em uma resposta humoral, através da produção de anticorpos por plasmócitos (linfócitos B ativados). Os anticorpos atuam na resposta imunológica neutralizando patógenos e facilitando, assim, a identificação destes pelas células fagocíticas^{66,67}.

Os monócitos são células de destaque no sistema imunológico, pois participam da resposta inata, realizando a fagocitose e liberando espécies reativas de oxigênio em uma ação microbicida. Assim como, são células apresentadoras de antígeno, via MHC classe II, para linfócitos TCD4 +, contribuindo para a formação de uma imunidade adquirida⁸⁹.

Na medula óssea, células precursoras, comprometidas com uma linhagem celular, dão origem aos granulócitos e aos monócitos. Estes, após o amadurecimento, são disponibilizados na circulação e posteriormente migram para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos^{93,162}.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que uma sessão de exercício de intensidade moderada poderia promover uma ativação do sistema imunológico, através da ativação do NFκB, um fator responsável pela transcrição de genes da resposta inflamatória, como por exemplo a produção de citocinas (TNF- α , IL-1) e NOS2⁹, responsável pela produção do agente bactericida NO, que é um radical amplamente utilizada por fagócitos na resposta imunológica inata.. No entanto, as vias responsáveis por essa ativação imunológica ainda não foram determinadas.

As catecolaminas, assim como os glicocorticóides, apresentam-se na maioria dos estudos como indutores de uma resposta antiinflamatória e imunossupressora^{79,92,114}. Buscou-se investigar o papel do sistema nervoso simpático periférico na resposta imunológica desses monócitos circulantes. Destaque-se nesse estudo, nossa preocupação com a análise da ação dessas catecolaminas através de uma liberação periférica por terminações nervosas, e não sistêmica *per se*⁶⁵⁻⁶⁷.

Uma sessão de exercício de intensidade moderada promove um estímulo à liberação periférica de catecolaminas, que por meio de receptores α e β adrenérgicos, participam da resposta inata, realizando quimiotaxia, fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias^{77,103,154,163}.

Durante o exercício físico, as catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina, promovem uma inibição da secreção de insulina e manutenção dos níveis de glicose plasmática, via glucagon e hormônio do crescimento (GH)¹⁰⁷. No entanto, um bloqueio α adrenérgico não seletivo é capaz de modificar essa manutenção da glicemia durante o exercício.

De acordo com os resultados obtidos, os animais aos quais foi administrada a fentolamina (antagonista α -adrenérgico não seletivo) apresentaram uma concentração de lactato elevada, quando submetidos a uma sessão de exercício supostamente moderado (peso equivalente a 5% do peso corporal do animal), fato que não permitia realização de um exercício considerado de intensidade moderada¹³⁵. Enquanto o grupo propranolol (antagonista β -adrenérgico não seletivo) apresentou uma concentração de lactato com curva semelhante ao grupo Exercício PBS. Assim, buscou-se uma nova carga de trabalho que representasse à execução de exercício moderado nos animais com bloqueio por fentolamina, através da diminuição do peso no peito para 2,5% de peso corporal. Curiosamente, após a realização do exercício com um peso equivalente 2,5% do peso do animal, o grupo fentolamina continuava apresentando concentrações de lactato elevadas.

A fentolamina é um antagonista α adrenérgico não seletivo, portanto pode bloquear receptores α_1 e α_2 , causando um efeito sinérgico de ambos. Durante o exercício, os receptores α presentes nos vasos sanguíneos, são estimulados pelo aumento das catecolaminas circulantes, apresentando uma ação vasoconstritora que regula o fluxo sanguíneo. Nesse controle do fluxo, existe uma redução na direção esplênica e aumento da demanda sanguínea para a musculatura, que necessita de um maior aporte de nutrientes e oxigênio, quando em atividade física. Um bloqueio α_1 interfere nesse processo, pois promove uma vasodilatação que mantém o fluxo sanguíneo esplênico, conseqüentemente diminuindo a disponibilidade para os músculos. Essa falta de suprimento para a musculatura, aumenta o processo de glicólise não oxidativa, gerando o lactato como produto e elevando as concentrações sanguíneas desse metabólito¹⁶⁴. No nosso estudo,

verificou-se que apenas o bloqueio α_1 não apresenta valores de lactato aumentados após 60 minutos. Provavelmente, o lactato produzido foi utilizado como substrato na gliconeogênese hepática e assim promoveu um aumento das concentrações de glicose no sangue, que pode ter mantido a glicemia estável durante o exercício. Contudo, a fentolamina também é um antagonista de receptores α_2 , com um mecanismo responsável por induzir um aumento da secreção de insulina pelas células β do pâncreas e assim, reduzir consideravelmente as concentrações de glicose no sangue, gerando um estado de hipoglicemia. No fígado, a gliconeogênese pode estar sendo inibida pela insulina, impedindo a metabolização do excesso de lactato produzido pela musculatura, gerando esses aumento de lactato circulante, como visto no estudo.¹³⁴

Assim, podemos considerar que a noradrenalina, em ação cooperativa com outros mediadores como o neuropeptídeo Y ¹⁵⁷, pode promover uma inibição da liberação de insulina pelas células β do pâncreas. A administração de um α bloqueador não seletivo pode levar aumento da secreção de insulina, representado por um quadro de hipoglicemia ¹⁶⁵.

Por essa razão, foram dosadas a glicemia e lactato dos animais com bloqueio α não seletivo, durante o exercício moderado, apresentando uma diminuição expressiva da glicemia nos primeiros 30 minutos de exercício, sendo esta mantida até o término do exercício em uma hora. Essa constatação permitiu observar, que o bloqueio com fentolamina causou um estado hipoglicêmico no animal, com concomitante diminuição da atividade hepática, impedindo a remoção adequada do lactato sanguíneo e gerando um aumento da concentração deste, não devido ao exercício, mas sim ao bloqueio α adrenérgico hepático ^{166,167,167,168}. Esse bloqueio não permita a ação contrareguladora do glucagon e do GH, que provavelmente deveriam apresentar concentrações elevadas em resposta a hipoglicemia. No entanto, a secreção de insulina no pâncreas é influenciada apenas por receptores α_2 adrenérgicos ¹³⁴, essa observação é justificada pela administração do fármaco yoimbina (antagonista α_2), que promove um aumento da secreção de insulina e consequente diminuição da glicemia. Fato que não ocorre quando administrada um antagonista α_1 , como a prazosina, quando a glicemia é mantida e os níveis de insulina decrescem durante o exercício ¹³⁴.

Os antagonistas α_2 adrenérgicos bloqueiam canais de potássio nas células β do pâncreas, induzindo uma despolarização, seguida da secreção de insulina^{157,169}. Acreditamos que esse mecanismo estava sendo ativado nos grupos fentolamina e fentolamina + propranolol, impedindo realização satisfatória do exercício, pois os animais apresentavam-se fatigados e em algumas sessões não atingiam os 60 minutos do experimento. Assim, neste estudo os grupos com bloqueio α adrenérgico demonstraram uma diminuição na glicemia gerada por um aumento na secreção de insulina.

Com esses resultados, os experimentos *in vivo* foram realizados com o fármaco prazosina, que não causa hipoglicemia durante o exercício, minimizando a interferência metabólica nas análises imunológicas^{134,170}.

A fim de confirmar dados encontrados na literatura, foram dosados os níveis de triglicerídeos, durante o exercício. Pois, os receptores β e α_2 regulam a atividade lipolítica, realizando aumento e redução, respectivamente. O bloqueio α_2 , resultaria, portanto em aumento da atividade lipolítica, produzindo ácidos graxos livres e glicerol¹³⁴. Nossos resultados demonstram que, apesar dos valores encontrados estarem na faixa de normalidade dos de referência, existe uma elevação dos triglicerídeos nos 30 minutos finais do exercício, em ambos os grupos. Os animais aos quais foi administrada fentolamina apresentaram valores aumentados com relação aos animais prazosina, sendo o possível responsável por essa elevação de triglicerídeos, a secreção de insulina induzida pelo bloqueio α_2 . A insulina, como hormônio anabólico que promove a síntese de gordura, poderia influenciar a maior conversão, no fígado, de qualquer excesso de ácidos graxos, resultante da ação lipolítica do bloqueio α_2 no tecido adiposo, em triglicerídeos. Estes poderiam então ser secretados para o sangue como complexos lipoprotéicos, como por exemplo VLDL, para estocagem no tecido adiposo¹⁷¹.

Uma sessão de exercício aeróbico, da mesma forma que o anaeróbico, promove um aumento da produção de radicais livres, podendo ou não resultar em um aumento do estresse oxidativo^{26,172}. Usualmente é utilizado como técnica para detecção de lipoperoxidação o TBARS, parâmetro que infere as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, medindo o malondialdeído (MDA) um produto da degradação de lipoperóxidos. No entanto, intermediários da metabolização das catecolaminas são confundidos com os lipoperóxidos e malondialdeído por responderem ao mesmo

comprimento de onda. Considerando esse interferente, utilizou-se a técnica de reação de lipoperóxidos com xilenol laranja, que demonstrou uma maior sensibilidade e especificidade na estimativa de lipoperóxidos decorrente do exercício^{143,173}. Em uma sessão de exercício físico moderado houve aumento na produção de lipoperóxidos, corroborando com a literatura que relata que existe lipoperoxidação após o exercício, com o restabelecimento dos valores normais após uma hora do término do exercício¹⁷².

Sob efeito de bloqueadores α e β adrenérgicos, os animais que realizaram exercício, demonstraram que os valores de lipoperoxidação voltam a níveis semelhantes ao controle. Assim, pode ser sugerido um papel estimulatório das catecolaminas sobre a lipoperoxidação, pois quando houve um maior aporte de catecolaminas aumentou a lipoperoxidação. Diferente do observado quando foi aplicado fentolamina, um α bloqueador não seletivo, os valores apresentam-se aumentados tanto com relação ao controle quanto no exercício. Não pode ser descartada uma possível relação entre o estado hipoglicêmico gerado pelo bloqueio α_2 adrenérgico, ou então, uma possível resposta ao efeito vasodilatador promovido pelo fármaco, que pode modificar o fluxo sanguíneo¹³⁴.

Na análise do estado redox sistêmico, o exercício aumenta o conteúdo de dissulfeto de glutationa e, da mesma forma como se comporta na lipoperoxidação, o bloqueio adrenérgico, tanto α quanto β elevam o conteúdo de dissulfeto de glutationa, independente do exercício. As catecolaminas podem estimular o aumento de GSSG, mas o maior aporte de noradrenalina e adrenalina não modifica a ação dos bloqueadores adrenérgicos, com valores semelhantes ao controle. Apenas com esses resultados, não é possível afirmar uma ação direta das catecolaminas com relação ao GSSG, pois os bloqueadores adrenérgicos são potentes agentes hipotensivos^{25,174}, promovendo uma diminuição na pressão arterial, e assim, influenciando diretamente nos eritrócitos.

Uma sessão de exercício também pode aumentar o conteúdo de glutationa reduzida, um parâmetro que demonstra uma resposta antioxidante gerada pelo exercício. Contudo, quando há um bloqueio α_1 e β não seletivo existe um aumento de 243%, sugerindo uma resposta antioxidante sistêmica pela simples administração de bloqueadores adrenérgicos. No exercício, quando há maior disponibilidade de catecolaminas, os valores de GSH são semelhantes ao do controle.

As catecolaminas têm uma ação sistêmica, com receptores presentes em diferentes tecidos, possivelmente influenciando nessa resposta, que pode ser resultado de mecanismos distintos¹⁷². As alterações no estado redox sistêmico poderiam ser uma via de ativação do NF κ B na indução de uma resposta imunológica de monócitos/macrófagos, conforme os dados de Silveira *et al.*, 2006.

Assim, quanto à relação GSSG/GSH houve um aumento expressivo apenas nos grupos com bloqueio β , tanto no controle quanto no exercício. Esse desbalanço redox observado, foi resultado de um aumento no conteúdo de dissulfeto de glutathiona e uma brusca diminuição da glutathiona reduzida (52%), tanto no grupo controle quanto no exercício. Os receptores β adrenérgicos são importantes agentes moduladores da resposta antioxidante em células *in vitro*¹⁷⁵, por isso o uso de bloqueadores β , como o propranolol, poderia gerar um estado de estresse oxidativo como o observado em nossos resultados. Em cultura de HEK293 (linhagem de células renais embrionárias humanas), um agonista β_2 não seletivo, isoproterenol, promove um mecanismo de transdução de sinal, através de receptores β , capaz de gerar espécies reativas de oxigênio¹⁷⁶.

Torna-se importante salientar que os fármacos utilizados no estudo, prazosina e propranolol, são amplamente consumidos como medicamentos anti-hipertensivos. Assim, os efeitos sobre a pressão arterial podem estar influenciando nos resultados acima descritos de conteúdo de glutathiona, pois este é medido em eritrócitos¹⁷⁴.

Seguiu-se a análise do estado redox em animais aos quais foi administrada fentolamina, um α bloqueador não seletivo. Houve um aumento na relação GSSG/GSH em comparação ao controle (administração de PBS), no entanto esse desbalanço redox não demonstrou ser expressivo, configurando um comportamento semelhante ao do fármaco prazosina. Os valores de dissulfeto de glutathiona no grupo fentolamina estavam aumentados com relação ao PBS e a prazosina nos animais não exercitados. Observar-se que além desse aumento de GSSG, esse grupo com bloqueio α também demonstrou um aumento na lipoperoxidação, fato que pode estar relacionado com o estado hipoglicêmico do animal. A diminuição repentina do aporte de glicose poderia gerar a produção de radicais livres. Na literatura, é reconhecido que a hiperglicemia pode gerar um estado de estresse oxidativo sistêmico com o aumento do fluxo de glicose e desvio dessa rota pra produção de sorbitol e EROS, apesar dessa via não ocorrer em todos os tipos celulares^{177,178 178}.

A hipoglicemia, gerada por um antagonista α não seletivo, é resultado do aumento da secreção de insulina, levando a uma aceleração do consumo de glicose e do fluxo mitocondrial, com produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons. No entanto, os eritrócitos não contêm mitocôndrias, possuindo a glicólise como principal mecanismo na obtenção de energia, e durante o exercício, as células vermelhas produzem lactato intensamente¹⁵⁵. O lactato é um efetivo “*scavenger*” de cisteína, um precursor da glutatona, diminuindo assim sua concentração intracelular⁴¹. Assim como, as altas concentrações de lactato circulantes e a redução da glicemia podem influenciar nesse fluxo, pois a glicose é o principal substrato energético para esse tipo celular. A falta de glicose impede a formação de NADPH pela via das pentoses fosfato, processo que permite que o dissulfeto de glutatona retorne ao estado reduzido. Visto que os eritrócitos possuem a glutatona como principal defesa antioxidante, essa ação do lactato poderia estar relacionada com o aumento do conteúdo de glutatona oxidada observados.

Diante da verificação do estado metabólico sistêmico de cada grupo experimental, foi feita a análise da resposta imune de monócitos/macrófagos. Essa ativação imunológica pode ser estimulada por exercício agudo ou mesmo de curta duração¹⁵⁴. O processo, provavelmente, seria via “hormônios do estresse”, como catecolaminas e glicocorticóides. Sendo que, classicamente, são observadas as vias do eixo HPA e do sistema nervoso simpático como reguladores de uma resposta antiinflamatória sistêmica^{66, 67}. Contudo, uma liberação local de catecolaminas estimula a ação pró-inflamatória através da ativação de células da resposta inata, como neutrófilos e macrófagos, além induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias^{163,179}.

A fagocitose é um processo no qual são eliminados agentes patogênicos ao organismo e produtos do processo inflamatório. Os monócitos/macrófagos, células fagocíticas profissionais, são aptos a responder a ativação do sistema imunológico¹⁸⁰ e apresentam α e β adrenorreceptores, sendo a expressão desses subtipos condicionada a fase do ciclo celular e a capacidade de ativação dessa célula. No entanto, situações patológicas ou tratamento farmacológico podem influenciar na ocorrência desses receptores nos monócitos¹⁶⁴.

Como no estudo realizado anteriormente⁹, houve um aumento na atividade fagocítica dos monócitos/macrófagos após uma sessão de exercício de intensidade

moderada, sugerindo uma ativação do sistema imunológico. E na análise da participação do sistema nervoso simpático periférico, existe um aumento claro na capacidade fagocítica quando há um bloqueio α_1 , independente da realização de exercício, sendo o mesmo comportamento observado no bloqueio com α_1 e β . Esses dados sugerem mecanismos distintos de regulação da fagocitose, pois poderiam ser resultado de uma ação inibitória, com características antiinflamatórias, que as catecolaminas realizariam periféricamente via receptoras α_1 ¹⁰⁹, ou então uma ação estimulatória via receptores β ^{154,163}. As catecolaminas exercem um efeito supressivo sobre a produção de H_2O_2 , via receptores α_1 , em macrófagos peritoneais *in vitro*, sendo esse efeito revertido por um bloqueio α adrenérgico¹⁶⁴. Maestroni e Conti (1994)¹⁸¹ observaram que a administração de prazosina, em diferentes doses *in vivo*, promoveu um aumento da produção de granulócitos e macrófagos, sugerindo a que existiria um inibição simpática tônica na mielopoiese, via receptores α_1 que estariam presentes nas células da medula óssea, impedindo o crescimento e diferenciação das unidades formadoras de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CFU). No entanto, é relatado a participação de receptores α adrenérgicos para o estímulo a quimiotaxia e a participação de α e β para ativação da fagocitose^{154,163}. Estudos *in vitro* demonstram essas relações, pois com a administração de doses fisiológicas de noradrenalina (10^{-9}) há um aumento na capacidade fagocítica de monócitos/macrófagos, que é revertido pelo uso de bloqueadores α e β ^{154,163,180,182}. Assim, a noradrenalina ativaria receptores α e β sinergicamente através de uma via de ativação pela MAPK que posteriormente ativariam o NF κ B¹⁰³. Esse fator é responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias e consequente indução da resposta imunológica^{40,41}. Como este estudo foi realizado *in vivo*, apresenta diferentes mecanismos de resposta aos efeitos causados por bloqueadores adrenérgicos. Aparentemente, não parece existir uma relação direta dos receptores β nessa resposta, pois este quando bloqueado tem um comportamento semelhante ao PBS nas duas situações estudadas. Quando há bloqueio α_1 e β , há um predomínio do aumento da capacidade fagocítica, com as mesmas características do simples bloqueio α_1 .

Os receptores α_2 presentes na superfície do monócito, quando estimulados, exercem um efeito inibitório na adenilil ciclase, gerando uma diminuição do segundo mensageiro cAMP e promovendo a uma ativação do NF κ B¹⁸². Os resultados com fentolamina,

bloqueador α não seletivo, demonstraram uma redução na capacidade fagocítica de monócitos/macrófagos quando comparado ao bloqueio realizado pela prazosina. No entanto, os aspectos metabólicos, como aumento de lactato, secreção de insulina e a hipoglicemia, envolvidos na administração de um bloqueador α não seletivo, poderiam estar interferindo na atividade das células imunológicas.

Outro parâmetro que complementa a análise da resposta imune de monócitos/macrófagos ao exercício, foi a produção espontânea de nitritos, medida que infere a capacidade de produção óxido nítrico, um importante agente da resposta bactericida. Esse dado demonstrou uma maior produção de nitritos pelos monócitos/macrófagos submetidos à natação por uma hora. O exercício aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, contudo, esses valores demonstraram-se muito expressivos. Um bloqueio α promove um aumento na produção de nitritos, sendo que o mesmo comportamento não é observado no bloqueio α_1 e β . Da mesma forma como foi visto na atividade fagocítica, a produção de nitritos pelo monócito/macrófago aumentou no grupo com bloqueio α_1 , sugerindo um mecanismo de ativação da resposta inflamatória que parece ser independente do exercício, ou seja, da maior concentração de catecolaminas circulantes. A noradrenalina é uma catecolamina que tem afinidade preferencialmente, em baixas concentrações, por receptores α , enquanto em altas concentrações existiria uma estimulação β ¹⁶⁴. O estímulo β tanto no controle quanto no exercício pode promover um aumento na atividade da arginase¹⁸³, gerando uma ação competitiva com a NOS2 pelo substrato arginina^{18,184,185}. Assim, haveria uma maior produção de ornitina e citrulina, em detrimento da produção de óxido nítrico realizada pela NOS2^{18,184}. Neste estudo, os animais exercitados tiveram sua produção de nitritos pelo monócito/macrófago diminuída, sugerindo que com o aumento da concentração de catecolaminas, existe preferencialmente um estímulo aos receptores β e esses poderiam aumentar a atividade da arginase, estabelecendo uma competição dessa enzima com a NOS2. Os animais não exercitados com bloqueio α_1 , obtiveram valores aumentados de nitritos que poderiam, devido à baixa concentração de catecolaminas disponível, dar preferência aos receptores α , resultando uma ação β diminuída. Em um bloqueio β houve diminuição da produção de nitritos, fato que contraria a hipótese de que receptores β poderiam estar predominando na produção de nitritos. Pois, como nos

resultados da avaliação da atividade fagocítica expostos anteriormente, o bloqueio α_1 parece estar realizando uma ação inibitória sobre a capacidade pró-inflamatória do monócito/macrófago, pois quando esta é retirada os valores de nitritos retornam aos níveis do controle.

Os animais exercitados aos quais foi administrado PBS apresentaram um aumento da capacidade fagocítica e da produção de nitritos pelos monócitos/ macrófagos, sem sofrer alteração na expressão de NOS2, enzima que tem sua expressão condicionada a ativação do NF κ B^{40,41}. Esse resultado demonstrou ser diferente dos dados encontrados em nosso laboratório⁹, fato que pode ser explicado por algumas modificações metodológicas utilizadas, assim como a aplicação intraperitoneal sofrida por todos os animais estudados. Os monócitos, como células imunológicas potencialmente produtoras de NO, podem apresentar uma expressão constitutiva da NOS2. Não pode ser descartada a possibilidade desta expressão apresentada ser das formas constitutivas, endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS)¹⁸⁶.

Um bloqueio α adrenérgico gerou no monócito/macrófago um aumento da capacidade fagocítica, da produção de nitritos e da expressão de NOS2 (6h), indicando claramente um estado de ativação dessa célula, sendo designado pró-inflamatório. No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos nesse processo, como um efeito inibitório α_1 , estimulatório α_2 , ou β , não poderiam ser definidos sem a realização de um ensaio com bloqueadores seletivos α_1 , como a yoimbina. Com relação aos mesmos parâmetros, um comportamento semelhante foi observado nos animais tratados com um duplo bloqueio (prazosina e propranolol), um predomínio do efeito imunoestimulatório gerado por bloqueadores α_1 . A participação β adrenérgica, não obteve uma ação expressiva na estimulação da capacidade fagocítica, com valores semelhantes aos dos animais PBS, tanto para o controle quanto para o exercício. Foi verificado um aumento na expressão de NOS2 (6h) apenas no grupo controle propranolol, mesmo com valores de nitritos considerados baixos. Os receptores β adrenérgicos parecem contribuir na regulação da produção imediata de nitritos realizada pelo monócito/macrófago, mas parecem influenciar diretamente para o aumento da expressão da NOS2¹⁶⁴. As catecolaminas via receptores β adrenérgicos ativam a adenilil ciclase, gerando cAMP como segundo mensageiro, que por sua vez impede a ativação do NF κ B, e assim produz citocinas antiinflamatórias^{102,182,187,188 188}. Por outro

lado, os receptores α_1 , inibem a adenilil ciclase, reduzindo os níveis de cAMP e possibilitando a ativação do NF κ B¹⁸⁹. Existem vias de ativação da PKA que são reguladas independentemente dos níveis de cAMP. Pois, a PKA é formada por uma subunidade catalítica (PKAc) e regulatória (PKAr), sendo que a PKAc interage com o I κ B α e I κ B β , promovendo a fosforilação e conseqüente translocação do NF κ B para o núcleo¹⁸². Dessa forma, seria possível uma ativação dos monócitos/macrófagos para a realização de uma resposta imunológica pró-inflamatória.

As análises realizadas acima de atividade fagocítica, produção de nitritos e expressão de NOS2 (6h) indicaram um efeito estimulatório na ativação de monócitos/macrófagos com um bloqueio α_1 , independente da disponibilidade aumentada de catecolaminas proporcionada pelo exercício.

As proteínas de choque térmico, principalmente da família das HSP70, são chaperonas moleculares, que atuam na conformação e dobramento corretos de proteínas que sofreram alterações no espaço intracelular, desempenhando, portanto, um papel citoprotetor. As HSP70, apresentam-se na forma constitutiva e induzível, com 73kDa e 72kDa respectivamente, e demonstram um aumento de expressão em resposta à ativação do NF κ B^{54,59,61}. Dessa forma, foi realizada a imunodeteção de HSP72 intracelular, com a análise seis horas após a realização do exercício, em que se verificou um aumento apenas no grupo com bloqueio α_1 , e, assim como os resultados obtidos anteriormente, independente da sessão de exercício. Portanto, o grupo no qual foi administrado um antagonista α_1 , apresentou uma resposta inflamatória caracterizada por aumento de fagocitose e produção de NO, além de comprovar a ativação do NF κ B pela expressão da NOS2 e da HSP72.

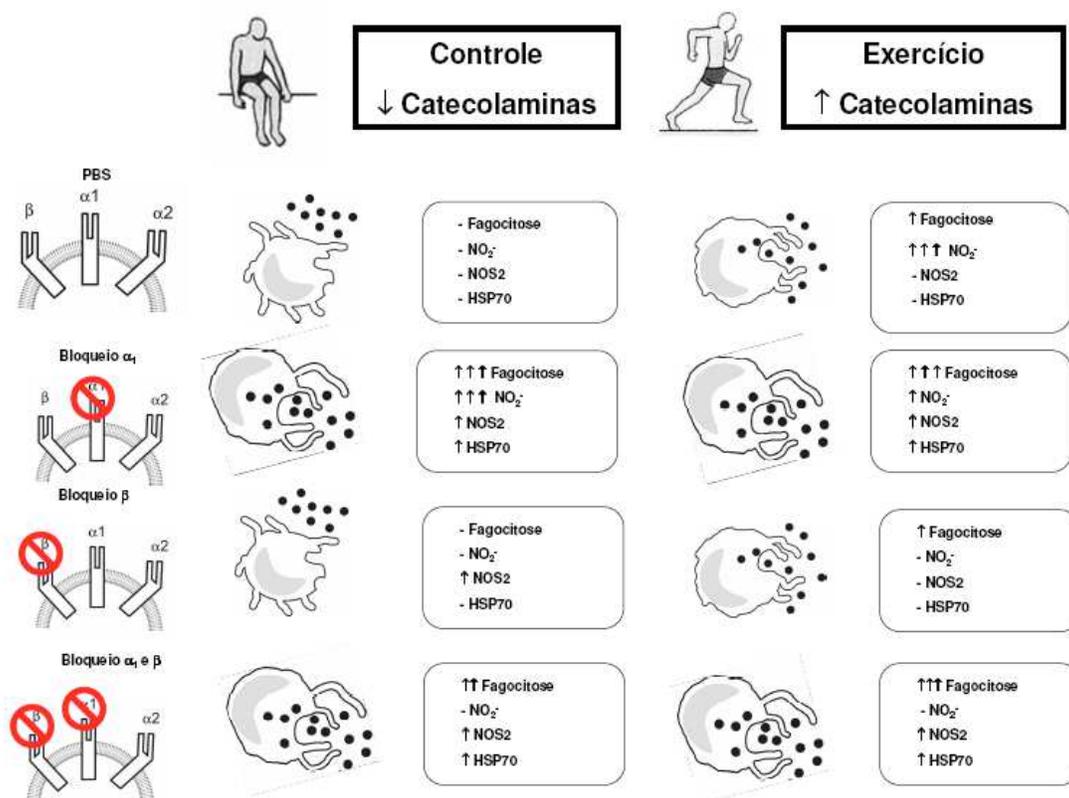


Figura 26. **Mecanismos envolvidos na resposta imunológica de monócitos/macrófagos a uma sessão de exercício físico (natação) por 1 hora.** No exercício, com um maior aporte de catecolaminas circulantes, os monócitos/macrófagos apresentam um aumento da capacidade fagocítica, produção de nitritos, que são fatores que demonstram um estado de ativação da resposta imunológica. Os animais que receberam administração intraperitoneal de antagonista α_1 , obtiveram um aumento expressivo nesses mesmos parâmetros, assim como também a expressão de NOS2 e HSP72 (imunodeteção após 6 horas do exercício). Cabe salientar, que essa ativação dos monócitos/macrófagos com bloqueio α_1 foi independente do exercício, ou seja, da maior disponibilidade de catecolaminas. Com um bloqueio β , as células apresentam um comportamento similar aos animais PBS, tanto no controle quanto no exercício. Da mesma forma, o bloqueio duplo (α_1 e β) demonstrou uma resposta de monócitos/macrófagos com mesmo aspecto do bloqueio por α_1 .

Situações estressantes induzem a produção de catecolaminas pelas células imunológicas, assim tanto monócitos quanto linfócitos possuem um mecanismo regulatório de secreção e recaptção de catecolaminas^{190,191,192}. Ainda não está bem definido sob que condições essas células imunológicas poderiam liberar essas catecolaminas e realizar essa regulação, no entanto esse processo é responsável pelo aumento da fagocitose e pela

produção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse aspecto, torna-se interessante observar se a produção periférica dessas catecolaminas seria apenas proveniente dos terminais nervosos ou também estaria condicionada a produção endógena de células imunológicas¹⁶⁴.

Outro fator que poderia interferir na resposta imunológica durante uma sessão de exercício, seria a produção de HSP72 extracelular (eHSP72), por uma via de estimulação noradrenérgica de receptores α_1 no fígado, principal órgão responsável por essa liberação^{133,193,194}. A eHSP72 desempenha um importante papel na promoção da atividade fagocítica e na produção de mediadores da resposta inflamatória via TLR2 e TLR4 (*Toll like receptors*)^{195,196,197}, no entanto, devido a administração de antagonistas α_1 , prazosina e fentolamina, haveria um bloqueio α_1 , impedindo a liberação de HSP72 do fígado para plasma, sob estímulo adrenérgico. Portanto, a eHSP72 não poderia ser a responsável pela ativação da resposta imunológica de monócito/macrófago neste caso.

A HSP72 pode ser produzida por monócitos e linfócitos, pois estes possuem vesículas secretoras de HSP72, denominadas exossomos, que armazenam essa proteína intracelularmente, para quando sob um estímulo que aumente o influxo de cálcio, possa realizar a exocitose dessa vesícula^{193,198}.

Durante uma sessão de exercício agudo de intensidade moderada (45min, 55% VO_2)¹⁹⁹ existe um aumento da capacidade fagocítica de neutrófilos quando na presença de antígenos, via estímulo noradrenérgico. No entanto, considera-se que essa resposta possa não ser diretamente modulada pelas catecolaminas. Valores plasmáticos de noradrenalina voltam ao valor basal após 24h do exercício, enquanto a capacidade fagocítica desses neutrófilos permanece estimulada. Esse fato permite inferir que existe outro fator, modulado pelas catecolaminas durante o exercício físico que é capaz de gerar essa resposta inata¹⁵⁴. Apesar dessas constatações, um efeito da ação das catecolaminas a longo prazo não deve ser descartado.

As catecolaminas, preferencialmente a noradrenalina, promovem um aumento na expressão e na liberação de HSP72 plasmática durante o exercício físico²⁰⁰. Essa HSP72 extracelular pode atuar como citocina gerando ativando o monócito/macrófago a fagocitar e produzir citocinas pró-inflamatórias. Assim, a eHSP72 demonstra uma função importante na formação da resposta imunológica inata, atuando como um “sinal perigoso”²⁰¹, em resposta as modificações induzidas pelo exercício. A HSP72 poderia apresentar um papel

tanto como chaperona molecular, acompanhando proteínas e impedindo a desnaturação proteica, como também, uma citocina capaz de estimular a resposta imunológica²⁰².

Portanto, situações estressantes, dentre eles o exercício físico, poderiam promover a liberação de noradrenalina, pelo sistema nervoso simpático, e adrenalina, pela adrenal, da mesma forma que existe um aumento da concentração plasmática de eHSP72, confirmando uma correlação entre a liberação de catecolaminas e o aumento da HSP72 extracelular¹³³.

O fígado é o maior produtor de HSP72 extracelular, através de exossomos, vesículas que estocam HSP72 no interior dos hepatócitos. Um estímulo noradrenérgico eleva liberação hepatoesplênica de HSP72, 20 a 30 minutos após o estresse, indicando que essa liberação de HSP72 não seria através do aumento da expressão proteica nos hepatócitos, afinal o processo de síntese proteica requer um tempo maior (2-6 horas)^{170,203}. Assim essa produção de HSP72 não pode ser considerada uma síntese *de novo*, demonstrando que existem *pools* de HSP72 estocadas em hepatócitos. O estímulo noradrenérgico provavelmente seria via α receptores, pois diante de um bloqueador α , tanto seletivo, quanto não seletivo, obteve-se diminuição na concentração plasmática de HSP72. O mesmo não foi observado num bloqueio β adrenérgico, no qual aumentou a concentração plasmática de HSP72 a níveis acima do controle submetido a estresse. Assim, a noradrenalina via adrenorreceptores poderia gerar um influxo de cálcio capaz de gerar a extrusão de vesículas contendo HSP72 do fígado para a circulação^{133,204}.

A HSP72 extracelular age como uma citocina, estimulando as células imunológicas através da ligação a receptores superfície denominados TLR^{195,205}. Esses receptores ativam o NF κ B, resultando em um aumento da atividade microbicida, da produção de citocinas pró-inflamatórias e provavelmente induzindo um incremento a resposta adquirida através do aumento da expressão de MHC, e moléculas como CD80 e CD 86 (moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T)^{195,206,207}.

Os TLR possuem a ativação estimulada pela HSP72, mas não a expressão, pois a expressão de TLR ocorre antes do aumento da expressão de HSP72, sugerindo a presença de outro fator que promove essa regulação²⁰⁶. *In vitro*, a expressão de TLR é modulada por glicocorticóides, no entanto em experimentos *in vivo* observou-se que indivíduos submetidos a exercício extenuante por 1,5 hora apresentaram uma diminuição na concentração plasmática de cortisol após 24 horas do exercício, sendo que a expressão de

TLR permaneceu diminuída. Logo, parece que existir outro fator envolvido, como citocinas circulantes durante o exercício, como a IL-6¹⁹⁷.

Outro estudo no qual verificou-se a relação entre a liberação de HSP72 pelo fígado e manutenção da glicemia durante o exercício, demonstrou que existe uma diminuição da liberação de HSP72 pelo fígado¹⁷⁰. Essa estreita relação entre a manutenção da glicemia e a liberação de HSP72 pelo fígado, interferindo na indução de uma resposta imunológica inata, é um mecanismo que ainda permanece desconhecido. Mas parece clara essa ligação entre o aumento de catecolaminas circulantes durante o exercício, promovendo um estímulo à liberação de HSP72 e glicose do fígado para o sangue, e que tanto essa HSP72 quando essa glicemia irá influenciar em receptores do tipo TLR a promover uma resposta inata.

Situações agudas de estresse, em que a produção de cortisol é desprezível quando comparada com estresses crônicos, levam à ativação do eixo Simpático-CRH Periférico-Histamina (SCPH). O CRH (hormônio ou fator liberador da corticotropina) e a histamina produzida periféricamente em resposta ao primeiro agem como agentes imunoestimulantes e pró-inflamatórios²⁰⁸. Monócitos possuem receptores CRHR1 que poderiam gerar uma resposta ativadora, como a resposta observada neste estudo^{66,114}.

Neste trabalho, o bloqueio α_1 apresentou uma resposta com aumento de fagocitose e produção de NO, além de comprovar a ativação do NF κ B pela expressão da NOS2 e da HSP72, independentemente da realização do exercício, ou seja da maior disponibilidade de catecolaminas circulantes. Podendo indicar um efeito inibitório tônico produzido por receptores α_1 periféricamente, que quando bloqueados gerariam um aumento da responsividade de monócitos/macrófagos.

Assim, outros mecanismos podem ser sugeridos como participantes dessa imunomodulação periférica, como o eixo CRH Periférico histamina e a própria eHSP70 produzida pelas células imunológicas. Sendo necessário investigar essas vias de ativação inflamatória com um modelo experimental semelhante ao realizado.

7. Conclusão

A prática regular de exercício físico promove significativos benefícios para a saúde do indivíduo, assim, nesse trabalho verificou-se que o efeito de uma sessão de exercício físico moderado poderia desencadear um mecanismo de ativação da resposta imunológica, especificado pela maior responsividade de células como monócitos/ macrófagos.

Pesquisas recentes consideram que imunomodulação proporcionada pelo exercício poderia ser mediada por hormônios do estresse, como catecolaminas e glicocorticóides. Fato que retrata uma estreita relação entre Sistema Nervoso e Sistema Imunológico. No entanto, normalmente é abordado o papel sistêmico e antiinflamatório da ação das catecolaminas. Cabe salientar que nesse trabalho, espera-se analisar a resposta das células imunológicas a liberação periférica de catecolaminas, através de terminações nervosas. Diante disso, foi observada a influência do sistema nervoso simpático periférico na ativação imunológica de monócitos/macrófagos durante uma sessão de exercício moderado, com uso de bloqueadores adrenoreceptores, em experimentos *in vivo*.

Os resultados do nosso trabalho sugeriram que:

- 1) O exercício físico de intensidade moderada, conforme protocolo de escolha (natação, por 60 minutos, com 5% do peso corporal do animal), demonstrou um aumento da capacidade fagocítica e produção de NO, corroborando com dados verificados anteriormente.
- 2) Um bloqueio α_1 pode promover um aumento da fagocitose e produção de NO, independentemente da realização de exercício.
- 3) Assim como, essa responsividade das células imunológicas a um antagonista α_1 é confirmada pelo aumento na expressão protéica de NOS2 e HSP72, fatores que demonstram que esse processo possivelmente é mediado pela ativação do NF κ B.
- 4) Pode existir um efeito tônico simpático inibitório, produzido periféricamente, atuando via receptores α_1 , que regularia a ativação imunológica de monócitos/macrófagos.
- 5) Esse efeito α_1 poderia ser predominante ao β , pois em um duplo bloqueio (α e β), foram reproduzidos mesmos resultados de um bloqueio α_1 .

- 6) Um antagonismo β adrenérgico não produziu modificações na resposta de monócitos/macrófagos quanto as análises realizadas, apresentando um comportamento semelhante ao controle, o qual não foi administrado fármaco.

Apesar do trabalho ter focado o papel do exercício moderado no mecanismo de ativação de células imunológicas como monócitos/ macrófagos, não poderíamos deixar de salientar alguns aspectos observados, sobre o efeito dos bloqueadores adrenérgicos que foram identificados durante o estudo.

Os fármacos utilizados nos experimentos como prazosina, propranolol e fentolamina são bloqueadores de receptores adrenérgicos amplamente consumidos como agentes anti-hipertensivos, para tratamento de hipertensão arterial. Como foram demonstrados nesse trabalho, bloqueadores adrenérgicos apresentaram efeitos metabólicos importantes, que devem ser considerados na medida em que necessitam ser investigados na prática de exercício. Resultados como:

- 1) Um bloqueio α não seletivo, com fentolamina, causou um aumento dos níveis de lactato e reduziu a glicemia dos animais durante a sessão de exercício moderado.
- 2) Constatar que um bloqueio α_2 resulta no aumento da produção de insulina pelo pâncreas, durante o exercício, desenvolvendo um estado hipoglicêmico que leva as animais a fadiga e não realização do exercício. Normalmente, durante o exercício, existe uma ação cooperativa envolvendo noradrenalina e neuropeptídeo Y, que promove uma inibição da liberação de insulina pelas células β do pâncreas.

Os antagonistas α_2 adrenérgicos bloqueiam canais de potássio nas células β do pâncreas, induzindo uma despolarização, seguida da secreção de insulina, fato que explica os resultados obtidos.

- 3) A secreção aumentada de insulina, deve ser responsável pela inibição da gliconeogênese hepática, impedindo a metabolização do excesso de lactato produzido pela musculatura, gerando esses aumentos de lactato circulante.
- 4) Variações na lipoperoxidação e no estado redox demonstraram ser expressivas apenas nos animais que receberam propranolol (antagonista β não seletivo), podendo estar relacionadas com o deslocamento do fluxo sanguíneo e

vasodilatação, causando alterações na pressão arterial que poderiam interferir na análise desses parâmetros.

- 5) O bloqueio α_1 apresentou uma resposta com aumento de fagocitose e produção de NO, além de comprovar a ativação do NF κ B pela expressão da NOS2 e da HSP72, independentemente da realização do exercício, ou seja da maior disponibilidade de catecolaminas circulantes. Dessa forma, um antagonismo α_1 pode representar um potencial indutor da resposta inflamatória, via estimulação inclusive por níveis basais de catecolaminas.

Devem ser considerados outros fatores como indutores dessa resposta periférica frente ao exercício moderado, como participação do eixo CRH – Histamina Periférico e da produção de HSP70 pelas células imunológicas, como possíveis vias de ativação do sistema imunológico. Esses parâmetros estão sendo investigados pelo Laboratório de Fisiologia Celular – UFRGS com modelos experimentais semelhantes.

Referências

- 1 da Silva Krause, M. and de Bittencourt, P. I., Jr., Type 1 diabetes: can exercise impair the autoimmune event? The L-arginine/glutamine coupling hypothesis. *Cell Biochem Funct* (2008).
- 2 Pedersen, B. K. and Hoffman-Goetz, L., Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* **80** (3), 1055 (2000).
- 3 Roubenoff, R. et al., Effect of a single bout of acute exercise on plasma human immunodeficiency virus RNA levels. *J Appl Physiol* **86** (4), 1197 (1999).
- 4 Costa Rosa, L. F.; Vaisberg, M., Influências do Exercício na Resposta Imune. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* (8), 167 (2002).
- 5 Natale, V. M. et al., Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Sao Paulo Med J* **121** (1), 9 (2003).
- 6 Khassaf, M. et al., Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol* **90** (3), 1031 (2001).
- 7 Pedersen, B. K., Rohde, T., and Ostrowski, K., Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand* **162** (3), 325 (1998).
- 8 Milne, K. J. and Noble, E. G., Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* **93** (2), 561 (2002).
- 9 Silveira, E. M. et al., Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell Biochem Funct* **25** (1), 63 (2007).
- 10 Krause, M. S. et al., MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* **25** (1), 23 (2007).
- 11 Pedersen, B. K. and Fischer, C. P., Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* **28** (4), 152 (2007).
- 12 Ishitani, L. H., Franco Gda, C., Perpetuo, I. H., and Franca, E., [Socioeconomic inequalities and premature mortality due to cardiovascular diseases in Brazil]. *Rev Saude Publica* **40** (4), 684 (2006).
- 13 DATASUS, (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Instituto Nacional do Câncer (Inca): Inquérito Domiciliar de Comportamentos de Risco de Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, 2008), pp. 228.
- 14 Ciccolo, J. T., Jowers, E. M., and Bartholomew, J. B., The benefits of exercise training for quality of life in HIV/AIDS in the post-HAART era. *Sports Med* **34** (8), 487 (2004).
- 15 DATASUS, (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Instituto Nacional do Câncer (Inca): Inquérito Domiciliar de Comportamentos de Risco de Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, 2008), pp. 232.

- 16 Costa Rosa, L. F., Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic
Disease: a Complementary Treatment Strategy. *Evid Based Complement
Alternat Med* **1** (1), 63 (2004).
- 17 Gutierrez, L. L., Maslinkiewicz, A., Curi, R., and de Bittencourt, P. I., Jr.,
Atherosclerosis: A redox-sensitive lipid imbalance suppressible by
18 cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol* (2008).
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R., Obesity induces a
phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*
117 (1), 175 (2007).
- 19 Kramer, H. F. and Goodyear, L. J., Exercise, MAPK, and NF-kappaB
signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **103** (1), 388 (2007).
- 20 Peake, J. M. et al., Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity
and muscle damage. *Eur J Appl Physiol* **95** (5-6), 514 (2005).
- 21 Foss-Freitas, M. C., Foss, N. T., Donadi, E. A., and Foss, M. C., In vitro
TNF-alpha and IL-6 production by adherent peripheral blood mononuclear
cells obtained from type 1 and type 2 diabetic patients evaluated according
to the metabolic control. *Ann N Y Acad Sci* **1079**, 177 (2006).
- 22 Friman, G.; Wesslén, L., Infections and exercise in high-performance
athletes. *Immunology and Cell Biology* (78), 510 (2000).
- 23 Palermo, P.; Feijó, O., Exercício físico e Infecção pelo HIV: atualização e
recomendações. *Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício* (2), 218
(2003).
- 24 Navalta, J. W., Sedlock, D. A., and Park, K. S., Blood treatment influences
the yield of apoptotic lymphocytes after maximal exercise. *Med Sci Sports
Exerc* **37** (3), 369 (2005).
- 25 Haddad, J. J., Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways.
Biochem Biophys Res Commun **316** (4), 969 (2004).
- 26 Ji, L. L., Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol
Med* **222** (3), 283 (1999).
- 27 Schneider, C; Oliveira, A., Radicais livres de Oxigênio: mecanismos de
formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina
do Esporte* (10), 308 (2004).
- 28 Paroo, Z. et al., Redox signaling of cardiac HSF1 DNA binding. *Am J
Physiol Cell Physiol* **283** (2), C404 (2002).
- 29 Droge, W. et al., Functions of glutathione and glutathione disulfide in
immunology and immunopathology. *FASEB J* **8** (14), 1131 (1994).
- 30 Rossi, A., Elia, G., and Santoro, M. G., Inhibition of nuclear factor kappa B
by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription
factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (2), 746 (1997).
- 31 Rossi, A., Elia, G., and Santoro, M. G., Activation of the heat shock factor 1
by serine protease inhibitors. An effect associated with nuclear factor-
kappaB inhibition. *J Biol Chem* **273** (26), 16446 (1998).
- 32 Aggarwal, B. B., Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* **6** (3),
203 (2004).
- 33 Rossi, A. et al., Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct
inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403** (6765), 103 (2000).

- 34 Schafer, P. H. et al., T cell activation signals up-regulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and induce TNF-alpha production in a manner distinct from LPS activation of monocytes. *J Immunol* **162** (2), 659 (1999).
- 35 Hoffmeyer, A. et al., Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *J Biol Chem* **274** (7), 4319 (1999).
- 36 Foey, A. D. et al., Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* **160** (2), 920 (1998).
- 37 Guha, M. et al., Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98** (5), 1429 (2001).
- 38 Zhou, R. et al., Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by (5R)-5-hydroxytryptolide in interferon-gamma- and bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **316** (1), 121 (2006).
- 39 Droge, W. and Breitkreutz, R., Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* **59** (4), 595 (2000).
- 40 Niess, A. M., Dickhuth, H. H., Northoff, H., and Fehrenbach, E., Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* **5**, 22 (1999).
- 41 Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82** (1), 47 (2002).
- 42 Mu, M. M. et al., The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res* **7** (6), 431 (2001).
- 43 Chakravorty, D. et al., The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* **166** (3), 2011 (2001).
- 44 Mantovani, A. et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25** (12), 677 (2004).
- 45 Curi, R. et al., Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. *Cell Biochem Funct* **23** (2), 77 (2005).
- 46 Curi, R. et al., Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* **204** (2), 392 (2005).
- 47 Newsholme, P. et al., Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* **10** (6), 316 (1999).
- 48 Newsholme, P. et al., Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* **36** (2), 153 (2003).
- 49 Newsholme, P., Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* **131** (9 Suppl), 2515S (2001).

- 50 Krzywkowski, K. et al., Effect of glutamine supplementation on exercise-
induced changes in lymphocyte function. *Am J Physiol Cell Physiol* **281** (4),
C1259 (2001).
- 51 Hiscock, N. and Pedersen, B. K., Exercise-induced immunodepression-
plasma glutamine is not the link. *J Appl Physiol* **93** (3), 813 (2002).
- 52 Anderson, M. E., Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation.
Chem Biol Interact **111-112**, 1 (1998).
- 53 Vermeulen, M. A. et al., Specific amino acids in the critically ill patient--
exogenous glutamine/arginine: a common denominator? *Crit Care Med* **35**
(9 Suppl), S568 (2007).
- 54 Pockley, A. G., Heat shock proteins in health and disease: therapeutic
targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med* **3** (23), 1 (2001).
- 55 Meyer, T.; Silva, A., Resposta celular ao estresse. *Revista da Associação*
Medica Brasileira (45), 181 (1999).
- 56 Pockley, A. G., Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and
allograft rejection. *Transplantation* **71** (11), 1503 (2001).
- 57 Fust, G. et al., Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV
infection. *Mol Immunol* **42** (1), 79 (2005).
- 58 Agnew, L. L. et al., Altered lymphocyte heat shock protein 70 expression in
patients with HIV disease. *AIDS* **17** (13), 1985 (2003).
- 59 Feder, M. E. and Hofmann, G. E., Heat-shock proteins, molecular
chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological
physiology. *Annu Rev Physiol* **61**, 243 (1999).
- 60 Todryk, S. M., Gough, M. J., and Pockley, A. G., Facets of heat shock
protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology* **110** (1), 1 (2003).
- 61 Santoro, M. G., Heat shock factors and the control of the stress response.
Biochem Pharmacol **59** (1), 55 (2000).
- 62 Ianaro, A. et al., HSF1/hsp72 pathway as an endogenous anti-inflammatory
system. *FEBS Lett* **499** (3), 239 (2001).
- 63 Ribeiro, S. P. et al., Effects of the stress response in septic rats and LPS-
stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational
regulation. *Am J Respir Crit Care Med* **154** (6 Pt 1), 1843 (1996).
- 64 Zaldivar, F. et al., Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and
growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* **100** (4),
1124 (2006).
- 65 Elenkov, I. J., Neurohormonal-cytokine interactions: implications for
inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int* **52**
(1-2), 40 (2008).
- 66 Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P., Stress system--organization, physiology
and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* **13** (5-6), 257 (2006).
- 67 Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P., Stress, cytokine patterns and
susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **13**
(4), 583 (1999).
- 68 Chrousos, G. P. and Harris, A. G., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
suppression and inhaled corticosteroid therapy. 2. Review of the literature.
Neuroimmunomodulation **5** (6), 288 (1998).

- 69 Chrousos, G. P., Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* **851**, 311 (1998).
- 70 Chrousos, G. P., The HPA axis and the stress response. *Endocr Res* **26** (4), 513 (2000).
- 71 Ostrowski, K. et al., Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* **515** (Pt 1), 287 (1999).
- 72 Chrousos, G. P., The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2**, S50 (2000).
- 73 Elenkov, I. J., Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *Int Rev Neurobiol* **52**, 163 (2002).
- 74 Newsholme, P. et al., Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* **21** (1), 1 (2003).
- 75 Drenth, J. P., Krebbers, R. J., Bijzet, J., and van der Meer, J. W., Increased circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production but decreased tumour necrosis factor-alpha production after a 5-km run. *Eur J Clin Invest* **28** (10), 866 (1998).
- 76 Morgan, D. et al., Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* **50** (2), 359 (2007).
- 77 Ortega, E. et al., Norepinephrine as mediator in the stimulation of phagocytosis induced by moderate exercise. *Eur J Appl Physiol* **93** (5-6), 714 (2005).
- 78 Steensberg, A. et al., Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* **529 Pt 1**, 237 (2000).
- 79 Calcagni, E. and Elenkov, I., Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1069**, 62 (2006).
- 80 Dunn, A. J., Cytokine activation of the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 608 (2000).
- 81 Ignatowski, T. A., Gallant, S., and Spengler, R. N., Temporal regulation by adrenergic receptor stimulation of macrophage (M phi)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post-LPS challenge. *J Neuroimmunol* **65** (2), 107 (1996).
- 82 Hadri, K. E. et al., Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* **272** (39), 24514 (1997).
- 83 Luo, G. et al., IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284** (5), R1249 (2003).
- 84 Zampetaki, A., Zhang, Z., Hu, Y., and Xu, Q., Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288** (6), H2946 (2005).

- 85 Petersen, A. M. and Pedersen, B. K., The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 10**, 43 (2006).
- 86 Vanden Berghe, W. et al., p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **273** (6), 3285 (1998).
- 87 Liu, Y. et al., Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol* **91** (2-3), 330 (2004).
- 88 Hoffman-Goetz, L., Spagnuolo, P. A., and Guan, J., Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain Behav Immun* **22** (2), 195 (2008).
- 89 Maestroni, G. J., Sympathetic nervous system influence on the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci* **1069**, 195 (2006).
- 90 Starkie, R. L. et al., Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol* **528** (Pt 3), 647 (2000).
- 91 Rhind, S. G. et al., Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281** (1), R66 (2001).
- 92 Elenkov, I. J., Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* **1024**, 138 (2004).
- 93 Gordon, S., Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest* **117** (1), 89 (2007).
- 94 Brubaker, P.; Myers, J., *Avaliação cardiorrespiratória de populações de alto risco ou enfermas*. (Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003).
- 95 Kizaki, T. et al., Swimming training prevents generation of suppressor macrophages during acute cold stress. *Med Sci Sports Exerc* **32** (1), 143 (2000).
- 96 Connor, T. J., Brewer, C., Kelly, J. P., and Harkin, A., Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 beta independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *J Neuroimmunol* **159** (1-2), 119 (2005).
- 97 Harri, M. and Kuusela, P., Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiol Scand* **126** (2), 189 (1986).
- 98 Coppes, R. P. et al., Co-released adrenaline markedly facilitates noradrenaline overflow through prejunctional beta 2-adrenoceptors during swimming exercise. *Eur J Pharmacol* **274** (1-3), 33 (1995).
- 99 Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M., and Schedlowski, M., Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun* **10** (2), 77 (1996).
- 100 Szelenyi, J. et al., Contribution of differently localized alpha 2- and beta-adrenoceptors in the modulation of TNF-alpha and IL-10 production in endotoxemic mice. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 145 (2000).

- 101 Maes, M. et al., The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products. *Psychiatry Res* **96** (3), 245 (2000).
- 102 Murray, D. R. et al., Sympathetic and immune interactions during dynamic exercise. Mediation via a beta 2-adrenergic-dependent mechanism. *Circulation* **86** (1), 203 (1992).
- 103 Garcia, J. J., del Carmen Saez, M., De la Fuente, M., and Ortega, E., Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxyphenyl-glycol. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors. *Mol Cell Biochem* **254** (1-2), 299 (2003).
- 104 Li, C. Y. et al., Adrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes: the role of beta-adrenergic receptors. *Anesth Analg* **96** (2), 518 (2003).
- 105 Sigola, L. B. and Zinyama, R. B., Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Immunology* **100** (3), 359 (2000).
- 106 Zinyama, R. B., Bancroft, G. J., and 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* **104** (4), 439 (2001).
- 107 Pritzlaff, C. J. et al., Catecholamine release, growth hormone secretion, and energy expenditure during exercise vs. recovery in men. *J Appl Physiol* **89** (3), 937 (2000).
- 108 Andreakos, E. et al., Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* **103** (6), 2229 (2004).
- 109 Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., and Vizi, E. S., The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52** (4), 595 (2000).
- 110 Steinacker, J. M., Lormes, W., Reissnecker, S., and Liu, Y., New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol* **91** (4), 382 (2004).
- 111 Tsigos, C. and Chrousos, G. P., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53** (4), 865 (2002).
- 112 Judd, A. M. et al., Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 628 (2000).
- 113 Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P., Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* **10** (9), 359 (1999).
- 114 Elenkov, I. J., Webster, E. L., Torpy, D. J., and Chrousos, G. P., Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann N Y Acad Sci* **876**, 1 (1999).

- 115 Krouwels, F. H. et al., Histamine affects interleukin-4, interleukin-5, and
interferon-gamma production by human T cell clones from the airways and
blood. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18** (5), 721 (1998).
- 116 Soltész, G., Diabetes in the young: a paediatric and epidemiological
perspective. *Diabetologia* **46** (4), 447 (2003).
- 117 Dahlquist, G., Can we slow the rising incidence of childhood-onset
autoimmune diabetes? The overload hypothesis. *Diabetologia* **49** (1), 20
(2006).
- 118 Sipetic, S. et al., Stressful life events and psychological dysfunctions before
the onset of type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* **20** (4), 527
(2007).
- 119 McGillis, J. P. et al., Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by
corticotropin-releasing factor. *J Neurosci Res* **23** (3), 346 (1989).
- 120 Jessop, D. S. et al., Effects of Acute Stress or Centrally Injected Interleukin-
1beta on Neuropeptide Expression in the Immune System. *Stress* **2** (2), 133
(1997).
- 121 Singh, V. K. and Leu, S. J., Enhancing effect of corticotropin-releasing
neurohormone on the production of interleukin-1 and interleukin-2. *Neurosci
Lett* **120** (2), 151 (1990).
- 122 Benou, C. et al., Corticotropin-releasing hormone contributes to the
peripheral inflammatory response in experimental autoimmune
encephalomyelitis. *J Immunol* **174** (9), 5407 (2005).
- 123 Chan, O. et al., Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal
activity, and diabetes lowers peak stress responses. *Endocrinology* **146** (3),
1382 (2005).
- 124 Wu, G., Knabe, D. A., and Kim, S. W., Arginine nutrition in neonatal pigs. *J
Nutr* **134** (10 Suppl), 2783S (2004).
- 125 Wilmore, D., Enteral and parenteral arginine supplementation to improve
medical outcomes in hospitalized patients. *J Nutr* **134** (10 Suppl), 2863S
(2004).
- 126 Mohan, I. K. and Das, U. N., Effect of L-arginine-nitric oxide system on
chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* **25** (7), 757 (1998).
- 127 Vasilijevic, A. et al., The effects of cold acclimation and nitric oxide on
antioxidative enzymes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol
Pharmacol* **145** (4), 641 (2007).
- 128 Piatti, P. M. et al., Long-term oral L-arginine administration improves
peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes
Care* **24** (5), 875 (2001).
- 129 Carvalho-Filho, M. A. et al., S-nitrosation of the insulin receptor, insulin
receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin
resistance. *Diabetes* **54** (4), 959 (2005).
- 130 Oliveira, H. R. et al., Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H
oxidase. *Diabetes* **52** (6), 1457 (2003).
- 131 Hirabara, S. M. et al., Acute effect of fatty acids on metabolism and
mitochondrial coupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1757** (1),
57 (2006).

- 132 Newsholme, P. et al., Diabetes associated cell stress and dysfunction: role
of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J*
Physiol **583** (Pt 1), 9 (2007).
- 133 Johnson, J. D. et al., Adrenergic receptors mediate stress-induced
elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol* **99** (5), 1789 (2005).
- 134 Aarnio, P., Lauritsen, T., and Dela, F., Insulin secretion and glucose kinetics
during exercise with and without pharmacological alpha(1)- and alpha(2)-
receptor blockade. *Diabetes* **50** (8), 1834 (2001).
- 135 Gobatto, C. A. et al., Maximal lactate steady state in rats submitted to
swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130** (1), 21
(2001).
- 136 de Oliveira Jr, L. P., Indução da Síntese de Proteínas de Choque Térmico
(HSP) mediada pelo óxido nítrico em resposta ao exercício de resistência. .
Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio grande do Sul 108pp
(2005).
- 137 Homem de Bittencourt, P. I., Jr. et al., Pyruvate is a lipid precursor for rat
lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. *Biochem Mol*
Biol Int **30** (4), 631 (1993); Curi, R. et al., The effect of propionate on lipid
synthesis in rat lymphocytes. *Gen Pharmacol* **25** (7), 1411 (1994).
- 138 Akerboom, T. P. and Sies, H., Assay of glutathione, glutathione disulfide,
and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**,
373 (1981).
- 139 Kolberg, A. et al., Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in
lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with
cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency.
Cell Biochem Funct **24** (1), 23 (2006).
- 140 Anderson, M. E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in
biological samples. *Methods Enzymol* **113**, 548 (1985).
- 141 Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., and Wolff, S. P., Lipid hydroperoxide
measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange.
Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26** (10),
853 (1991).
- 142 Arab, K. and Steghens, J. P., Plasma lipid hydroperoxides measurement by
an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* **325** (1), 158 (2004).
- 143 Sodergren, E., Nourooz-Zadeh, J., Berglund, L., and Vessby, B., Re-
evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the
measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods*
37 (3), 137 (1998).
- 144 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 **72**, 248 (1976).
- 145 Newman, S. L. and Mikus, L. K., Deposition of C3b and iC3b onto
particulate activators of the human complement system. Quantitation with
monoclonal antibodies to human C3. *J Exp Med* **161** (6), 1414 (1985).
- 146 Walter, R. J., Berlin, R. D., Pfeiffer, J. R., and Oliver, J. M., Polarization of
endocytosis and receptor topography on cultured macrophages. *J Cell Biol*
86 (1), 199 (1980).

- 147 Sanguedolce, M. V., Capo, C., Bongrand, P., and Mege, J. L., Zymosan-stimulated tumor necrosis factor- α production by human monocytes. Down-modulation by phorbol ester. *J Immunol* **148** (7), 2229 (1992).
- 148 Capo, C. et al., Effect of cytotoxic necrotizing factor-1 on actin cytoskeleton in human monocytes: role in the regulation of integrin-dependent phagocytosis. *J Immunol* **161** (8), 4301 (1998).
- 149 Kroner, E. E., Peskar, B. A., Fischer, H., and Ferber, E., Control of arachidonic acid accumulation in bone marrow-derived macrophages by acyltransferases. *J Biol Chem* **256** (8), 3690 (1981).
- 150 Kurose, I. et al., Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ Res* **76** (1), 30 (1995).
- 151 Santoro, M. G., Garaci, E., and Amici, C., Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (21), 8407 (1989).
- 152 Elia, G. and Santoro, M. G., Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem J* **300** (Pt 1), 201 (1994).
- 153 Navas Diaz, A., Gonzalez Garcia, J. A., and Lovillo, J., Enhancer effect of fluorescein on the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase chemiluminescence: energy transfer process. *J Biolumin Chemilumin* **12** (4), 199 (1997).
- 154 Ortega, E. et al., Role of Hsp72 and norepinephrine in the moderate exercise-induced stimulation of neutrophils' microbicide capacity. *Eur J Appl Physiol* **98** (3), 250 (2006).
- 155 Lehninger, Albert Lester, *Lehninger Principios de bioquímica*, 3 ed. (Sarvier, 2002, 2002).
- 156 Kreisman, S. H., Halter, J. B., Vranic, M., and Marliss, E. B., Combined infusion of epinephrine and norepinephrine during moderate exercise reproduces the glucoregulatory response of intense exercise. *Diabetes* **52** (6), 1347 (2003).
- 157 Straub, R. H. et al., Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay. *J Neurochem* **75** (6), 2464 (2000).
- 158 Gay, C. A. and Gebicki, J. M., Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem* **304** (1), 42 (2002).
- 159 Gladwin, M. T., Lancaster, J. R., Jr., Freeman, B. A., and Schechter, A. N., Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* **9** (5), 496 (2003).
- 160 Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Stamler, J. S., S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* **380** (6571), 221 (1996).
- 161 Akerboom, T. P., Gartner, M., and Sies, H., Cellular hydroperoxide metabolism: the roles of glutathione peroxidases and of catalase in liver. *Bull Eur Physiopathol Respir* **17 Suppl**, 221 (1981).
- 162 Gordon, S., The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**, S9 (2007).

- 163 Ortega, E. et al., Neuroimmunomodulation during exercise: role of catecholamines as 'stress mediator' and/or 'danger signal' for the innate immune response. *Neuroimmunomodulation* **14** (3-4), 206 (2007).
- 164 Dimitrijevic, M. et al., Chronic propranolol treatment affects expression of adrenoceptors on peritoneal macrophages and their ability to produce hydrogen peroxide and nitric oxide. *J Neuroimmunol* **211** (1-2), 56 (2009).
- 165 Skoglund, G. et al., Comparison of effects of neuropeptide Y and norepinephrine on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas. *Diabetes* **40** (6), 660 (1991).
- 166 Chu, C. A. et al., The direct effects of catecholamines on hepatic glucose production occur via alpha(1)- and beta(2)-receptors in the dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279** (2), E463 (2000).
- 167 Lekas, M. C. et al., Glucose uptake during centrally induced stress is insulin independent and enhanced by adrenergic blockade. *J Appl Physiol* **87** (2), 722 (1999).
- 168 Coker, R. H. et al., Role of hepatic alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation on hepatic glucose production during heavy exercise. *Am J Physiol* **273** (5 Pt 1), E831 (1997).
- 169 Savontaus, E., Fagerholm, V., Rahkonen, O., and Scheinin, M., Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* **578** (2-3), 359 (2008).
- 170 Febbraio, M. A. et al., Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* **9** (4), 390 (2004).
- 171 Stafford, J. M. et al., Central nervous system neuropeptide Y signaling modulates VLDL triglyceride secretion. *Diabetes* **57** (6), 1482 (2008).
- 172 Fisher-Wellman, K. and Bloomer, R. J., Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* **8**, 1 (2009).
- 173 Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., and Storey, K. B., Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Radic Biol Med* **19** (3), 271 (1995).
- 174 Cabell, K. S., Ma, L., and Johnson, P., Effects of antihypertensive drugs on rat tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels. *Biochem Pharmacol* **54** (1), 133 (1997).
- 175 Gillissen, A., Wickenburg, D., van Zwoll, D., and Schultze-Werninghaus, G., Beta-2-agonists have antioxidant function in vitro. 2. The effect of beta-2-agonists on oxidant-mediated cytotoxicity and on superoxide anion generated by human polymorphonuclear leukocytes. *Respiration* **64** (1), 23 (1997).
- 176 Moniri, N. H. and Daaka, Y., Agonist-stimulated reactive oxygen species formation regulates beta2-adrenergic receptor signal transduction. *Biochem Pharmacol* **74** (1), 64 (2007).
- 177 Abdel-Zaher, A. O., Ahmed, I. T., and El-Koussi, A. D., The potential antidiabetic activity of some alpha-2 adrenoceptor antagonists. *Pharmacol Res* **44** (5), 397 (2001).

- 178 Dasu, M. R. et al., High glucose induces toll-like receptor expression in
human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* **57** (11), 3090 (2008).
- 179 Madden, K. S., Sanders, V. M., and Felten, D. L., Catecholamine influences
and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev*
Pharmacol Toxicol **35**, 417 (1995).
- 180 Gosain, A., Muthu, K., Gamelli, R. L., and DiPietro, L. A., Norepinephrine
suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and
beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery* **142** (2), 170 (2007).
- 181 Maestroni, G. J. and Conti, A., Modulation of hematopoiesis via alpha 1-
adrenergic receptors on bone marrow cells. *Exp Hematol* **22** (3), 313 (1994).
- 182 Zhong, H. et al., The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by
the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent
mechanism. *Cell* **89** (3), 413 (1997).
- 183 Bernard, A. C. et al., Beta adrenoceptor regulation of macrophage arginase
activity. *Surgery* **127** (4), 412 (2000).
- 184 Bronte, V. and Zanovello, P., Regulation of immune responses by L-arginine
metabolism. *Nat Rev Immunol* **5** (8), 641 (2005).
- 185 Peranzoni, E. et al., Role of arginine metabolism in immunity and
immunopathology. *Immunobiology* **212** (9-10), 795 (2007).
- 186 Wu, G. and Morris, S. M., Jr., Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.
Biochem J **336** (Pt 1), 1 (1998).
- 187 Farmer, P. and 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* **279** (4), L675 (2000).
- 188 Ye, R. D., beta-Adrenergic agonists regulate NF-kappaB activation through
multiple mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279** (4), L615
(2000).
- 189 Zhou, M. et al., The role of Kupffer cell alpha(2)-adrenoceptors in
norepinephrine-induced TNF-alpha production. *Biochim Biophys Acta* **1537**
(1), 49 (2001).
- 190 Flierl, M. A. et al., Upregulation of phagocyte-derived catecholamines
augments the acute inflammatory response. *PLoS One* **4** (2), e4414 (2009).
- 191 Flierl, M. A. et al., Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory
arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med*
14 (3-4), 195 (2008).
- 192 Flierl, M. A. et al., Phagocyte-derived catecholamines enhance acute
inflammatory injury. *Nature* **449** (7163), 721 (2007).
- 193 Fleshner, M. and Johnson, J. D., Endogenous extra-cellular heat shock
protein 72: releasing signal(s) and function. *Int J Hyperthermia* **21** (5), 457
(2005).
- 194 Campisi, J. and Fleshner, M., Role of extracellular HSP72 in acute stress-
induced potentiation of innate immunity in active rats. *J Appl Physiol* **94** (1),
43 (2003).
- 195 Asea, A. et al., Novel signal transduction pathway utilized by extracellular
HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277** (17),
15028 (2002).

- 196 Zhou, J. et al., Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2
and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway.
Immunology **114** (4), 522 (2005).
- 197 Gleeson, M., McFarlin, B., and Flynn, M., Exercise and Toll-like receptors.
Exerc Immunol Rev **12**, 34 (2006).
- 198 Lancaster, G. I. and Febbraio, M. A., Exosome-dependent trafficking of
HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem*
280 (24), 23349 (2005).
- 199 Ortega, E., Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by
exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev* **9**, 70 (2003).
- 200 Walsh, R. C. et al., Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress*
Chaperones **6** (4), 386 (2001).
- 201 Matzinger, P., The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**
(5566), 301 (2002).
- 202 Asea, A., Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72:
Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev* **2** (3), 209 (2006).
- 203 Febbraio, M. A. and Koukoulas, I., HSP72 gene expression progressively
increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise.
J Appl Physiol **89** (3), 1055 (2000).
- 204 Johnson, J. D. et al., Catecholamines mediate stress-induced increases in
peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* **135** (4), 1295
(2005).
- 205 Asea, A. et al., HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-
dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and
cytokine. *Nat Med* **6** (4), 435 (2000).
- 206 Lancaster, G. I. et al., The physiological regulation of toll-like receptor
expression and function in humans. *J Physiol* **563** (Pt 3), 945 (2005).
- 207 Devaraj, S. et al., Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression
in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a
proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* **93** (2), 578 (2008).
- 208 Ralph, J. A. et al., A role for type 1alpha corticotropin-releasing hormone
receptors in mediating local changes in chronically inflamed tissue. *Am J*
Pathol **170** (3), 1121 (2007).