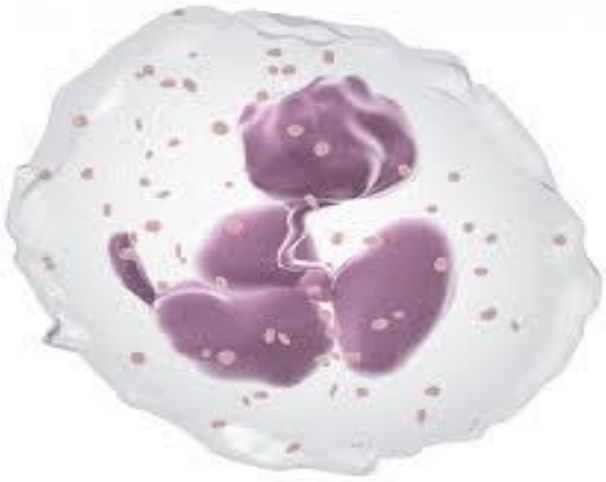
2014

DOUTORADO



Albená Nunes da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Estudo do papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico em camundongos

Belo Horizonte
Janeiro
2014

Albená Nunes da Silva

Estudo do papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico em camundongos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profª. Drª. Vanessa Pinho
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Menezes

Belo Horizonte
Janeiro
2014

Dedicatória...

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, minha maior fonte diária de energia. À minha amada esposa Janaína Matos Moreira pela paciência na minha ausência, pelo carinho no dia-a-dia, pela cumplicidade e por nunca ter duvidado de que eu conseguiria. Aos meus familiares, amigos e alunos que me incentivam diariamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço, imensamente, à brilhante orientadora, professora Drª. Vanessa Pinho, pela ciência, pela paciência, pelo zelo e por ser exemplo de trabalho diariamente.

Agradeço, ao professor, co-orientador e amigo professor Dr. Gustavo Menezes, por ser inspiração diária e sinônimo de amor à ciência de qualidade.

Agradeço ao professor Mauro Martins Teixeira, pelo apoio, pela supervisão e pela estrutura necessária para realização do projeto.

Agradeço aos meus sogros, Claudete Botaro e Marcelo Moreira pela confiança e por terem se tornado minha família.

Agradeço aos amigos do convívio no laboratório, principalmente Fernando Lopes, Marina Romero, Priscila Telles, Bárbara Maximino, Denise Perez, William Wilson e Rayssa Athayde pela receptividade, carinho e respeito.

Agradeço aos demais alunos do laboratório e do programa de pós-graduação em Biologia Celular por fazerem do ICB um ambiente adorável para trabalhar. Aos professores da Pós-graduação, pela sabedoria, ensinamentos e cobranças. A todos os amigos que com incentivo e valorização me conduziram e nunca me deixaram desistir.

Agradeço à minha família, que torce por mim e valoriza minhas conquistas.

Agradeço, com todo meu amor, à minha esposa Janaina, por, nesta vida, caminhar lado a lado comigo, olhando em frente, cultivando sentimentos tão valorosos como carinho, respeito, companheirismo e cumplicidade. A você, “pretinha”, dedico este trabalho, minha companhia, minha lealdade e principalmente meu AMOR.

"[...] Voa e canta,

Enquanto resistirem suas asas."

(Menochi Dell Pichia)

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Estudo do papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico em camundongos.

Aluno: Albená Nunes da Silva
Orientadora: Profª. Drª. Vanessa Pinho da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte
Janeiro
2014

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....19
1 – Inflamação.....19
1.1 – Recrutamento de leucócitos.....19
1.2 – Moléculas de adesão.....25
1.3 – Quimiocinas.....30
1.4 – Espécies reativas de oxigênio.....31
2 – Exercício físico.....40
2.1 – Exercício físico e inflamação.....41
2.2 – Exercício físico e estresse oxidativo.....42
3 – OBJETIVO GERAL.....49
3.1 – Objetivos Específicos.....49
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....51
4.1 – Animais.....51
4.2 – Protocolos de Exercício Físico.....51
4.3 – Procedimentos Técnicos.....53
4.3.1.0 – Análise do Lactato Sanguíneo.....53
4.3.1.1 – Análise da Glicose Sanguínea.....53
4.3.1.2 – Análise da Creatina Kinase (CK).....53
4.3.1.3 – Administração de Fármacos.....53
4.3.1.4 – Determinação de Citocinas e Quimiocinas (ELISA).....54
4.3.1.5 – Imagem de Perfusão por Laser DOPPLER.....54
4.3.1.6 – Técnica Histológica.....55
4.3.1.7 – Ensaio Enzimático para MPO e NAG.....55
4.3.1.8 – Estresse Oxidativo (TBARS e GSH).....57
4.3.1.9 – Teste de Pressão na Pata (VON FREY): Medida de nocicepção.....58
4.3.2.0 – Análise do Consumo de Oxigênio.....58
4.3.2.1 – Microscopia Intravital e Confocal na Vasculatura do Quadríceps....59
4.3.2.2 – Contagem Total e Diferencial de Células.....60
4.3.2.3 – Expressão Gênica (qPCR – Real Time).....61
5 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....62

6 – RESULTADOS 63
7 – DISCUSSÃO.....90
8 – CONCLUSÃO.....103
9 – RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS.....104
10– DIREÇÕES FUTURAS.....104
11 – SUPORTE FINANCEIRO.....104
12 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....105

Resumo: Uma única sessão de exercício físico intenso pode induzir aumento na produção e ativação de células do sistema imune na circulação. Estas células estimuladas podem infiltrar o tecido muscular e induzir uma resposta inflamatória local. No processo inflamatório há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), porém, o papel da ROS na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico ainda não foi elucidado. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é estudar o papel do ROS na resposta inflamatória induzida por um protocolo de exercício físico. **Método:** Foram utilizados camundongos C57/BL6, LysM-eGFP e gp91$^{phox-/-}$. Estes animais realizaram um protocolo de exercício físico até a fadiga na esteira, onde percorreram uma distância média de 438.6 ± 68.4 metros, alcançaram uma velocidade média de 15.8 ± 3.7 metros/minuto, com duração média de 56,3 ± 6.7 minutos. Foram realizadas análises no sangue e no tecido muscular esquelético imediatamente após, 01, 03, 06, 12 e 24 horas após a realização do exercício físico até a fadiga. **Resultados:** Imediatamente após o exercício físico houve aumento nas concentrações plasmáticas de lactato e redução nos níveis de glicose. A CK aumentou 06 e 12 horas após o exercício físico até a fadiga. O número de células totais do sangue aumentou 12 e 24 horas após o exercício físico, assim como aumentaram as subpopulações de neutrófilos (12 e 24 horas), monócitos (06, 12 e 24 horas) e linfócitos (12 e 24 horas). Utilizando microscopia intravital, pode-se perceber aumento no número de células rolando e aderidas ao endotélio vascular, nos momentos 03, 06, 12 e 24 horas no grupo exercitado quando comparado com o grupo controle. A utilização da técnica de microscopia confocal e animais LysM-eGFP pode-se perceber que os neutrófilos de animais exercitados estavam em processo de transmigração 12 horas após o exercício físico até a fadiga. Estes resultados foram confirmados pela histologia que demonstrou a presença de neutrófilos no tecido muscular e foco inflamatório 12 horas após o protocolo. A utilização de apocinina foi capaz de impedir o recrutamento de células para o tecido muscular esquelético no pico da inflamação. Este resultado foi confirmado utilizando camundongos deficientes de gp91$^{phox-/-}$. A administração de SOD exacerbou a adesão e a transmigração de leucócitos nos vasos do músculo quadríceps. As moléculas de adesão *E-selectina*, *L-selectina* e *PECAM-1* estavam com a expressão aumentada 12h após a aplicação do exercício físico até a fadiga. O aumento no recrutamento ocorreu ainda que o exercício não tenha sido realizado até a fadiga. O treinamento físico de seis semanas não impediu o aumento de células em processo de rolamento e adesão na vasculatura do tecido muscular. Mesmo após o treinamento, quando levados até à fadiga, os animais apresentaram níveis de CK elevados quando comparados ao repouso, porém mais baixos do que os não treinados. *E-selectina*, *L-selectina* e *PECAM-1* estavam com a expressão aumentada após seis semanas de treinamento, assim como *Pax3.* **Conclusão:** Estes resultados, em seu conjunto mostram que o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induz recrutamento de leucócitos para o tecido muscular exercitado e este recrutamento é dependente da espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Exercício físico, sistema imune, inflamação e estresse oxidativo.

Abstract: During an acute bout of exercise there is an activation and mobilization of immune cells into circulation. These cells may infiltrate into muscle sites inducing local inflammatory response. Skeletal muscle has many sources of reactive oxygen species (ROS) that are activated during and after exercise. These factors indicate changes in biologic redox state and onset of an inflammatory process in response to exercise. Nevertheless, the role of ROS in an inflammatory response immediately and hours after an exercise bout is not elucidated. **PURPOSE:** The aim of this study is, thus, to investigate the role of ROS in an inflammatory response in mice running to fatigue. **METHODS:** C57/BL6, LysM-eGFP and gp91$^{phox-/-}$ animals performed exercise to fatigue on a treadmill. Blood, muscle and intravital images from the muscle tissue were collected after exercise at different time-points. Leukocyte recruitment was assessed by intravital microscopy and histological technical. **RESULTS:** There was an enhancement in plasma lactate and CK concentration after exercise. Total number of cells in the blood increased 12 and 24h after exercise when compared with control group. The number of blood monocytes, neutrophils and lymphocytes also increased 12 and 24h post-exercise. There was a raise in leukocyte rolling compared to basal levels at 3, 6, 12 and 24h post-exercise. In the exercising group Adhesion cells and transmigrating cells were increased 6 and 12h post-exercise, respectively Apocynin administration completely inhibited cell recruitment and SOD exacerbated the increase of number of adherent cells 12h more than exercise group. The magnitude of workload (60% of intensity or 60% of duration) did not change the number of rolling and adherent cells. CK levels increased less in a lower magnitude of workload. Physical training does not inhibit the increase in blood CK levels and in the number of rolling and adherent leukocytes in a post capillary venule. The expression of adhesion molecules as *L-selectin*, *P-selectin* and *PECAM-1* increases 12h after exercise and apocynin can block this response. Training protocol also increased the expression of *L-selectin*, *E-selectin* and *Pax3*. **CONCLUSION:** These findings suggest that exercise to fatigue leads to a cross-talk between immune system and muscular tissue in a ROS-dependent manner.

Key Words: Physical exercise, immune system, inflammation and oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas clássicas da cascata da diapedese

Figura 2. Ativação da NADPH oxidase.

Figura 3. Protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga.

Figura 4. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga representou estresse fisiológico para os camundongos.

Figura 5. O protocolo de exercício físico até a fadiga aumentou o fluxo de sangue na pata.

Figura 6. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induziu alterações nas sub-populações de leucócitos no sangue.

Figura 7. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induziu aumento no recrutamento de leucócitos.

Figura 8. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga causou transmigração de neutrófilos através do endotélio.

Figura 9. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga gerou infiltrado de leucócitos no tecido muscular.

Figura 10. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga aumentou a quantidade relativa de número de neutrófilos no tecido muscular.

Figura 11. Resposta na nociecpção ao protocolo de exercício físico até a fadiga.

Figura 12. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga altera os níveis de citocinas no tecido muscular.

Figura 13. O protocolo de exercício físico alterou a expressão gênica de moléculas de adesão.

Figura 14. O protocolo de exercício físico alterou a expressão gênica do fator hipertrófico.

Figura 15. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga alterou o equilíbrio oxidante/redutor no tecido muscular.

Figura 16. A inibição ou a deleção da NADPH oxidase bloqueia o recrutamento de leucócitos para o tecido muscular.

Figura 17. Superoxido dismutase (geradora de H_2O_2) amplificou o recrutamento de células para o músculo exercitado.
Figura 18. Protocolos de exercício físico que não induziram fadiga também induziram recrutamento de leucócitos.
Figura 19. Protocolo de treinamento físico de seis semanas.
Figura 20. O protocolo de treinamento de seis semanas de treinamento alterou a expressão gênica de moléculas inflamatórias e ativação de células satélites.
Figura 21. O protocolo de treinamento de seis semanas não induziu melhoria do desempenho.
Figura 22. Evolução do peso dos animais e consumo de oxigênio após 6 semanas de treinamento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers específicos para qPCR – Real Time

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Dismutação de dois ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O).

Equação 2. Reação de Haber-Weiss exemplificando a redução do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) à hidroxila ($OH^{\bullet}$) utilizando Fe^{2+}.

Equação 3: Reação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com a hidroxila ($OH^{\bullet}$) formando o oxigênio singlet ($^1O_2$) e a reação do óxido nítrico com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formando peroxinitrito ($ONOO^-$).

Equação 4. Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) na NADPH oxidase, com gasto de uma molécula de NADPH.

Equação 5. Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) originado a partir de homólise.

Equação 6. Formação de hidroxila ($OH^{\bullet}$) a partir da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metal de transição.

Equação 7. Dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Equação 8. Redução tetravalente do oxigênio resultando em água.

Equação 9. Mecanismos de redução do O_2.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Protocolo do CETEA
ANEXO II – Resposta da revista PLOS ONE
ANEXO III – Artigo submetido

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Observação: Foram utilizadas algumas siglas em inglês, pois ainda não existe consenso para traduções em português.

ADM = amplitude de movimento
ADP = difosfato de adenosina
ATP = trifosfato de adenosina
Ca^{2+} = cálcio
CAT = catalase
CD = grupamento de diferenciação (cluster of differentiation)
CK = creatina kinase
CSF = fator estimulador de colônia
Cu-ZnSOD = superóxido dismutase dependente de cobre ou zinco
DAG = diacilglicerol
DNA = ácido desoxirribonucleico
DAMP = padrões moleculares associados ao perigo
DOMS = dor muscular de aparecimento tardio
ECAM = moléculas de adesão da célula epitelial
ESL-1 = ligante de E-selectina
GAG = glicosaminoglicanas
$gp91^{phox}$ = subunidade glicosilada da enzima NADPH oxidase
GPx = glutationa peroxidase
GR = glutationa redutase
GSH = glutationa reduzida
GSSG = glutationa oxidada
H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
$HO_2^{\bullet}$ = hidroperoxila
HOCl = ácido hipocloroso
ICAM-1 = molécula de adesão intercelular-1
IL-1 = interleucina-1
IL-1β = interleucina-1β
IL-4 = interleucina-4
IL-6 = interleucina-6
IL-10 = interleucina-10
IFN-g = interferon-g
i.p. = intraperitonealmente
JAM = molécula de adesão juncional
LTB4 = leucotrieno B4
LFA-1 = antígeno associados à função linfocitária-1
LSP-1 = proteínas específicas de neutrófilos-1
Mac-1 = antígeno de macrófago
Mb = mioglobina
MPO = mieloperoxidase
MDA = malondialdeído
Mn-SOD = superóxido dismutase dependente de manganês
MTT = sal tetrazólio

NAG = N-acetil-glicosaminidase
NADPH oxidase = nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase
NF-κB = factor nuclear kappa B
NK = linfócitos exterminadores naturais
$^1O_2$ = oxigênio singlet
$O_2^{\bullet -}$ = ânion superóxido
O_3 = ozônio
$OH^{\bullet}$ = hidroxila
PAF = fatores ativadores de plaquetas
PAMPs = padrões moleculares associados a patógenos
Pax3 = paired box 3
Pax7 = paired box 7
PCr = fosfocreatina
PKC = proteínas *kinases* C
PBS = solução salina tampão
PECAM-1 = molécula de adesão celular endotélio-plaqueta-1
PDB = éster de forbol
PI3 kinase = fosfatidilinositol 3 kinase
PGE2 = prostaglandina E_2
PSGL-1 = ligante da glicoproteína P-selectina-1
PVR = receptor poliovirus
RNS = reactive nitrogen species (espécies reativas de nitrogênio)
$RO^{\bullet}$ = alcoxila
$RO_2^{\bullet}$ = peroxila
ROS = espécies reativas de oxigênio
RNA = ácido ribonucléico
RLU = unidade relativa de luz
SOD = superóxido dismutase
TBARS = substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TNF-α = fator de necrose tumoral-α
VAP-1 = proteína de adesão vascular-1
VCAM-1 = molécula de adesão celular vascular-1
VLA-4 = Antígeno muito tardio-4
$VO_{2máx}$ = volume máximo de oxigênio
WT = wild type

INTRODUÇÃO

A hipótese deste trabalho foi estruturada no sentido de investigar a associação entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelo exercício físico e o possível processo inflamatório que ocorre no tecido muscular exercitado nas horas subsequentes ao exercício físico extenuante. Para tanto, fez-se necessário um melhor entendimento dos conceitos de inflamação e estresse oxidativo, bem como da relação existente entre o exercício físico e o processo inflamatório no tecido muscular e também entre o exercício físico e o estresse oxidativo.

1 – Inflamação

A inflamação é conhecida desde os primeiros registros históricos da humanidade e a descrição de mudanças no tecido que caracterizam esta resposta a vários fatores irritantes foram descritos por *Cornelius Celsus* no século 30, contudo, existiam referências muito anteriores, descrevendo a inflamação em papiros egípcios 1650 BCE (*Before Common Era*) (citado em WALLACH *et al.*, 2013). Desde então, algumas mudanças conceituais são sugeridas por estudiosos que se preocupam com os mecanismos envolvidos na inflamação. Estas alterações refletem uma crescente consciência de que a inflamação, apesar de ter sido principalmente estudada em respostas a agentes externos prejudiciais, é fundamentalmente mediada pelo hospedeiro (WALLACH *et al.*, 2013). Na segunda metade do século XX, a descoberta de citocinas e seus mecanismos de sinalização intracelular ajudaram a avançar nossa compreensão molecular sobre o padrão característico de atividades celulares que está envolvido na inflamação. Juntamente com a mudança na ideia geral sobre inflamação, induzidas pelas descobertas mais recentes sobre os mecanismos inflamatórios, também tem mudado nossa compreensão dos papéis funcionais da inflamação, da lesão tecidual e da morte celular que dela decorrem. Assim, embora a inflamação tenha sido inicialmente pensada como uma consequência patológica passiva da lesão, o

fenômeno foi gradualmente sendo reconhecido também como um mecanismo de defesa imunitária e reparação tecidual (WALLACH *et al.*, 2013).

A inflamação pode ser conceituada como uma resposta do tecido a uma infecção ou a um dano do tecido (MEDZHITOV, 2008). Ainda que o conceito de inflamação esteja sofrendo alterações ao longo dos anos e o entendimento da comunidade científica sobre inflamação tenha avançado muito nas ultimas décadas devido à alta tecnologia hoje disponível para o estudo deste fenômeno, a inflamação é comumente relacionada ao aparecimento de cinco sinais cardinais: calor, vermelhidão (rubor), inchaço (edema), dor e a perda da função (SCOTT *et al.*, 2004). Na resposta inflamatória, são observadas alterações funcionais nos tecidos envolvidos, tais como, produção de citocinas, na expressão de moléculas de adesão e na permeabilidade do endotélio vascular adjacente. Desta forma, a inflamação é entendida como um mecanismo importante tanto na restauração da homeostase após uma lesão tecidual como também na eliminação de agentes físicos, químicos e microrganismos presentes no organismo (WALLACH *et al.*, 2013).

1.1 – Recrutamento de leucócitos

A inflamação é fortemente caracterizada pela diapedese de leucócitos que resulta no recrutamento de leucócitos do sangue para o tecido conjuntivo. Para que isso ocorra, faz-se necessária uma cascata de eventos mediada por inúmeras moléculas que resultam em uma maior interação leucócito-endotélio e leucócito-leucócito (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013). Durante o processo de recrutamento, os leucócitos migram do sangue para dentro do tecido, atravessando as paredes das vênulas pós-capilares. Algumas moléculas especializadas da superfície das células endoteliais possuem um papel crucial neste processo. Estas moléculas além de funcionarem como âncoras mecânicas, conferem especificidade no processo de recrutamento através do padrão seletivo na parede do vaso. Células mielóides e os linfócitos possuem etapas semelhantes da cascata de adesão, entretanto, existem algumas diferenças significativas

(RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008). As classes de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento celular incluem as selectinas e suas respectivas glicoproteínas, as integrinas e as imunoglobulinas. Todas estas moléculas de adesão são glicoproteínas transmembranas do tipo I.

Inúmeras células estão envolvidas na inflamação, entre elas os leucócitos, que são células diferenciadas a partir de células-tronco, oriundas da medula óssea e presentes no sangue, linfa, órgãos linfóides e vários tecidos conjuntivos. Os leucócitos fazem parte de um grande grupo de células que se apresenta em uma grande variedade de formas, tamanhos, número e funções específicas. Os leucócitos se dividem em duas classes, os granulócitos que constituem de 50% a 60% de todos os leucócitos e dividem-se em neutrófilos, eosinófilos e basófilos e os agranulócitos que constituem 30% a 40% de todos os leucócitos e dividem-se em linfócitos (células B, T), linfócitos exterminadores naturais (*natural killers* - NK) e os monócitos.

Um adulto normal possui entre 3.800 e 9.800 mil leucócitos por microlitro (milímetro cúbico) de sangue. Os leucócitos fazem parte do sistema imune do organismo e têm por função a eliminação de microrganismos (bactérias, vírus e fungos) pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou manutenção da homeostase do organismo pelo reconhecimento de padrões moleculares associados lesões celulares (DAMPs). Os leucócitos podem agir na captura, na eliminação de patógenos invasores, na fagocitose de *debris* (resto de tecido) e na produção de citocinas e anticorpos (HICKEY e KUBES, 2009). Tem ficado cada vez mais claro na literatura que esta resposta do hospedeiro é essencial à sobrevivência do organismo.

Quando ocorre um processo inflamatório em resposta a uma infecção ou agressão/dano ao organismo, os leucócitos podem sair da corrente sanguínea e entrar no tecido lesado, esta passagem do sangue para o tecido é chamada de diapedese (HICKEY e KUBES, 2009; SHEN *et al*., 2013). Na inflamação, a diapedese de leucócitos para os diversos tecidos envolve quatro etapas fundamentais: a captura, o rolamento, a adesão e a transmigração da célula (KUBES e KERFOOT, 2001). Estas etapas ocorrem por ação das moléculas de

adesão presentes nos leucócitos e no endotélio que se encaixam de maneira complementar. Além disso, a produção de fatores quimiotáticos, como por exemplo as quimiocinas, contribui para o direcionamento do processo de recrutamento.

O entendimento do processo de recrutamento celular na inflamação tem evoluindo muito nos últimos anos, principalmente devido à evolução da tecnologia disponível para se estudar este fenômeno. Tem sido descrito que no recrutamento de leucócitos para os diversos tecidos durante uma resposta inflamatória além das etapas fundamentais (descritras anteriormente), existem fases intermediárias como a firme adesão e o *crawling* (engatinhar) imediatamente anterior à etapa de transmigração (PHILLIPSON *et al.*, 2006). Estas etapas também ocorrem por ação das moléculas de adesão específicas presentes tanto no leucócito quanto no endotélio que se encaixam de maneira complementar e sequencial.

Captura

A fase de captura é definida como a primeira ligação molecular entre o leucócito circulante e o endotélio vascular, onde, é necessário uma aproximação entre leucócito e endotélio para que ocorra esta ligação que é mediada por L-selecinta e P-selectina e seus ligantes de selectinas que são proteínas que contêm carboidratos, principalmente a ligante da glicoproteina P-selectina-1 (PSGL-1) (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008). Esta etapa permite a aproximação dos leucócitos às células endoteliais e aos eventos locais de inflamação que estão ocorrendo no tecido. Uma vez capturados e iniciando a fase de rolando nas células endoteliais, os leucócitos podem então ser ativados por agentes quimiotáticos que se difundem do tecido adjacente, ou, mais provavelmente, são expressos e se ligam a glicosaminoglicanos na superfície da célula endotelial. Estes fatores quimiotáticos podem também estar acoplados em receptores com domínios transmembrana (serpentinóides) acoplados a proteína G. Essa ativação leva ao aumento do número e, principalmente, da afinidade de integrinas expressas na superfície do leucócito (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013). Em

vênulas inflamadas *in vivo*, a conexão de leucócitos também envolvem outros mecaniscmos tais como a captura secundária através da interação leucócito-leucócito (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008).

Rolamento

Se após a captura do leucócito ocorrer formação de novas ligações moleculares, a ligação inicial é então desfeita e o leucócito entra então em uma fase de rolamento estável. Esta fase é regulada pelo próprio movimento gerado no fluxo sanguíneo e o contato do leucócito com o endotélio. O rolamento tem como função reduzir a velocidade do leucócito em relação ao fluxo e também facilitar a firme adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008). A fase de rolamento aumenta a exposição do leucócito à superfície endotelial, as possíveis quimiocinas acopladas e outros sinais importantes para ativação presentes na superfície do endotélio vascular (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008). A ativação de leucócitos durante o rolamento pode acontecer em resposta à presença de quimiocinas ou receptores transmembrana tanto na superfície dos próprios leucócitos quanto na superfície de células endoteliais e resultam em uma adesão firme e esta fase é relativamente mais rápida (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008).

Adesão

Na fase seguinte, a chamada adesão, as integrinas que são glicoproteínas heterodiméricas aderentes transmembranas, constituídas de cadeias α e β, então, se ligam aos seus receptores, moléculas da família das imunoglobulinas, expressos nas células endoteliais. Essa ligação permite firme adesão entre o leucócito e o endotélio. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, tem mostrado que, nesta fase de adesão, os leucócitos são ativados rapidamente por quimiocinas e outros quimioatraentes e esta ativação é mediada pela ligação da integrinas à superfamília das imunoglobulinas, tais como ICAM-1 e VCAM-1 expressos nas

células endoteliais (LEY *et al*., 2007). Durante a inflamação, as células endoteliais são ativadas por citocinas pró-inflamatórias e expressam moléculas de adesão, sintetizam quimiocinas e quimioatraentes lipídicos que estão presentes em sua superfície. A ativação das células endoteliais pode resultar também da presença de quimioatraentes gerados da clivagem proteolítica dos mastócitos ativados. Muitas quimiocinas estão aderidas à glicosaminoglicanas (GAGs) na superfície das células endoteliais. A especificidade da adesão de leucócitos tem sido atribuída à expressão de integrinas e seus ligantes, de quimiocinas e seus receptores, e além disso, a cascata de sinalização desencadeada por quimiocinas podem regular integrinas distintas de diferentes subtipos de leucócitos. Esta diversidade pode estar relacionada às variações quantitativas de parâmetros pró-adesivos, tais como níveis de expressão e afinidades das quimiocinas e receptores (LEY *et al*., 2007).

Transmigração

A etapa de adesão do recrutamento prepara o neutrófilo para a transmigração, que não necessariamente acontece no local onde se iniciou a captura do leucócito. Sob condições de estresse de cisalhamento, a arquitetura das células endoteliais se alongam na direção do fluxo sanguíneo e permitem com que o neutrófilo “engatinhe” e procure o melhor local para então transmigrar através da junção endotelial. Os diversos leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e diferentes linfócitos) utilizam moléculas diferentes, entretanto sobrepostas, para o processo de recrutamento. Este fato explica, em parte, a seletividade por certos tipos celulares em determinados tipos de resposta inflamatória. Após o extravasamento, os leucócitos migram através do tecido em direção ao dano ou ao agente infeccioso, orientados através do gradiente quimiotático. Os neutrófilos são tipicamente os primeiros leucócitos recrutados para o sítio inflamatório e são capazes de eliminar patógenos invasores através de múltiplos mecanismos. Dados experimentais mostram que a chegada do leucócito ao sítio inflamatório é crucial para o *“clearance”* tanto do tecido lesado quanto do

infectado. Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que a função dos leucócitos vai além do "*clearance*" e podem estar associados às respostas adaptativas do tecido acometido do processo inflamatório.

Na transmigração, o leucócito atravessa o endotélio o que leva aproximadamente 2 a 5 minutos e através da membrana basal mais 5 a 15 minutos. A fase de transmigração requer integrinas tais como as moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1 e ICAM-2) e a proteína de adesão vascular-1 (VCAM-1) assim como diferentes moléculas juncionais incluindo a molécula de adesão celular plaquetas-endotélio (PECAM-1 também conhecida como CD31) e as moléculas de adesão juncional (JAMs), moléculas de adesão da célula epitelial (ECAM) e outras moléculas de células endoteliais nas quais os mecanismos de funcionamento ainda não são claros tais como receptor poliovirus (PVR também conhecido como CD155), ectoenzimas, por exemplo, a proteína de adesão vascular-1 (VAP-1) e proteínas específicas de neutrófilos-1 (LSP-1). A passagem através da camada celular ocorre de maneira paracelular (entre células endoteliais) ou de maneira transcelular (através da célula endotelial) (LEY *et al*., 2007).

Desta maneira, fica clara a importância de mediadores inflamatórios no processo de recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, tanto para iniciar, para modular a resposta inflamatória e também para resolver a inflamação. Entre estes mediadores estão as quimiocinas, as moléculas de adesão e as espécies reativas de oxigênio.

1.2 – Moléculas de adesão

Existem algumas famílias de moléculas de adesão que estão envolvidas no processo de recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios. Entre elas a famílias das selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina) e seus ligantes tais como o ligante da glicoproteína P-selectina-1 (PSGL-1) (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008) e a molécula de adesão intercelulares-1 (ICAM-1), molécula de adesão da

célula vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotélio-plaqueta-1 (PECAM-1) (LEY *et al*., 2007).

Selectinas

As selectinas são uma família de proteínas lectinas transmembrana expressas na superfície de leucócitos (L-selectina), de células endoteliais (P-selectina e E-selectina). As selectinas contém um domínio N-terminal extracelular com a estrutura homóloga à lectina dependente de cálcio, seguido por um domínio homólogo do fator de crescimento epidermal. Cada selectina insere dentro da membrana celular via domínio hidrofóbico de membrana e calda citoplasmática. Cada uma das três selectinas medeiam o rolamento de leucócitos de maneira independente em condições específicas. Todas as três selectinas estão envolvidas no tráfego de granulócitos para o sítio inflamatório, entretanto, o papel de cada selectina é diferente, dependendo das condições fisiológicas e da sequência do evento de diapedese em que se encontra, é importante também perceber que o papel das selectinas é diferente dependendo do modelo de inflamação (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008).

A P-selectina (também conhecida como CD62) é sintetizado constitutivamente pelas células endoteliais, entretanto não é expressa na superfície de células endoteliais não ativadas. Normalmente, a P-selectina é estocada em vesículas chamadas de corpos de Weibel-Palade dentro das células endoteliais. Estes grânulos são ativados por sua fusão com a membrana plasmática por ativadores específicos como histamina, trombina, complemento C5a, cálcio e ATP, resultando na expressão de P-selectina na superfície celular de células endoteliais. Os níveis máximos de P-selectina são detectados em alguns minutos após a sua rápida mobilização, degradação e reciclagem. Nem mesmo em humanos a expressão de P-selectina e induzida pela estimulação de citocinas e são possivelmente resultado final dos promotores de P-selectinas. A interação transiente entre P-selectina e o ligante glicoproteina de P-selectina (PSGL-1) permite aos leucócitos o rolamento ao longo das vênulas pós-capilares. P e E-

selectinas são responsivas nas vênulas estimuladas por fator de necrose tumoral (TNF-α). Camundongos deficientes, ou que tenham tido a P-selectina e E-selectina bloqueadas, tem uma significativa redução do rolamento celular. Ainda que estas moléculas tenham funções redundantes, observações do fluxo e da velocidade do rolamento mostram que sob condições fisiológicas a P-selectina é responsável por iniciar o rolamento enquanto que a E-selectina permite reduzir a velocidade do rolamento e iniciar a firme adesão. A síntese aumentada de P-selectina é percebida duas horas após a estimulação com citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e TNF-α.

A E-selectina é expressa em células endoteliais após ativação com IL-1 e TNF-α. Na superfície celular de células endoteliais em cultura a expressão é transitória e dura entre duas e seis horas após estimulação. Na sequência a E-selectina é então internalizada novamente ou se espalha pela superfície celular. *In vivo*, a expressão de E-selectina parece ser mais prolongada e é constitutiva nos vasos de alguns tecidos, como a pele por exemplo. Camundongos deficientes de E-selectina possuem um número menor de leucócitos firmemente aderidos aos vasos em resposta a quimioatraentes, quando estimulados por citocinas. Então, parece que a E-selectina participa ativamente na conversão da fase de rolamento para a firme adesão. A ligação de E-selectina com seu ligante PSGL-1 ativa os neutrófilos através da proteína tirosina kinase. Além dos ligantes clássicos responsáveis pela interação endotélio-leucócito, tais como a E-selectina, a PSGL-1, o CD44 e o próprio ligante de E-selectina (ESL-1), os glicolipídeos e as glicoproteínas também podem contribuir para o rolamento dependente de E-selectina *in vitro*. Em baixas velocidades, a E-selectina medeia o rolamento em mais do que a P-selectina, devido a ativação parcial de LFA-1. A velocidade aceita como rolamento é entre 5 metros por segundo e 15 metros por segundo e a taxa de dissociação molecular de E-selectina e P-selectina é muito similar.

A L-selectina é também conhecida como CD62L é constitutivamente expressa em granulócitos, monócitos e na maioria dos linfócitos circulantes. A expressão de L-selectina nos neutrófilos correlaciona negativamente com a idade individual do neutrófilo, sugerindo que o neutrófilo talvez perca L-selectina em seu

processo de maturação na medula óssea e durante seu envelhecimento (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008). A L-selectina é clivada proteolíticamente na superfície dos leucócitos após a estimulação. Os agentes ativadores mais conhecidos da L-selectina nos neutrófilos são a interleucina-8 (IL-8), fatores do complemento C5a, peptídeos bacterianos N-formil-methionil-leucil-phenilalanina (fMLP), fatores ativadores de plaquetas (PAF) e leucotrieno B4 (LTB4). *In vivo*, a L-selectina solúvel é derivada predominantemente dos linfócitos, está presente no plasma em altas concentrações.

Integrinas

O endotélio é uma barreira semipermeável que regula a troca entre o sangue e os tecidos periféricos. A regulação da permeabilidade vascular é uma função importante realizada pelo endotélio, uma vez que as células endoteliais regulam ou impedem a infiltração específica tanto de moléculas quanto de células em órgãos tais como o cérebro, músculo e tecido adiposo. Em tecidos normais, não inflamados, a permeabilidade microvascular é geralmente uma função das moléculas de adesão expressas na superfície celular e o aumento da permeabilidade microvascular pode ser observado de forma aguda ou crônica em tecidos submetidos a sinais pró-inflamatórias. É observada também uma modificação de junções interendoteliais é observada.

Moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) desempenham um papel importante na inflamação induzida pela exposição ao TNF-α. A via de sinalização de TNF-α é mediada pelo fator nuclear kappa B (NF-kB) e é responsável pela expressão de moléculas de adesão, tais como a VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio. Já foi mostrado previamente que TNF-α pode induzir a expressão de ICAM-1 e estas moléculas de adesão permitem a fixação dos leucócitos ao endotélio e podem permitir a sua transmigração subsequente ao tecido periférico. Ao mesmo tempo, a permeabilidade microvascular é aumentada.

Trabalhos tem investigado o papel da ICAM-1 na interação leucócito-endotélio e na regulação da permeabilidade vascular. Durante o desenvolvimento

da inflamação, dois grandes eventos ocorrem: os leucócitos interagem com o endotélio em um processo que permite que estas células atravessem a barreira criada pelas células endoteliais e esta migração celular resulta em alterações da permeabilidade vascular que permitem a transferência do soluto para os tecidos periféricos. Os trabalhos mostram que ambos, as arteríolas e as vênulas podem responder a um estimulo pró-inflamatório. Além disso, os dados demonstram também, que em condições basais, as alterações na permeabilidade vascular estão associadas à expressão de ICAM-1 de um modo dependente de proteína kinase C (PKC) (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008).

A molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1), também conhecido como aglomerado de diferenciação 106 (CD106). Esta molécula funciona como uma âncora para o processo de adesão celular. O gene que codifica esta proteína contém seis ou sete domínios de imunoglobulina, e é expressa em vasos sanguíneos de grande e pequeno porte e são estimuladas por citocinas. A VCAM-1 medeia a adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular. Esta molécula funciona também como transdutora de sinais entre os leucócitos e as células endoteliais. O “up regulation” da expressão de VCAM-1 nas células endoteliais ocorre em resposta à estimulação por citocinas como, por exemplo, o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-4 (IL-4). A região promotora do gene da VCAM-1 contém sítios NF-kB (RIVERA-NIEVES *et al.*, 2008).

As moléculas de adesão celular endotélio-plaqueta-1 (PECAM-1), também conhecido como aglomerado de diferenciação 31 (CD31). Esta molécula desempenha um papel fundamental na migração de leucócitos, na angiogênese, e na ativação de integrinas. Esta proteína é encontrada na superfície das plaquetas, monócitos, neutrófilos, e alguns tipos de células T. Faz-se presente nas junções intercelulares de células endoteliais. O ligante desta molécula é membro da superfamília das imunoglobulinas.

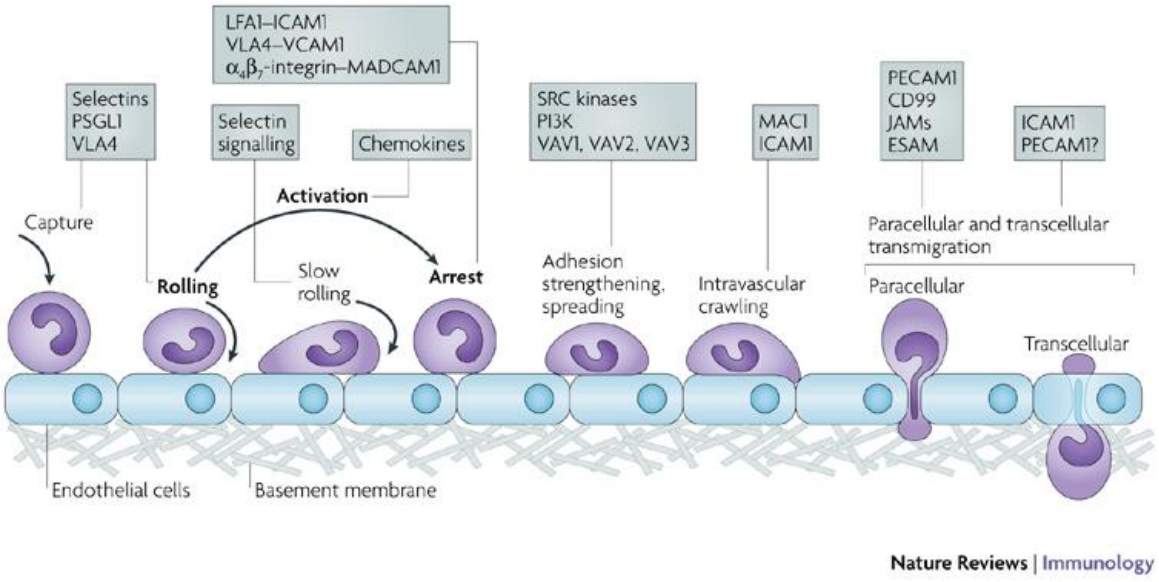


Figura 1. **Etapas clássicas da cascata da diapedese**. O rolamento mediado por selectinas, ativação, mediada por quimiocinas, e a adesão mediada por integrinas. A figura também mostra outras etapas como a captura, rolamento lento, o engatinhar (crawling) e a transmigração paracelular e transcelular. As moléculas envolvidas em cada uma das fases também são mostradas. ICAM-1 = molécula de adesão intercelular-1; JAM = molécula de adesão juncional; LFA-1 = antígeno associados à função linfocitária-1; Mac-1 = antígeno de macrófago; PSGL-1 = ligante da glicoproteína P-selectina-1; PECAM-1 = molécula de adesão celular endotélio-plaqueta-1; PI3 kinase = fosfatidilinositol 3 kinase; VCAM-1 = molécula de adesão celular vascular-1; VLA-4 = Antígeno muito tardio-4. (LEY *et al*., 2007)

1.3 – Quimiocinas

Os mediadores inflamatórios são substâncias endógenas que são liberadas durante a inflamação e uma vez liberadas e ativadas desencadeiam, mantêm ou ampliam diversos processos envolvidos na resposta inflamatória. Alguns dos importantes mediadores inflamatórios são as citocinas, as quimiocinas, mediadores lipídicos e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (KUBES e KERFOOT, 2001) e tem a capacidade de modular a magnitude da resposta inflamatória.

O recrutamento de leucócitos é facilitado quando há quimiocinas aderidas ao endotélio que facilitam sua ativação. Para a ativação e quimiotaxia dos neutrófilos especificamente, quimiocinas ELR-CXC (que são CXC por conterem o glutamato-leucina-arginina modificada imediatamente antes do amino-terminal

CXC) tem papel crucial, mas não exclusivo para a ativação de neutrófilos. As quimiocinas ELR-CXC incluem CXCL-8, também conhecida como interleucina- 8 (IL-8) em humanos e seu análogo em camundongos CXCL-1 (KC), CXCL-2 (MIP-2) e CXCL-5 (LIX). Estas quimiocinas são ativadas via receptor CXCR2 que ativam os neutrófilos e subsequentemente promovem aumento na adesão ao endotélio (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013).

As quimiocinas, que são moléculas mutáveis, são imobilizadas no endotélio e se ligam aos sulfatos de heparana que funcionam como âncoras para prevenir o estresse de cisalhamento. Isto permite a formação de gradientes quimiotáticos intracelulares. A ativação de receptores de quimiocinas acoplados à proteína G induz a conformação das integrinas expressos na superfície celular os quais subsequentemente mostram alta afinidade com seus ligantes, incluindo as imunoglobulinas tipo moléculas de adesão celulares (CAMs). Os neutrófilos expressam constitutivamente altos níveis de integrinas chamadas antígenos associados à função linfocitária-1 (LFA-1, também conhecida como CD11a/CD18) e o antígeno de macrófago (MAC-1 ou1.5- moléculas de adesão CD11b/CD18), o que levam a mudanças conformacionais para se ligarem a moléculas de adesão de superfície de células endoteliais tais como ICAM-1 e ICAM-2. A ligação de LFA-1 a ICAM-1 é essencial para a firme adesão de leucócitos (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013).

1.4 – Espécies reativas de oxigênio

Radical Livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons não pareados na camada mais externa ou camada de valência, o que lhes confere meia vida curta e alta reatividade com outras biomoléculas, principalmente proteínas, lipídeos e o ácido desoxirribonucléico (DNA) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Existem, entretanto, moléculas altamente reativas, devido a sua instabilidade, mas que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada e, assim, não podem ser classificadas como radicais livres. Essas moléculas são derivadas do metabolismo

do oxigênio, sendo conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS). Os radicais livres são: ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), peroxila ($RO_2^{\bullet}$), alcoxila ($RO^{\bullet}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$) e dentre as espécies não radicalares, podemos citar, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3) e o oxigênio singlet ($^1O_2$) (RIBEIRO, 2005).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Segundo LEHNINGER (2006), o oxigênio, devido à sua própria configuração, tende a receber um elétron de cada vez e formar compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$).

Formação do Radical Ânion Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) pode ser formado pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2) na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (RIBEIRO, 2005) e no complexo de multicomponentes enzimáticos NADPH oxidase (BABIOR, 1999), mas, ao contrário da maioria dos radicais livres, é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma molécula de oxigênio (O_2).

$$\mathbf{2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$

Equação 1: Dismutação de dois ânions superóxidos ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) participa de processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar a produção do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) através de reação de redução que, utilizando Fe^{3+} forma Fe^{2+}, e é conhecida como reação de Haber-Weiss (EL-BENNA *et al.*, 2005).

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{+++}} OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$$

Equação 2: Reação de Haber-Weiss exemplificando a redução do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) à hidroxila ($OH^{\bullet}$) utilizando Fe^{2+}.

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) também pode reagir com a hidroxila ($OH^{\bullet}$), produzindo oxigênio singlet ($^1O_2$), e com o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$) (EL-BENNA *et al.*, 2005).

$$O_2^{\cdot -} + OH^{\cdot} \rightarrow {}^1O_2 + OH^{-}$$

$$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^{-}$$

Equação 3: Reação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) com a hidroxila ($OH^{\bullet}$) formando o oxigênio singlet ($^1O_2$) e a reação do óxido nítrico com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) formando peroxinitrito ($ONOO^-$).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), no organismo, pode ser eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de duas moléculas de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, quando não eliminado do organismo pelas enzimas antioxidantes da família das peroxidases (GPx) e catalases (CAT), pode gerar radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$). Apesar de causar efeitos danosos (peroxidação lipídica), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) tem importância vital para as células de defesa e, sem ele, o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, já que ele é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio de um complexo de multicomponentes enzimáticos chamado NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do oxigênio molecular (O_2) com o gasto de uma molécula de NADPH.

$$2O_2 + NADPH \rightarrow 2\ O_2^{\cdot -} + NADP^{+} + H^{+}$$

Equação 4: Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) na NADPH oxidase, com gasto de uma molécula de NADPH.

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formado no organismo é um bactericida fraco capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias; porém, ele gera alguns produtos com forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$), os quais são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos (EL-BENNA *et al.,* 2005).

Em alguns casos, o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) age como antioxidante, reduzindo semiquinonas para que elas possam retomar suas atividades metabólicas na célula. Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria.

Por fim, o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) funciona como sinalizador molecular por meio da sua capacidade de oxidar grupos –SH em ligações dissulfeto, podendo ativar e desativar enzimas que contenham metionina.

Formação do Radical Hidroxila ($OH^{\bullet}$)

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Nos experimentos em laboratório, o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas devido à sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar altas concentrações de antioxidante para que este alcance o local onde o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) esteja presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$): reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação (EL-BENNA *et al*., 2005).

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante. A incidência de radiação ultravioleta, radiação γ e raios X pode produzir o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) nas células

da pele. O ataque intensivo e frequente deste radical pode originar mutações no DNA e, consequentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos.

Equação 5: Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) originado a partir de homólise.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana nuclear. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) em seu interior.

$$M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Equação 6: Formação de hidroxila ($OH^{\bullet}$) a partir da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metal de transição

O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocôndria. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA.

O exemplo mais comum do seu ataque a lipídios é a sua ação nos lípides de membrana. Os radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis, como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo centro de radical livre. O carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio, gerando o radical lipídio-peroxila que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células.

Formação do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por enzimas oxidases ou pela β-oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são também ricas em superóxido dismutase (SOD), a qual o converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado é então parcialmente eliminado pela catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx); todavia, como sua eficiência é limitada, a maior parte do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é liberada para a célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Ele também pode ser encontrado em bebidas como chás e, principalmente, café instantâneo, rapidamente se difundindo pelas células da cavidade oral e do trato gastrintestinal.

$$\mathbf{2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$

Equação 7: Dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Função do ROS

Os organismos vivos não só se adaptaram a uma coexistência pacífica com os radicais livres, mas na realidade, desenvolveram mecanismos para tirarem vantagem dos mesmos (DRÖGE, 2002).

Apesar de seus efeitos danosos o ROS tem uma importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos já que os fagócitos ou linfócitos e fibroblastos produzem ROS durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima da membrana do leucócito, NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do oxigênio molecular (O_2) com gasto de uma molécula de NADPH (BABIOR, 1999).

Em alguns casos o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) age como antioxidante, reduzindo semiquinonas para que elas possam retomar suas atividades metabólicas na célula. Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria (BABIOR, 1999).

Por fim, o ROS funciona como sinalizador molecular por meio da sua capacidade de oxidar grupos –SH em ligações dissulfeto, podendo ativar e desativar enzimas que contenham metionina.

O radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP+ e citrulina. Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades pelos fagócitos humanos, quando estimulados. O nitrato pode transformar-se em nitrito, que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso (HNO_2). O óxido nitroso (N_2O_3) também é precursor do ácido nitroso (HNO_2) como resultado da sua reação com a água. O ácido nitroso (HNO_2) promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo NH_2 livre: citosina, adenina e guanina, formando-se uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito ($ONOO^-$).

Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrir aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007). A presença do tampão CO_2/HCO_3^- contribui para a nitração de biomoléculas, pois o carbonato, ao ser protonado, forma o radical ($HCO_3^{\bullet}$) e este oxida anéis aromáticos, produzindo bicarbonato (HCO_3^-) e o radical aromático correspondente, facilitando a entrada do radical $NO_2^{\bullet}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração

intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (DRÖGE, 2002). Este desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (DRÖGE, 2002).

Em alguns casos o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) age como antioxidante, reduzindo semiquinonas para que elas possam retomar suas atividades metabólicas na célula. Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria (BABIOR, 1999).

O radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP+ e citrulina. Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades pelos fagócitos humanos, quando estimulados. O nitrato pode transformar-se em nitrito, que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso (HNO_2). O óxido nitroso (N_2O_3) também é precursor do ácido nitroso (HNO_2) como resultado da sua reação com a água. O ácido nitroso (HNO_2) promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo NH_2 livre: citosina, adenina e guanina, formando-se uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito ($ONOO^-$).

Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrir aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007). A presença do tampão CO_2/HCO_3^- contribui para a nitração de biomoléculas, pois o carbonato, ao ser protonado, forma o radical ($HCO_3^{\bullet}$) e este oxida anéis aromáticos, produzindo bicarbonato (HCO_3^-) e o radical aromático correspondente, facilitando a entrada do radical $NO_2^{\bullet}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-

oxidante, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (DRÖGE, 2002). Este desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (DRÖGE, 2002).

O estresse oxidativo ocorre quando há uma falta de equilíbrio dinâmico (ou "desbalanço") entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. O estresse oxidativo pode ocorrer pela elevada produção de radicais livres, pela diminuição das defesas ou por ambos os processos simultaneamente (DRÖGE, 2002).

Como já mencionado, os agentes oxidantes são formados no processo normal do metabolismo, mas, em algumas condições patológicas, eles podem ser produzidos em excesso, levando ao estresse oxidativo e à possível morte celular. Uma série de processos patológicos (como câncer e isquemia) e não patológicos (envelhecimento) estão associados ao estresse oxidativo.

2 – Exercício físico

Atualmente, a importância da prática regular de exercício físico alcançou ampla aceitação pelo público, pelas organizações profissilonais e pela comunidade médica. Cada vez mais pessoas ao redor do mundo incluíram em seu dia-a-dia a prática regular de exercícios físicos. Se por um lado os benefícios do exercício físico em termos de manutenção e promoção da saúde são bem conhecidos, incluindo risco reduzido de problemas graves relacionados ao ganho de peso e à síndrome plurimetabólica, por outro lado recentes pesquisas têm mostrado evidências muito fortes de que a inatividade física está diretamente associada a inúmeras condições adversas à saúde, tais como doenças coronarianas, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de cânceres tais como o de mama e cólon (LEE *et al.*, 2012).

A prática regular de exercícios físicos, nas suas mais diferentes manifestações, tais como aeróbicos, anaeróbicos, de resistência, força ou

flexibilidade, pode promover importantes adaptações morfofuncionais e metabólicas no organismo (POWERS, 2000). Existem também evidências epidemiológicas que dão suporte à ideia de que o exercício físico regular aumenta a resistência a infecções mais frequentes tais como resfriado e infecção das vias aéreas superiores (upper respiratory tract infections URTI). Dessa forma, um estilo de vida fisicamente ativo oferece proteção contra inúmeras enfermidades e está cada vez mais claro que o exercício físico moderado estimula o sistema imunológico culminando em proteção contra inúmeras doenças (PEDERSEN e TOFT, 2000). De maneira contrária o sedentarismo pode promover redução na expectativa de vida da população (STESSMAN *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012).

Recentes investigações tem tentado explorar a relação entre a função de células inflamatórias no dano e no reparo do tecido muscular esquelético usando modelos animais. Estes estudos têm contribuindo para o entendimento deste cenário complexo, onde as células inflamatórias promovem o dano e o reparo deste tecido (TIDBALL, 2005).

2.1 – Exercício físico e inflamação

No exercício físico, a inflamação parece estar inter-relacionada com vias do metabolismo muscular e com o dano muscular induzido pelo exercício físico (PEAKE *et al.*, 2006). Devido ao fato da inflamação ter tradicionalmente associada à fadiga e à fase de recuperação muscular após o exercício físico, as pesquisas realizadas buscam estratégias nutricionais para reduzir estes efeitos (PEAKE *et al.*, 2006; PEAKE *et al.*, 2007). Entretanto, estudos mais recentes tem procurado avaliar alterações nos marcadores pró-inflamatórios após o exercício (citocinas, quimiocinas e proteína C reativa) e, também, em marcadores de estresse oxidativo (produção de ROS, malonaldeido (MDA), capacidade antioxidante).

Após a realização de um exercício físico extenuante, não usual ou sob a forma de ações musculares predominantemente excêntricas pode ocorrer o surgimento de dano tecidual (CHEUNG *et al.*, 2003). Segundo PROSKE, (2005) a

sequencia de eventos que conduz ao dano muscular induzido pelo exercício é: as miofibrilas, dentro das fibras musculares, são alongadas durante a ação muscular excêntrica; como alguns sarcômeros são mais resistentes ao alongamento do que outros, os sarcômeros mais fracos são deformados com o alongamento e, dependendo da taxa de tensão, resulta-se em pequena ou nenhuma sobreposição entre os filamentos. Durante contrações excêntricas repetidas e intensas, primeiramente os mais fracos e, posteriormente, os outros sarcômeros são extremamente alongados. Durante a fase de relaxamento, os miofilamentos de sarcômeros que foram muito alongados talvez falhem ao se reconectarem, resultando em sarcômeros rompidos. Esta alteração estrutural pode se espalhar por áreas adjacentes do músculo e, por fim, pode conduzir a danos nas membranas, no retículo sarcoplasmático, nos túbulos transversos e no sarcolema. Ao mesmo tempo, o mecanismo de acoplamento excitação-contração é alterado e o cálcio (Ca^{2+}) se move livremente para dentro do sarcoplasma, onde ativa vias proteolíticas relacionadas à degradação e reparo das fibras musculares. Este processo parece produzir alguns dos sintomas associados com o dano muscular, incluindo a perda da função, a dor muscular de aparecimento tardio (*Delayed Onset Muscle Soreness* - DOMS) e aumento de proteínas na circulação, o que representa que houve dano na membrana plasmática (PROSKE, 2005). Sabe-se que o tecido muscular esquelético se adapta ao dano muscular induzido pelo exercício, entretanto, mecanismos precisos que expliquem estas adaptações não estão claros.

Estudos recentes têm mostrado que o sistema imune possui um papel relevante nos processos de regeneração do tecido muscular. Além disso, o exercício físico induz uma resposta imune através da ativação de células do sistema imunológico, caracterizando uma resposta inflamatória tanto sistêmica com a liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea, quanto localmente no músculo exercitado (PEAKE *et al.*, 2006; COOPER *et al.*, 2007; BARBIERI e SESTILI, 2012).

Um estudo pioneiro nessa área foi realizado no início do século XX (1902) por LARRABEE, o qual verificou um quadro de leucocitose e neutrofilia em

corredores após uma maratona. Este resultado também foi relatado por outros autores em trabalhos mais recentes (NIEMAN e PEDERSEN, 1999; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). É possível que além do aumento dos leucócitos na corrente sanguínea também ocorra aumento na interação destas células com a parede dos vasos adjacentes ao músculo exercitado, gerando assim um aumento no recrutamento destas células para o tecido muscular.

2.2 – Exercício físico e estresse oxidativo

A relação entre exercício físico e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi primeiramente mostrada em um trabalho pioneiro publicado por DAVIES *et al.*, (1982) que defendeu que o exercício físico poderia estar associado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este estudo e inúmeros outros publicados nos últimos trinta anos levantam um paradoxo interessante, uma vez que, o exercício físico está cada vez mais associado à benefícios para a promoção e manutenção da saúde e ROS está associado ao surgimento e/ou agravamento de mais de duzentas doenças (DRÖGE, 2002).

Estudos têm demonstrado que o exercício físico intenso provoca estresse oxidativo em animais e humanos, estando possivelmente relacionado, por exemplo, com a síndrome da fadiga crônica (LOGAN, 2001), dor muscular de aparecimento tardio e lesões teciduais (CLOSE *et al.*, 2004). Isso torna este tema de extrema importância para o profissional de atividade física.

Muitos trabalhos afirmam que o exercício físico induz aumento no consumo de oxigênio, bem como na demanda energética, induzindo elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (COOPER *et al.*, 2002). Este aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), associado à ineficiência do sistema de defesa antioxidante em neutralizá-las, levaria à condição conhecida estresse oxidativo, em que as espécies reativas de oxigênio (ROS) reagem com estruturas celulares, oxidando-as. Altos níveis de oxidação alteram a função e prejudicam a homeostase intracelular. O mecanismo molecular envolvido no estresse oxidativo e o dano muscular induzido por um protocolo de exercício

agudo têm sido objetos de intensa investigação nos últimos anos (DAVIES *et al*., 1982; JI *et al*.,1993; TEMIZ *et al.*,2000).

O consumo de oxigênio no corpo humano é aumentado muitas vezes quando o indivíduo se encontra em exercício físico intenso (ALESSIO,1992). A utilização de oxigênio pelos músculos esqueléticos, durante esforços físicos intensos, pode aumentar em cerca de 15 a 20 vezes quando comparados com o consumo na situação de repouso (DAVIES *et al*., 1982). Este aumento do metabolismo muscular conduz ao aumento no fluxo de elétrons, devido ao crescimento da velocidade da respiração mitocondrial no músculo ativo, e pode levar a um maior extravasamento de elétrons e, consequentemente, elevar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

O exercício físico, tanto aeróbia quanto anaeróbia, pode promover importantes adaptações morfofuncionais e metabólicas no organismo (POWERS, 2000), embora sua prática esteja agora relacionada também à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995). Estas podem ser produzidas por diversos mecanismos durante a prática de exercícios físicos, dentre os quais se destacam as reduções parciais de oxigênio nas mitocôndrias (cadeia transportadora de elétrons) e o processo inflamatório (VOLLAARD, 2005). Nesse sentido, o processo inflamatório é uma importante fonte de ROS durante e após o exercício físico, uma vez que contrações intensas provocam lesões nas fibras musculares, o que requer remoção das proteínas danificadas, seguida por ressíntese de novas proteínas.

A prática de exercícios físicos predominantemente aeróbios provoca aumento do fluxo de oxigênio na mitocôndria e, já que de dois a cinco por cento deste oxigênio não são completamente reduzidos, formam-se assim espécies reativas de oxigênio (ROS) (VOLLAARD, 2005). Por outro lado, apesar do exercício anaeróbio ser executado independente do aporte de oxigênio, ainda assim a produção excessiva de ROS tem sido verificada durante esse tipo de esforço (LEE *et al.*, 2002), provavelmente por outros mecanismos celulares (SCHNEIDER *et al*., 2004). Destaca-se que, na situação anaeróbia, o estresse

metabólico aumenta a degradação de adenosina trifosfato (ATP), ativando a via xantina oxidase (XO) e originando produção adicional de ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (LEE *et al*, 2002).

Principais fontes de ROS durante e após exercício físico

A literatura científica tem relatado duas fontes principais de produção de ROS após o exercício físico: a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e a via da NADPH oxidase nas membranas dos leucócitos celulares.

Cadeia Transportadora de Elétrons

O oxigênio é o elemento que, na classificação periódica dos elementos químicos, pertence à família VI A, cujo número atômico e massa atômica são 8 e 16,0 respectivamente, e que possui 8 elétrons distribuídos nas suas camadas eletrônicas. Pela sua configuração, a molécula de oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos (LEHNINGER, 2006).

Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água. Isso ocorre na cadeia respiratória da mitocôndria, através do transporte de elétrons, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo oxidase, através do processo de fosforilação oxidativa, procede à redução tetravalente do O_2, fornecendo-lhe simultaneamente quatro elétrons e o reduzindo diretamente à água.

$$\mathbf{O_2 + 4H^+ + 4\ \bar{e} \rightarrow 2H_2O}$$

Equação 8: Redução tetravalente do oxigênio resultando em água.

As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Todavia, como já referido, de 2 a 5% do O_2 é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não pareado, produzindo as espécies reativas de oxigênio (ROS) que, algumas vezes, como dissemos, constituem os radicais livres.

A redução monovalente (um elétron de cada vez) do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons gera a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) seguindo as equações abaixo:

$$O_2 + \bar{e} \rightarrow O_2^{\cdot -}$$
$$O_2^{\cdot -} + \bar{e} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$H_2O_2 + \bar{e} + H^+ \rightarrow OH^{\cdot} + H_2O$$
$$OH^{\cdot} + \bar{e} + H^+ \rightarrow H_2O$$

Equação 9: Mecanismos de redução do O_2.

Via da NADPH oxidase

Achados recentes na literatura (INOGUCHI *et al.*, 2003) têm demonstrado que a via da NADPH oxidase com ativação dependente de Proteína Kinase C (PKC) está envolvida em mecanismos responsáveis pelo estresse oxidativo que atinge células vasculares, e segundo este mesmo autor, a hiperglicemia parece ser a principal responsável pela ativação desta via.

A via da NADPH oxidase é citada como sendo a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos vasos sanguíneos e talvez esteja relacionada com inúmeros processos fisiopatológicos de várias doenças, incluindo hipercolesterolemia, aterosclerose e hipertensão (INOGUCHI *et al*., 2003).

Estudos demonstram que níveis altos de glicose levam ao aumento da síntese *de novo* da DAG (diacilglicerol), o ativador fisiológico da Proteína Kinase C (PKC), o que eleva a atividade da NADPH oxidase e resulta, assim, no aumento da produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (INOGUCHI *et al*., 2003).

Estudos recentes indicam que uma NADPH oxidase tipo fagocítica é a maior fonte de produção de ROS em muitas células não fagocíticas, incluindo fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais, células mesangiais renais e células tubulares renais.

Este sistema enzimático foi originalmente descoberto em neutrófilos, que são potenciais fontes de grandes quantidades de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) durante a fagocitose e são vitais para a defesa inata. A produção de ROS pela oxidase, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode originar um dano oxidativo. Os tipos celulares encontrados nas paredes dos vasos geralmente possuem NADPH oxidases semelhantes às fagocíticas, as quais são ativadas em condições fisiológicas. Essas oxidases parecem ter múltiplas funções, controlando funções vasculares, respostas à expressão gênica e sinalização em numerosos processos celulares, como crescimento, apoptose, migração e remodelação da matriz extracelular.

A NADPH oxidase é um complexo multienzimático, formado por subunidades de membrana como a $gp91^{phox}$, $p22^{phox}$ (que juntas formam o flavocitocromo b_{558}) e subunidades citosólicas, tais como $p47^{phox}$, $p60^{phox}$, $p67^{phox}$ e rac1 ou rac2. Quando ativadas, algumas subunidades são fosforiladas por várias quinases, incluindo a Proteína Kinase C (PKC), e translocadas para a membrana, formando a oxidase ativa cataliticamente (figura 2) (RAY e SHAH, 2005).

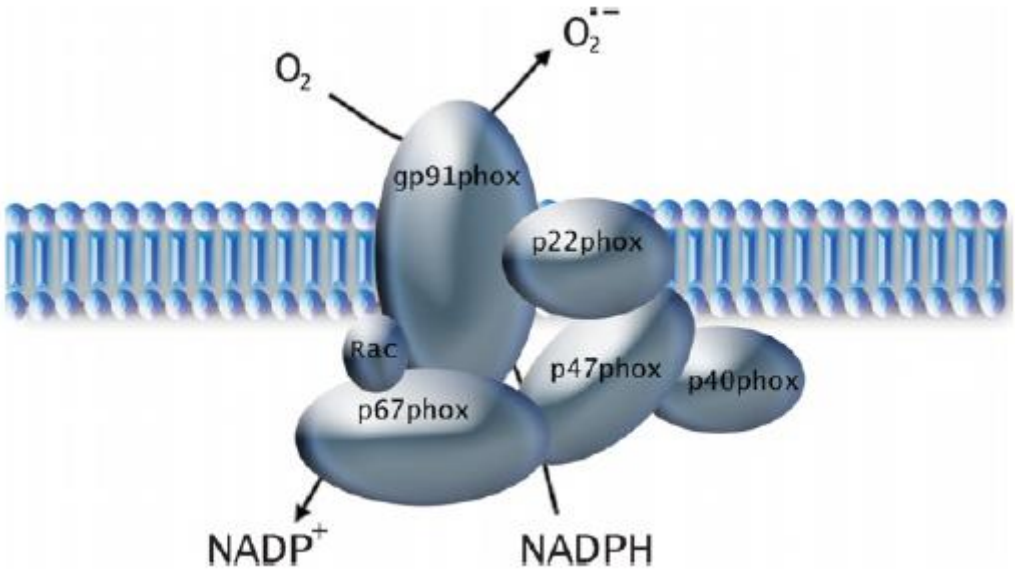


Figura 2. **Ativação da NADPH oxidase.** Em células em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão distribuídos no citosol e na membrana. Quando a célula é ativada, os componentes citosólicos $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ e rac2 migram para a membrana, onde se associam aos componentes do flavocitocromo b_{558}: $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$. Essa associação ativa a NADPH oxidase que utiliza o elétron doado pela NADPH citosólica para reduzir o oxigênio e formar radicais ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (RAY e SHAH, 2005).

Os leucócitos são a principal fonte de produção de ROS no sangue durante o exercício físico (NIKOLAIDIS, 2009; NIKOLAIDIS, 2013). Na corrente sanguínea de um indivíduo em repouso os neutrófilos constituem a maioria (50-70%) do número total de leucócitos. A principal função do neutrófilo estudada até o momento é a fagocitose e a digestão de resíduos celulares em sítios de danos ou inflamação (NIKOLAIDIS, 2009). Os neutrófilos respondem ao estímulo adequado, como por exemplo, a um acentuado aumento no consumo de oxigênio chamado de “oxidative burst”. O consumo de oxigênio aumenta devido à ativação da NADPH oxidase, que é a enzima que transforma o oxigênio molecular (O_2) em radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e consequentemente em outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (NIKOLAIDIS, 2009). A produção de citocinas pró-inflamatórias durante o exercício físico parece ser influenciada por fatores como a quebra do glicogênio muscular e a dinâmica do cálcio (Ca^{2+}) no músculo esquelético durante o exercício físico (FEBBRAIO, 2005).

Apesar de estar claro na literatura que o exercício físico representa estímulo significativo para ativação do sistema imunológico no que se refere à resposta inflamatória (PYNE e GLEESON, 1998), **ainda não é sabido se esta resposta é mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS).**

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é investigar o papel de espécies reativas de oxigênio (ROS) na possível resposta inflamatória associada ao exercício físico intenso. O objetivo é acompanhar a cinética de eventos que ocorrem no balanço oxidativo/redutor e no processo inflamatório no tecido muscular de camundongos exercitados até a fadiga na esteira elétrica, na tentativa de estabelecer associações entre estes dois eventos após um exercício físico.

3 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é analisar a relação entre exercício físico, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e resposta inflamatória. Assim, venho propor com esse projeto **estudar o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta inflamatória induzida por um protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga.**

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diante desse objetivo maior, pretendemos:

1- Padronizar o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga em camundongos na esteira elétrica utilizando marcadores fisiológicos;

2- Analisar o efeito do protocolo de exercício físico no comportamento do fluxo sanguíneo na pata dos camundongos;

3- Verificar o efeito da aplicação do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue;

4- Analisar o recrutamento de células inflamatórias para o músculo exercitado (quadríceps);

5- Investigar a cinética da nocicepção na pata dos camundongos após o exercício físico até a fadiga;

6- Avaliar as cinéticas de mediadores inflamatórias (citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão) em resposta ao protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga;

7- Avaliar o efeito do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga no balanço oxidante e redutor no tecido muscular;

8- Verificar o papel da NADPH oxidase e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no processo de recrutamento celular;

9- Verificar se o recrutamento de leucócitos é dependente da magnitude da carga de trabalho e/ou de lesão tecidual;

10- Avaliar o efeito da ausência de ROS na resposta inflamatória e no remodelamento do tecido muscular esquelético, após um período de treinamento físico;

11- Avaliar o efeito de um período de treinamento físico na resposta inflamatória aguda;

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para que as perguntas propostas nesse projeto fossem respondidas, utilizamos as estratégias experimentais descritas abaixo:

4.1 – Animais

Neste estudo utilizamos camundongos C57Bl/6 obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG), camundongos LysM-eGFP (que são animais mutantes e expressam uma proteína eGFP florescente no lócus M e desta forma apresentam neutrófilos fluorescentes) e $gp91^{phox-/-}$ (que possuem a NADPH oxidase não funcional) adquiridos no biotério mantido pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunofarmacologia). Todos os procedimentos experimentais foram avaliados pelo Comitê de Ética da UFMG (CETEA - 17412/12).

4.2 – Protocolos de Exercício Físico

Exercício físico progressivo até a fadiga

Para a realização deste protocolo, foi utilizada uma esteira ergométrica, com paredes montadas em metal e piso emborrachado, motor de 2,5 Ampers – 30 Watts, e controle de velocidade de 3 a 30 m/minuto, movida à eletricidade.

Anteriormente à corrida, os animais permaneceram na esteira por 30 minutos a uma velocidade de 5 metros por minuto para familiarização. A partir daí, os camundongos foram submetidos ao protocolo de exercício físico até a fadiga, em que a velocidade foi aumentada em 1 metro por minuto a cada 3 minutos, até que estes animais atingissem a fadiga. A fadiga foi definida como o momento em que cada camundongo foi incapaz de manter a velocidade de exercício pré-estabelecida, sujeitando-se ao estímulo elétrico por pelo menos 10 segundos

(American Physiological Society, 2006). A inclinação da esteira foi mantida constante em 5% (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2007).

Exercício físico progressivo até 60% da duração e 100% da intensidade do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga.

Neste protocolo os animais permaneceram na esteira por 18 minutos a uma velocidade de 5 metros por minuto, para familiarização. A partir daí a velocidade foi aumentada em 1 metro por minuto a cada 2 minutos, até que se atingisse a velocidade máxima alcançada no protocolo até a fadiga. O tempo total de exercício neste protocolo foi 60% da duração total alcançada no protocolo de exercício físico até a fadiga.

Exercício físico progressivo até 60% da intensidade e 100% da duração do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga.

Neste protocolo os animais permaneceram na esteira por 30 minutos a uma velocidade de 5 metros por minuto para familiarização. A partir daí a velocidade foi aumentada em 1 metro por minuto a cada 3 minutos, até que se atingisse 60% da velocidade máxima alcançada no protocolo até a fadiga e então esta velocidade era mantida até a duração total do protocolo de exercício físico até a fadiga. Apesar de a duração ser total, a intensidade (velocidade) foi 60% da intensidade máxima alcançada no protocolo de exercício físico até a fadiga.

Protocolo de treinamento físico

Os animais passaram por um protocolo de treinamento físico de seis semanas com aumento progressivo da duração da sessão de treino. Previamente foi realizado um teste de esforço físico até a fadiga e então estipulada uma intensidade de treinamento (60% da velocidade máxima). A duração de cada

sessão foi aumentada seguindo o seguinte protocolo: 15 minutos (1º semana), 30 minutos (2º semana), 45 minutos (3º semana), 60 minutos (4º, 5º e 6º semanas).

4.3 – Procedimentos Técnicos

4.3.1.0 – Análise do Lactato Sanguíneo

As concentrações de lactato foram analisadas através do lactímetro Accutrend Plus (Roche) antes e imediatamente após a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga. O sangue para esta análise foi extraído da cauda dos animais.

4.3.1.1 – Análise da Glicose Sanguínea

Antes e após a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga foram realizados experimentos em duplicata para análises das glicemias capilares. O sangue foi coletado na porção caudal dos animais e analisado através do glicosímetro (Accu-Chek Advantage).

4.3.1.2 – Análise da Creatina Kinase (CK)

A dosagem de creatina kinase foi realizada no soro através da utilização do kit (CK-NAC) referência 11.002.00 da BIOTÉCNICA (Biotecnologia Avançada). A amostra foi lida em um aparelho espectrofotômetro (Shimadzu UV-160A UV - Recording Spectrophotometer) a um comprimento de onda de 340 nm.

4.3.1.3 – Administração de Fármacos

Os fármacos utilizados nestes experimentos foram a superóxido dismutase (SOD) e apocinina. Desta forma, 3mg/kg de SOD e 10mg/kg de apocinina foram

administrados intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes da realização do protocolo de exercício físico até a fadiga.

4.3.1.4 – Determinação de Citocinas e Quimiocinas (ELISA)

No músculo quadríceps foram dosadas a citocinas TNF-α, interleucina-6 (IL-6), interleucina-1β (IL-1β), interleucina-10 (IL-10) e as quimiocinas CXCL-1 (KC) e CXCL-2 (MIP-2) por ELISA. Para tal, utilizaram-se anticorpos monoclonais (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Após 18 horas de incubação a 4°C as placas (NUNC) foram lavadas com salina acrescida de 0,05% de Tween-20 e bloqueadas com PBS a 0,5% de caseína. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, os extratos de tecido foram adicionados às placas e as mesmas foram incubadas overnight a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas novamente com salina com 0,05% de Tween-20 e posteriormente foi adicionado anticorpos monoclonais (Pharmingen) conjugados com biotina específicos para estas citocinas e quimiocinas. Após 2 horas de incubação, as placas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 1:15000 vezes em PBS contendo 0,5% caseína durante uma hora a 37˚C. Finalmente, a revelação foi feita através da incubação de uma solução de citrato de sódio pH 4,5 acrescida de OPD e H_2O_2 30 volumes como substrato. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com uma solução de $H_2SO_4$2N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Expert Plus, Assays Hitech GMBH, Eugenorf, Austria), em 492 nm. As reações de ELISA tiveram como controle positivo citocinas recombinantes de camundongo (RD Systems). Os resultados foram expressos como pg/100mL de tecido muscular.

4.3.1.5 – Imagem de perfusão por laser DOPPLER

O equipamento de imagem de perfusão por Laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra) é utilizado para o monitoramento não invasivo (e sem contato físico) da

circulação sanguínea, permitindo a avaliação do fluxo sanguíneo na microcirculação. A técnica permite o acompanhamento de alterações no fluxo de uma área ao longo do tempo ou a avaliação de diferenças no fluxo entre mais de uma área. A técnica baseia-se no princípio de Doppler: em que a luz de um laser monocromático incide sobre o tecido onde é, então, dispersa pelas hemácias em movimento e, como consequência, a frequência é ampliada. A luz é foto detectada e processada de forma a construir um mapa codificado de cores do fluxo sanguíneo. A mudança de frequência média Doppler é proporcional à velocidade média das hemácias. A variação de frequência é transformada em voltagem que vai de 0 a 10 V. O valor de perfusão 0 V é calibrado como 0% de perfusão e o de 10 V como 100% de perfusão. Quando o procedimento de escaneamento da área de interesse é finalizado, a perfusão do tecido é codificada em um mapa de cores.

Pouca ou nenhuma perfusão é apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão, em vermelho. No presente estudo, animais BALB foram anestesiados e tiveram seus membros posteriores (direito e esquerdo) escaneados por um laser (830 nm) antes e nos tempos de 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a realização do exercício físico até a fadiga.

4.3.1.6 – Técnica Histológica

O músculo quadríceps foi isolado e imerso em formol tamponado a 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos provenientes deste músculo foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de hematoxilina e eosina (H&E).

4.3.1.7 – Ensaio Enzimático para MPO e NAG

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no músculo quadríceps, será também utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. Brevemente, um fragmento do músculo será pesado e picado, suspenso a 5% em salina EDTA,

submetido à homogeneização e centrifugação (3000 g, 10 minutos). O sobrenadante será desprezado e o componente residual (pellet) ressuspendido em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizar-se-a nova centrifugação 3000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante será descartado e o pellet ressuspendido em tampão fosfato com HTAB a 5% e 15 re-homogenizado por 30 segundos. As amostras serão congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. Atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras será determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzine (1.6 mM) e H202 (0.5 mM). Os resultados serão expressos como número total de neutrófilos.

Para quantificação do infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), uma porção de 100 mg do tecido muscular (quadríceps) foi ressuspendida em solução salina 0,9% (4º C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida, foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 4º por 10 minutos a 1500 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:10. A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na_2HPO_4 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24mM. A reação se processou a 37ºC por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M. (pH 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido úmido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de macrófagos” /100mg de tecido.

4.3.1.8 – Estresse Oxidativo (TBARS e GSH)

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malonaldeídos (MDA) e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515nm de excitação e 555nm de emissão. Para a avaliação da peroxidação lipídica 100g de tecido muscular (quadríceps) foi colocado em tubo falcon com 1ml de PBS (1X) e homogeneizado. A partir daí 100µl do homogenato (solução: 100mg + 1ml de PBS(1x)), foram transferidos para eppendoffs identificados.Foram então adicionados 100 µl da solução (TBA + BHT) e 50 µl de ácido fosfórico (7%). Esta mistura foi aquecida em banho seco por 15' a 100 graus Célsius. Imediatamente após aquecer no banho seco, a amostra foi colocada em gelo durante 10 minutos. Para interromper a reação foi adicionado 750µl de butanol em cada amostra e homogeneizado no VORTEX. A amostra foi então centrifugada por 5minutos a 2000 RPM. 250 µl do sobrenadante foi coletado e transferido para a placa de ELISA onde foi realizada a leitura nos comprimentos de onda de 532 nm e a 600nm. O experimento foi realizado em duplicata e o cálculo de TBARS foi realizado da seguinte maneira: TBARS ($nmol.g^{-1}$) = absorbância da amostra (A532 – A600) x 10^3 x 170/156.

Para a dosagem de glutationa reduzida (GSH) 100g do músculo foi extraído e colocado em tubo falcon. Foi adicionado neste tubo, 100µl de PBS(1x) e 300µl de TCA 12,5%, homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm (4º). Foi então coletada 100µl porção translúcida (sobrenadante) colocado na placa de ELISA para e leitura. O branco foi composto por 300µl de TRIS HCl. A curva de GSH foi feita com 2mg de GSH diluído em 01 ml de TRIS HCl 0,4M (2.400mg/ml). O plaqueamento foi realizado da seguinte maneira: 40µl da amostra + 260µl de TRIS HCl + 20µl de DTNB. A leitura foi realizada a 415 nm.

4.3.1.9 – Teste de pressão na pata (VON FREY): medida de nocicepção

A hiperalgesia mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata dos camundongos, denominado teste Von Frey (tenocicepção). O método consiste no uso de um anestesiômetro eletrônico (modelo 1601C, Life Science Instruments®), o qual possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1g e o mesmo é calibrado para registrar força máxima de 150g, mantendo a precisão de 0,1g até a força de 80g. O contato do transdutor de força com a pata foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a $5mm^2$, constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento, para adaptação ao ambiente. Espelhos posicionados 25cm abaixo das caixas de experimentação facilitaram a visualização das plantas das patas dos animais. Aplicou-se, por entre as malhas da rede, força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta de retirada e "sacudida" da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos até seis vezes, em geral até que o animal apresentasse três medidas similares com uma nítida resposta de "sacudida" após a retirada da pata. A intensidade da nocicepção foi então quantificada como sendo a variação na força (D de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média dos três valores expressos em gramas (força) observados antes do exercício físico até a fadiga e nos tempos 06, 12, 24 e 30 horas após a realização do exercício físico até a fadiga.

4.3.2.0 – Análise do Consumo de Oxigênio

No dia do experimento do teste de esforço para análise do consumo de oxigênio, os animais foram alocados em repouso na esteira (Treadmill control HARVARD apparatus modelo LE8710) acoplada ao analisador de gases (LE 404

GAS ANALYZER HARVARD APPARATUS), por uma hora (ou mais) na sala de experimentação antes do teste de esforço. Quando os animais estavam com um consumo de oxigênio considerado de repouso, era então iniciado o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga descrito anteriormente. Em resumo, o teste iniciou-se na velocidade de 5 m/minuto, que foi aumentada em 1 m/minuto a cada três minutos, até que o animal se recusasse a permanecer exercitando. O consumo de oxigênio (VO_2) e o a produção de dióxido de carbônico (VCO_2) foram medido indiretamente pelo analisador de gases, previamente calibrado para a mistura de gases em torno de 20,5% de O_2 e 0.5% de CO_2. Durante o teste o VO_2 (ml/kg/minuto) e o VCO_2 (ml/kg/minuto) foram registrados continuamente, segundo a segundo, usando um programa de computador (METABOLISM V 2.2.01). Neste teste a temperatura ambiente foi mantida em uma pequena faixa de variação (23 a 24ºC) (FERREIRA *et al.*, 2010).

4.3.2.1 – Microscopia intravital e confocal na vasculatura do quadríceps

A técnica de microscopia intravital foi utilizada com o intuito de visualizar o recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura do músculo (quadríceps) dos camundongos (MARQUES *et al.*, 2012). Os animais forma anestesiados com uma mistura Ketamina S+ (200mg/kg, Cristália, SP), de xilazina (10mg/kg, Rompun®, Bayer) e PBS, injetada via intraperitoneal (i.p.). Para a avaliação do processo de recrutamento de leucócitos nos vasos do músculo os animais receberam, inicialmente, uma injeção por via retro-orbital de rodamina 6G (0,3 mg/kg) para marcação dos leucócitos. A Rodamina 6G foi utilizada por sua capacidade de marcar leucócitos, permitindo a visualização dos mesmos, numa elevada velocidade de fluxo sanguíneo. Para a visualização dos vasos sanguíneos na região da coxa foi realizada uma ressecção da pele. Um microscópio (Olympus BX40) com objetiva de 20X foi utilizado para observar os eventos de rolamento e adesão celular na parede dos vasos. Uma câmera de vídeo (Optronics) instalada ao microscópio projeta a imagem em um monitor e as imagens são, então, gravadas no computador para posterior contagem do número de leucócitos, em

rolamento e aderidos, ao longo da parede dos vasos. Foram considerados aderidos os leucócitos que permanecem estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, e esta adesão foi quantificada pelo número total de células aderidas em 100μm da parede da vênula. O rolamento foi considerado para os leucócitos que migraram da região central para a margem do vaso e se moveram a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. Foram avaliados três a quatro vasos sanguíneos por animal e os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/minuto e número de células/100μm, respectivamente.

Para captar as imagens de transmigração dos neutrófilos, os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal (i.p.). O músculo quadríceps foi exposto e a vasculatura foi marcada com anti-corpo anti-PECAM (10μL de anti-PECAM diluídos em 90μL de solução salina). A interação entre neutrófilo e o endotélio nos vasos dos músculos foi então gravada por vinte minutos usando microscópio OLYMPUS (*upright*). O número de células em processo de transmigração foi determinado durante a posterior análise das imagens obtidas. Brevemente, o vídeo foi pausado a cada intervalo de um minuto e o número de neutrófilos foi contado dentro e fora da vênula pós-capilar marcada em vermelho.

4.3.2.2 – Contagem Total e Diferencial de Células

Para a realização da contagem total de células, vinte microlitros (20 μL) de sangue foram coletados do plexo braquial e diluídos em solução de TURK. Esta amostra foi então colocada na câmara de Neubawer e as células que estivessem dentro dos quadrantes foram contadas. Para a contagem diferencial foi realizado um esfregaço do sangue dos camundongos, corado com panótico e a porcentagem de neutrófilos, monócitos e linfócitos foram determinados pela contagem de pelo menos 300 células usando características morfológicas.

4.3.2.3 – Expressão Gênica (qPCR – Real Time)

Para a realização do qPCR Real Time, 100mg de amostras tecido muscular esquelético (quadríceps) foram coletadas e imediatamente congeladas nos momentos 6 e 12 horas após a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga para análise dos níveis de transcritos de *CXCL-1*, *E-selectina*, *L-selectina*, *P-selectina*, *ICAM-1*, *PECAM-1*, *VCAM-1*, *Pax3* e *Pax7*. O RNA total foi obtido usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o procedimento sugerido pelo fabricante. O RNA total foi reversamente transcrito com o SuperScript III (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. O Real Time quantitativo (qPCR) foi realizado em ABI PRISM 7500 Fast detection wystem (Applied Biosystems, Carlbad, CA) usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com pares de primers específicos (tabela 1). A expressão relativa dos níveis de genes foram determinados pelo método de $22^{-\Delta\Delta Ct}$ e foram normalizados pela nível de expressão da subunidade ribossômica 18S. Todas as reações foram replicadas.

Sequência de Primers:

Tabela 1. Primers específicos para qPCR – Real Time

mCXCL1 (KC)	TGT CCC CAA GTA ACG GAG AAA
	TGT CAG AAG CCA GCG TTC AC
mE-selectinF	5'-AGCTACCCATGGAACACGAC-3'
mE-selectinR	5'-CAAGTTCTCCAGCTGTT-3'
mVCAM1F	5'-CCCCAAGGATCCAGAGATTCA -3'
mVCAM1R	5'- ACTTGACCGTGACCGGCTT -3'
mICAM1F	5'- ATCTCAGGCCGCAAGGG -3'
mICAM1R	5'- CGAAAGTCCGGAGGCTCC -3'
mP-selectinF	5'- CCTGGCAAGTGGAATGATGA -3'
mP-selectinF	5'- CTGTGATGCAGGGTATTACGGG -3'
mL-selectinF	5'- CTGTGATGCAGGGTATTACGGG -3'
mL-selectinR	5'- CTCTCTTCCCTCAGAACAGTTG -3'
mPECAM -1 fw	5´- TCC CTG GGA GGT CGT CCA T-3´
mPECAM -1 rv	5´- GAA CAA GGC AGC GGG GTT TA-3´

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados serão apresentados com média + SE. A análise da diferença entre dois ou mais grupos será realizada, respectivamente, pelo teste t-student e One-way ANOVA seguida do pós-teste Newman-Keuls. A significância estatística será estabelecida em $p<0,05$.

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na ordem em que aparecem nos objetivos específicos:

1. Padronização do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga em camundongos na esteira elétrica utilizando marcadores fisiológicos:

No protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga adotado (Figura 1), os animais alcançaram uma velocidade média de 15.8 ± 3.7 metros por minuto, com duração máxima média de 56,3 ± 6.8 minutos e a distância total percorrida de 438.6 ± 68.4 metros.

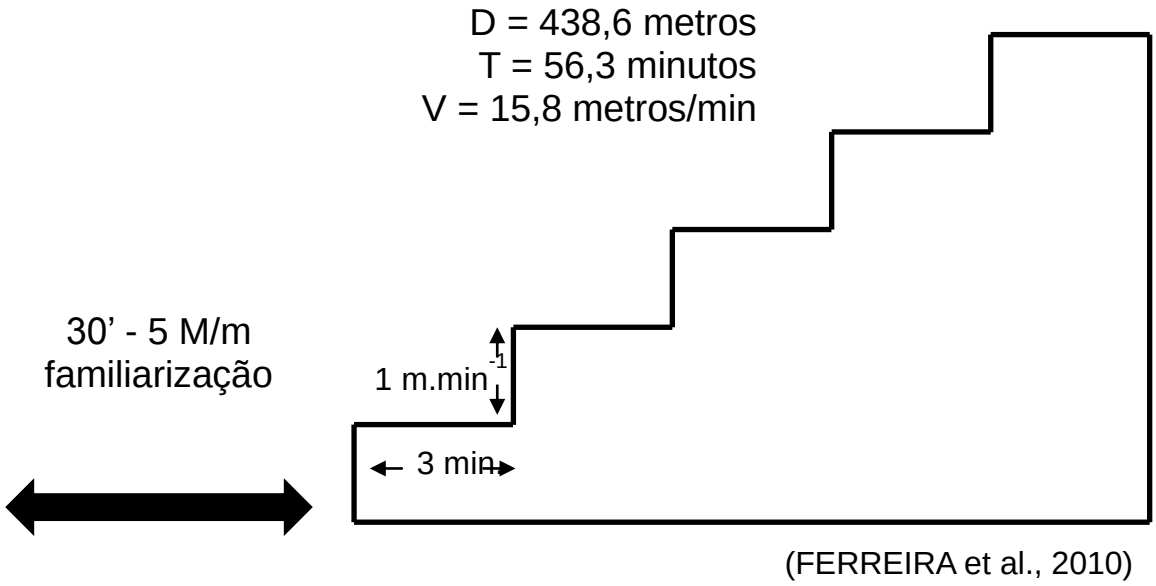


Figura 3. Protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga. Os animas foram colocados na esteira elétrica, onde foram exercitados a uma velocidade de 5m/minuto durante 30 minutos para familiarização e então a velocidade foi aumentada 1m/minuto a cada 3 minutos até que os animais atingissem a fadiga. Os animais atingiram a fadiga em ± 56,3 minutos, a uma velocidade máxima de ± 15,8 metros por minuto. A média da distância máxima alcançada foi de 438,6 metros (N = 16).

O volume máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) é um importante marcador da intensidade do esforço físico e durante a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga o consumo máximo de oxigênio (ml/Kg/minuto) dos camundongos aumentou quando comparados o momento inicial e o momento final

da aplicação do protocolo (Fig. 2A). O exercício físico também aumentou as concentrações sanguíneas de lactato, que é tradicionalmente utilizado como marcador da intensidade do exercício físico (Fig. 2B). A cinética das concentrações séricas de creatina kinase (CK-NAC), que é reconhecidamente um marcador específico de lesão do tecido muscular esquelético, mostra um aumento nos momentos 6 e 12 horas após a realização do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga, retornando aos níveis basais 24 horas. Durante a realização de exercícios físicos intensos há aumento no consumo de glicose sanguínea para a realização da tarefa e os resultados mostram que a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga reduziu os níveis de glicose sanguínea neste estudo (Fig. 2D). Estes resultados em seu conjunto mostram que o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga adotado foi intenso, consumiu glicose e oxigênio e causou dano ao tecido muscular esquelético. Desta forma, constatamos que o protocolo adotado induziu alterações metabólicas importantes para a continuação do projeto proposto e gerou o estresse fisiológico necessário para as futuras investigações.

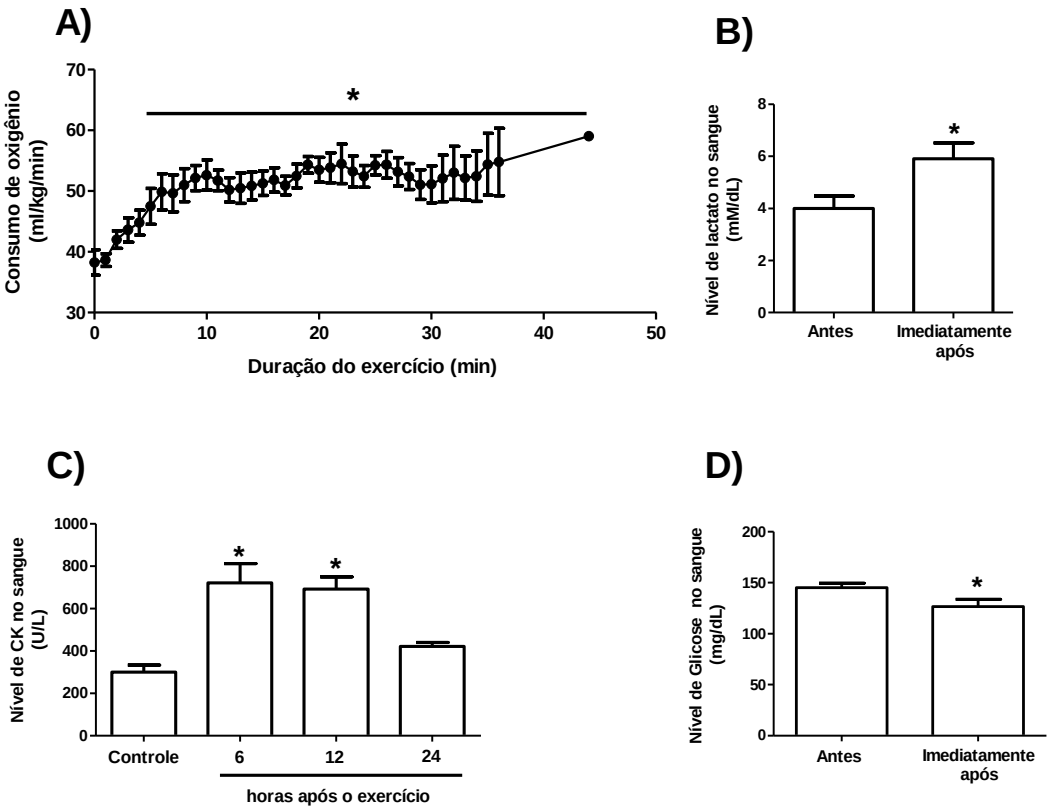


Figura 4. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga representou estresse fisiológico para os camundongos. O exercício físico elevou o consumo de oxigênio (A), os níveis de lactato (B) e reduziu os níveis de glicose (D) sanguínea dos camundongos. O exercício físico também elevou os níveis séricos de creatina kinase (CK) 6 e 12 horas após a realização do protocolo (C). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 6-8).

2. Efeito do protocolo de exercício físico no comportamento do fluxo sanguíneo na pata dos camundongos:

Para investigar se houve alteração do fluxo sanguíneo em resposta ao protocolo de exercício físico até a fadiga, utilizamos o Laser Doppler para realizar a quantificação desse fluxo na pata dos animais. Os resultados mostram que o exercício físico até a fadiga induziu aumento (3, 6 e 12 horas) no fluxo de sangue na pata (Fig. 3B e C) quando comparados com a situação sem o exercício físico (Fig. 3A e C) e a apocinina não foi capaz de inibir esta alteração.

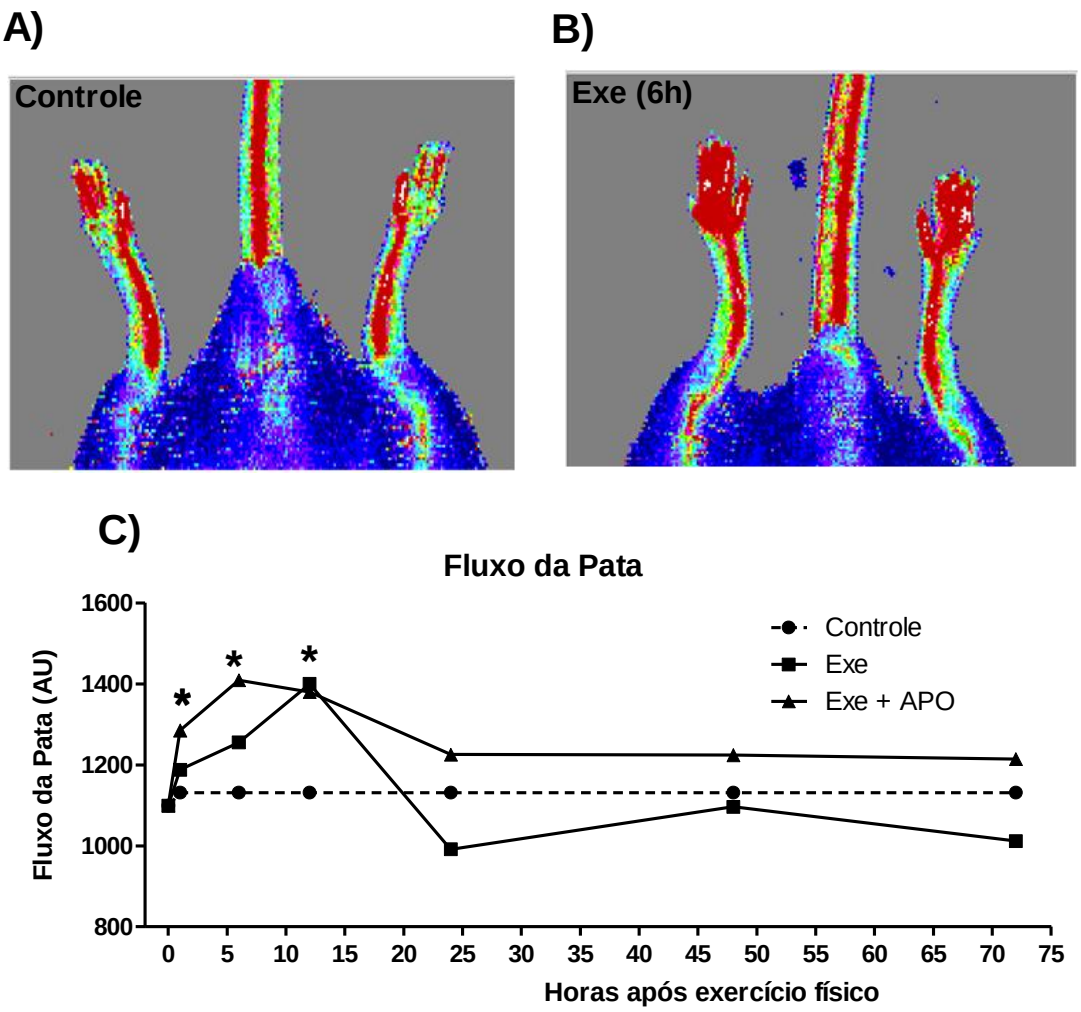


Figura 5. O protocolo de exercício físico até a fadiga aumentou o fluxo de sangue na pata. Os animais realizaram o protocolo de exercício físico até a fadiga, foram anestesiados e tiveram o fluxo sanguíneo de pata analisado pelo laser DOPPLER (A e B). Os resultados mostraram que houve alteração do fluxo sanguíneo na pata (A, B e C) após exercício físico na presença e na ausência de apocinina. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-8).

3. Efeito da aplicação do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue:

Para investigarmos um possível efeito do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga na quantidade de leucócitos no sangue, foram realizadas contagens totais e diferenciais destas células em esfregaço sanguíneo dos animais. Os resultados mostraram que o número total de leucócitos no sangue

periférico aumentou 12 e 24 horas após a realização do exercício físico (Fig. 4A). Este aumento estava associado a um aumento de neutrófilos 12 e 24 horas (Fig. 4B) e monócitos que aumentou 6, 12 e 24 horas (Fig. 4C). De forma interessante o número de linfócitos diminuiu 6 horas e, então, aumentou 12 e 24 horas após o protocolo de exercício físico até a fadiga, quando comparado ao grupo não exercitado (Fig. 4D).

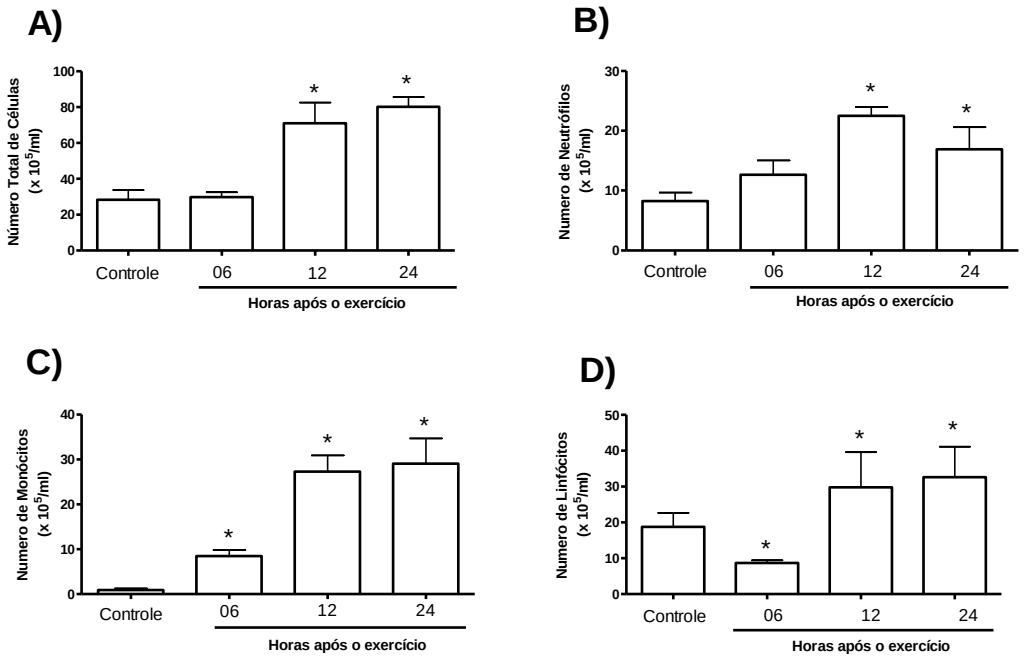


Figura 6. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induziu alterações nas sub-populações de leucócitos no sangue. O exercício aumentou o número total de células no sangue 12 e 24 horas após o exercício (A). Associado a este aumento as sub-populações de neutrófilos 12 e 24 horas (B), monócitos 6, 12 e 24 horas também aumentaram (C) em resposta ao exercício físico. Os resultados mostram que os linfócitos primeiramente reduziram 6 horas e então aumentaram 12 e 24 horas (D) após o protocolo de exercício físico. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

4. Recrutamento de células inflamatórias para o músculo exercitado (quadríceps):

Neste estudo foi utilizada a técnica de microscopia intravital com o intuito de visualizar o recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura do músculo da coxa de camundongos. As imagens obtidas pela microscopia

intravital mostram claramente alterações nas interações leucócito-endotélio em resposta ao exercício físico até a fadiga. Os resultados mostram que o rolamento dos leucócitos estava aumentado 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga (Fig. 5B e C) quando comparados ao grupo controle (Fig. 5A e C). Observou-se também, no grupo exercitado, aumento na adesão de leucócitos ao endotélio 3, 6, 12 e 24 horas após o exercício físico quando comparado ao grupo controle (Fig. 5D).

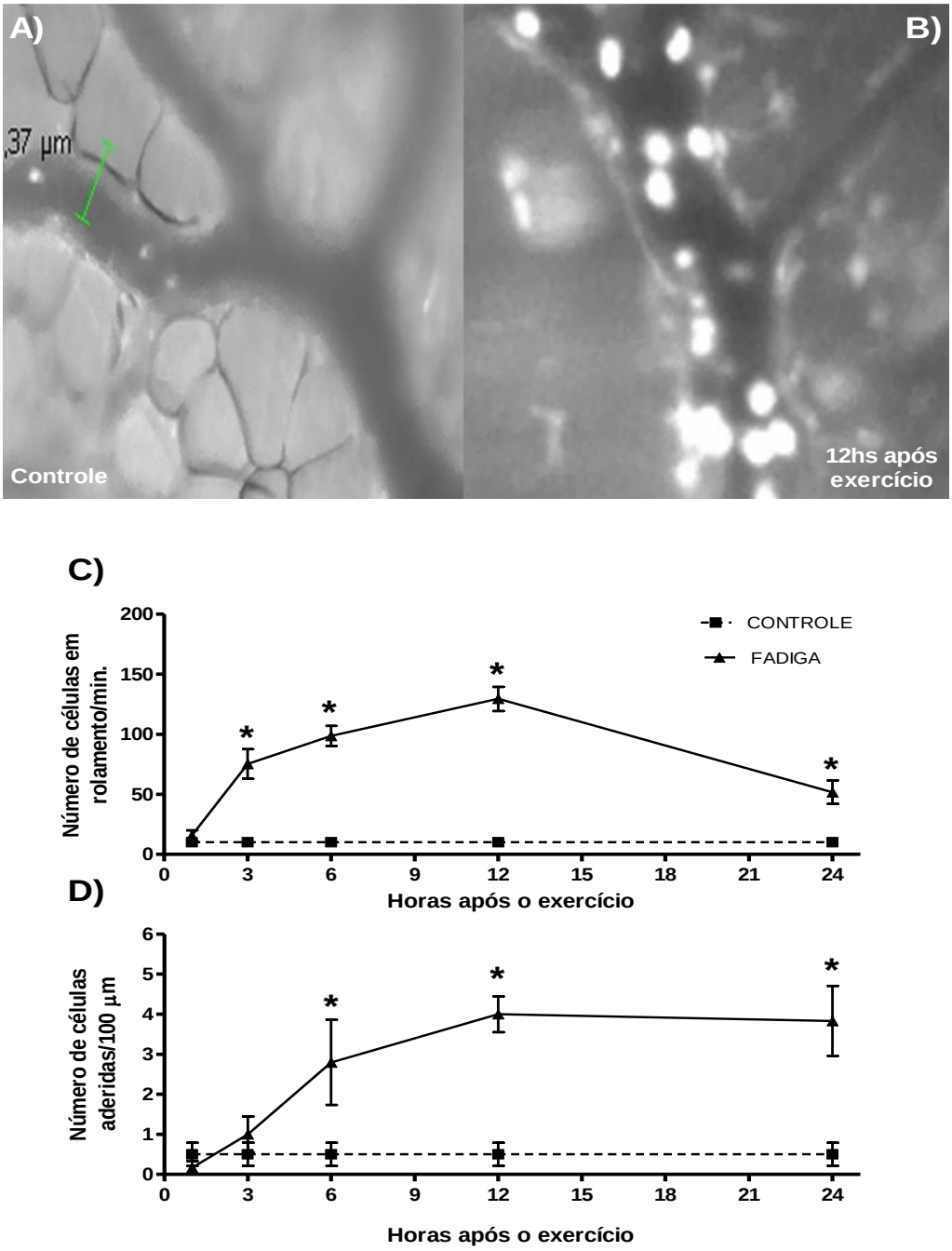


Figura 7. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induziu aumento no recrutamento de leucócitos. Imagens captadas em vênulas pós-capilares do músculo quadríceps, através de microscopia intravital, mostraram que o exercício aumentou o recrutamento de leucócitos 12 horas após o exercício físico (B) quando comparado ao músculo de animais que não exercitaram (A). A quantificação das células mostra que o pico do rolamento (C) e adesão (D) ocorreu 12 horas e permaneceu elevado até 24 horas. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

Para estudar melhor o processo de recrutamento de leucócitos e qual tipo de leucócito estava migrando para a o tecido muscular em resposta ao exercício físico até a fadiga utilizamos a técnica de microscopia intravital confocal (MIC) e camundongos que expressam LysM-eGFP e desta forma possuem neutrófilos fluorescentes.

Como as imagens captadas por microscopia intravital mostraram que o pico da resposta inflamatória ocorreu por volta de 12 horas após a realização do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga, fizemos as análises da MIC somente neste momento. Podemos perceber que, nos animais exercitados até a fadiga, ocorreu aumento no processo de transmigração através do endotélio em direção ao interstício do tecido muscular quando comparados com animais que não se exercitaram (Fig. 6A, B e C).

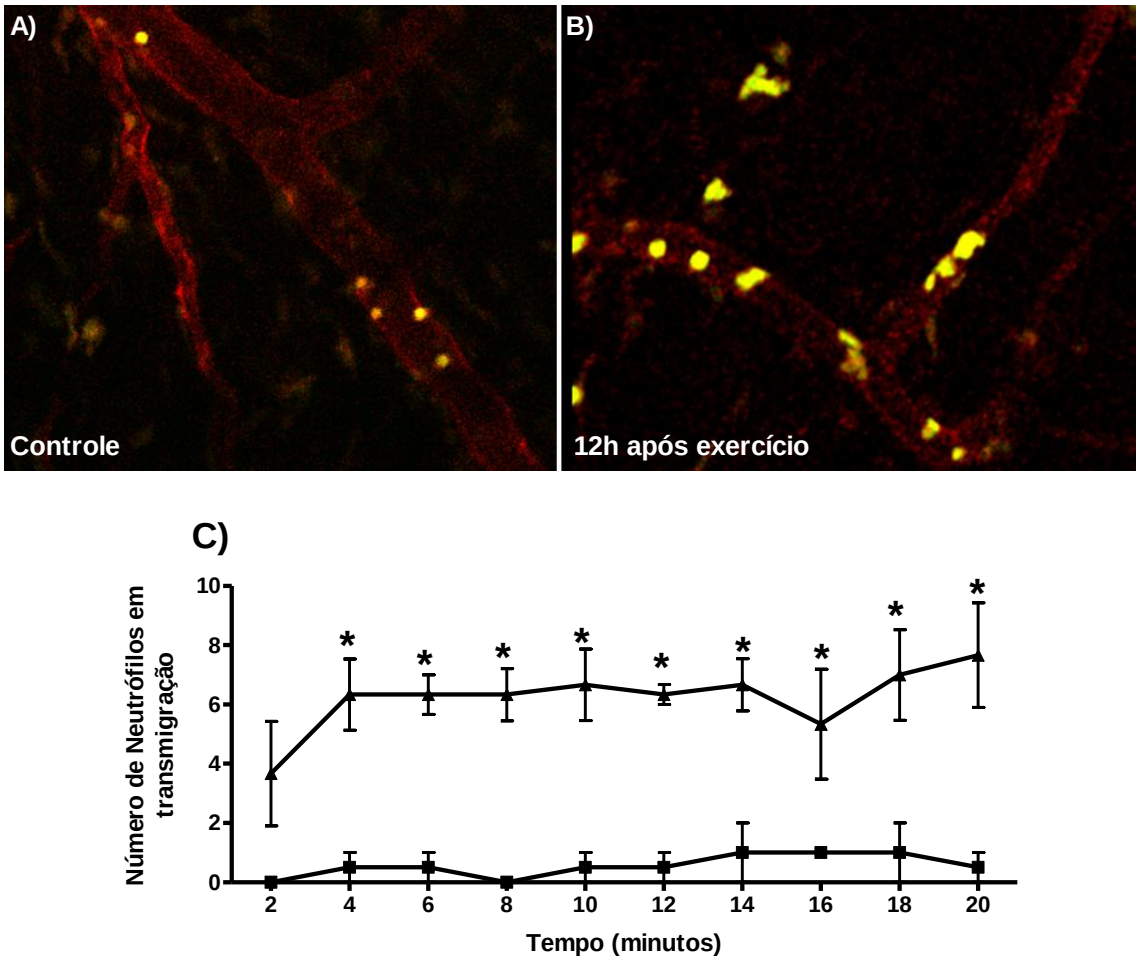


Figura 8. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga causou transmigração de neutrófilos através do endotélio. Imagens captadas durante 30 minutos por microscopia confocal mostraram que os animais que realizaram o protocolo de exercício físico apresentaram aumento na transmigração de neutrófilos através do endotélio vascular (B) quando comparados ao grupo não exercitado (A). A quantificação dos neutrófilos presentes fora do lúmen do vaso (no interstício muscular) mostrou esta diferença (C). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 3).

Para comprovar a presença de neutrófilos infiltrados no tecido muscular, fizemos a análise histológica do tecido muscular (Fig. 7). A análise das imagens adquiridas mostrou que o tecido muscular de animais exercitados (Fig. 7B e C) apresentou aspecto histológico diferente daquele de animais que não exercitaram (Fig. 7A). A imagem do tecido do animal sem exercício apresenta tecido íntegro, fibras musculares organizadas, com alinhamento normal, com ausência de

qualquer indício inflamatório, porém, o tecido do animal que se exercitou apresenta pontos de desorganização tecidual, estrutura danificada de fibras com a presença de acúmulo de neutrófilos (Fig. 7C). Vale a pena ressaltar aqui que o exercício físico até a fadiga não gerou lesões exacerbadas, porém pontuais, gerando processo inflamatório de baixo grau. Estes dados confirmam as imagens captadas por microscopia intravital confocal que mostraram a transmigração de neutrófilos para o tecido muscular que foi lesado durante o exercício físico.

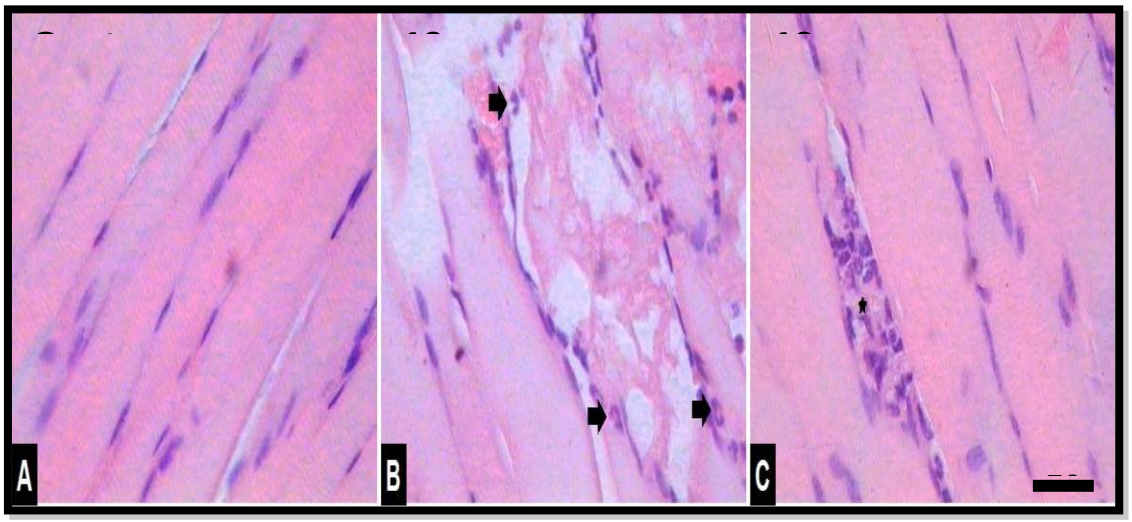


Figura 9. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga gerou infiltrado de leucócitos no tecido muscular. Fotos de micrografias de secções do músculo quadríceps de animais controle (A) e 12 horas após o exercício físico (B e C) feitas em hematoxilina e eosina (H&E). Fibras musculares com aspecto histológico normal (A)**.** Destruição parcial das fibras musculares associada à infiltração leve de neutrófilos (setas) (B). Foco inflamatório com predomínio de neutrófilos (asterisco) (C) (N = 4).

Além disso, realizamos o ensaio enzimático para detecção de MPO e NAG no tecido muscular após a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga. MPO e NAG são marcadores do acúmulo de neutrófilos e macrófagos no tecido, respectivamente. Como podemos perceber os resultados de MPO mostraram que o número de neutrófilos estava aumentado 6 horas após o exercício físico (Fig. 8A), entretanto o ensaio de NAG demonstrou redução na quantidade de macrófagos no tecido muscular (Fig. 8B) com retorno aos níveis basais 24 horas após a realização do exercício físico até a fadiga. Dessa forma, podemos afirmar com base nos dados acima, que o principal leucócito que foi recrutado para o

tecido muscular nas horas subsequentes após o exercício físico até a fadiga é o neutrófilo.

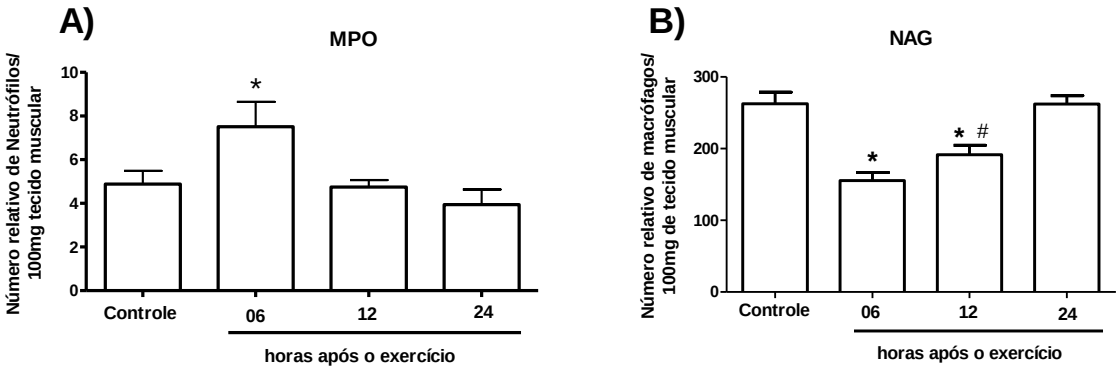


Figura 10. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga aumentou a quantidade relativa de número de neutrófilos no tecido muscular. O protocolo de exercício físico até a fadiga aumentou o número de neutrófilos 6 horas após o exercício físico até a fadiga (A), porém o número de macrófagos estava reduzido 6 e 12 horas tendo voltado aos níveis basais 24 horas após a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga (B). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 6-8).

5. Cinética da nocicepção na pata dos camundongos após o exercício físico até a fadiga:

Exercícios físico extenuantes podem gerar uma resposta conhecida como dor muscular de aparecimento tardio (DOMS), que é um fenômeno complexo, multifatorial que pode estar associado à resposta inflamatória induzida pelo exercício físico. Em modelos animais realiza-se a medida da nocicepção utilizando técnicas específicas. Para investigar se o exercício físico até a fadiga resultou na alteração da nocicepção na pata dos camundongos utilizamos o método de Von Frey. O resultados mostraram que não houve alteração na nocicepção na pata de camundongos induzida pelo exercício físico (Fig. 9).

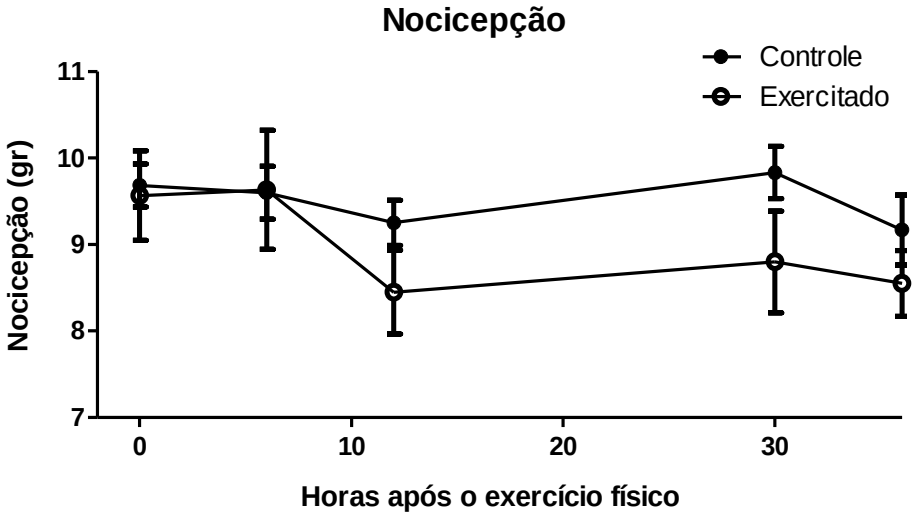


Figura 11. Resposta na nociecpção ao protocolo de exercício físico até a fadiga. Este resultado mostrou que o protocolo de exercício físico ralizado até a fadiga não foi suficiente para induzir alterações na nocicepção na pata dos camundongos. Não houve diferença na cinética da nocicepção entre animais que realizaram exercício físico até a fadiga e animais que não realizaram. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 6-8).

6. Produção de mediadores inflamatórias (citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão) em resposta ao protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga:

Para verificação do perfil pró e anti-inflamatório do tecido muscular após o exercício físico até a fadiga, fizemos ensaios de ELISA para quantificação das citocinas IL-6, TNF-α, IL-1β e IL-10 e das quimiocinas CXCL-1 (KC) e CXCL-2 (MIP-2). Os resultados mostraram que a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga aumentou as concentrações das citocinas IL-1β (Fig. 10C) e IL-10 (Fig. 10D) 6 horas após o exercício físico. Entretanto, as citocinas IL-6 (Fig. 10A), TNF-α (Fig. 10B) e as quimiocinas CXCL-1 (KC) (Fig. 10E) e CXCL-2 (MIP-2) não estavam aumentadas após a realização do exercício físico.

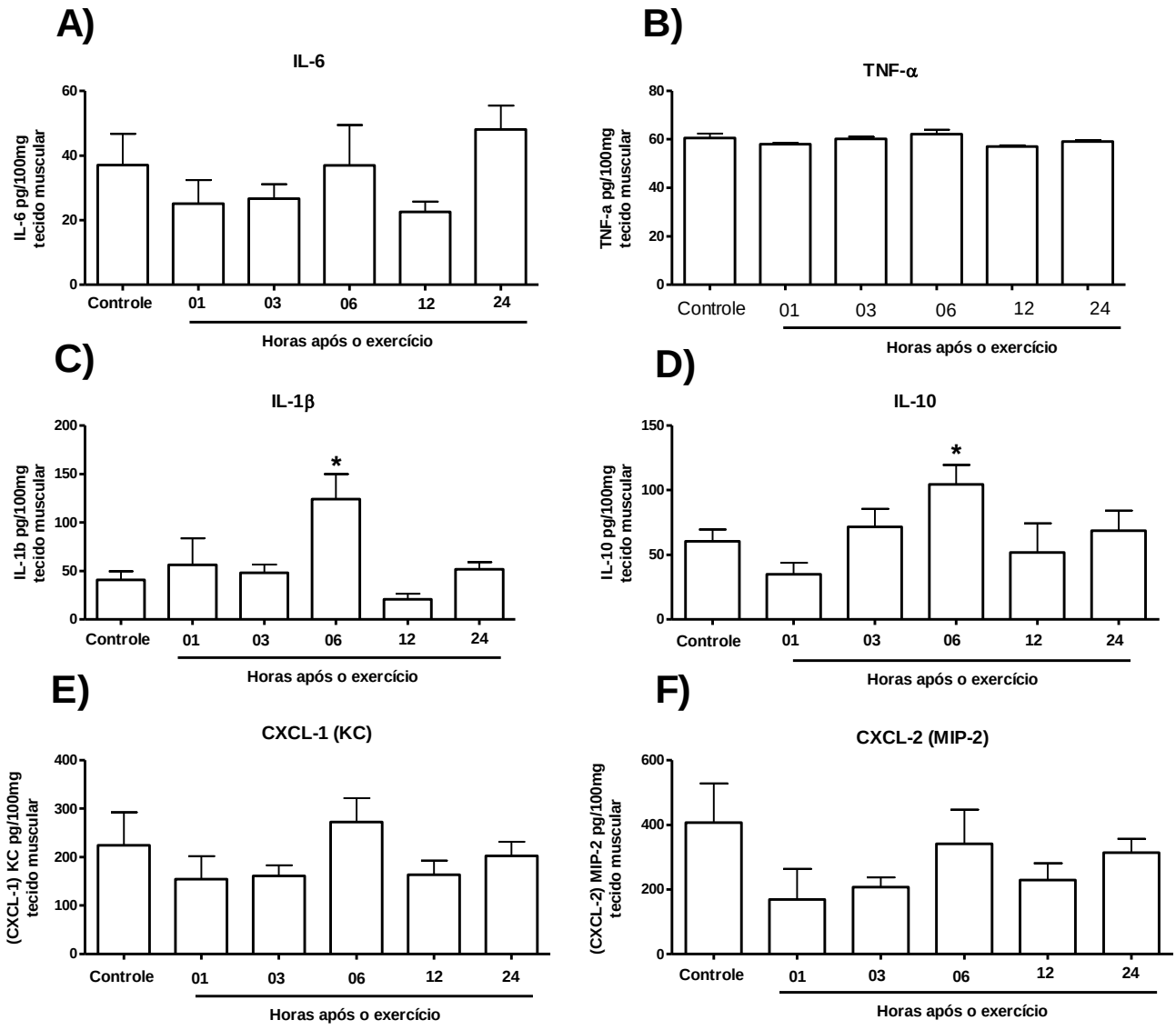


Figura 12. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga altera os níveis de citocinas no tecido muscular. Os resultados mostram que o exercício físico aumentou os níveis de IL-1β (C) e IL-10 (D) no tecido muscular. Os níveis das citocinas IL-6 (A) e TNF-α (B) das quimiocinas CXCL-1 (KC) (E) e CXCL-2 (MIP-2) (F) não sofreram alterações em resposta ao exercício físico até a fadiga. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

Como os resultados mostraram que o exercício físico até a fadiga, induziu resposta inflamatória e esta resposta teve seu pico entre 6 e 12 horas após a realização do exercício físico até a fadiga, investigamos a expressão de moléculas associadas ao processo inflamatório (citocinas, quiciocinas e moléculas de adesão

celular) como também marcadores de ativação de células satélites neste intervalo de tempo. Utilizamos a técnica de qPCR (Real Time) para verificar a expressão de mediadores após a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga (Fig. 11). Ainda que a expressão de *CXCL-1* (Fig. 11A) e *PECAM-1* (Fig. 11C) não tenham sido alteradas 6 horas após o exercício físico, os resultados mostram que houve aumento na expressão de *E-selectina* (Fig. 11B), *L-selectina* (Fig. 11C) e *PECAM-1* (Fig. 11D) 6 e 12 horas após a realização do exercício físico. Estes resultados mostram também que a apocinina foi eficiente em inibir este aumento em *E-selectina* (Fig. 11B) 6 horas e também foi capaz de inibir este aumento na expressão de *L-selectina* (Fig. 11C) e *PECAM-1* 12 horas após o exercício físico (Fig. 11D).

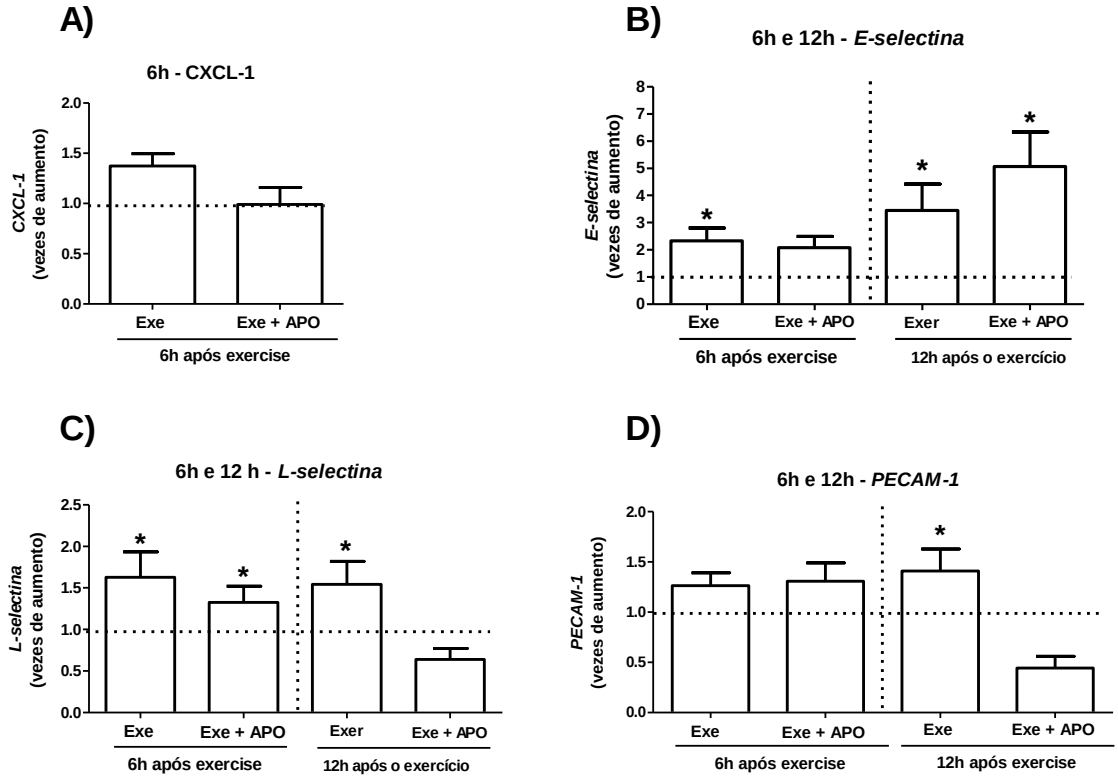


Figura 13. O protocolo de exercício físico alterou a expressão gênica de moléculas de adesão. A expressão de *CXCL-1* (A) e *PECAM-1* (C) sofreram alterações 6 horas após o exercício físico. Houve aumento na expressão de *E-selectina* (B), *L-selectina* (C) e *PECAM-1* (D) 6 e 12 horas após a realização do exercício físico. A apocinina foi eficiente em inibir este aumento em *E-selectina* (B) 6 horas e *L-selectina* (C) e *PECAM-1* 12 horas após o exercício físico (D). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 3-6).

Como consequência do aumento do infiltrado celular no tecido muscular, talvez ocorra o remodelamento do tecido muscular esquelético na tentativa de restaurar a organização alterada pelo exercício físico. Este processo de remodelamento é resultado da ativação de células satélites que são células quiescentes no tecido muscular e estão relacionadas à miogênese e hipertrofia muscular. A molécula *Pax7* é um importante marcador de ativação de células satélites e neste estudo nós investigamos a expressão gênica desta molécula 12 horas após a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga (Fig. 12). Os resultados mostram que a expressão deste fator hipertrófico estava aumentada 12 horas após a realização deste protocolo.

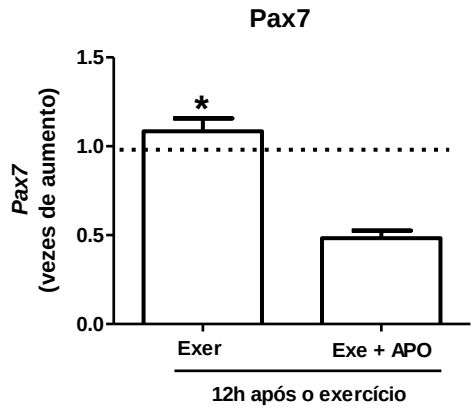


Figura 14. O protocolo de exercício físico alterou a expressão gênica do fator hipertrófico. O protocolo de exercício físico até a fadiga alterou a expressão gênica de *Pax7* 12 horas após o exercício físico e a apocinina inibiu este aumento (N = 6-8).

7. Efeito do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga no balanço oxi-redutor no tecido muscular:

Para verificarmos o perfil do estresse oxidativo no tecido muscular e analisarmos o possível papel das espécies reativas de oxigênio no mecanismo de recrutamento celular, fizemos ensaios enzimáticos para substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutationa reduzida (GSH). Os resultados mostraram que não houve peroxidação lipídica, uma vez que TBARS não sofreu nenhuma alteração (Fig. 13A), porém, os níveis de glutationa reduzida (GSH) diminuíram 6, 12 e 24 horas após o exercício físico até a fadiga (Fig. 13B). O que

significa dizer que o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga alterou o balaço oxidante/redutor sem induzir dano à membrana lipoproteica.

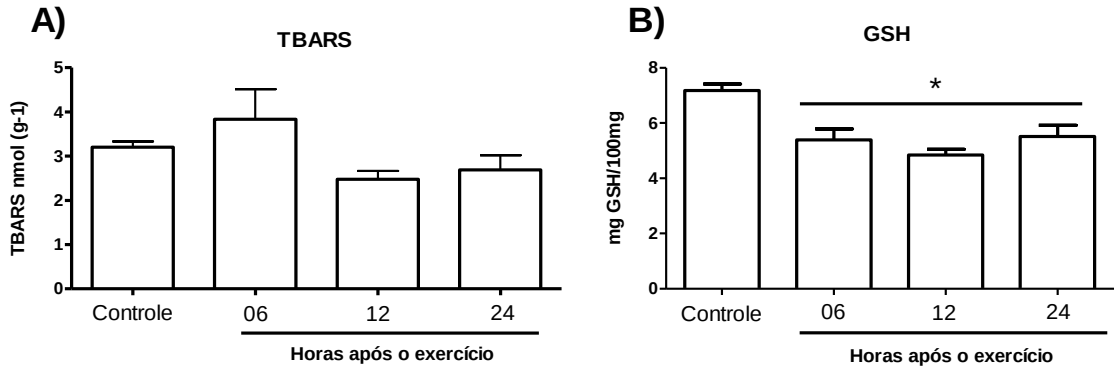


Figura 15. O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga alterou o equilíbrio oxidante/redutor no tecido muscular. O exercício físico realizado até a fadiga foi capaz de diminuir a glutationa reduzida (GSH) (B), porém não induziu peroxidação lipídica, uma vez que não interferiu nos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)(A). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

8. Papel da NADPH oxidase e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no processo de recrutamento celular para o tecido muscular:

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são mediadores produzidos por vários tecidos e que participam da ativação de leucócitos durante a resposta inflamatória. Após o exercício físico até a fadiga vimos que os níveis de GSH estavam reduzidos indicando que houve aumento na produção de ROS. Uma das mais importantes fontes de ROS durante o exercício físico é a enzima NADPH oxidase, dessa forma, resolvemos investigar o papel do ROS produzido pela NADPH oxidase na resposta inflamatória induzida pelo exercício até a fadiga. Para este fim utilizamos a apocinina que é um conhecido inibidor da NADPH oxidase. Com base nos resultados, podemos perceber que a apocinina foi capaz de inibir o aumento do número de células rolando e aderidas 6 e 12 horas após o exercício físico (Fig. 14A e B). De maneira semelhante, a administração de apocinina também foi capaz de inibir a transmigração de neutrófilos para o tecido muscular (figura 14C).

Outra estratégia utilizada para investigar o papel das espécies reativas de oxigênio no processo de recrutamento celular foi a utilização de camundongos deficientes da subunidade $gp91^{phox}$ da NADPH oxidase. Estes animais foram exercitados e as células em rolamento e aderidas aos vasos foram quantificadas 12 horas após o exercício físico. Os resultados mostram que a ausência da subunidade $gp91^{phox}$ impede o aumento do rolamento (Fig. 14D) e da adesão (Fig. 14E) de leucócitos às vênulas pós-capilares no tecido muscular de camundongos exercitados.

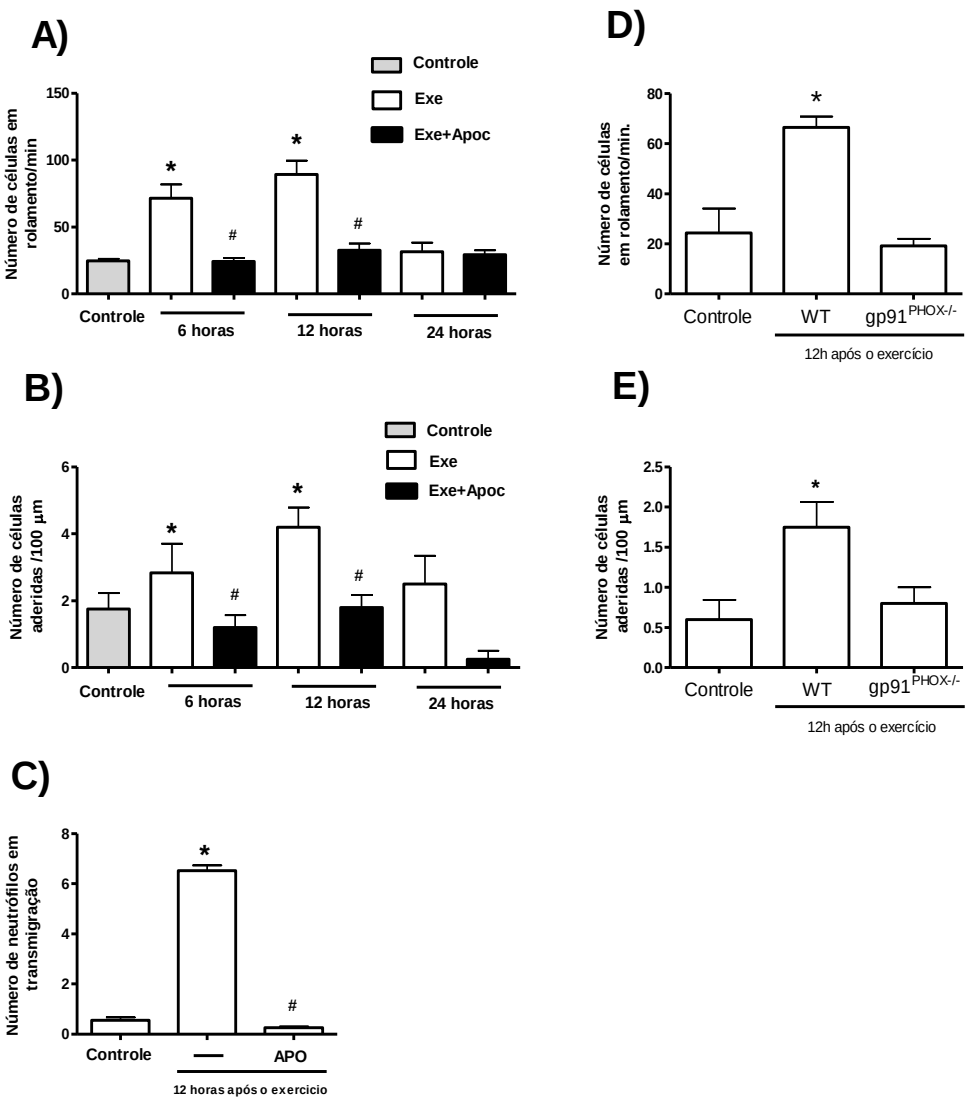


Figura 16. A inibição ou a deleção da NADPH oxidase bloqueia o recrutamento de leucócitos para o tecido muscular. A administração de apocinina intraperitonealmente (i.p.), 30 minutos antes da realização do protocolo de exercício físico até a fadiga, inibiu o aumento no rolamento (A) e na adesão (B) de leucócitos 6 e 12h horas após o exercício físico. A apocinina também inibiu a transmigração de neutrófilos (C) através do endotélio vascular 12 horas após o exercício. A ausência de NADPH oxidase (animais $gp^{91phox-/-}$) inibiu o rolamento (D) e a adesão (E) de leucócitos em resposta ao exercício físico. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

Uma das espécies reativas de oxigênio geradas pela via da NADPH oxidase é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessa forma, decidimos estudar a importância do H_2O_2 para o acúmulo de leucócitos após o exercício físico até a fadiga. Para isso, administramos a superóxido dismutase (SOD) intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes do protocolo de exercício físico até a

fadiga (Fig. 15). Os resultados mostram que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não alterou o rolamento (Fig. 15A), entretanto, a SOD exacerbou a quantidade de células aderidas no endotélio vascular (Fig. 15B) e também a quantidade de células que estavam em processo de transmigração (Fig. 15C) para o tecido muscular 12 horas após a aplicação do protocolo de exercício físico até a fadiga.

Para confirmar a exacerbação no processo de transmigração de neutrófilos, induzida por exercício físico na presença de SOD utilizamos a tecnologia de filmagem em 3D no microscópio confocal e um programa de análises de imagens chamado VOLOCITY. Podemos perceber que o grupo que realizou exercício físico até a fadiga e recebeu SOD apresentou um número maior de neutrófilos no tecido (Fig. 15E) quando comparado ao grupo que apenas se exercitou (Fig. 15D). As imagens captadas mostram que a SOD realmente aumentou o número de células transmigradas no endotélio de músculos exercitados até à fadiga.

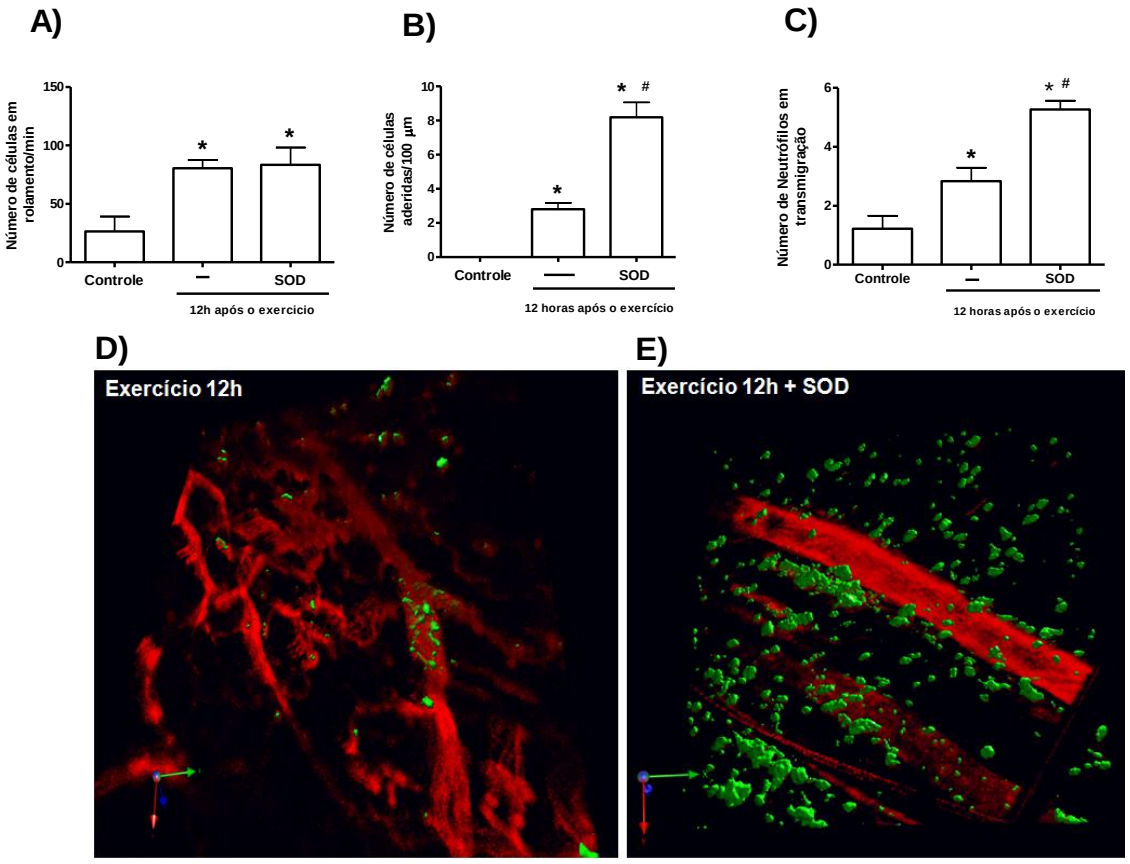


Figura 17. Superoxido dismutase (geradora de H_2O_2) amplificou o recrutamento de células para o músculo exercitado. A administração da superóxido dismutase (SOD) intraperitonealmente, 30 minutos antes da realização do exercício físico até a fadiga, não alterou a magnitude do aumento no número de células em rolamento (A), porém exacerbou o número de células aderidas (B) e em processo de transmigração (C) através do endotélio vascular 12 horas após o exercício físico até a fadiga. Estes resultados foram confirmados por imagens em microscopia confocal tridimensional que mostram o número de neutrófilos é exacerbado no grupo exercitado na presença de SOD (E) quando comparado com o grupo que apenas realizou o exercício físico (D). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 3-4).

9. Efeito da magnitude da carga de trabalho e da lesão tecidual no recrutamento de leucócitos para o tecido muscular:

Com base nos resultados da resposta inflamatória induzida pelo exercício físico até a fadiga, resolvemos investigar se o recrutamento de leucócitos é dependente da duração e/ou intensidade do exercício físico. Desta forma, os animais foram exercitados em um protocolo utilizando 60% da duração máxima alcançada quando o exercício foi realizado até a fadiga (36 minutos e 100% da

média intensidade alcançada) e 60% da média da intensidade máxima alcançada (velocidade) do protocolo anterior (9 metros/minuto e 100% da média da duração máxima alcançada – 55 minutos). A figura 15 mostra que o exercício com duração e intensidade menores também induziram aumento no número de células em rolamento (Fig. 16C) e aderidas (Fig. 16D). Além disso, houve aumento nas concentrações de lactato na corrente sanguínea (Fig. 16A) e dos níveis de creatina kinase (CK) (Fig. 16B), entretanto, o aumento na CK foi menor quando a intensidade ou a duração do exercício físico era menor em relação ao protocolo de esforço até a fadiga. Estes resultados demonstram claramente que o aumento do rolamento e da adesão de leucócitos no endotélio vascular não é dependente de lesão tecidual, possivelmente dependendo de outros fatores como o estresse de cisalhamento induzido pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso e produção de mediadores pró-inflamatórias como as ROS, estimulando assim a interação entre leucócito e endotélio com consequente aumento do recrutamento celular.

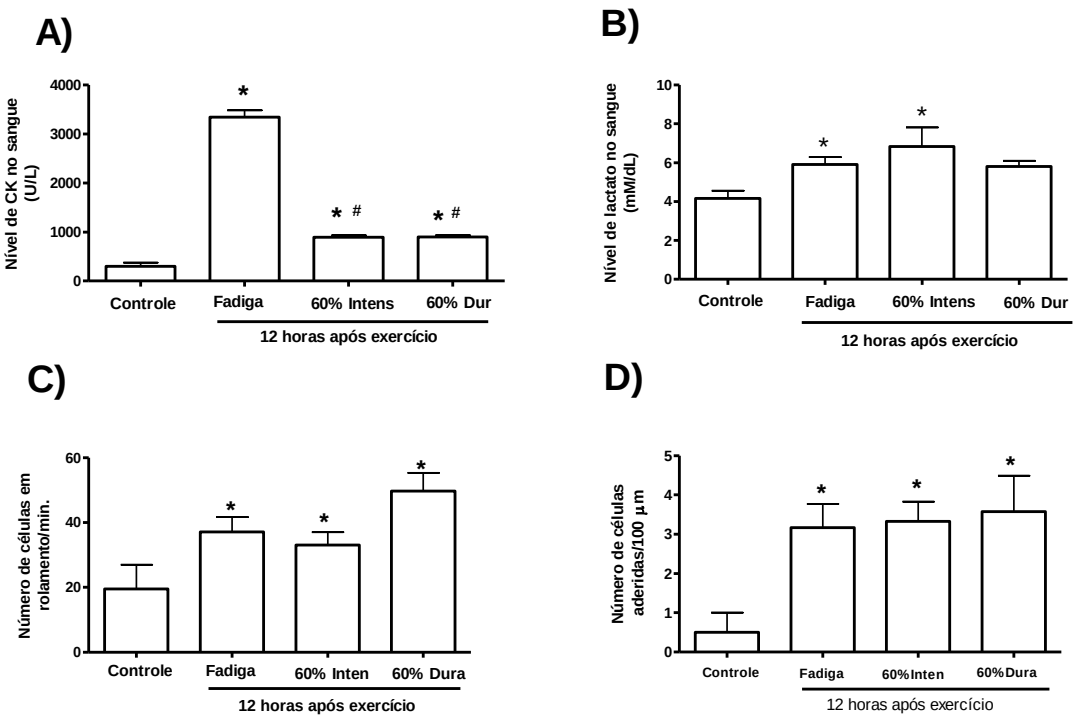


Figura 18. Protocolos de exercício físico que não induziram fadiga também induziram recrutamento de leucócitos. O exercício físico com carga de trabalho menor não conduziu o animal à fadiga mas gerou aumento no número de células em rolamento (C) e aderidas (D). Exercícios que alcançaram 60% da duração ou 60% da intensidade também aumentaram as concentrações de CK (A) e lactato (B) no sangue. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6).

10. Efeito do tratamento com apocinina na resposta inflamatória e no remodelamento do tecido muscular esquelético, após um período de treinamento físico:

Sendo nossa hipótese a de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas nos leucócitos, músculos e endotélio vascular, contribuem para o recrutamento de células do sistema imune para dentro do tecido lesionado e que, uma vez infiltrados, os leucócitos contribuem para o remodelamento do tecido muscular esquelético, investigamos o efeito de um protocolo de treinamento físico (crônico) em marcadores fisiológicos, de estresse oxidativo e inflamatórios neste tecido. Camundongos “wild type” (WT) foram treinados por seis semanas, na presença e na ausência de apocinina, seguindo o seguinte protocolo: Com base no teste de esforço realizado até a fadiga realizado previamente, os animais treinaram a aproximadamente 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço, durante 60 minutos (1º semana) e, então, a velocidade foi aumentada para 70% na segunda semana e mantida até a sexta semana (figura 17).

O protocolo de exercício físico até a fadiga representa um desafio fisiológico ao organismo do camundongo. Este evento altera o metabolismo quebrando a homeostase imediatamente após a realização do exercício físico. Inúmeras alterações ocorrem em resposta a esta sessão de exercício físico tais como: aumento nas concentrações de lactato, no consumo de oxigênio, redução da glicose circulante e extravasamento de CK para a corrente sanguínea. Além disso, ocorre aumento no número de células do sangue e este aumento permanece por algumas horas. Concomitantemente a este aumento de células no sangue, ocorre o recrutamento destas células para o músculo exercitado (quadríceps) com possível transmigração de algumas destas células para o interstício muscular. Esta resposta é dependente de ROS produzido pela NADPH oxidase e o bloqueio desta enzima pode inibir este recrutamento.

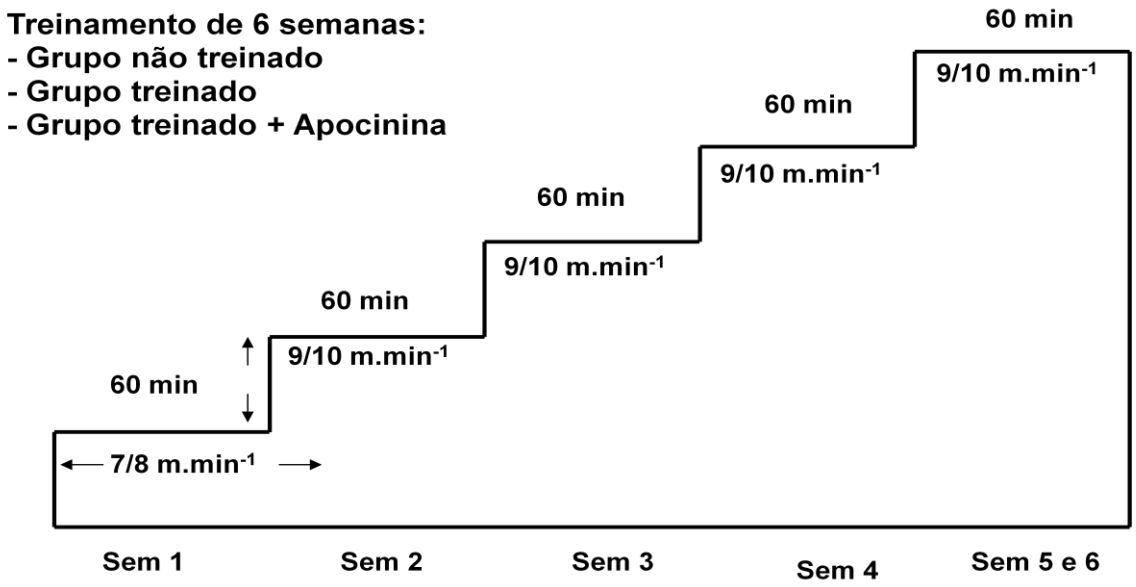


Figura 19. Protocolo de treinamento físico de seis semanas. Com base na velocidade máxima alcançada no teste de esforço físico progressivo até a fadiga utilizamos a intensidade de 60% da velocidade na 1ª semana e a partir daí 70% da velocidade máxima atingida até o final do treinamento.

Após um período de treinamento de seis semanas consecutivas, os animais tiveram três dias de recuperação e então tiveram o tecido muscular extraído para análise da expressão gênica de moléculas associadas ao processo inflamatório (citocinas e quimiocinas) e ao remodelamento do tecido muscular (*Pax3* e *Pax7*). Os resultados mostraram claramente que o treinamento de seis semanas induziu alterações nos mediadores inflamatórios. O protocolo de seis semanas de treinamento elevou os níveis de *CXCL-1* (Fig.18A), *E-selectina* (Fig. 18B), *VCAM-1* (Fig. 18F), *PECAM-1* (Fig. 18G) e *Pax3* (Fig. 18H), porém não alterou a expressão de *L-selectina* (Fig. 18C) *ICAM-1* (Fig. 18D), *P-selectina* (Fig. 18E) e *Pax7* (Fig. 18I). Interessantemente a apocinina foi capaz de inibir o "up-regulation" na expressão da quimiocina, de algumas moléculas de adesão e do fator hipertrófico. Estes resultados mostram claramente que estas respostas adaptativas induzidas pelo treinamento físico são dependentes do equilíbrio oxidante redutor, e a NADPH oxidase é relevante neste processo adaptativo.

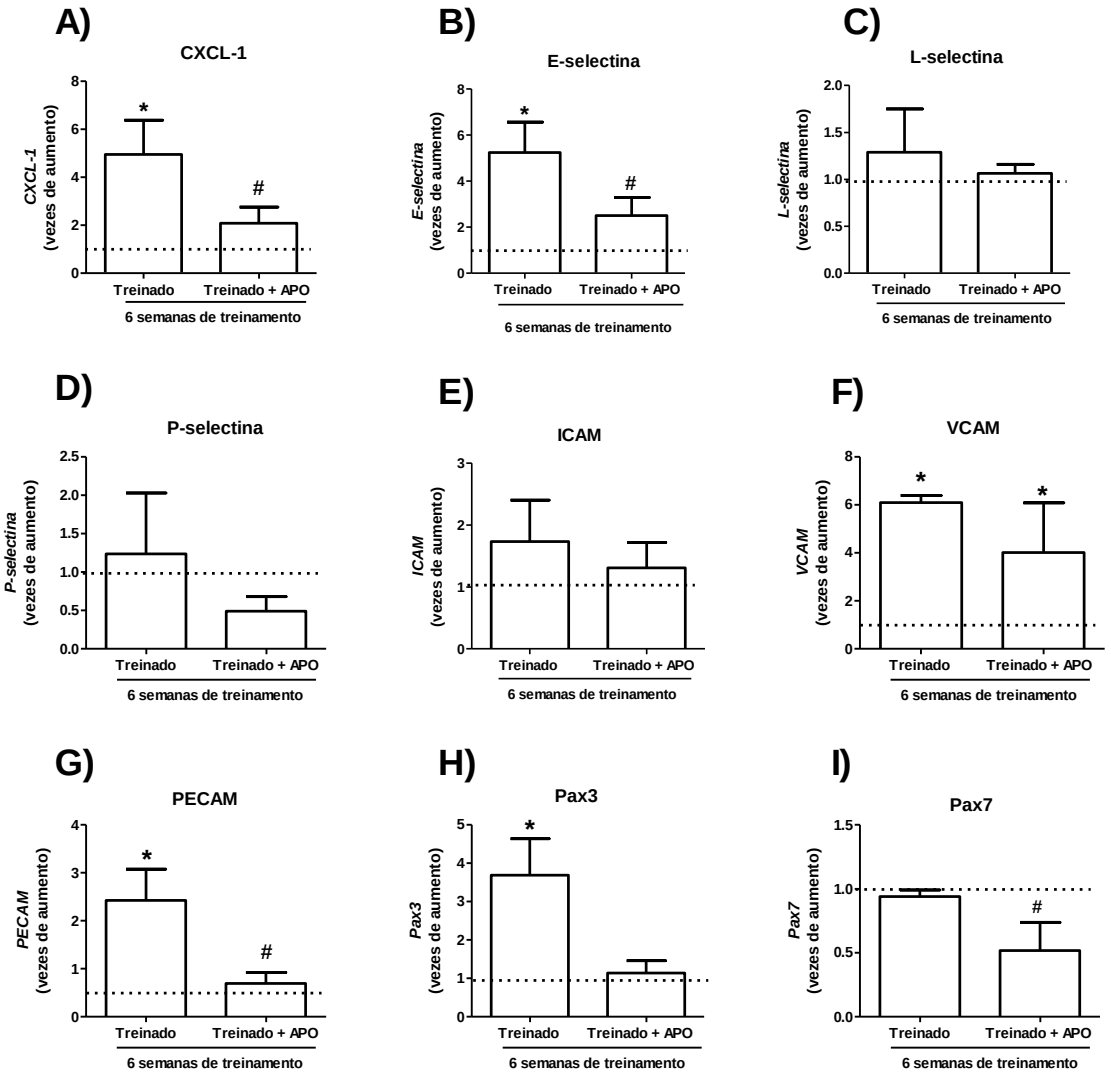


Figura 20. O protocolo de treinamento de seis semanas de treinamento alterou a expressão gênica de moléculas inflamatórias e ativação de células satélites. O protocolo de seis semanas de treinamento alterou a expressão gênica de *CXCL-1* (A), *E-selectina* (B), *VCAM-1* (F), *PECAM-1* (G) e *Pax3* (H), porém não alterou a expressão de *L-selectina* (C) *ICAM-1* (D), *P-selectina* (E) e *Pax7* (I). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4).

11. Efeito de um período de treinamento físico na resposta inflamatória aguda:

Durante todo o treinamento os animais foram pesados duas vezes por semana para registro do ganho de peso. Não houve diferença no ganho de peso

entre os animais do grupo controle, grupo treinado e grupo treinado que recebeu administração de apocinina (Fig. 19E).

Ao final do treinamento, realizamos um teste de esforço progressivo até a fadiga para compararmos o desempenho entre os grupos, avaliamos o recrutamento de leucócitos 12 horas após este teste de esforço e o dano tecidual. De forma interessante, não houve diferença em parâmetros do desempenho como na duração máxima de esforço (Fig. 1A) e no consumo máximo de oxigênio (Fig. 19F). Os resultados mostraram também que o treinamento não interfere no rolamento (Fig. 19C) e adesão (Fig. 19D) de leucócitos em vênulas pós-capilares do músculo quadríceps induzido pelo protocolo de exercício físico até a fadiga. Entretanto, o treinamento interfere no dano tecidual, após o exercício físico houve menor dano tecidual quando comparado com a situação sem treinamento (Fig. 19B)

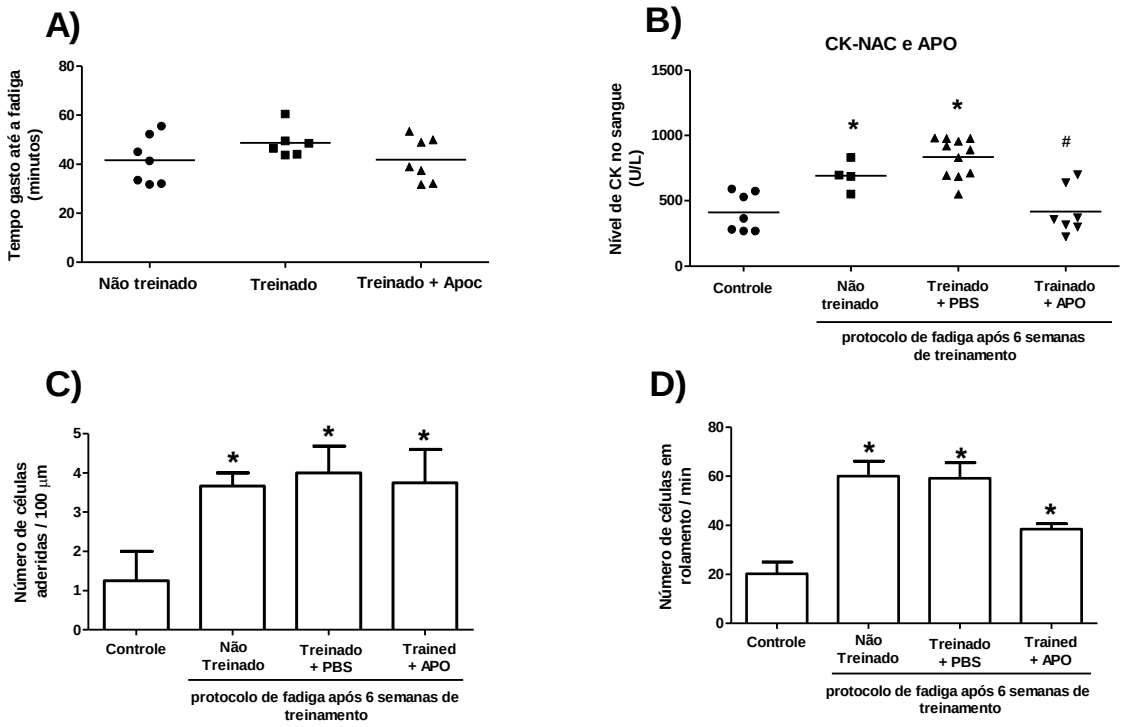
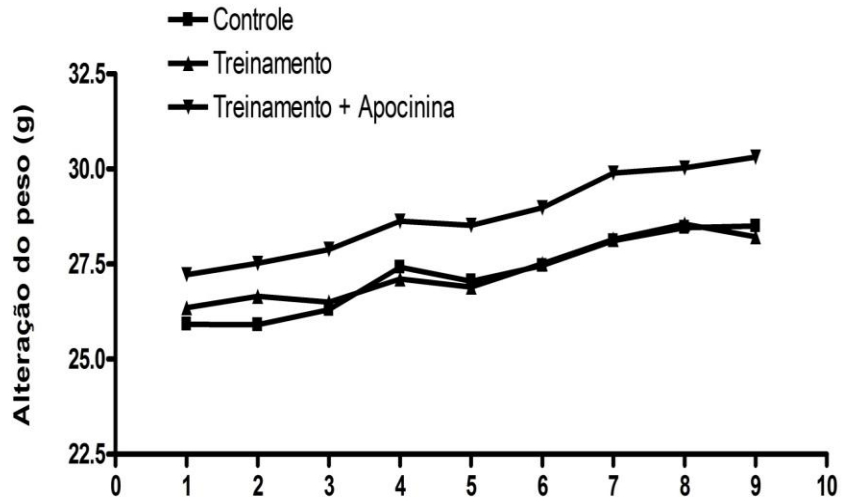


Figura 21. O protocolo de treinamento de seis semanas não induziu melhoria do desempenho. Após o treinamento de seis semanas não houve alteração do desempenho após a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga (A). O treinamento físico não interferiu no rolamento (C) e a adesão (D) dos leucócitos nas paredes dos vasos, porém, o grupo treinado demonstrou menor lesão tecidual que o grupo não treinado (B).

(A)



(B)

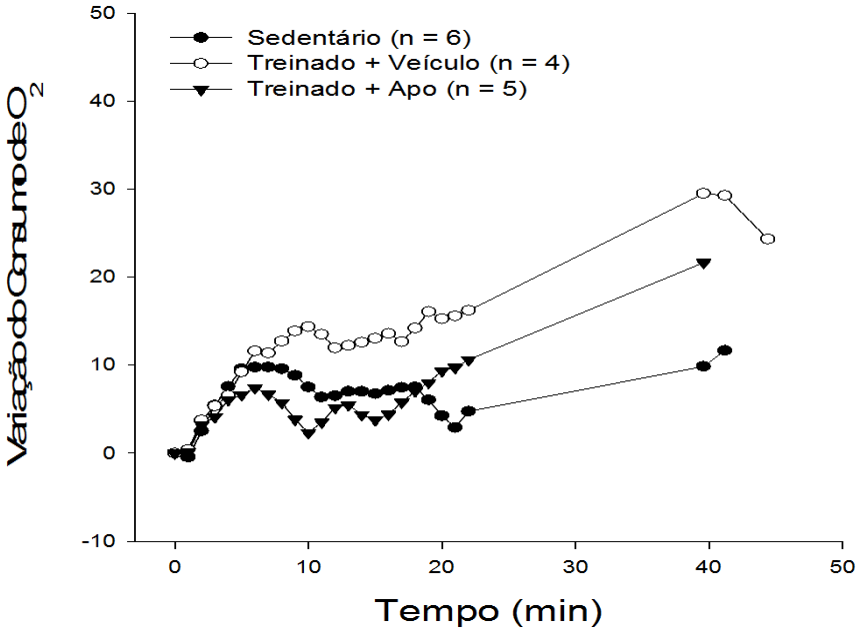


Figura 22. Evolução do peso dos animais e consumo de oxigênio após 6 semanas de treinamento. Peso dos animais aumentou durante o processo de treinamento e este aumento não foi diferente entre os grupos (A) assim como o consumo de oxigênio (B). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (N = 4-6). Falar o q é o controle: animais que não foram submetidos a nenhum protocolo de exercício físico.

7 – DISCUSSÃO

O exercício físico extenuante, não usual ou predominantemente excêntrico tem sido associado ao surgimento do dano muscular de aparecimento tardio (PEAKE *et al.,* 2006). Na última década, o fenômeno do dano muscular induzido pelo exercício físico tem recebido atenção especial tanto da comunidade científica internacional envolvida com o exercício físico, quanto dos treinadores, atletas e esportistas recreacionais de todo o mundo (TIDBALL, 2005; PEAKE *et al.,* 2006; PEAKE *et al.*, 2007; SCHNEIDER *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008). Estas microlesões no tecido muscular induzido pelo exercício físico são caracterizadas por alterações ultraestruturais na arquitetura do tecido muscular, que pode ocasionar aumento do extravasamento de proteínas tais como creatina kinase (CK) e mioglobina (Mb) para a corrente sanguínea, redução da função muscular (redução dos níveis de força muscular) e da amplitude de movimento (ADM), além de dor muscular de aparecimento tardio (DOMS) (CHEUNG, *et al.*, 2003; PEAKE *et al.*, 2006; PEAKE *et al.,* 2007). A literatura apresenta algumas teorias que tentam explica o surgimento da dor muscular de aparecimento tardio, entre elas a do ácido lático, do espasmo muscular, do dano ao tecido conjuntivo, do dano muscular e da inflamação. Algumas destas teorias, como por exemplo, a do espasmo muscular e a do ácido lático não se sustentaram ao longo dos anos, pois não foram demonstradas experimentalmente. Nos últimos anos as teorias mais investigadas são a do dano muscular e a teoria do processo inflamatório (CHEUNG, *et al.*, 2003).

No presente trabalho tentamos entender o processo inflamatório que ocorre após o exercício físico intenso e estabelecer associações com a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Os resultados encontrados neste estudo podem ser resumidos nos seguintes pontos: (1) o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga causou alterações fisiológicas importantes; (2) este estudo mostrou pela primeira vez, imagens da interação entre leucócito-endotelio no tecido muscular induzida pelo exercício físico, utilizando a técnica de microscopia intravital; (3) através da microscopia confocal foi possível ver claramente que houve transmigração de neutrófilos para o tecido muscular após

exercício físico até a fadiga; (4) os resultados mostram produção aumentada de ROS após exercício físico até a fadiga, o que se relaciona com o acúmulo de neutrófilos no tecido muscular esquelético; (5) os resultados mostram também que a inibição da produção de ROS tanto famacológica (administração intraperitoneal de apocinina) quanto pela ausência da molécula $gp91^{phox}$ impede a interação leucócito/endotélio sugerindo que esta enzima seja uma importante produtora de ROS no sistema; (6) o aumento na produção de peróxido de hidrogênio pela administração de SOD eleva o processo de recrutamento e transmigração celular.

Primeiramente, selecionamos um protocolo de exercício físico que alterasse o estado de repouso dos animais. O protocolo adotado foi o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga, vastamente utilizado na literatura e através dele, percebemos que o exercício físico até a fadiga gerou alterações bioquímicas e fisiológicas importantes para a continuidade do projeto.

O nível de lactato sanguíneo é usado classicamente como marcador de intensidade do exercício físico e seu acúmulo no músculo esquelético (ou na corrente sanguínea) induz redução do pH intracelular e está associado com mecanismo de fadiga (incapacidade de manutenção do desempenho). Em nosso modelo, o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga elevou os níveis de lactato na corrente sanguínea imediatamente após o final do exercício e este resultado é coerente com achados prévios da literatura (KOKUBUN e BRUM, 2007). Outro marcador importante é o nível de glicose no sangue, uma vez que a glicose sanguínea é usada pelo metabolismo energético para a produção de energia durante exercícios de alta intensidade (McARDLE, 1998). Neste estudo houve diminuição dos níveis de glicose sanguínea imediatamente após a realização do protocolo de exercício físico até a fadiga.

Outra variável fisiológica importante a ser observada durante a realização do exercício físico é o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) que é definido como a quantidade máxima de oxigênio consumido pelo organismo durante o exercício físico (McARDLE, 1998). Esta é uma das principais variáveis fisiológicas na área da fisiologia do exercício e é importante tanto para avaliar a condição cardiorrespiratória quanto para prescrição da adequada carga de treinamento

(BASSETT e HOWLEY, 2000). Nós avaliamos o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) durante o protocolo de exercício físico até a fadiga e constatamos que o protocolo foi eficiente para aumentar o consumo de oxigênio. As alterações que ocorreram nos níveis de lactato, da glicose e do consumo de oxigênio foram importantes, pois mostraram que o protocolo de exercício físico até a fadiga, utilizado neste trabalho representou um estresse fisiológico capaz de tirar o camundongo da situação de homeostase.

A creatina kinase (CK) é uma enzima presente em vários tecidos e tipos de células. A CK catalisa a reação entre a fosfocreatina (PCr) e o difosfato de adenosina (ADP) gerando trifosfato de adenosina (ATP). A CK tem sido amplamente utilizada na pesquisa e na clínica, como marcador indireto de dano muscular e mais recentemente tem sido utilizado por treinadores como marcador de desgaste físico do atleta. Esta enzima tem sido relacionada principalmente às lesões musculares decorrentes da fase excêntrica do exercício, podendo permanecer aumentada em até sete dias após a realização de um esforço extenuante. Exercícios de força de alta intensidade ou atividades cíclicas que envolvam alto volume têm sido associados a maiores aumentos da CK quando comparados com intensidades e volumes moderados (CHEUNG *et al.*, 2003). Em nosso estudo realizamos uma cinética mostrando os níveis de creatina kinase (CK) no sangue e os resultados mostraram que o protocolo de exercício físico até à fadiga e elevou os níveis de CK no sangue, ou seja, podemos perceber que o protocolo adotado gerou alterações na membrana celular e microlesões no tecido muscular dos camundongos, o que permitiu o extravasamento do CK para a corrente sanguínea. Este resultado foi confirmado pelas fotos de micrografias de secções do músculo quadríceps dos camundongos que mostraram que após o exercício físico algumas fibras musculares apresentaram aspecto histológico com destruição parcial e pontos de lesão.

O endotélio vascular representa a camada de células que reveste a parede interna dos vasos e é sensível a alterações nas forças hemodinâmicas e nos sinais originados pelo sangue. O endotélio responde aos estímulos físicos e químicos pela síntese de diversas substâncias vasoativas, sinalizadoras e fatores

de crescimento. As substâncias sintetizadas e liberadas pelo endotélio incluem o óxido nítrico (NO), a prostaciclina, as endotelinas, os fatores de crescimento endoteliais, as interleucinas, e os fatores fibrinolíticos (BLAIR *et al.*, 1995). O exercício físico eleva agudamente o débito cardíaco, a frequência cardíaca e o metabolismo cardiovascular de maneira geral. Desta forma, para captar alterações do comportamento hemodinâmico dos camundongos, utilizamos a técnica de Laser Doppler. A análise das imagens captadas por esta técnica permitiu a quantificação da alteração hemodinâmica induzida pelo exercício físico realizado até a fadiga. Estes resultados mostraram claramente que logo após o exercício físico houve aumento no fluxo de sangue nas patas dos animais e esta alteração confirmou que o protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga induziu estresse necessário para a continuidade do projeto. A apocinina (antioxidante) não alterou a resposta do comportamento hemodinâmico do fluxo das patas dos camundongos.

Como continuação do projeto, fomos investigar se este protocolo de exercício físico poderia gerar alterações na contagem de leucócitos no sangue, uma vez que a literatura tem apresentado resultados mostrando que o exercício físico intenso pode provocar alterações transientes na contagem de células do sistema imune na corrente sanguínea (KAKANIS *et al*., 2009). Após a realização de protocolo de exercício físico até a fadiga houve uma leucocitose induzida pelo exercício físico, representada pelo aumento no número de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Como esta resposta é rápida e ocorre nas primeiras horas após a realização do exercício físico, inferimos que a quantidade de células aumentadas na corrente sanguínea pode não representar aumento da produção de leucócitos pela medula óssea e sim ser proveniente do “pool” marginado de leucócitos, que são células que podem estar aderidas à parede de alguns vasos ou alojadas em órgãos específicos como fígado, baço e a própria medula óssea (SUMMERS *et al.*, 2010). Os resultados do presente estudo fornecem evidências de que o exercício físico intenso eleva o número de leucócitos nas horas subsequentes à realização do exercício físico até a fadiga. Coletivamente, estes resultados sugerem que algumas funções do sistema imune podem estar alteradas após o

estresse imposto pelo protocolo de exercício físico até a fadiga. O número de leucócitos na corrente sanguínea aumentou e isto já foi demonstrado por outros pesquisadores imunologistas do esporte (KAKANIS *et al.,* 2009). O mecanismo pelo qual os neutrófilos aumentam na circulação pode estar associado à produção e liberação de hormônios tais como o hormônio do crescimento, a adrenalina e a noradrenalina durante o exercício físico (KAKANIS *et al.,* 2009; SUMMERS *et al.*, 2010). Nossos resultados e resultados de outros imunologistas do exercício mostram que o sistema imune entende o exercício físico como um possível "ameaça" e desencadeia uma resposta como um sinal de alerta induzindo um quadro de leucocitose nas horas subsequentes ao exercício. É descrito na literatura e percebido na prática dos treinadores e atletas, que após eventos extenuantes, como por exemplo a maratona, os atletas sofrem imunossupressão e ficam mais susceptíveis à infecção das vias aéreas superiores (UIRT), por exemplo. Este fenômeno é conhecido como "open window" e pode estar associado à redução do número de linfócitos (linfopenia) induzida pelo exercício físico (KAKANIS *et al.,* 2009).

O próximo passo foi investigar a interação leucócito-endotélio dentro da microvasculatura do tecido muscular esquelético, utilizando a tecnologia de microscopia intravital. Observamos que após a realização do exercício físico até a fadiga há aumento na interação dos leucócitos com a parede do vaso, mostrando que o exercício físico induz uma resposta inflamatória no músculo estimulado durante o exercício. Então, investigamos se o aumento do número de células rolando e aderidas ao endotélio vascular representou aumento no número de células transmigrando para o tecido muscular. Há na literatura diferentes métodos para detecção do infiltrado de leucócitos no tecido muscular, como por exemplo, ensaio enzimático para mieloperoxidase (MPO) e marcação para anticorpo (imunohistoquímica e imunofluorescência) (BUTTERFIELD, *et al.,* 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2007; CHEN, 2010; KUBES e MEHAL, 2012). Entretanto, a migração de neutrófilos para o tecido muscular após exercício físico ainda não foi elucidada e não há na literatura especializada imagens de microscopia intravital que mostrem este processo de transmigração de leucócitos em resposta ao

exercício físico até a fadiga. Desta maneira, utilizando tecnologia de microscopia confocal e camundongos LysM-eGFP mostramos um aumento de neutrófilos em processo de transmigração. Os vídeos adquiridos mostram claramente o neutrófilo saindo do lúmen do vaso em direção a um ponto específico no interstício muscular. Outros neutrófilos se aglomeraram na mesma região e realizam rotas semelhantes. Este resultado também foi confirmado pela análise histológica do músculo quadríceps dos camundongos e quantificação de MPO. Existem algumas evidências que o leucócito quando infiltrado no tecido muscular produz moléculas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas que podem contribuir com o processo de remodelamento e reparo deste tecido, por exemplo, ativando células satélites e orquestrando a neo-vascularização (NOZAWA *et al.*, 2006). Nossos resultados mostram que houve um processo inflamatório transiente de baixo grau no músculo exercitado. A interação entre leucócito-endotélio também ocorre quando a lesão tecidual é menor, ou seja, no protocolo onde a liberação de CK foi menor (exercício de menor intensidade) também houve aumento no número de leucócitos rolando e aderidos à vênula pós-capilar. A relevância real do acúmulo de neutrófilos no tecido muscular não é bem conhecida e certamente merece mais investigações. Tem sido sugerido, entretanto, que a inflamação associada ao exercício físico intenso talvez seja importante para o processo de adaptação do músculo à carga de treinamento, corroborando com a ideia de que a inflamação pode ser uma resposta fisiológica de remodelamento do tecido. Além disso, nossos resultados mostram que a aplicação do protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga aumentou a expressão das moléculas *E-selectina*, *L-selectina* and *PECAM-1* nas horas subsequentes à realização do exercício físico. Este aumento poderia explicar o aumento no número de células em rolamento e aderidas ao endotélio após exercício físico até a fadiga (WEBER *et al.*, 2007). Esses dados corroboram com resultados prévios da literatura que mostraram que o dano muscular induzido pelo exercício pode estar associado à resposta inflamatória local e acúmulo de leucócitos no tecido muscular exercitado (PEAKE *et al.,* 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008). Vale a pena ressaltar que este foi o primeiro trabalho que usou a tecnologia de microscopia intravital de

fluorescência e confocal para mostrar o processo de transmigração celular após a aplicação de protocolo de exercício físico até a fadiga. Estes resultados criam uma nova possibilidade para investigar a resposta inflamatória induzida pelo exercício físico. Os dados de acúmulo de macrófagos serão melhor investigados.

Sabendo que os animais apresentavam um processo inflamatório após à realização do exercício físico até a fadiga, e que a dor é um dos sinais cardinais da inflamação, investigamos a nocicepção nos animais após a realização do protocolo de esforço físico até a fadiga. Os resultados não mostram alteração da nocicepção nas horas subsequentes ao exercício físico, entretanto, nós utilizaremos outros métodos para investigar a alteração de nocicepção no músculo exercitado dos camundongos.

A IL-1β é uma citocina pró-inflamatória expressa por várias células, entre elas os neutrófilos e macrófagos e sua produção é aumentada em um processo inflamatório. As ações da IL-1β podem ser diretas ou através de mediadores, como a prostaglandina E_2 (PGE_2), fator estimulador de colônia (CSF), IL-6 e IL-8. As atividades biológicas mais importantes da IL-1β incluem a estimulação de células CD4+ para secretarem IL-2 e produzir receptores para a IL-2; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias e aumento da hematopoiese. Estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais. Já a IL-10 é uma citocina inibidora de macrófagos ativados que tem como papel a modulação da resposta inflamatória. A IL-10 é produzida principalmente por células CD8+, Th0, Th1, Th2, linfócitos B, mastócitos e monócitos. O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o interferon (IFN-g), IL-2, IL-12, TNF-β. Inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2. A IL-10 atua como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores e ainda co-estimula o crescimento dos timócitos imaturos (SHAIKH, 2011). Trabalhos científicos publicados na ultima década mostraram que citocinas inflamatórias podem aumentar em resposta ao exercício físico tanto no músculo quanto na

corrente sanguínea (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Assim, quantificamos as citocinas associadas ao processo inflamatório e os resultados mostraram que o protocolo de exercício físico até a fadiga elevou os níveis de IL-1β e IL-10. Este resultado é interessante, pois mostrou que a inflamação induzida pelo exercício físico, ativa a via pró-inflamatória, mas também ativa a via anti-inflamatória, o que possivelmente contribui para que a inflamação aconteça por um período curto de tempo após a realização do exercício físico até a fadiga, retornando o músculo à homeostase rapidamente.

O ROS por si funciona como mediador inflamatório (PATTWELL, *et al.*, 2004; POWERS e JACKSON, 2008; POWERS *et al.*, 2011). Para verificarmos se o exercício físico até a fadiga alterou o equilíbrio oxidante redutor, fizemos ensaios enzimáticos para dosagem de GSH e TBARS. Interessantemente o exercício físico elevou a produção de espécies reativas de oxigênio, confirmado pela depleção do GSH, entretanto, não gerou dano à membranas lipoproteicas, uma vez que, não houve peroxidação lipídica (alteração nos níveis de MDA). Este resultado reforça a concepção de que o exercício físico aumenta a produção de ROS e o ROS funciona como mediador da resposta inflamatória no músculo quadríceps. Tomando como exemplo outros modelos de inflamação em outros tecidos e estudos *in vitro*, hipotetizamos que a produção aumentada de ROS talvez pudesse coordenar o influxo neutrofílico para o tecido muscular. Neste sentindo, experimentos foram feitos utilizando estratégia farmacológica, administração de apocinina, que é um reconhecido anti-oxidante e inibe a produção de ROS pela via da NADPH oxidase e animais mutantes ($gp91^{phox-/-}$) que possuem a NADPH oxidase não funcional. O bloqueio da via da NADPH oxidase inibiu o recrutamento (rolamento, adesão e transmigração) de leucócitos para dentro do tecido muscular esquelético, desta forma, mostrando que o ROS específico da NADPH-oxidase possui papel importante no recrutamento de leucócitos. Neste trabalho não determinamos a origem do ROS, mas este, possivelmente, podem ser produzido por células endoteliais (FREY *et al.*, 2009), células musculares esqueléticas (WHITEHEAD, *et al.,* 2010; COOK-MILLS *et al.,* 2011; BARBIERI *et al.,* 2012) e leucócitos (EL-BENNA *et al.,* 2005), uma vez que estas células expressam

NADPH-oxidase contendo a subunidade gp91^{phox}. Mecanisticamente ROS talvez regule o recrutamento celular nos músculos exercitados via modulação de algumas moléculas de adesão presente nos leucócitos e no endotélio vascular. O aumento na expressão de algumas moléculas de adesão é inibido na presença de apocinina o que explica a redução no processo de rolamento e adesão quando o animal recebe apocinina intraperitonealmente, ou seja, a inibição da NADPH oxidase pode modular a resposta inflamatória pela indução da expressão de moléculas de adesão.

É sugerido que os leucócitos realizem a fagocitose de *debris* (restos de tecido muscular) e desta maneira contribua para o "clearance" do local onde ocorreu a inflamação (TIDBALL, 2005). A literatura dá suporte a estas inferências, pois, a regeneração do músculo é mais lenta em animais mais velhos e, além disso, animais que apresentam taxa mais lenta de remoção de tecido danificado, possui menores taxas de remodelamento (TIDBALL, 2005). Experimentos com animais depletados de neutrófilos e monócitos também mostrou mais restos de tecido, em músculos lesionados, o que sugeriu a possibilidade de que a capacidade comprometida para remover os restos de tecido por fagócitos poderia retardar o processo de regeneração Desta forma, alguns autores defendem a ideia de que a fagocitose gerada pelo infiltrado de neutrófilos é necessária para o reparo e remodelamento tecidual (TIDBALL, 2005). Nós estamos ampliando nossa perspectiva de investigação no sentido de entender se o processo inflamatório induzido pelo exercício físico agudo (após uma sessão de treino) é importante para este processo adaptativo crônico (após um período de treinamento) do tecido muscular ao exercício físico. A produção de ROS aumentada talvez resulte no aumento de moléculas de adesão expressas na superfície celular possibilitando o infiltrado de células específicas como neutrófilos e possivelmente macrófagos podem contribuir para o remodelamento do tecido muscular esquelético, em processos como a angiogênese, a hipertrofia muscular e a biogênese mitocondrial (GOMES *et al.,* 2012).

Nossos resultados também mostram aumento no número de leucócitos aderidos e em processo de transmigração quando a enzima superóxido dismutase

(SOD) foi administrada 30 minutos antes do exercício físico, inferindo que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a molécula envolvida no processo de recrutamento induzido pelo exercício físico até a fadiga como demonstrado em outros modelos de inflamação (LEE e YANG, 2012). Os pesquisadores tem mostrado que o H_2O_2 produzido endogenamente medeia o aumento na expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e também a proteína quimioatraente de neutrófilo-1 (MCP-1) e podem ser responsáveis pelo aumento no número de rolamento e adesão de leucócitos induzido pelo exercício físico (CAI, 2005; JIANG *et al.*, 2011). Existem algumas evidências que as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem induzir um “up regulation” na expressão gênica de moléculas de adesão, tais como *ICAM-1* e *VCAM-1* em modelos de doenças pulmonares (MARRIOTT *et al.,* 2008).

Com a certeza de que o protocolo de exercício físico até a fadiga aumenta o recrutamento celular para o endotélio vascular, fomos investigar se este recrutamento é da fadiga, da intensidade ou da duração do exercício física. Desta forma exercitamos os camundongos com diferentes protocolos de exercício físico e os resultados mostraram que, mesmo quando o animal não se exercita até a fadiga, há aumento no rolamento e adesão celular, ainda que o exercício não gere dano tecidual aumentado. Ou seja, o recrutamento de leucócitos não é dependente apenas da lesão, talvez o próprio estresse de cisalhamento do fluxo sanguíneo nos vasos, ative moléculas de adesão na superfície do endotélio vascular e induza rolamento e adesão de leucócitos.

Acreditando que o processo inflamatório é importante para o remodelamento do tecido muscular e que o remodelamento é importante para as adaptações induzidas pelo treinamento esportivo. Fomos investigar se a inibição da inflamação, utilizando apocinina, poderia comprometer o remodelamento e consequentemente o desempenho após período de treinamento esportivo. Desta forma, os animais forma treinador por seis semanas com velocidades entre 60% e 70% da velocidade máxima alcançada no teste de esforço e através de qPCR real time, investigamos a expressão de algumas moléculas de adesão e fatores hipertróficos. Os resultados mostraram que o quadríceps dos animais que froam

treinados, apresentavam expressão gênica 4 vezes maior de *Pax3* (importante fator hipertrófico) quando comparados com animais não treinados e a administração de apocinina inibe esta elevação. Os genes que codificam a quimiocina *CXCL-1* e as moléculas de adesão *E-selectina*, *VCAM-1* e *PECAM-1* também estavam aumentadas após 6 semanas de treinamento. Estes resultados são importantes, pois podem sinalizar que o tecido muscular talvez fique mais eficiente para remodelar-se após um período de treinamento o que poderia ser facilmente explicado pelo aumento na carga de treinamento com o progresso do treinamento. Após o treinamento físico é possível que ocorra um “up regulation” de todo o sistema biológico o que levaria o tecido endotelial do músculo exercitado a responder mais eficientemente à mesma demanda e gerasse uma resolução da resposta inflamatória mais rápida e eficiente, possibilitando a aplicação de outra carga de treinamento após um período menor de recuperação.

Nossos resultados mostram que o exercício físico aumenta a produção de ROS do sistema no tecido muscular, este ROS possivelmente produzido pela NADPH oxidase induz aumento na interação leucócito-endotélio e coordena o recrutamento de neutrófilos para o tecido muscular exercitado. Desta maneira a NADPH oxidase é uma enzima interessante para se entender processos adaptativos no tecido muscular esquelético. A expressão de *Pax7*, que é um importante fator hipertrófico produzido por células satélites, apresentou aumento mostrando que exercício físico até a fadiga induz ativação de células satélites, talvez com o objetivo de induzir o remodelamento tecidual.

Sumarizando, nossos resultados mostram que, o protocolo de exercício físico até a fadiga representa um desafio fisiológico ao organismo do camundongo. Este evento altera o metabolismo quebrando a homeostase imediatamente após a realização do exercício físico. Inúmeras alterações ocorrem em resposta a esta sessão de exercício físico tais como: aumento nas concentrações de lactato, no consumo de oxigênio, redução da glicose circulante e extravasamento de CK para a corrente sanguínea. Além disso, ocorre aumento no número de células do sangue e este aumento permanece por algumas horas. Concomitantemente a este aumento de células no sangue, ocorre o recrutamento destas células para o

músculo exercitado (quadríceps) com possível transmigração de algumas destas células para o interstício muscular. Esta resposta é dependente de ROS produzido pela NADPH oxidase e o bloqueio desta enzima pode inibir este recrutamento. Nossa expectativa é de investigar o papel do neutrófilo transmigrando no tecido muscular, para entender se ele é relevante para o processo de remodelamento do tecido muscular esquelético induzido pela prática crônica do exercício físico.

Com base nos resultados do nosso trabalho e na leitura de trabalhos científicos recentemente publicados, elaboramos um esquema que pode representar a associação existente entre o exercício físico progressivo até a fadiga, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase e o processo inflamatório no tecido muscular como demonstrado na figura 22 e descrito abaixo:

(1) O exercício físico quando realizado em carga de trabalho adequada (alta intensidade e duração suficiente) gera alteração da homeostase, elevando o metabolismo, consequentemente produzindo uma quantidade maior de espécies reativas de oxigênio (ROS), tanto por vias ativadas diretamente para a produção de energia (cadeia transportadora de elétrons) como em vias indiretas (NADPH oxidase).

(2) Agudamente este aumento na produção de ROS ativa vias de sinalização intracelular que culminam no aumento de moléculas de adesão na superfície do endotélio vascular e dos leucócitos.

(3) O aumento da quantidade de moléculas de adesão possibilita maior interação leucócito-endotélio, representado pelo aumentado no número de células em processo de rolamento ou aderidas às vênulas pós capilares. Na presença de lesão tecidual estas células podem então transmigrar para o interstício muscular em direção à lesão existente.

(4) Acreditamos que estes eventos agudos de aumento na produção de ROS que resultam em um processo inflamatório local no tecido muscular esquelético pode contribuir para um possível remodelamento deste tecido, gerando um “up regulation” do sistema que prepara o tecido muscular para cargas de trabalho cada vez maiores.

(5) Nossos resultados mostram também que a inibição ou deleção da NADPH oxidase que bloquea a produção de ROS poderia consequentemente inibir a resposta adaptativa à prática crônica (treinamento) do exercício físico.

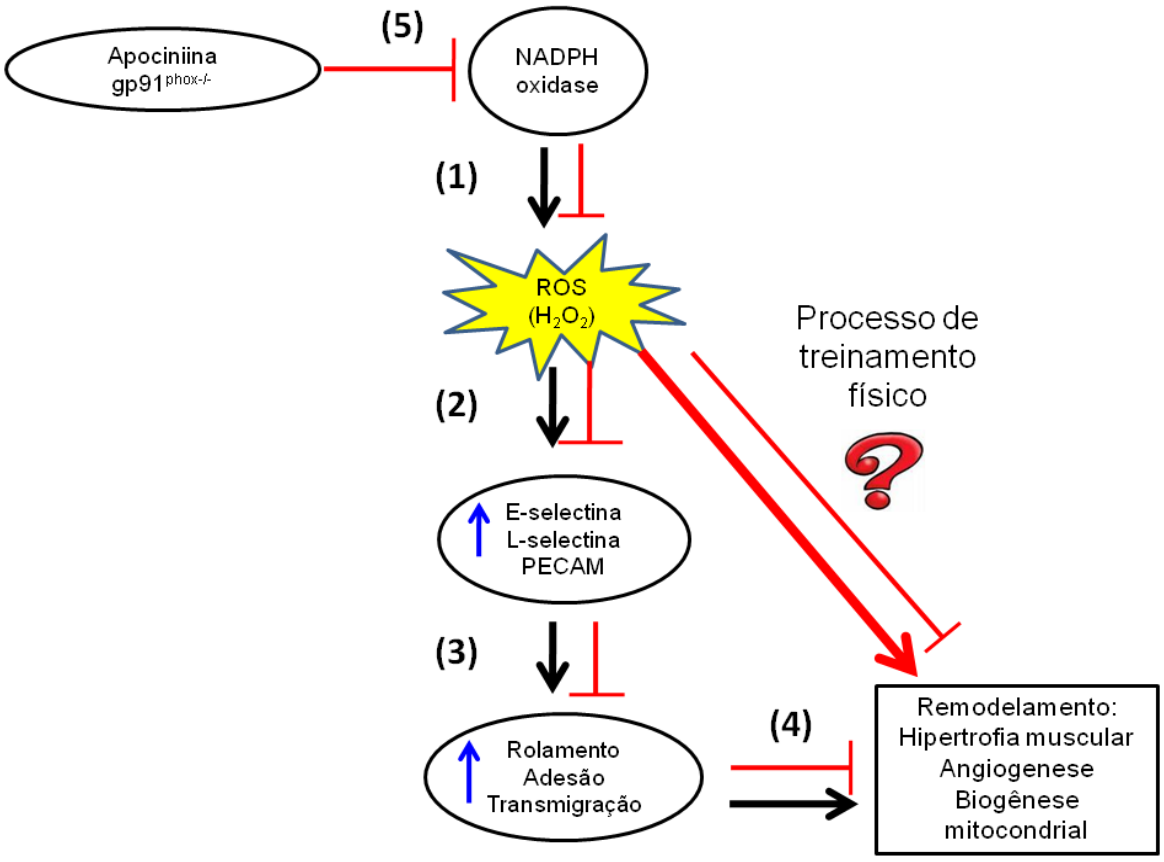


Figura 22: O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga aumenta a produção de ROS, a expressão de moléculas de adesão e o recrutamento de leucócitos. Este esquema

mostra a possível interação entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados na NADPH oxidase, estimulando o aumento na expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e nas vênulas pós-capilares adjacentes ao dano tecidual induzido pelo exercício físico o que eleva o recrutamento (rolamento, adesão e transmigração) de leucócitos em locais próximos ao dano tecidual. Este processo inflamatório possivelmente é relevante para induzir respostas adaptativas no tecido muscular exercitado, tais como hipertrofia muscular, angiogenese e biogênese mitocondrial.

Nossa expectativa futura é de investigar o papel do neutrófilo infiltrado no tecido muscular, para entender se ele é relevante para o processo de remodelamento do tecido muscular esquelético induzido pela prática crônica do exercício físico.

8 – CONCLUSÃO

O protocolo de exercício físico progressivo até a fadiga aumentou o número de leucócitos (provavelmente neutrófilos) rolando, aderidas e em processo de transmigração no endotélio vascular do tecido muscular (quadríceps) e o ROS produzido pela NADPH oxidase parece ser relevante neste processo.

9 – RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS

Este foi o primeiro estudo que utilizou microscopia intravital para mostrar a interação entre leucócitos e o vaso após a aplicação de um protocolo de exercício físico até a fadiga. Utilizando estratégias farmacológicas e camundongos mutantes, nós também identificamos que as espécies reativas de oxigênio (ROS) possuem papel de sinalização importante neste cenário.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a produção de ROS induzida pelo exercício físico aumenta a interação leucócito-endotélio, que coordena a infiltração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético exercitado. Desta forma, a modulação de produção de ROS via NADPH oxidase talvez seja uma estratégia terapêutica interessante para a modulação da magnitude do processo inflamatório induzido pelo exercício físico.

10 – DIREÇÕES FUTURAS

Como os resultados adquiridos com o projeto de doutorado levantaram inúmeras questões que se forem respondidas contribuirão sobremaneira para o entendimento da relação processo inflamatório e respostas adaptativas no tecido muscular. Desta maneira, a intenção agora é no pós-doutorado, estudar as respostas adaptativas (remodelamento tecidual) em animais treinados, na ausência e na presença de processo inflamatório.

11 – SUPORTE FINANCEIRO

Agradecimento às agências que patrocinaram este projeto: CAPES, FAPEMIG e CNPq.

11 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALESSIO, H.M. (1993). Exercise-induce oxidative stress. *Med Sci. Sports Exerc.* 25: 218-224.

BABIOR, B.M. (1999). NADPH Oxidase: An Update. *Blood*, Vol. 93, Nº 5 (March 1); pp 1464-1476.

BARBIERI, E. and SESTILI, P. (2012). Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct.* 1-17.

BLAIR, S.N.; KOHL, H.W.; BARLOW, C.E.; PAFFENBARGER, R.S.; GIBBONS, L.W. and MACERA, C.A. (1995). Changes in physical fitness and all-cause mortality. *Journal of American Medical Association*. 273; 1093-1098.

BUTTERFIELD, T.A., BEST, T.M. and MERRICK, M.A. (2006). The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. *Journal of Athletic Training.* 41(4):457–465.

CAI, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.*68(1):26-36.

CHEN, G.Y. and NUNEZ, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.*10(12):826-37.

CHEUNG, K., HUME, P. and MAXWELL, L. (2003). Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. *Sports Med.*33(2):145-64.

CLOSE, G.L., ASHTON, T., CABLE, T., DORAN, D. and MACLAREN, P.M. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayde onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur. J Appl. Physiol* n. 91: 6l5-621, Liverpool, U.K. Dec.

COOK-MILLS, J.M., MARCHESE, M.E. and ABDALA-VALENCIA, H. (2011). Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants and redox signaling*. Vol. 15.

COOPER, C.E., VOLLAARD, N.B.J., CHOUERI, T and WILSON, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc.* Trans. 30:280-285.

COOPER, D.M., RAMDOM-AIZIK, S., SCHWINDT, C. and JR, F.Z. (2007). Dangerous exercise, lessons learned from deregulated inflammatory responses to physical activity. *J. Appl. Physiol* 103. 700-709.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A. and PACKER, L. (1982). Free radical and tissue damage produced by exercise. Biochemical and

biophysical research communications. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol. 107; n° 4; pp 1198-1205.

BASSETT, D. R.JR. and HOWLEY, E.T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.,* Vol. 32, No. 1, pp. 70–84.

DRÖGE, W. (2002). Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*.vol. 82;47-95.

EL-BENNA J., DANG, P. M. C. , GOUGEROT-POCIDALO, M. A. and ELBIM, C. (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses*; Arch Immunol Ther Exp*, n. 53, 199–206.

FEBBRAIO, M.A; and PEDERSEN, B.K. (2007). Contraction-induced myokines production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc. Sport Sci Rev*. 33:114-9.

FERREIRA, J.C.B; ROLIM, N.P.L.; BATHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E. and BRUM, P.C. (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 34, n. 8, p. 760- 765.

FERREIRA, J.C., BACURAU, A.V., BUENO, C.R.J., CUNHA, T.C., TANAKA, L.Y., JARDIM M.A., RAMIRES, P.R. and BRUM, P.C. (2010). Aerobic exercise training improves Ca^{2+} handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 235(4):497-505.

FREY, R.S., USHIO–FUKAI, M. and MALIK, A.B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 11. number 4.

GOMES, E.C., NUNES-SILVA, A. and OLIVEIRA, M.R. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 12. 12 pages.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. (2007). Free radical in biology and medicine. 2º ed. Oxford, University Press.

HICKEY, M.J. and KUBES, P. (2009). Intravascular immunity: the host–pathogen encounter in blood vessels. *Nature*. 365. Vol. 9

INOGUCHI, T.; SONTA, T.; TSUBOUCHI, H.; ETOH, T.; KAKIMOTO, M.; SONODA, N.; SATO, N.; SEKIGUCHI, N.; KOBAYASHI, K.; SUMIMOTO, H.; UTSUMI, H.; and NAWATA, H. (2003). Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. *J Am Soc Nephrol* n. 14.

JIANG, F., ZHANG, Y. and DUSTING, G.J. (2011). NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* 63(1):218-42.

JI, L.L. (1993). Antioxidant enzime response to exercise and aging. *Medicine and Science in Sports and Execise.* Vol. 25; n° 2; pp; 225-231.

KAKANIS, M.W.; PEAKE, J; BRENU, E.W.; SIMMONDS, M. GRAY, B; HOOPER, S.L. and MARSHALL-GRADISNIK, S.M. (2009). The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exercise Immunology Review*.

KOLACZKOWSKA, K and KUBES, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology.* Vol. 13.

KUBES, P. and KERFOOT, S.M. (2001). Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci.*16(76-80)

LARRABEE, R. C. (1902). *J. Med. Res*. 2, 76–82.

LEE, I., SHIROMA, E.J., LOBELO, F., PUSKA, P., BLAIR, S.N. and KATZMARZYK, PT. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*. 380: 219–29.

KUBES, P. and MEHAL, W.Z. (2012). Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology.* 143:1158–1172.

LEE, J.; GOLDFARB, A.H.; RESCINO, M.H.; HEGDE, S. PATRICK, S. and APPERSON, K. (2002). Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayde onset of muscle soreness. *Medicine and Science in Sports & Exercise.* Vol. 34; n° 3; pp 443-448, Greensboro, NC. July.

LEE, I. and YANG, C.M. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology* 84. 581–590.

LEHNINGER, D. and Cox, M.M. (2006). *Princípios de bioquímica*. 4º edição. São Paulo: Editora Saviers.

LEY, K; LAUDANNA, C; CYBULSKY, M.I. and NOURSHARGH, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nature Reviews Immunology. Vol. 7. 678-689.

LOGAN, A. C. and WONG, C. (2001). Chronic Fatigue Syndrome: Oxidative Stress and Dietary Modifications. *Alternative Medicine Review*, Volume 6, N. 5, Toronto.

MARRIOTT, H.M, JACKSON, L.E., WILKINSON, T.S., SIMPSON, A.J., MITCHELL, T.J., BUTTLE, D.J., CROSS, S.S., INCE, P.G. HELLEWELL, P.G. WHYTE, M.K.B. and DOCKRELL, D.V. (2008). Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Medicine*. Vol. 177.

MARQUES, P.E., OLIVEIRA,A.G., AMARAL, S.S. NUNES-SILVA, A., ALMEIDA, A.F.S., REIS, A.C. BRAGA, A.D. PEREZ, D.A. *et al*. (2012). Intravital microscopy: Taking a close look inside the living organisms. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 6 (7), pp. 1603-1614, 23 February.

MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I. and KATCH, V.L. (1998). Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 4ª ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*.

MEDZHITOV, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 454 (7203): 428-35.

MOORE, S.C.; PATEL, A.V.; MATTHEWS, C.E.; GONZALEZ, A.B. PARK, Y.; KATKI, H.A.; LINET, M.S. WEIDERPASS, E.; VISVANATHAN, K.; HELZLSOUER, K.J. THUN, M.; GAPSTUR, S.M. HARTGE, P. and LEE, I. (2012). Leisure Time Physical Activity of Moderate to Vigorous Intensity and Mortality: A Large Pooled Cohort Analysis. *Plos one*. Volume (9). Issue 11.

NIEMAN, D.C. and PEDERSEN, BK. (1999). Exercise and Immune Function - Recent Developments. *Sports Med.* Feb; 27 (2): 73-80

NIKOLAIDIS, M.G. and JAMURTAS, A.Z. (2009). Blood as a reactive oxygen species generator and redox status regulator during exercise. *Archives of biochemistry and biophysics*. 490; 77-84.

NIKOLAIDIS,M.G. KYPAROS, A. SPANOU, C. PASCHALIS, V. THEODOROU, A.A. and VRABAS, I.S. (2013). Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *The Journal of Experimental Biology* 215, 1615-1625.

PYNE, D.B and GLEESON, M. (1998). Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J Sports Med* 19: 138-194.

NOZAWA, H., CHIU, C. and HANAHAN, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *August* 15, vol. 103; no. 33; 12493–12498.

PATTWELL, D.M. McARDLE, A; MORGAN, J.E.; PATRIDGE, T.A. and JACKSON, M.J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Rad. Biol. Medic.* 37; 1064-72.

PEAKE, J., NOSAKA, K. and SUZUKI, K. (2006). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise Immunology Review.*

PEAKE, J.M.; SUZUKI, K. and COOMBES, J.S. (2007). The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 18, Issue 6 Pages 357-426.

PEDERSEN, B.K. and TOFT, A. D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br. J. Sports Med*. 34: 246-251.

PEDERSEN, B.K. and HOFFMAN-GOETZ, L. (2000). Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiological Reviews.* Vol. 80, No. 3.

PHILLIPSON, M; HEIT, B; COLARUSSO, P; LIU, L. BALLANTYNE, C.M. and KUBES, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The journal of experimental medicine*. Vol. 203, No. 12, November 27. 2569–2575.

POWERS, S.K. (2000). Fisiologia do exercício: Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3º edição. *Ed. Manole*; Barueri; SP.

POWERS, S.K. and JACKSON, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88(4):1243-76.

POWERS, S.K., TALBERT, E.E. and ADHIHETTY, P.J. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 589(Pt 9): 2129-38.

PROSKE, U. and ALLEN, T.J. (2005). Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 33; 98-104.

RAY, R. and SHAH, A. M. (2005). NADPH oxidase and endothelial cell function*, Clinical Science* 109, p. 217–226.

RIBEIRO, S.M.R. (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico, *Biociência Jornal*, v.21, n.3, p.113-149, Uberlândia, Brasil: Dez.

RIVERA-NIEVES, J. GORFU, G and LEY, K. (2008). Leukocyte Adhesion Molecules in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis. 14:1715–1735.*

Shaikh, P.Z. (2011). Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. International Journal of Pharmacy and Life Sciences. (2); 11.

SCHNEIDER, C. e OLIVEIRA, A. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte* – vol. 10, nº 4.

SCHNEIDER, B.S. and TIIDUS, P.M. (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med.* 37(10):837-56.

SCOTT, A.; KHAN, K.M.; COOK, J.L. and DURONIO, V. (2004) What is ‘‘inflammation’’? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med.* 38 : 248-249.

SHEN, H.; KREISEL, D. and GOLDSTEIN, D.R. (2013). Processes of Sterile Inflammation. *J Immunol* 2013; 191:2857-2863.

SIGNORINI, J.L. e SIGNORINI, S.L. (1993). Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. São Paulo. *Editora da Universidade de São Paulo*.

SMITH, C.; KRUGER, M.J.; SMITH; R.M. and MYBURGH, K.H. (2008). The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury Illuminating Complexities. *Sports Medicine*. 38 (11): 947-969

STESSMAN, J.; HAMMERMAN-ROZENBERG,; COHEN, R.A.; EIN-MOR, E.; M.A. and JACOBS, J. M. (2009). Physical Activity, Function, and Longevity Among the Very Old. *Arch Intern Med.* 169(16):1476-1483.

SUMMERS, C,; RANKIN, S.M.; CONDLIFFE, A.M. SINGH, N.; PETERS, A.M. and CHILVERS, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. Trends in Immunology 31; 318–324

TEMIZ, A.; BASKURT, O.K.; PERÇETIN, C; KANDEMIR, F.; and GÜRE, A. (2000). Leukocyte activation, oxidant stress and red blood cell properties after acute, exhausting exercise in rats. *Clinical Hermorheology and Microcirculation,* 22, p. 253-259, Balçova-Izmir, Turkey: April.

TIDBALL, J.G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(2):R345-53.

VOLLAARD, N.B.J. SHEARMAN, J.P. and COOPER, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Medicine*, v. 35, n. 12, p.1045-1062.

WALLACH, D.; KANG, T. and KOVALENKO, A. (2013). A.Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology.* Published online DOI:10.1038/nri3561.

WEBER, C.; FRAEMOHS, L. and DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature Reviews. Immunology.* V. 7; June 2007.

WHITEHEAD, N.P., YEUNG, E.W., FROEHNER, S.C. and ALLEN, D.G. (2010) Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *Plos one*. Volume 5. Issue 12.

Anexo I – Protocolo do CETEA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 17412/2012,** relativo ao projeto intitulado "***Estudo do papel das espécies reativas de oxigênio (ros) na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico em camundongos***", que tem como responsável(is) **Vanessa Pinho da Silva** , está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** **(CETEA/UFMG),** tendo sido aprovado na reunião de **09/ 05/2012.**

Este certificado expira-se em **9/ 05/ 2017.**

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 17412/2012,** related to the project entitled "***Study of reactive oxygen species(ROS) role in exercise-induced inflammatory response in mice***", under the supervisiors of **Vanessa Pinho da Silva,** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** **(CETEA/UFMG),** and was approved in **May 9, 2012.**

This certificate expires in **May 9, 2017.**

Belo Horizonte, 11 de Maio de 2012.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo II – Resposta da revista PLOS ONE

PONE-D-13-43381
Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study.
PLOS ONE

Dear Dr. Vanessa Pinho,
Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE. This is an impressive study examining effects of exercise on neutrophil infiltration in skeletal muscle, and the mechanisms underlying this infiltration. The results represent a significant advance in our understanding. However, there are many errors and typos in this manuscript. In addition, introduction and methods for animal study need to be more clarified. Additional experiments are required to increase the quality of this paper.

We feel that it has merit, but is not suitable for publication as it currently stands. Therefore, my decision is "Major Revision." We invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses the points raised by the reviewers shown below. We encourage you to submit your revision within forty-five days of the date of this decision.

When your files are ready, please submit your revision by logging on to http://pone.edmgr.com/ and following the Submissions Needing Revision link. Do not submit a revised manuscript as a new submission. Before uploading, you should proofread your manuscript very closely for mistakes and grammatical errors. Should your manuscript be accepted for publication, you may not have another chance to make corrections as we do not offer pre-publication proofs.
If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter.
Please also include a rebuttal letter that responds to each point brought up by the academic editor and reviewer(s). This letter should be uploaded as a Response to Reviewers file.
In addition, please provide a marked-up copy of the changes made from the previous article file as a Manuscript with Tracked Changes file. This can be done using 'track changes' in programs such as MS Word and/or highlighting any changes in the new document.
If you choose not to submit a revision, please notify us.

Yours sincerely,

Masuko Ushio-Fukai
Academic Editor
PLOS ONE

Anexo III – Artigo submetido à revista PLOS ONE.

Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study.

Authors: **Albená Nunes-Silva[1]**, Priscila T. T. Bernardes[1], Bárbara M. Rezende[1], Fernando Lopes[1], Elisa C. Gomes[4], Pedro E. Marques[2], Paulo M. A. Lima[3], Cândido C. Coimbra[4], Gustavo B. Menezes[2], Mauro M. Teixeira[4] and Vanessa Pinho[1*]

1 Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, **2** Laboratório de Imunobiofotônica, Departamento de Morfologia, **3** Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Departamento de Fisiologia e Biofísica, **4** Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*** Corresponding author: Vanessa Pinho da Silva**
e-mail: vpinho@icb.ufmg.br
Address: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Morfologia – Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil.

ABSTRACT

Intense exercise is a physiological stress capable of inducing the interaction of neutrophils with muscle endothelial cells and their transmigration into tissue. Mechanisms driving this physiological inflammatory response are not known. Here we investigate whether production of reactive oxygen species is relevant for neutrophil interaction with endothelial cells and recruitment into muscle in mice subjected to treadmill exercise to fatigue. Mice exercised until fatigue by running for 56.3 ± 6.8 min on an electric treadmill. Skeletal muscle was evaluated by intravital microscopy at different time points after exercise and then removed to assess local oxidative stress and histopathological analysis. We observed an increase in plasma lactate and creatine kinase (CK) concentrations after exercise. The numbers of monocytes, neutrophils, and lymphocytes in blood increased at 12 h and 24 h after exercise. By intravital microscopy, number of rolling and adherent leukocytes increased 3, 6, 12, and 24 hours post-exercise. Using LysM-eGFP mice and confocal intravital microscopy technology, we show that the number of transmigrating neutrophils increased 12 h post-exercise. Mutant $gp91^{phox-/-}$ (non-functional NADPH oxidase) mice and mice treated with apocynin showed diminished neutrophil recruitment. SOD treatment promoted further adhesion and transmigration of leukocytes 12 h after exercise. These findings confirm our hypothesis that treadmill exercise increases the recruitment of leukocytes to the postcapillary venules and NADPH oxidase-induced ROS play an important role in this process.

INTRODUCTION

Intense, unaccustomed, and eccentric exercise is associated with reactive skeletal muscle inflammatory response (1-2). These types of physical activity result in disruptions in the cytoskeleton and plasma membrane, which may occur because of the increased mechanical load (2). This type of muscle damage is also associated with an increase in circulating muscle proteins, such as creatine kinase and myoglobin, and a decrease in motor control (3). Structural abnormalities in the muscle that are also associated with this type of damage include sarcolemmal disruption, distortion of the myofibrillar component, Z- line streaming, fragmentation of the sarcoplasmic reticulum, lesions in the plasma membrane, changes in the extracellular myofiber matrix, and swollen mitochondria (4, 5).

There is a growing body of evidence that damaged and dead cells trigger a potent inflammatory response by releasing necrosis-derived products, including genomic and mitochondrial DNA, formyl-peptides, F-actin and others (6). Once within the interstitium, these damage-associated molecular patterns (DAMPs) activate resident cells to release chemotactic mediators (6, 7), which may act on leukocytes and make them adhere to and transmigrate through the endothelial wall (8). In the context of infection, neutrophils may control pathogen proliferation and spread, but may also contribute to additional inflammation and cell damage. In the context of exercise, we hypothesize that controlling the muscular inflammatory response post-exercise may be useful to reduce tissue injury following extrenuous exercises.

During intense or repeated skeletal muscle contractile activity, reactive oxygen species (ROS) may be generated through different mechanisms, including nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase), electron

transport chains (ETC), and xanthine oxidase (XO) (9). Inflammation is an adaptive response that is triggered by noxious stimuli, such as infection and tissue injury, and alters the cellular oxidative-antioxidant homeostasis, which can result in neutrophils infiltrating the muscles to activate the respiratory burst and secrete cytokines (10). During and after exercise, skeletal muscle injury can occur, which results in the release of inflammatory cytokines that can bind to membrane receptors and activate specific ROS-generating enzymes, such as cyclooxygenase-2 (COX2), NADPH oxidase, and XO (11). Transient oxidative stress is necessary for proper anti-septic function and the activation of various signal transduction pathways in inflamed muscle cells, but prolonged severe oxidative stress may alter the intracellular antioxidant homeostasis and long-term muscle integrity (11). The precise role ROS play during the inflammatory response that occurs during and after exercise is unknown. In this study, we investigated the role that reactive oxygen species (ROS) play during the leukocyte recruitment that occurs after treadmill exercise fatigue in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male wild-type C57Bl/6 mice, LysM-eGFP (mice carrying a knock-in mutation for enhanced green fluorescent protein-eGFP-in the lysozyme M locus) mice and gp91phox-deficient mice (non-functional NADPH oxidase) weighing 25-30 g were housed in groups of 5 mice per cage at room temperature (25°C) with water and food *ad libitum* and kept on a 12 h light–12 h dark cycle. The animal care and

handling procedures were in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, and the study received prior approval from the local animal ethics committee (CETEA, Certificate number 17412/12).

Exercise protocols

An electric treadmill instrument (EP - 132 - INSIGHT) was used for the exercise fatigue protocol. The initial speed was set at 5 meters per minute (m/min) for 30 minutes to familiarize the mice with the apparatus and task. The speed was then increased 1 m/min every 3 min, at a 5% grade, until the animal stopped running and was fatigued - judged by the refusal of the mouse to continue moving on the treadmill belt. A mild electrical stimulus (0.5 mA) was applied to mice that stepped off the treadmill to keep them exercising (12).

Oxygen consumption (VO_2)

On the day of the oxygen consumption (VO_2) experiment, the animals were allowed to rest for 1 h in the rodent treadmill chamber before the test. Exercise was performed on a motor driven treadmill (Treadmill Control HARVARD apparatus model LE8710) between 12:00 and 16:00 h at a room temperature of 22 ± 2ºC. Fatigue was defined as the point at which the animals were no longer able to keep pace with the treadmill. Oxygen consumption (VO2) was measured by an open-flow indirect calorimeter (LE 404 Gas Analyzer HARVARD Apparatus) calibrated before each use with a certified mixture of gases (20.5% O2 and 0.5% CO2). VO2 (mlO_2/ kg/min) was continuously recorded on-line, every minute at rest and during exercise until fatigue (exercise protocol) and then analysed using a computerized system (Metabolism V 2.2.01) (13).

Lactate and glucose analysis

The lactate and glucose concentration in blood was analyzed before and immediately after the exercise fatigue protocol, the protocol at 60% intensity and the protocol at 60% duration, using a lactimeter Accutrend Plus Roche (14).

Creatine Kinase (CK-NAC)

To determine the level of creatine kinase (CK-NAC) a kit from BIOMEDIC and a Shimadzu (UV-160A UV) spectrophotometer were used.

Total and differential cell count

Twenty microliters (µL) of blood were collected from the brachial plexus. The blood was diluted in Turk's solution, and total cell counts were performed in a modified Neubawer chamber. A blood smear was prepared and stained with Giemsa and May-Grumwald stains. The percentages of lymphocyte, monocytes, and neutrophils were determined by counting at least 300 cells and using standard morphological criteria.

Reduced glutathione (GSH)

Reduced glutathione (GSH) levels were measured using the method which quantifies the formation of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)- sulfidryl groups using a colorimetric assay. A sample of skeletal muscle tissue (100 mg) was homogenized in 900 µL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), and the supernatant was added to 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) to create the reaction mixture. The absorbance was measured at 412 nm in a microplate reader using GSH as an external standard (15).

Intravital microscopy

Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection, and the quadriceps muscles were exposed to visualize the vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37°C using a heating pad, and the exposed muscle was continuously superfused with PBS buffer. Leukocytes, fluorescently labeled by the intravenous administration of Rhodamine 6G-Sigma (0.5 mg/kg body weight), were observed using a microscope (Nikon, ECLIPSE 50i, 20x objective lens) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). The numbers of rolling and adherent leukocytes were determined offline during the video playback analyses. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for at least 30s. Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity slower than that of the erythrocytes within a given vessel. To obtain the transmigration score, Lysm-eGFP mice were anesthetized by intraperitoneal injection. The quadriceps muscle was exposed, and the vasculature was stained by PE-coupled anti-PECAM-1 antibody (10 µL diluted in 90 µL of saline solution). The neutrophil-endothelium interactions from muscle vessel were recorded for twenty minutes using a confocal microscope (Olympus *UPRIGHT* - 488). The number of transmigrating neutrophils was determined offline during the video playback analyses. Briefly, the video recording was paused at 1-min time intervals, and the numbers of neutrophils inside and outside of the postcapillary venules were counted (16).

Histology

A set of experiments was conducted to quantify the histopathological parameters in the quadriceps muscle. The skeletal muscle tissue was removed and fixed in buffered formaldehyde (10% in PBS) for 24 h and routinely processed for paraffin embedding. Sections (5-µm thick) were obtained and stained with H & E. The images were captured using a microscope at a resolution of 720 x 480 pixels (Cool SNAP-Procf Color, Media Cybernetics, Bethesda, MD) and evaluated using the program Image ProExpress version 4.0 for Windows (Media Cybernetics). The histopathological scores were determined according to criteria that have been previously established.

Real time - PCR

Expression of molecules of adhesion were quantified by Real-Time PCR as described previously (17). Briefly, skeletal muscle tissue (quadriceps) was removed for analysis of transcript levels of E-selectina, L-selectina and PECAM. Total RNA was obtained using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the procedure supplied by the manufacturer. Total RNA was reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) as described by the manufacturer. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed in an ABI PRISM 7500 Fast detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with specific primer pairs (Table1). The relative expression level of genes was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and data were normalized by 18S ribosome subunit expression levels. All reactions were replicated.

Drug administration

In this study, 10 mg/kg of apocynin, a well-established NADPH oxidase inhibitor, and 3 mg/kg of superoxide dismutase (SOD) were administered 30 minutes before exercise protocol by intraperitoneal (i.p.) injection, to investigate the role ROS to neutrophil recruitment into quadriceps muscle.

Statistical analyses

All of the results are presented as the mean ± SEM. Normalized data were analyzed by one-way analysis of variance and differences between groups were assessed using the Student-Newman-Keuls post-test. *P* values less than 0.05 were considered significant. The results are expressed as the means ± S.E.M (*N*=4–8).

RESULTS

Exercise until fatigue induced muscle injury and alteration in number of circulating leukocytes.

During the exercise protocol the mice reached a maximum speed of 15.8 ± 3.7 m/min, which resulted in a total time of 56.3 ± 6.7 minutes and a total distance of 438.6 ± 68.4 meters. Exercise progressive protocol until fatigue induced a rapid increase in oxygen consumption (VO2) that indicates an enhancement of metabolic rate exercise-induced (Fig. 1A). The plasma lactate concentration, an important marker for exercise intensity, was analyzed before and immediately after exercise. The exercise protocol was able to increase the peripheral blood lactate

concentration (Fig. 1B). The serum CK level, a specific muscle injury marker, was also elevated at the 6 h and 12 h post-exercise (Fig. 1C) and the glucose level, that is a energetic substrate, was reduced on blood immediately after progressive fatigue exercise protocol (Fig. 1D). These results indicate that our exercise protocol has a high intensity level and induces skeletal muscle damage. Furthermore, this treadmill exercise protocol increased the number of leukocytes in the peripheral blood at 12 h and 24 h post-exercise (Fig. 2A) associated with an increase in the numbers of neutrophils and monocytes at the same time points (Fig. 2B and C). Interestingly, the number of lymphocytes was reduced at 6h post-exercise and then increased 12 and 24 hours after exercise (Fig. 2D).

Exercise until fatigue induced neutrophil accumulation in quadriceps muscle

To examine whether treadmill exercise interferes with leukocyte migration into muscle tissue, we performed intravital microscopy of the post-capillary venules in the quadriceps muscles of exercised animals until fatigue. Firstly, using epifluorescence intravital microscopy, we observed an increase in the number of rolling and adherent leukocytes from 3 to 24 hours after running (Fig.3A-B and Fig.4A-B and supporting video 1-2). Quadriceps muscle tissue sections were evaluated 12h after exercise. Quadriceps from exercised group display disruption of the fiber alignment and partial destruction of the muscle fibers associated with predominate neutrophil infiltration. Representative pictures are shown in Figure 3D-F. These results are consistent with intravital microscopy data. Then, using LysM-eGFP mice, we found that the predominant number of rolling and adherent leukocytes were neutrophils (data not shown). Furthermore, by confocal intravital

microscopy, we had shown an increase of transmigrating neutrophils into the parenchymal tissue muscle after exercise when compared with the control mice at rest (Fig.3C and Fig.4C-D and supporting video 3-4).

In order to evaluate if fatigue exercise protocol could increase adhesion molecule we investigate a gene expression of E-selectin, L-selectin and PECAM, once, this expression would be important to explain the increasing in the number of rolling, adherent and transmigrating neutrophil. The results of qPCR – Real Time technique show that the E-selectin (Fig. 4E) expression increases after 12 hours and apocynin does not change this status. L-selectin expression also increases after 12 hours time-point, but apocynin administration blocker this elevation (Fig. 4F), as well as the level of PECAM molecule (Fig. 4G). These results clearly show that exercise induces ROS production, increases the recruitment of leukocytes and contributes to the raise of adhesion molecule expression on skeletal muscle tissue. This process can be inhibited by presence of apocynin in L-selectina and PECAM molecules.

Reactive oxygen species (ROS) play a relevant role to leukocyte/endothelial cell interactions in muscle tissue after fatiguing exercise.

Once we established that neutrophil accumulation occurs in muscle tissue after fatiguing exercise, we determined the role reactive oxygen species (ROS) to leukocyte-endothelium interaction. First, we determined the GSH levels in mice after fatiguing exercise. At different time points there was a reduction in the amount of GSH which indicates that ROS increased post-exercise (Fig. 5A). Thus, we evaluated the role of endogenous ROS in neutrophil accumulation in muscle after

exercise. The mice were treated with a single dose of apocynin (an NADPH oxidase inhibitor) 30 minutes before fatigue protocol was initiated**.** In animals treated with apocynin there was fewer neutrophil rolling, adhesion and transmigration (Fig.5A-D). Moreover, the $gp91^{phox}$ deficiency also reduced the number of rolling (Fig. 5E) and adherent (Fig. 5F) leukocytes 12 hours after exercise. The administration of superoxide dismutase, the enzyme responsible for converting radical anion superoxide ($O\cdot^{-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2), increased the number of adherent cells (Fig. 6B) and transmigrating neutrophils at the same time-points (Fig. 6C). However, SOD treatment did not alter leukocyte rolling (Fig. 6A).

DISCUSSION

The results presented here can be summarized as follows. (1) this is the first study to show interaction of neutrophils with endothelial cells in skeletal muscle by intravital microscopy; (2) there is clear rolling, adhesion and subsequent transmigration of neutrophils; (3) there is production of ROS after exercise which correlates with neutrophil accumulation; (4) absence of gp91phox or pharmacological blockade of ROS production with apocynin prevented leukocyte/endothelial cell interactions suggesting that gp91phox is a major source of ROS in the system; (5) enhancement of the production of hydrogen peroxide by the administration of SOD enhanced neutrophil transmigration.

In the last decade, exercised-induced skeletal muscle damage has received special attention (1, 2, 4, 18, 19). It is characterized by ultra structural changes in muscle architecture, increase of muscle proteins in the bloodstream including creatine kinase (CK) and myoglobin (Mb), loss of muscular strength and range of movement and muscle pain (2-4). In our model, lactate and CK were increased. This increase was associated with loss of histological structure. In addition, exercise-induced muscle damage is associated with local inflammatory response involving leukocyte accumulation in damaged muscle tissue (3, 18, 19). In order to detect leukocytes accumulation into skeletal muscle tissue, different methods have been used including myeloperoxidase (MPO) biochemical assay, antibody staining procedure (immunohistochemistry or immunofluorescence) and white blood cell (WBC) radionuclide imaging (as reviewed in 18, 20). However, neutrophil migration into muscle tissue after fatiguing exercise has not been fully elucidated yet.

To expand our understanding in the mechanisms involved in the leukocyte recruitment post-exercise, we assessed leukocyte-endothelial interactions within the muscular microvasculature using intravital microscopy. This is the first paper that has used confocal intravital microscopy to show the interaction between leukocytes and endothelial vessel after exercise to fatigue. This result creates a new possibility to investigate the inflammatory process during exercise. We demonstrated that neutrophils precisely transmigrate to the muscle tissue following fatigue exercise. Therefore, these results clearly show that a physiological stimulus (exercise) induces inflammation in the muscle, concurring with the idea that inflammation is a physiological host response. However, if infiltrating neutrophils contribute to skeletal muscle damage or to skeletal muscle tissue repair remains

elusive. There is some evidence that neutrophils induce the production of pro-inflammatory molecule that may contribute to the remodeling and repair process by activating satellite cells and liberating angiogenic factors (21). Indeed, we have shown in preliminary studies that interaction leukocyte-endothelium also occurs in lower intensity when tissue injury is mild (Supplemental Figure 1). The relevance of this inflammatory infiltrate in the muscle is not known yet and clearly deserves further investigation. It has been suggested, however, that exercise-associated inflammation may be relevant for muscle remodeling and adaptation to the new load of exercise. We are currently investigating these possibilities in our model.

The present study also investigated the role reactive oxygen species (ROS) play in the neutrophil migration into muscle tissue resulting from treadmill exercise in mice. An interestingly finding was that vigorous exercise triggers a muscular ROS production, which may coordinate neutrophil influx to muscle. Then, using pharmacological strategy (apocynin) and mutant animal ($gp91^{phox-/-}$) we assessed the role of ROS in recruitment of leukocytes into the skeletal muscle tissue. Our results show that ROS from NADPH-oxidase play an important role in the leukocytes recruitment and blockage/deletion of NADPH-oxidase may inhibit rolling, adhesion and transmigration. We have not determined the source of ROS in this system but ROS may be produced by endothelial cells (22, 23), skeletal muscle cells (8, 24, 25) and leukocytes (26), once these cells express NADPH-oxidase with $gp91^{phox}$ subunit and regardless of source it is clearly produced by this subunit (27). The results also showed enhancement of the number in leukocytes adherent and transmigrating when superoxide dismutase (SOD) is used, confirming that probably oxygen peroxide (H_2O_2) is the ROS molecule involved.

Researchers have shown that H_2O_2 produced endogenously mediates upregulation of ICAM-1 and monocytes chemoattractant protein-1 (MCP-1) and are responsible for increased number of rolling and adherent leukocytes (28). There are some evidences that reactive oxygen species (ROS) can induce an “up regulation” in gene expression of molecule adhesion, as ICAM-1 and VCAM-1 in pulmonary disease models (29).

Here, for the first time, we show that exercise progressive until fatigue protocol can increase the expression of E-selectina, L-selectina and PECAM that could explain the raise in the number of rolling and adherent leukocytes 12 hours after exercise until fatigue. These results also show that apocynin administration that reduces ROS production by inhibiting NADPH oxidase can modulate this response. Thus, ROS may regulate cell recruitment to the exercised muscle via modulation of leukocyte adhesiveness to the vessel wall. One potential function of ROS may be to recruit cells to the exercised muscle and orchestrate the correct clearance of the damaged tissue and induce the proper adaptive response to exercise training. This production of ROS that contribute to the infiltration of neutrophil may have an important role in exercise remodeling process, as angiogenesis, hypertrophic response and mitochondrial biogenesis (30). In unpublished data, we could see that after 6 weeks of running training, skeletal muscle (quadriceps) presents over expression of E-selectin, L-selectin, PECAM. The training period also increase the expression of Pax3, that is an important hypertrophic factor produced by satellite cell and apocynin administration during the training period inhibited this response. Taken together, our data suggest that exercise-triggered ROS production enhance leukocyte-endothelium interaction, which coordinates neutrophil infiltration to the

exercised skeletal muscle. Thus, modulation of ROS production via NADPH oxidase may be a promising therapeutic approach to manage exercise-related muscle injuries.

Acknowledgments:

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Authorship:

ANS, PTTB, BMR, PEM – performed *in vivo* experiments (Intravital Microscopy)
ANS, PMAL, CCC – performed oxygen consumption experiments
ANS, FL – enzymatic assay and conceived hypothesis
ANS, ECG, GBM, MMT, VP – conceived hypothesis and analyzed data
All authors contributed to the writing of the paper

REFERENCES:

1. Tidball, JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 288(2):R345-353.

2. Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Hordern M, Nosaka K, Mackinnon L, Coombes JS (2005) Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. Med Sci Sports Exerc. 37(5):737-745.

3. Peake JM, Nosaka K, Suzuki K. (2006) Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. Exercise immunology review. Vol. 12.

4. Cheung K, Hume P, Maxwell L. (2003) Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. Sports Med.33(2):145-64.

5. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar FJ. (2007) Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. J Appl Physiol. 103(2):700-9.

6. Kubes P, and MEHAL WZ. (2012) Sterile Inflammation in the Liver. Gastroenterology. 143:1158–1172.

7. Chen GY, Nunez G. (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol.10(12):826-37.

8. Cook-Mills JM, Marchese ME, and Abdala-Valencia H. (2011) Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. Antioxidants and redox signaling. Vol. 15.

9. Powers SK, Talbert EE, Adhihetty PJ (2011) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. J Physiol.589 (Pt 9): 2129-38.

10. Medzhitov R, (2008) Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 454 (7203):428-35.

11. Powers SK, Jackson MJ. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev. 88(4):1243-76.

12. Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CRJ, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA, Ramires, PR, Brum PC. (2010) Aerobic exercise training improves Ca^{2+} handling and redox status of skeletal muscle in mice. Exp Biol Med Maywood).235(4):497-505.

13. Leite LHR, Lacerda ACR, Balthazar CH, Marubayashi U, Coimbra CC. (2007). Central AT1 receptor blockade increases metabolic cost during exercise reducing mechanical efficiency and running performance in rats. Neuropeptides 41; 189–194.

14. Billat VL, Sirvent P, Py G, Koralsztein JP, Mercier J. (2003) The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. Sports Med. 33(6):407-26.

15. Avila TV, Pereira ALB, Christoff AO, Soley BS, Telles JEQ, Eler GJ, Bracht A, Zampronio AR, Acco A. (2009) Hepatic effects of flunixin-meglumin in LPS-induced sepsis. Fund. & Clin. Pharmacology.

16. Marques PE, Oliveira AG, Amaral SS, Nunes-Silva A, Almeida AFS, Reis AC, Braga AD, Perez DA et al. (2012) Intravital microscopy: Taking a close look inside the living organisms. African Journal of Microbiology Research. Vol. 6 (7), pp. 1603-1614, 23 February.

17. Miura S, Kai Y, Kamei Y, Ezaki O. (2008) Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise. Endocrinology 149: 4527–4533.

18. Schneider BS, Tiidus PM (2007) Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? Sports Med. 37(10):837-56.

19. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, and Myburgh KH. (2008) The Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury Illuminating Complexities. Sports Medicine. 38 (11): 947-969

20. Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. (2006) The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. Journal of Athletic Training. 41(4):457–465.

21. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. (2006) Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. August 15, vol. 103; no. 33; 12493–12498.

22. Frey RS, Ushio–Fukai M, and Malik AB. (2009) NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. Antioxidants & Redox Signaling. Vol. 11. number 4.

23. Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res.68(1):26-36.

24. Whitehead NP, Yeung EW, Froehner SC, Allen, D.G. (2010) Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. Plos one. Volume 5. Issue 12.

25. Barbieri E, Sestili P. (2012) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. J Signal Transduct. vol. 2012;1-17.

26. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA and Elbim C. (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses; Arch Immunol Ther Exp, n. 53, 199–206.

27. Lee I, Yang CM. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. Biochemical Pharmacology 84. 581–590.

28. Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. (2011) NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. Pharmacol Rev. 63(1):218-42.

29. Marriott HM, Jackson LE, Wilkinson TS, Simpson AJ, Mitchell TJ, Buttle DJ, Cross SS, Ince PG, Hellewell PG, Whyte MKB and Dockrell DV. (2008) Reactive Oxygen Species Regulate Neutrophil Recruitment and Survival in Pneumococcal Pneumonia. American Journal of Respiratory and Critical Medicine. Vol. 177.

30. Gomes EC, Nunes-Silva, A. and Oliveira MR. (2012) Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Legends:

Figure 1. The fatiguing exercise protocol increased oxygen consumption, lactate and creatine kinase (CK) levels in the blood. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill that elevated the oxygen consumption (A). At different time-points after fatiguing exercise b**lood samples were collected for measurement of** lactate (B), creatine kinase (C) and glucose level (C). The results are presented as the mean ± SEM (n=5). *P<0.05 when compared with the control group.

Figure 2. The fatiguing exercise is associated with changed number of leukocytes in the peripheral blood. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill. At different time-points after the exercise protocol blood sample were collected and number of total cell (A) neutrophils (B), monocytes (C) and lymphocytes (D) were evaluated. The results are presented as the mean ± SEM (n=4-6). *P<0.05 when compared with the control group.

Figure 3. The fatiguing exercise is associated with neutrophil recruitment into quadriceps muscle. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill. At different time-points after the exercise protocol, mice were anesthetized and muscle postcapillary venules selected for counting number of rolling (A), adherent (B) and transmigrating (C) leukocytes using epifluorescence and confocal intravital microscopy, respectively. After intravital microscopy, quadriceps muscle samples were removed to histological analyses. Tissue section from control (D) and 12h after exercise (E-F) mice are shown for illustration. Neutrophil infiltration is shown by arrows and inflammatory foci consisting predominantly of neutrophils is shown by asterisk. Original scale bars 50 µm for all panels. The results are presented as the mean ± SEM (n=5). *P<0.05 when compared with the control group.

Figure 4. Leukocytes-endothelium interaction in quadriceps muscle after exercise and adhesion molecules expression. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill. Quadriceps muscle was exposed to visualize the vasculature 12h after exercise by intravital microscopy. Epifluorescence intravital microscopy images are shown in control (A) and exercised wild-type mice (B). Confocal intravital microscopy images are shown in control (C) and exercised LysM-eGFP mice (D). Using qPCR technique, the molecules expression was quantified: E-selectina (A), L-selectina (B) and PECAM (F) were evaluated 12h after exercise. The results are presented as the folder increase (n=4-6). *P<0.05 when compared with the control group.

Figure 5. The fatiguing exercise increases ROS production and NADPH oxidase is important to leukocyte recruitment process. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill. GSH levels were measured at different time-points after exercise protocol (A). Mice received an injection of apocynin (10 mg/kg, i.p.) 30 minutes before exercise and number of rolling (B),

adherent (C) and transmigrating (D) leukocytes was evaluated 6h and 12h after exercise. In another experimental setting, number of rolling (E) and adherent (F) leukocytes was evaluated 12h after exercise using mutant mice (gp91$^{phox-/-}$). The results are presented as the mean ± SEM (n=5). *P<0.05 when compared with the control and # when compared with exercised mice.

Figure 6. Superoxide Dismutase (SOD) exacerbates adhesion and transmigration of neutrophil. Fatigue was induced by spontaneous running in an electric treadmill. Superoxide dismutase (3mg/kg, i.p.) was injected 30 minutes before exercise. Using LysM-eGFP mice, number of rolling (A), adherent (B) and transmigrating (C) neutrophil was evaluated 12h after exercise. This results are confirmed by 3D images from exercised (D) and exercised + apocynin (E) mice. The results are presented as the mean ± SEM (n=4-6). *P<0.05 when compared with the control and # when compared with exercised mice.

FIGURE 1. EXERCISE INCREASED OXYGEN CONSUMPTION, LACTATE AND CK LEVELS.

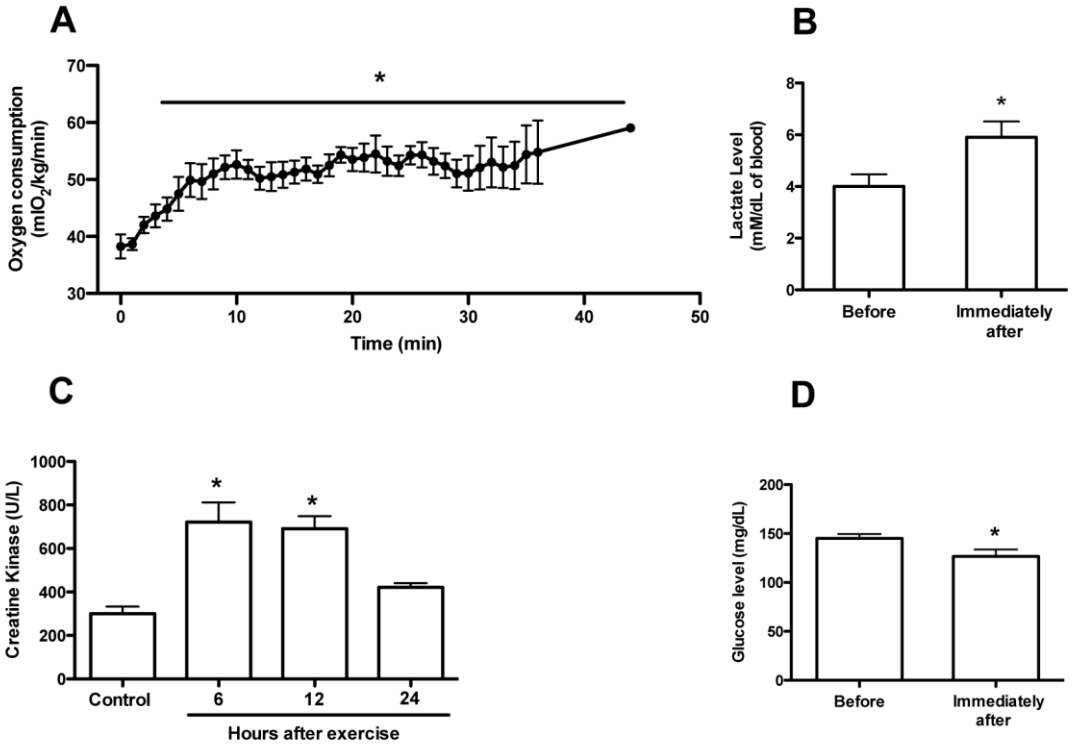


FIGURE 2. EXERCISE IS ASSOCIATED WITH CHANGED NUMBER OF LEUKOCYTES IN THE BLOOD.

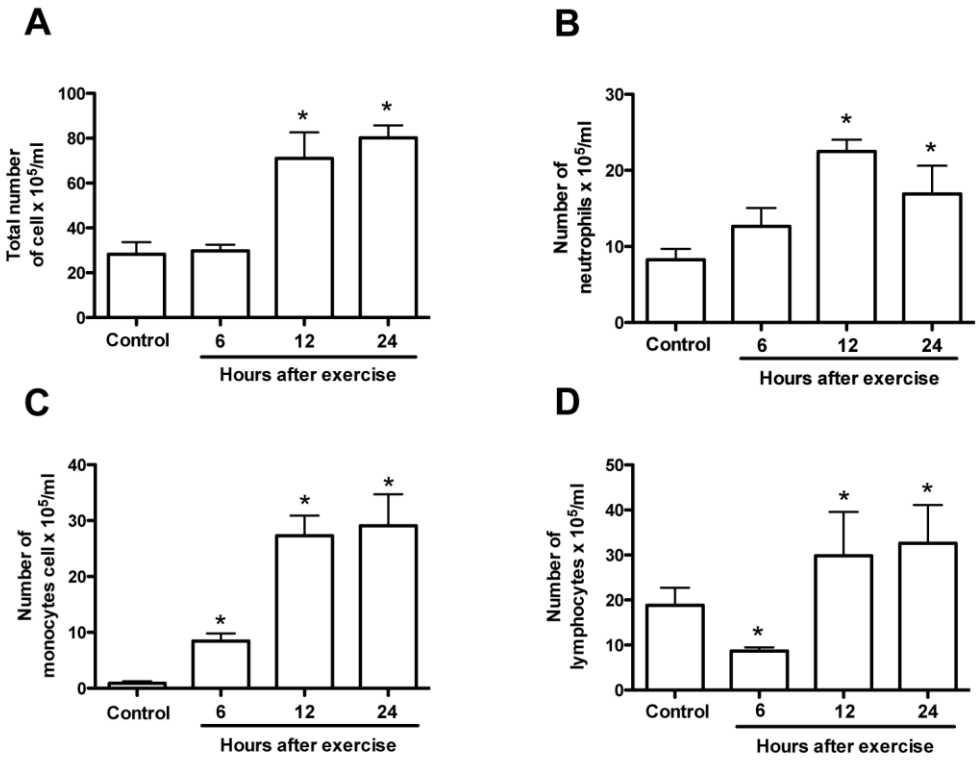


FIGURE 3. EXERCISE IS ASSOCIATED WITH NEUTROPHIL RECRUITMENT INTO QUADRICEPS MUSCLE.

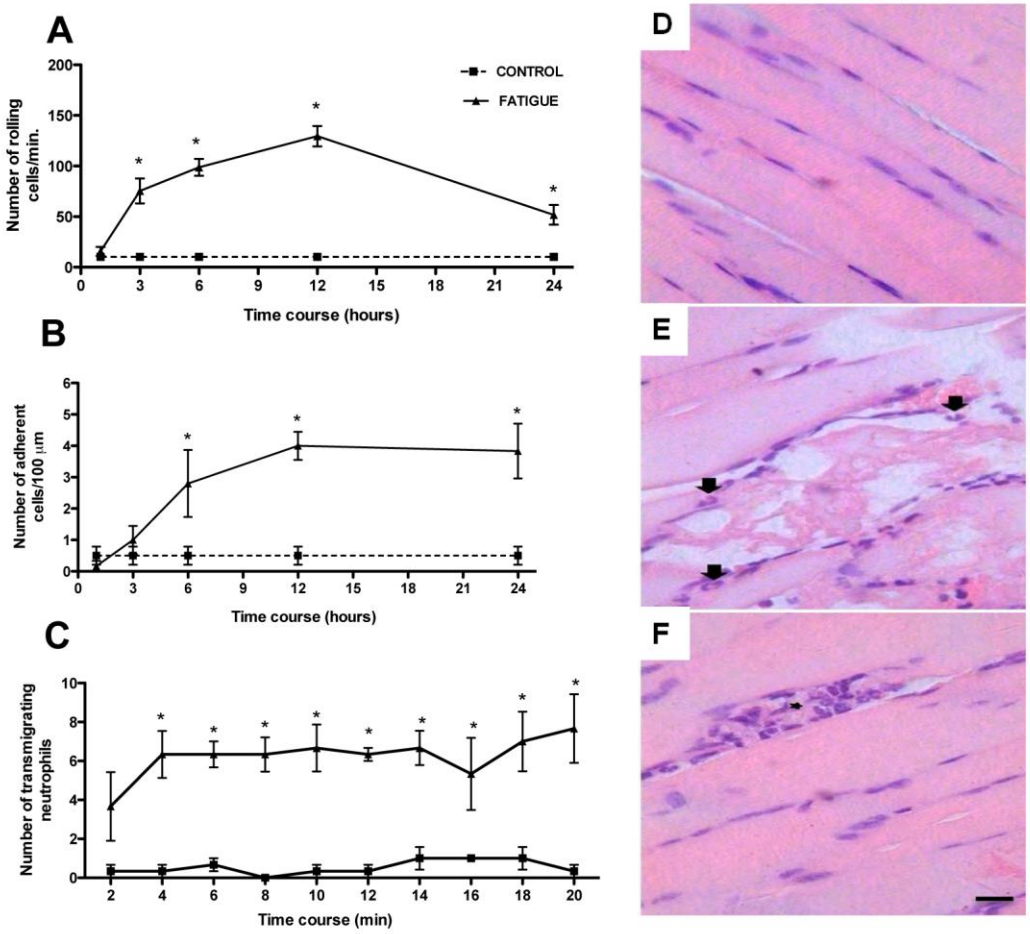


FIGURE 4. LEUKOCYTES-ENDOTHELIUM INTERACTION IN QUADRICEPS MUSCLE AFTER EXERCISE AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION.

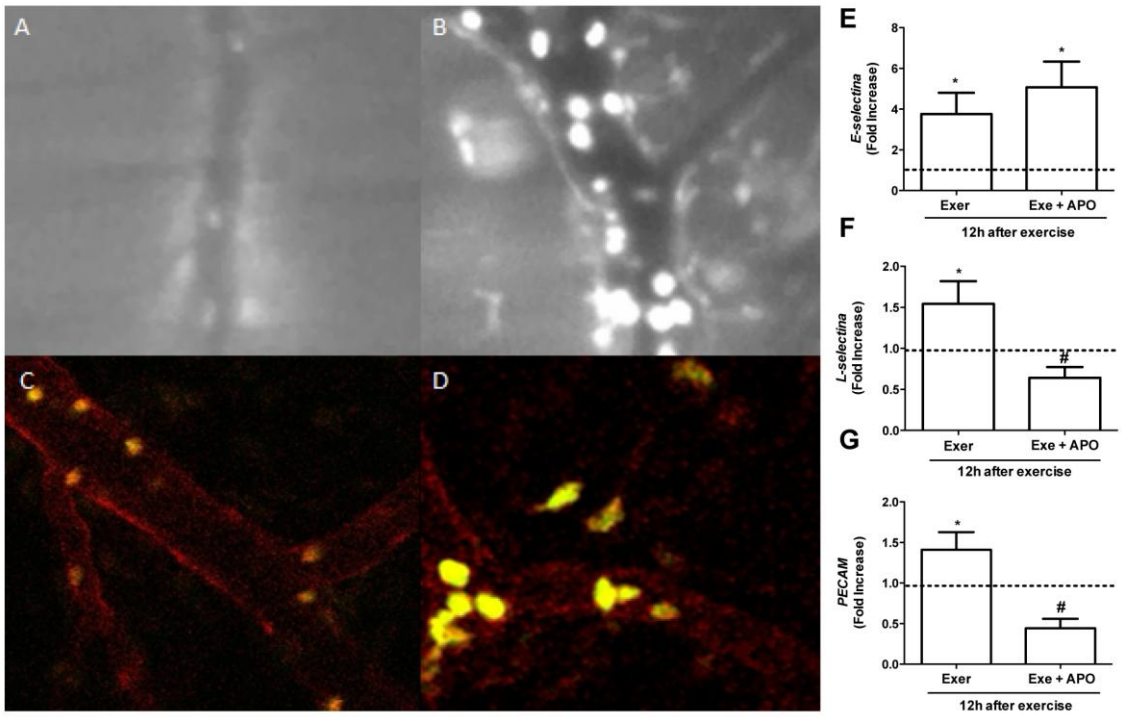


FIGURE 5. EXERCISE INCREASED ROS PRODUCTION AND NADPH OXIDASE IS IMPORTANT TO LEUKOCYTE RECRUITMENT PROCESS.

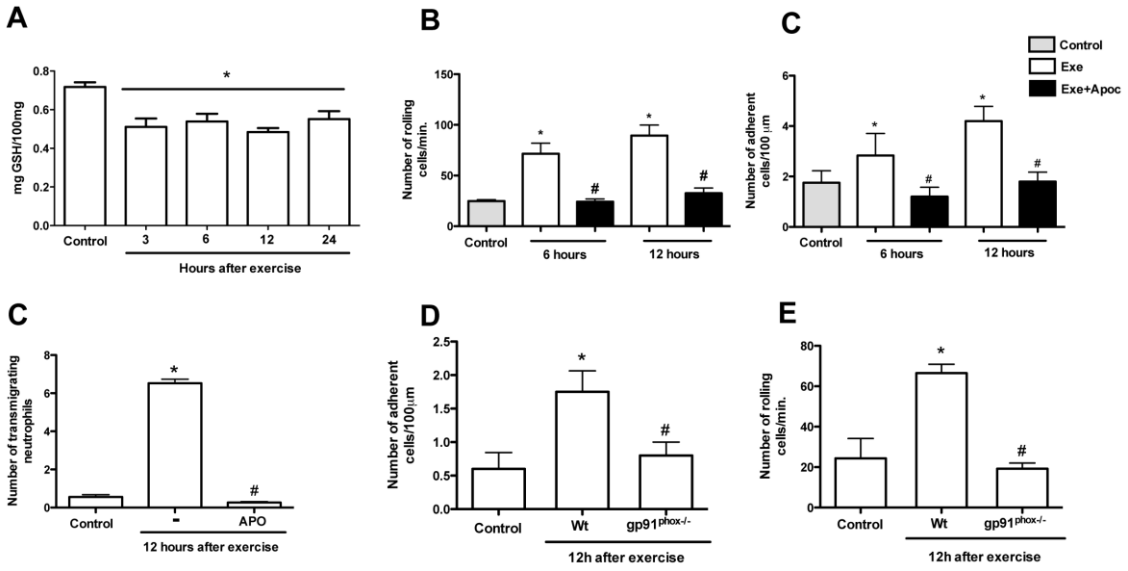
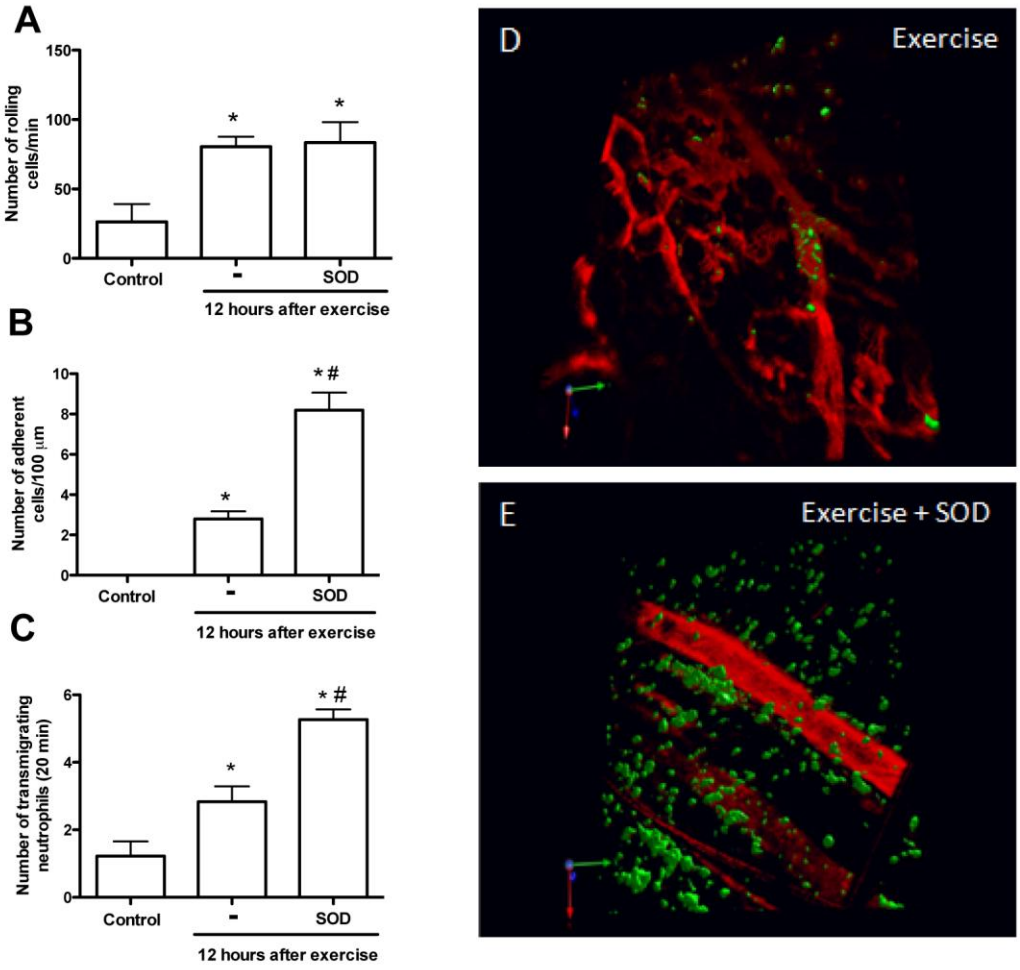
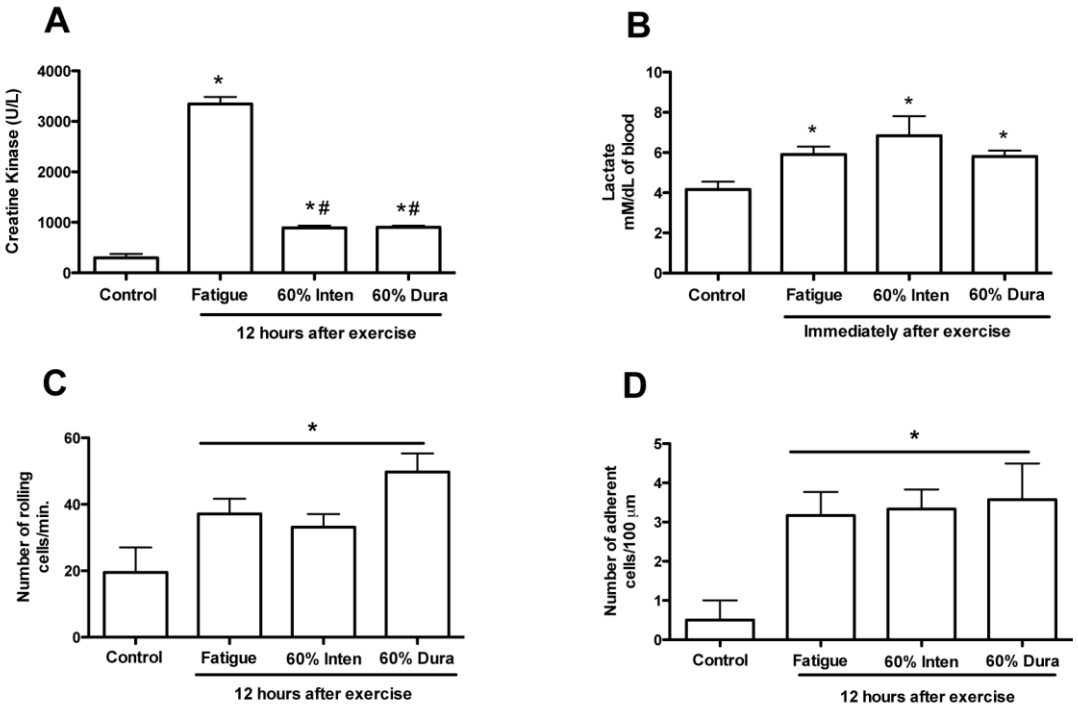


FIGURE 6. SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) EXACERBATED ADHESION AND TRANSMIGRATION OF NEUTROPHIL.



SUPPORTING FIGURE 1: LEUKOCYTES RECRUITMENT ALSO OCCURRED IN A LOWER LEVEL OF EXERCISE LOAD.