

Luiz Alexandre Medrado de Barcellos

**O treinamento físico altera a resposta inflamatória induzida pelo  
exercício físico agudo em camundongos: participação das  
espécies reativas de oxigênio (EROs).**

Instituto de Ciências Biológicas- Departamento de Morfologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2018

Luiz Alexandre Medrado de Barcellos

**O treinamento físico altera a resposta inflamatória induzida pelo exercício físico agudo em camundongos: participação das espécies reativas de oxigênio (EROs).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Pinho da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Albená Nunes Silva

Instituto de Ciências Biológicas- Departamento de Morfologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2018



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**

**LUIZ ALEXANDRE MEDRADO DE BARCELLOS**

201/2018  
entrada  
2º/2014  
2014770110

Às **quatorze horas** do dia **30 de novembro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**O TREINAMENTO FÍSICO ALTERA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO EXERCÍCIO AGUDO EM CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vanessa Pinho da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	APROVADO
Dr. Albená Nunes da Silva	CEDUFOP	APROVADO
Dr. Kelerson Mauro de Castro Pinto	Universidade Federal de Ouro Preto	APROVADO
Dr. Dr Washington Pires	Universidade federal de Juiz de Fora	APROVADO
Dra. Danusa Dias Soares	UFMG	APROVADO
Dra. Lucíola da Silva Barcelos	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: ARROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora **Belo Horizonte, 30 de novembro de 2018.**

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Pinho da Silva (Orientadora) Vanessa Pinho da Silva

Dr. Albená Nunes da Silva (Co-orientador) [Assinatura]

Dr. Kelerson Mauro de Castro Pinto Kelerson Mauro de Castro Pinto

Dr Washington Pires Washington Pires

Dr<sup>a</sup>. Danusa Dias Soares Danusa Dias Soares

Dr<sup>a</sup>. Lucíola da Silva Barcelos Lucíola da Silva Barcelos

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória do Departamento de Morfologia e no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram concedidos auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, ao meu pai (*in memoriam*),  
às minhas irmãs, ao meu irmão e à minha  
querida Juliana.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Rubens (*in memorian*) e Suzana Thereza, pelo esforço na criação e formação dos filhos durante todos os momentos. A você pai, minha especial lembrança, pois a saudade é permanente, eu sei que do seu jeito sempre torceu por mim e por todos os filhos, e nesse momento diria, parabéns meu filho e eu teria seu abraço! Muito obrigado mãe e pai!

À minha companheira Juliana (Bonita) por todo companheirismo e amizade, pela compreensão e apoio nos momentos difíceis, pelo incentivo constante, pela contribuição com sua capacidade de solucionar problemas. Tenho muita admiração por você e o que representa como professora da Universidade do Estado de Minas Gerais e como representante nacional na luta por uma educação pública e para todos. Muito obrigado por estar e querer estar sempre junto. Obrigado meu amor!

Aos meus queridos irmãos, Marta Luiza, Ana Paula, Helena, Maria Lúcia e Namur, pelo afeto, carinho, amizade e amor. Pela luta conjunta do dia a dia e por compartilharem todos os anseios, desejos e expectativas comigo.

Ao Namur e Érika, um agradecimento especial por me proporcionarem a alegria de ter mais uma sobrinha, a Alice, uma doçura!

Às queridas sobrinhas, Anna Luiza (agora mãe) e Bruna, pela preocupação e torcida para que tudo desse certo.

À Anna e ao Breno por também trazerem a felicidade com a chegada do Otto, meu sobrinho neto. Gostaria agora daquele “emoticons” de espanto, pois a vida passa ligeiro.

Ao Breno (Golira) por contribuir também com sua experiência no criostato e pela disponibilidade.

Aos meus sobrinhos João, Miguel e Pedro por serem crianças alegres e participativas, que me fazem sempre pensar e refletir sobre a vida.

À Débora e Sadao, pela amizade e por me presentear com um novo sobrinho e afilhado, o Jorginho, por quem tenho enorme carinho.

Aos meus cunhados Julian, Marcelo e Wagner por fazerem parte e compartilharem muitos momentos.

À professora Dra. Vanessa Pinho pela orientação nesta trajetória, por ter me dado a oportunidade de realizar o doutoramento no Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória (LARRI), por ter aceitado a ideia do exercício físico, mesmo não sendo uma linha de pesquisa amplamente explorada pelo grupo da inflamação.

Ao professor Dr. Mauro Martins Teixeira pela abertura do grande grupo IMUNOFAR e pelo seu envolvimento e contribuição indireta neste trabalho.

Ao professor Dr. Cândido Celso Coimbra pela colaboração fundamental e pelo acesso à estrutura do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB-UFMG.

Ao amigo e professor Dr. Albená Nunes Silva, quem me incentivou desde o começo e acima de tudo, acreditou na continuidade e concretização de um sonho, o de ver o avanço dos conhecimentos na área do exercício físico e suas implicações na resposta imune. Obrigado pela incansável dedicação à Educação Física.

Ao amigo William Gonçalves pelas contribuições e pela sua capacidade de me fazer enxergar o valor dos resultados deste projeto. Vê-lo muitas vezes empolgado com os resultados era sempre bom. Muito obrigado!

À amiga, professora Dra. Bárbara Maximino Rezende pela participação crucial nos diversos procedimentos desde o início desta trajetória, pela naturalidade em lidar com os experimentos. Você tem enorme valor na construção deste projeto.

Ao amigo Walyson Costa por sua vontade e disponibilidade para contribuir de qualquer forma, pela sua simplicidade e por transmitir uma tranquilidade que pacifica o ambiente.

À Rose, pela sua dedicação à organização do laboratório e pela sua naturalidade em sempre sorrir para os colegas, o que me fez sempre pensar que a leveza nas coisas sempre vale a pena.

Ao amigo Marcos, aluno de iniciação científica, pela sua dedicação voluntária, pelo seu envolvimento incondicional com os experimentos, pelo seu desejo de aprender e ajudar e pela sua preocupação em ser justo e correto nas suas atitudes. Valeu cara!

Às colegas do LARRI, Denise, Rayssa, Jéssica e Alesandra. Vocês certamente têm uma parcela de contribuição neste trabalho.

À colega Dra.Carolina, por ter contribuído com o experimento de quimiotaxia e pelas contribuições no aprendizado sobre sepse.

Ao amigo Dr. Frederico Sander Mansur Machado pela contribuição nos procedimentos de consumo de oxigênio e uso do criostato, pelas discussões e questionamentos providenciais que sempre levam à mudança de pensamento e pelas correções do artigo.

À professora Dra. Érika Jorge pelas contribuições na qualificação e ao longo deste projeto, além da abertura do laboratório e da vontade em contribuir.

À professora Lucíola da Silva Barcelos por também dar espaço e oportunidade de testar algumas técnicas, que apesar de não termos conseguido padronizar, foram importantes devido ao aprendizado.

Ao professor Dr. Flávio Almeida Amaral por disponibilizar a estrutura do O4/202 e pela dedicação à organização na geração de animais transgênicos e sua distribuição.

Ao professor Dr. Gustavo Batista de Menezes pela participação em dados momentos neste projeto e por sempre ter se colocado à disposição em vários momentos.

Ao professor Dr. André Oliveira pelas sugestões em experimentos e pela disponibilidade para contribuir.

Aos colegas do N3-140, que principalmente no início desta trajetória estiveram presentes e contribuíram de alguma forma.

Ao colega Dr. Celso Queiroz-Junior do Laboratório de Biologia Cardíaca do ICB- UFMG pela disponibilidade e serenidade na contribuição com as análises histológicas.

À técnica Simone, pela atenção sempre imediata às solicitações de uso da estrutura e equipamentos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB-UFMG.

Aos alunos de iniciação científica, Sofia, Débora e Wyni pelas vezes que me ajudaram com a troca de caixas dos camundongos.



Aos funcionários, Ilma, Hermes e Ilda pela dedicação e prontidão na organização do trabalho que influencia diretamente o andamento de diversas pesquisas.

Ao técnico Chico, por orientar nos cortes de amostras de músculo em bloco de parafina.

À Polyana aluna de pós-doc da professora Dra. Lucíola da Silva Barcelos por se disponibilizar nos testes de imunohistoquímica e de coloração por Prico-sirius.

Ao colega Rodrigo Machado, pela dedicação às imagens de imunofluorescência.

Aos funcionários do Biotério Central/ICB-UFMG pelo cuidado com os animais e pela organização quanto aos pedidos solicitados.

A todos os funcionários da secretaria da pós-graduação por compartilharem a nossa rotina, muitas vezes difíceis.

Ao povo brasileiro que luta por um ideal de Brasil mais justo, sem desigualdade, sem preconceitos e cumpre com o pagamento dos seus tributos e anseiam que eles sejam convertidos na garantia pública de direitos básicos, incluindo o acesso à educação de qualidade. Agradeço, por ter feito meu Doutorado com recursos públicos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram pra que este trabalho fosse realizado.

*“...Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia...”*

*João Guimarães Rosa,*

*Grande Sertão: Veredas*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de limites integrados.....	02
Figura 2	Modelo do efeito bifásico do estado redox celular na contração muscular.....	05
Figura 3	Etapas do recrutamento de leucócitos.....	09
Figura 4	Linha do tempo do delineamento experimental 1.....	16
Figura 5	Linha do tempo do delineamento 2.....	17
Figura 6	Linha do tempo do delineamento 3.....	18
Figura 7	Linha do tempo do delineamento 4.....	19
Figura 8	Linha do tempo do delineamento 5.....	20
Figura 9	Linha do tempo do delineamento 6.....	21
Figura 10	Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga.....	23
Figura 11	Etapas do procedimento de microscopia intravital para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do reto femoral.....	27

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito da intensidade do exercício sobre o VO <sub>2</sub> .....	36
Gráfico 2	Concentrações de IL-6 (A), IL1-β (B) e TNFα (C) na musculatura do quadríceps nos grupos REP, Ex40 e Ex80.....	37
Gráfico 3	Rolamento (A) e adesão de leucócitos (B) em vênulas pós-capilares do quadríceps nos grupos REP, Ex40 e Ex80 .....	38
Gráfico 4	Migração <i>in vitro</i> de neutrófilos isolados da medula de camundongos dos grupos REP e Ex80.....	39
Gráfico 5	Característica da sobrecarga durante o protocolo de treinamento.....	41
Gráfico 6	Desempenho físico no TVI.....	43
Gráfico 7	Desempenho físico no TVC.....	46
Gráfico 8	Recrutamento celular em vênula pós-capilar do musculoesquelético em camundongos Naive e doze horas após o exercício até a fadiga nos grupos NT e T.....	48
Gráfico 9	Desempenho físico no teste de velocidade constante até a fadiga.....	49
Gráfico 10	Comparação entre o trabalho realizado no TVC pós-treinamento físico e no EF.....	50
Gráfico 11	Recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do musculoesquelético em camundongos Naive e doze horas após o EF nos grupos NT e T.....	51
Gráfico 12	Desempenho físico no teste de velocidade constante até a fadiga.....	53
Gráfico 13	Perfil de células no sangue.....	54
Gráfico 14	Perfil celular da medula óssea.....	55

Gráfico 15	<i>Dot plot</i> representativo de citometria de fluxo com marcação de neutrófilos Ly6G <sup>+</sup> , macrófagos F480 <sup>+</sup> , linfócitos CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> e CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> de animais treinados e o não treinados, 72 horas pós o TVC.....	56
Gráfico 16	Cortes representativos histológicos transversais do quadríceps (10µm) corados com hematoxilina e eosina (HE) (A-D).....	57
Gráfico 17	Recrutamento de leucócitos 12 horas após o TVC em camundongos WT e Gp91 <sup>phox-/-</sup> .....	59
Gráfico 18	Desempenho físico no TVC de camundongos WT e Gp91 <sup>phox-/-</sup> .....	62
Gráfico 19	Taxa de variação do VO <sub>2</sub> no TVC de camundongos <i>wild-type</i> e Gp91 <sup>phox-/-</sup> nos grupos NT e T pós- treinamento físico.....	63
Gráfico 20	Recrutamento de leucócitos nos grupos NT e T de camundongos WT e Gp91 <sup>phox-/-</sup> 12 horas após o TVC.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: trifosfato de adenosina	NK: <i>natural killers</i>
ATPase: adenosina trifosfatase	NO: óxido nítrico
CAT: catalase	NOX: NADPH oxidase
CO <sub>2</sub> : dióxido de carbono	NT: não treinado
COX: ciclooxigenase	O <sub>2</sub> : Oxigênio
EDTA:	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> : superóxido
EF: exercício de duração e intensidade fixa	OCT: <i>optimum cutting temperature</i>
ELISA: <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>	OH: radical hidroxila
EPM: erro padrão da média	PBS: tampão fosfato salino
ERNs: espécies reativas de nitrogênio	pg: picograma
EROs: espécies reativas de oxigênio	PGC-1 $\alpha$ : coativador gama de receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1 alpha
Ex40: exercício a 40% da velocidade máxima	PMSF: fluoreto de fenilmetanosulfonil
Ex80: exercício a 40% da velocidade máxima	PPAR- $\gamma$ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma $\gamma$
FMLP: N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina	REP: repouso
g: gramas	RPMI: Roswell Park Memorial Institute
GPX: glutationa peroxidase	SNC: sistema nervosa central
H <sup>+</sup> : hidrogênio	SOD: superóxido dismutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrogênio	T: treinado
HE: hematoxilina e eosina	TVC: teste de corrida com velocidade constante até a fadiga
i.p: intraperitoneal	TVI: teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga
i.v: intravenosa	V <sub>max</sub> : velocidade máxima
J: joules	VO <sub>2</sub> : consumo de oxigênio
Kg: kilograma	VO <sub>2max</sub> : consumo de oxigênio máximo
Ki: constante de inibição	VO <sub>2pico</sub> : consumo de oxigênio pico
MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógeno	$\mu$ m: micrômetro
m.min <sup>-1</sup> : metros por minuto	
mA: miliamper	
mL: mililitro	
n: número amostral	
NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B	

## RESUMO

O presente estudo investigou a influência do estresse oxidativo sobre o desempenho físico e a resposta inflamatória depois de um protocolo de treinamento físico. Primeiramente, foi verificada a influência da intensidade do exercício de corrida em esteira (40% e 80% da velocidade máxima) sobre parâmetros associados à resposta inflamatória. A concentração de citocinas no músculo esquelético e o recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do reto femoral foram dependentes da intensidade do exercício. Neutrófilos purificados de camundongos do grupo exercitado a 80% também apresentaram maior capacidade migratória *in vitro*. Depois, foi avaliado o efeito de um treinamento físico de quatro semanas sobre a resposta inflamatória induzida por um teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC) e por um exercício de duração e intensidade fixa (EF). O treinamento físico aumentou o desempenho dos camundongos evidenciado pela maior  $V_{max}$  e pelo maior trabalho no TVC. E ainda, o rolamento de leucócitos foi maior no grupo treinado (T) após o TVC. Já após o EF, foi verificada uma atenuação do rolamento de leucócitos no grupo T. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do treinamento sobre a resposta inflamatória sistêmica e local após o exercício até a fadiga. O grupo T apresentou um aumento de linfócitos no sangue e uma menor quantidade de macrófagos na medula e um *score* inflamatório reduzido três dias depois do exercício até a fadiga. Ainda, foi avaliada a influência da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o efeito do treinamento físico no recrutamento de leucócitos no músculo. Animais *wild-type* e  $gp91^{phox^{-/-}}$  apresentaram um aumento no rolamento de leucócitos, porém a adesão de leucócitos foi menor em camundongos  $gp91^{phox^{-/-}}$ . Além disso, os camundongos *wild-type* e  $gp91^{phox^{-/-}}$  foram submetidos ao protocolo de treinamento de quatro semanas. O treinamento aumentou o desempenho dos animais *wild-type* e  $gp91^{phox^{-/-}}$ . Porém, o esse aumento foi maior em camundongos  $gp91^{phox^{-/-}}$ . O rolamento e a adesão de leucócitos foi maior em *wild-type* do grupo T, em comparação a todos os demais grupos. Diante disso, conclui-se que a magnitude da resposta inflamatória induzida pelo exercício é determinada pelo estresse oxidativo e pelo nível de desempenho físico em camundongos.

## ABSTRACT

The present study investigated the influence of oxidative stress on physical performance and inflammatory response after a physical training protocol. First, the influence of exercise intensity (40% and 80% of maximal velocity) on parameters associated with the inflammatory response was verified. The concentration of cytokines in the skeletal muscle and the recruitment of leukocytes in post capillary venules of the rectus femoris were dependent on exercise intensity. Neutrophils purified from mice of the exercised at 80% also showed greater *in vitro* migratory capacity. Then, the effect of a four-week physical training on the inflammatory response induced by a constant speed test until fatigue (CVT) and by an exercise of duration and fixed intensity (FE) was evaluated. The physical training increased the performance of the mice evidenced by the higher maximal velocity and the greater workload in the TVC. Also, the leukocyte rolling was higher in the trained group (T) after the TVC. However, after EF, the rolling of leukocytes was attenuated in the T. Additionally, the effect of training on the systemic and local inflammatory response after exercise until fatigue was evaluated. The T showed increased lymphocytes in the blood, a smaller amount of macrophages in the bone marrow and a reduced inflammatory score three days after exercise until fatigue. In addition, the influence of the production of reactive oxygen species (ROS) on the effect of physical training on the recruitment of leukocytes in the muscle was evaluated. Wild-type and gp91phox<sup>-/-</sup> mice showed an increase in leukocyte rolling, but leukocyte adhesion was lower in gp91phox<sup>-/-</sup> mice. In addition, the wild-type and gp91phox<sup>-/-</sup> mice were submitted to the four week training protocol. Training increased the performance of wild-type and gp91phox<sup>-/-</sup> animals. However, this increase was greater in gp91phox<sup>-/-</sup> mice. Leukocyte rolling and adhesion was higher in wild-type T group, compared to all other groups. Therefore, it is concluded that the magnitude of the inflammatory response induced by exercise is determined by oxidative stress and the level of physical performance in mice.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Exercício físico e fadiga.....	01
1.2 Exercício físico e balanço oxidativo.....	06
1.3 Exercício físico e inflamação.....	07
1.4 Treinamento físico e inflamação.....	11
2 OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MATERIAIS e MÉTODOS.....	15
3.1 Cuidados éticos.....	15
3.2 Delineamentos experimentais.....	15
3.2.1. Delineamento experimental 1.....	15
3.2.2. Delineamento experimental 2.....	16
3.2.3. Delineamento experimental 3.....	17
3.2.4. Delineamento experimental 4.....	18
3.2.5. Delineamento experimental 5.....	19
3.2.6. Delineamento experimental 6.....	20
3.3. Procedimentos experimentais.....	22

3.3.1. Amostra.....	22
3.3.2. Familiarização à corrida em esteira rolante .....	22
3.3.3. Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (TVI).....	22
3.3.4. Medida do Consumo de Oxigênio.....	23
3.3.5. Teste de exercício físico com intensidade de 40 e 80% da $V_{max}$ e duração fixa.....	24
3.3.6. Teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC).....	24
3.3.7. Protocolo de treinamento físico.....	25
3.3.8. Recrutamento de leucócitos na microcirculação musculoesquelética por microscopia intravital após o exercício físico.....	26
3.3.9. Exercício agudo com intensidade e duração fixa (EF).....	27
3.3.10. Variáveis Calculadas.....	27
3.3.11. Concentração de citocinas no tecido muscular.....	28
3.3.12. Migração de neutrófilos <i>in vitro</i> .....	28
3.3.13. Colheita sanguínea, retirada de tecido muscular e fêmur.....	29
3.3.14. Confecção de lâminas para coloração de hematoxilina e eosina (HE).....	30
3.3.15. Observações histológicas.....	30
3.3.16. Isolamento de células do sangue para análise de citometria.....	31
3.3.17. Isolamento de células da medula óssea para análise de citometria.....	31
3.3.18. Marcação das células com anticorpos para leitura no citômetro.....	32
3.3.19. Eutanásia.....	33

3.3.20. Análise estatística.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Delineamento experimental 1.....	35
4.2. Delineamento experimental 2.....	40
4.3. Delineamento experimental 3.....	49
4.4. Delineamento experimental 4.....	52
4.5. Delineamento experimental 5.....	58
4.6. Delineamento experimental 6.....	60
5. Discussão.....	65
6. Conclusão.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	77
8. Anexo.....	93
9. Apêndice.....	94

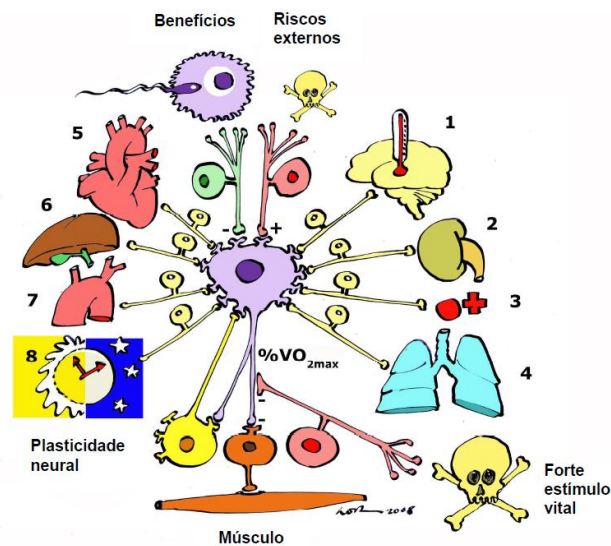
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Exercício físico e fadiga

A realização de exercício físico é controlada por centros cerebrais de integração que estimulam o sistema motor, transformando a informação neural em contração muscular. Com o início do exercício, simultaneamente à estimulação dos motoneurônios, o córtex motor aumenta a atividade simpática para diversos órgãos de maneira dependente da intensidade do esforço (Silber *et al.*, 2000). Essa estimulação autonômica e do sistema motor consistem no comando central (pré-alimentação), o qual é ajustado de acordo com a necessidade dos sistemas orgânicos à intensidade e duração do exercício. Devido ao aumento da taxa metabólica induzido pelo exercício, alterações no meio interno são direcionadas, por retroalimentação, ao sistema nervoso central (SNC). A partir daí, o SNC integra a informação com os valores de referência da capacidade dos diferentes sistemas e desencadeia respostas efetoras fisiológicas para manutenção da homeostase. Diante disso, é provável que estes mecanismos estejam envolvidos na diminuição ou interrupção da contração muscular, caracterizando o controle da fadiga durante o exercício, com o objetivo de proteger a integridade do organismo (Kayser, 2003).

A fadiga foi tradicionalmente definida como a incapacidade de manter uma determinada potência, devido a uma falha em qualquer etapa da sequência de eventos que estimulam a atividade muscular voluntária, desde o aparecimento do estímulo nervoso no cérebro até a contração da fibra muscular (Gandevia, 1992). A literatura propõe alguns modelos, com diferentes abordagens, para tentar explicar a fadiga, são eles: modelo cardiovascular/ anaeróbio; modelo do fornecimento / depleção de energia; modelo de recrutamento muscular; modelo biomecânico e modelo psicológico/

motivacional (Noakes, 2000). No entanto, alguns achados não podem ser explicados pelos pressupostos estabelecidos nos diferentes modelos e sugerem que o desempenho, sob diferentes condições de esforço, pode ser determinado por diferentes sistemas fisiológicos (Noakes, 2000). Dentro desta perspectiva, existe a proposta de um modelo de limites integrados (Figura 1) para explicar a fadiga aguda, a qual é compreendida como um mecanismo de defesa, que integra múltiplos estímulos sensoriais e estabelece um limite fisiológico para cada sistema associado ao controle do esforço. Neste modelo, fatores tais como: disponibilidade de substratos, temperatura corporal, equilíbrio ácido-básico e hidroeletrólítico, fluxo sanguíneo, ventilação pulmonar, atividade neural, e outros, estão associados permanentemente à determinação do desempenho físico, em função do ambiente, no sentido de evitar falha e proteger o organismo (Rodrigues & Silami-Garcia, 1998).



**Figura 1:** Modelo de limites integrados. A redução da intensidade ou interrupção do exercício ocorre como resultado de informações neurais geradas pelas respostas integradas dos benefícios e riscos de continuar a atividade. Estas respostas são moduladas por: 1) taxa de armazenamento de calor; 2) osmolalidade plasmática; 3) concentração de  $H^+$ ; 4) disponibilidade de  $O_2$ ; 5) perfusão sanguínea; 6) disponibilidade de substratos; 7) concentrações de  $CO_2$  e 8) ritmo circadiano. Um forte estímulo poderia inibir os mecanismos de fadiga e resultar em exaustão. A plasticidade permite ao sistema adaptar-se aos desafios do ambiente (legenda adaptada de Martini, 2009).

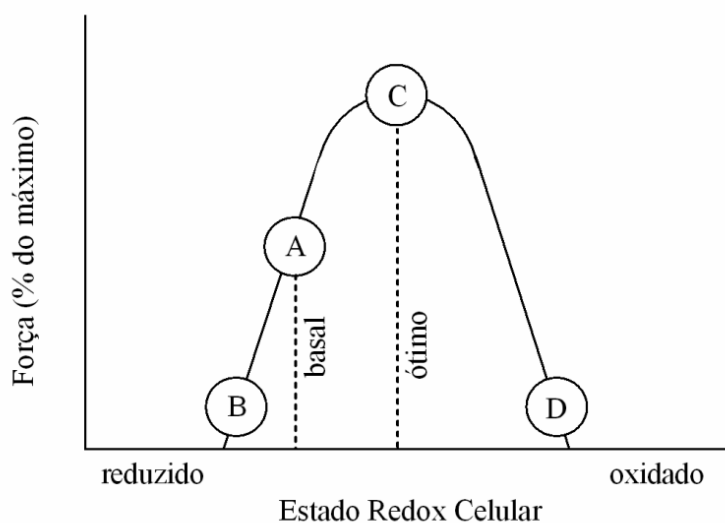
Diante deste contexto, existem abordagens periféricas sobre os mecanismos de fadiga durante o exercício físico, as quais envolvem a participação de um sistema de balanço intracelular oxidante e antioxidante (Clarkson & Thompson, 2000). Durante o exercício físico, há um aumento na demanda de adenosina trifosfato (ATP) devido à contração muscular. Essa maior necessidade de transferência de energia é prontamente atendida pela ativação de diferentes vias metabólicas de acordo com a intensidade do exercício. Em condições de exercício predominantemente aeróbicas, a maior parte da demanda energética é suprida pelo ATP gerado na cadeia de transporte de elétrons, através da fosforilação oxidativa. Durante este processo de transferência de energia, uma pequena parte de elétrons escapa da cadeia de transporte dando origem primariamente ao radical livre ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual também pode ser produto específico de sistemas enzimáticos. Esta molécula, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), é reduzida a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual pode ser reduzido a  $H_2O$  pela ação da catalase (CAT) e/ou glutathiona peroxidase (GPX). Além disso,  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  podem reagir e dar origem ao radical hidroxila (OH) (reação de Haber-Weiss), uma espécie com alta reatividade e grande potencial oxidativo (Powers & Jackson, 2008). Coletivamente,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e OH são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs). Outra forma reativa de radical livre formado é o óxido nítrico (NO), o qual surge como produto de enzimas óxido nítrico sintases. O NO e  $O_2^-$  podem reagir rapidamente e formar peroxinitrito e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Powers & Jackson, 2008).

Apesar do maior fluxo de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons com aumento da demanda energética durante o exercício, estima-se que apenas uma pequena quantidade, cerca de 2%, de todo oxigênio consumido pelo tecido, seja convertido em EROs (Jackson, 2009). No entanto, já está estabelecido que outras fontes de produção

de EROs como: NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase, cicloxigenase (COX)-2, lipoxigenase e fosfolipase A2 são ativadas durante o exercício (Powers & Jackson, 2008). Dentre essas, a NOX destaca-se como a principal fonte de EROs durante o exercício físico (Jackson, 2009). Além disso, a contração muscular pode aumentar a produção de diversas citocinas e quimiocinas que estimulam a geração de EROs (Nieman *et al.*, 2003).

Particularmente, diversos pesquisadores têm demonstrado que o aumento do consumo de oxigênio durante exercício físico leva a uma maior produção de EROs (Dillard *et al.*, 1978; Davies *et al.*, 1982; Alessio *et al.*, 1988; Duthie *et al.*, 1990). Além de essas moléculas serem continuamente produzidas pelo organismo como parte do metabolismo oxidativo de mamíferos (Finaud *et al.*, 2006; Powers *et al.*, 2011), elas podem agir como mensageiros intracelulares e desempenhar funções em diversos processos fisiológicos (Droge, 2002; Niess & Simon, 2007). Por outro lado, evidências demonstram que altas concentrações de EROs representam toxicidade à célula e podem causar dano oxidativo à bomba adenosina trifosfatase (ATPase), o que leva a uma redução da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, a qual interfere no processo de acoplamento excitação-contração e diminui a contratilidade do músculo (Xu *et al.*, 1997; Vollaard *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2011). Do mesmo modo, o dano à bomba ATPase está associado à redução do influxo de potássio de volta à fibra muscular esquelética, o que pode inibir o desenvolvimento de potenciais de ação para a contração (Sen *et al.*, 1995; Lawler *et al.*, 1998). Desta maneira, o dano oxidativo parece interferir diretamente sobre as proteínas contráteis e enzimas mitocondriais (Haycock *et al.*, 1996). Além disso, investigações *in vitro* detectaram uma redução na capacidade contrátil de miofibrilas diante de baixa ou alta concentração de EROs (Reid *et al.*, 1993; Andrade *et al.*, 1998; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). Estas evidências

apoiaram a proposta de um modelo conhecido como efeito bifásico do estado redox na contração muscular (Figura 2), o qual estabelece um balanço entre a produção de oxidantes e o sistema antioxidante, o que pode influenciar o desempenho físico. Com isso, este modelo indica a existência de uma condição redox intracelular ideal para o desenvolvimento de força pelo músculo (Reid, 2001).



**Figura 2:** Modelo do efeito bifásico do estado redox celular na contração muscular. Dados de músculos fadigados e não fadigados: A: estado basal de músculo não fadigado. B: músculo não fadigado exposto a agente redutor ou antioxidante. C: músculo não fadigado exposto a baixos níveis de EROs. D: músculo exposto a altos níveis de EROs. As linhas tracejadas representam o estado redox basal (músculos em repouso sem estímulo redox exógeno) e estado redox ótimo (condição na qual a força é máxima). (Adaptada de Reid, 2001).

Contudo, dependendo da intensidade do esforço a produção de moléculas oxidantes pelo músculo durante o exercício pode ser maior do que a capacidade do sistema antioxidante endógeno de tamponamento do estresse oxidativo. Conseqüentemente, o acúmulo de EROs poderia sinalizar para a diminuição ou interrupção do exercício físico por mecanismos ainda não esclarecidos.

## 1.2. Exercício físico e balanço oxidativo



Há alguns anos, diversas investigações têm demonstrado que as EROs participam na ativação de vias sinalização específicas, envolvidas em adaptações do músculo esquelético ao exercício físico. Esta sinalização redox compreende um sistema parácrino, também chamado de autócrino, que por meio de diferentes sinais ativa múltiplas vias em células adjacentes com uma participação de mediadores locais, a exemplo de EROs. Dentre essas vias podem ser citadas algumas de destaque na literatura tais como: NF- $\kappa$ B (Meyer *et al.*, 1994), MAPKs (Allen & Tresini, 2000), PPAR- $\gamma$  e PGC-1 $\alpha$  (Wu *et al.*, 1999). A manutenção de um equilíbrio no sistema oxidante/antioxidante é crucial na regulação das funções celulares (Banerjee *et al.*, 2003). Durante o exercício físico ocorre uma ruptura do equilíbrio redox devido ao aumento na produção de EROs, o qual leva a um disparo de sinalizações para aumentar a atividade enzimática antioxidante, na tentativa de reestabelecer a homeostase (Ashton *et al.*, 1998; Groussard *et al.*, 2003; Aguilo *et al.*, 2005).

Evidências estabelecem que o estado redox do músculo durante diferentes tipo de exercício é dependente de componentes como intensidade e duração (Watson *et al.*, 2005; Finaud *et al.*, 2006). Especificamente, exercícios prolongados ou de alta intensidade demonstram um potencial em gerar um desequilíbrio no balanço redox, por uma aumentada produção de EROs, e conseqüente redução no desempenho físico (Powers *et al.*, 2011). Por sua vez, esta maior produção de EROs pode gerar uma resposta adaptativa contra o estresse oxidativo. Como exemplo, tem sido observado que uma única sessão de exercício estimula a expressão de genes da enzima antioxidante SOD, em músculos de ratos (Hollander *et al.*, 2001). Gomez-Cabrera e colaboradores verificaram que a administração de alopurinol, um inibidor da enzima xantina oxidase, durante o exercício agudo, impediu a ativação de vias celulares que regulam as adaptações musculares em ratos (Gomez-Cabrera *et al.*, 2005). Estes dados evidenciam

a participação de EROs na ativação de vias relacionadas ao aumento da atividade antioxidante durante o exercício físico. Esta maior atividade antioxidante é também evidenciada pela maior expressão de GPX, SOD e CAT em fibras musculares com alta capacidade oxidativa (tipo I) (Lawler *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1994; Powers *et al.*, 1994), o que talvez possa ser explicado pelo maior recrutamento desse tipo de fibra em exercícios predominantemente aeróbicos (Sale, 1987). Além disso, estudos *in vitro* sugerem que a expressão fisiológica de genes associados à biogênese mitocondrial em miotubos necessita de concentrações adequadas de EROs (Irrcher *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, o oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece estar envolvido nos mecanismos de atrofia da célula musculoesquelética (McClung *et al.*, 2009). Com isso, parece razoável pensar que, além do balanço redox participar das respostas adaptativas induzidas pela contração muscular, talvez este fenômeno seja dependente de fatores tais como intensidade e duração do exercício físico. No entanto, ainda não está claro se a resposta inflamatória é influenciada de maneira intensidade dependente pelo exercício físico.

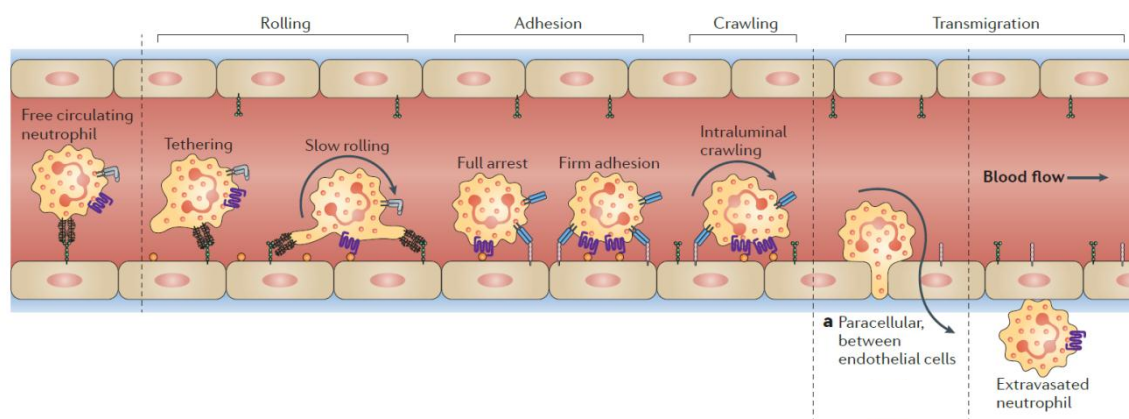
### **1.3 Exercício físico e inflamação**

Em condições fisiológicas, seres humanos e roedores, possuem na circulação aproximadamente de  $3-10 \times 10^6$  leucócitos por mililitro de sangue. Além disso, grande quantidade destas células está armazenada em diversos órgãos como, medula óssea, timo, baço, gânglios linfáticos e na maioria dos tecidos do organismo, de onde podem ser prontamente mobilizadas (Scheiermann *et al.*, 2015). Particularmente, uma variedade de estudos tem demonstrado que o exercício induz modificações fisiológicas consideráveis no sistema imunológico, o que compreende uma interação capaz de estabelecer uma ligação entre fisiologia básica e clínica, além de possibilitar a avaliação da função de mecanismos imunofisiológicos sobre condições de estresse (Nieman *et al.*,

2005; Markovitch *et al.*, 2008; McKay *et al.*, 2009; Nieman *et al.*, 2012). De forma geral, está bem estabelecido que o exercício físico ativa células do sistema imune e induz a produção de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que regulam as adaptações do tecido muscular (Choi, 2005; Mahoney *et al.*, 2005; Guelfi *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2007; Ouchi *et al.*, 2008; Holloway *et al.*, 2009). Especificamente, o aumento na produção de EROs induzido pela maior atividade muscular estimula a expressão de mediadores inflamatórios que participam da regulação da resposta imune ao exercício. Já está claro na literatura que o exercício estimula um aumento do número de leucócitos (neutrófilos, monócitos, células NK, linfócitos T e B) na circulação sanguínea, o qual é sugerido ocorrer pela mobilização marginal (“*pool*” intravascular) e da medula óssea (Kakanis *et al.*, 2010). Esta alteração na quantidade de leucócitos parece ser dependente do grupo e da quantidade de massa muscular recrutada no exercício (Cannon *et al.*, 1994; Malm *et al.*, 2004; Peake *et al.*, 2005). Além disso, diversas investigações, apesar da variação no tipo, duração, intensidade, momento da medida e nível de aptidão, parecem ser consistentes nos achados sobre as alterações sanguíneas de leucócitos durante ou após o exercício (Nieman & Pedersen, 1999; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). É importante ressaltar que, grande parte de EROs produzida durante o exercício é proveniente de leucócitos presentes na circulação sanguínea (Nikolaidis & Jamurtas, 2009). Nesse sentido, o processo inflamatório induzido pelo exercício físico está intimamente associado ao estresse oxidativo.

Existem evidências de que o estresse mecânico durante a contração muscular pode levar à desorganização morfológica de sarcômeros, a unidade contrátil do músculo esquelético. Esta ruptura estrutural pode ocorrer em áreas adjacentes do músculo, e com isso, causar dano ao retículo sarcoplasmático, a túbulos transversos e ao sarcolema (Proske & Allen, 2005). Este dano induz uma resposta inflamatória local, relacionada a

processos de degeneração e reparo do tecido danificado, caracterizada pelo recrutamento de distintos subtipos de leucócitos para o tecido, em um processo conhecido como diapedese, o qual que se divide em quatro etapas fundamentais: captura, rolamento, adesão e transmigração celular (Figura 3) (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Este processo de recrutamento de leucócitos é iniciado devido às mudanças na superfície do endotélio vascular induzidas por diferentes mediadores inflamatórios, os quais são liberados pelo próprio endotélio, pela fibra muscular ou por células residentes (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Adicionalmente, os mecanismos pelos quais o exercício físico estimula a interação leucócito e endotélio estão associados ao efeito de EROs sobre a expressão de diversas moléculas na parede vascular (Nunes-Silva *et al.*, 2014).



**Figura 3:** Etapas do recrutamento de leucócitos. (adaptada de Kolaczkowska e Kubes, 2013)

Numa perspectiva cronológica, a etapa de captura consiste na primeira ligação entre o leucócito e o endotélio vascular e é mediada por glicoproteínas, classificadas como P-selectina e L-selectina (Rivera-Nieves *et al.*, 2008). Na sequência, os leucócitos passam para a etapa de rolamento, na qual são ativados por agentes quimiotáticos

expressos na parede do endotélio ou difundidos do tecido adjacente. Esta ativação, por sua vez, aumenta a expressão de integrinas, glicoproteínas aderentes transmembrana da superfície do leucócito, que se ligam a receptores endoteliais e conseqüentemente leva à firme adesão na parede vascular. Finalmente, após a adesão o leucócito se desloca pelo gradiente químico ao longo do endotélio e é direcionado até ao local preferencial para transmigração (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Esta resposta inflamatória tem papel importante nos mecanismos adaptativos do tecido em resposta ao exercício (Nagaraju *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2010; Henningsen *et al.*, 2011; Scheler *et al.*, 2013). Primeiramente, neutrófilos infiltram-se no espaço extracelular ao redor do dano dentro de poucas horas após o exercício e permanecem por até 24 horas. Subseqüentemente, a redução na quantidade de neutrófilos é acompanhada por um aumento de macrófagos com fenótipo M1 pró-inflamatórios. De certo modo, neutrófilos e macrófagos M1 contribuem para a degradação do dano muscular pela liberação de EROs e produção de citocinas pró-inflamatórias. Juntamente com o declínio do subtipo M1, acontece um aumento de macrófago M2, o qual tem perfil anti-inflamatório. Finalmente, outros tipos celulares, a exemplo de células T ativadas podem ser recrutadas e contribuem para o processo de regeneração tecidual e remodelamento (MacIntyre *et al.*, 2000; Raastad *et al.*, 2003; Paulsen *et al.*, 2010).

No entanto, a regulação do recrutamento de células inflamatórias assim como a magnitude da resposta inflamatória depende da extensão do dano muscular e do tempo necessário para o reparo (Paulsen *et al.*, 2012). Além disso, a literatura sugere que o dano muscular é atenuado após sessões subseqüentes com a mesma intensidade absoluta de exercício (Hortobagyi *et al.*, 1998). Portanto, parece necessária a compreensão da participação da resposta inflamatória no recrutamento celular em resposta ao treinamento físico.

#### **1.4 Treinamento físico e inflamação**

O treinamento físico pode ser definido como um processo de sobrecarga crônica que gera perturbações na homeostase do organismo e eventualmente leva a adaptações que melhoram a função cardiovascular, a capacidade oxidativa do músculo esquelético e aumentam o desempenho físico (Bigard *et al.*, 1996; Billat *et al.*, 1999; Meeusen *et al.*, 2013). Além disso, estas adaptações dependem tanto das características específicas do exercício, as quais são definidas principalmente pelos componentes, intensidade, duração e frequência, quanto da relação entre estímulo e recuperação (Meeusen *et al.*, 2013). Sendo assim, a manipulação eficiente destes componentes pode modular de maneira positiva as sinalizações moleculares nos diferentes sistemas fisiológicos (Wenger & Bell, 1986). Especificamente, o tecido muscular é considerado um tecido com alta plasticidade para responder ao treinamento físico. De maneira geral, estas respostas incluem ativação de biogênese mitocondrial, alteração da composição dos tipos de fibra, angiogênese, aumento do número e tamanho de proteínas contráteis e aumento de reservas energéticas.

Há alguns anos, já existe um consenso de que as adaptações musculares induzidas pelo treinamento físico são influenciadas pela resposta inflamatória (Tidball & Villalta, 2010). Como já descrito anteriormente, o exercício agudo induz uma resposta imune inflamatória aguda, a qual possui função essencial no controle da homeostase do organismo (Fielding & Evans, 1997). Tem sido evidenciado que uma sessão de contrações musculares intensas é suficiente para induzir adaptações que tornam o músculo menos suscetível a danos quando submetido a novos episódios de esforço (Hortobagyi *et al.*, 1998; Nosaka *et al.*, 2001). No entanto, grande parte dos trabalhos envolvendo resposta inflamatória e adaptações musculares ao treinamento

físico utilizaram modelos de exercício com repetidas contrações excêntricas para induzir dano muscular. Sendo assim, faltam investigações sobre a participação da resposta inflamatória em outros modelos de treinamento físico. Geralmente, estudos com roedores utilizam protocolos de treinamento físico em esteira, nos quais a sobrecarga prescrita nas sessões é baseada em percentuais de desempenho máximo alcançado em protocolos incrementais na velocidade de corrida. Depois do surgimento do conceito de consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ), dado por Hill e Lupton (Hill & Lupton, 1923) como a taxa máxima de oxigênio que pode ser consumida pelo organismo durante o exercício, foi estabelecida uma relação linear entre velocidade de corrida e  $VO_2$  (Fernando *et al.*, 1993; Schefer & Talan, 1996; Wisloff *et al.*, 2001), a qual validou a aplicação de protocolos incrementais na velocidade de corrida até a fadiga para roedores e seres humanos. No entanto, esses protocolos podem não ser eficazes em determinar parâmetros para a prescrição do treinamento, uma vez que o  $VO_{2max}$  não é o único parâmetro fisiológico que determina o desempenho físico aeróbico em condições submáximas (Joyner & Coyle, 2008). Além disso, a adaptação induzida por um dado protocolo de treinamento pode aumentar a capacidade de exercício sem influenciar o  $VO_{2pico}$  (Teixeira-Coelho *et al.*, 2017). Geralmente, a prescrição do treinamento físico em modelos de corrida em esteira tem sido realizada com a utilização apenas do parâmetro intensidade, sem qualquer referência para a prescrição da duração das sessões para roedores (Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2013). De certa maneira, isto pode comprometer a individualização da sobrecarga no processo de treinamento físico. Desta forma, existe a necessidade de se estabelecer protocolos de avaliação do desempenho e de treinamento físico baseados no do trabalho realizado durante a corrida.

Nas últimas décadas, evidências epidemiológicas têm indicado que a prática regular de exercício físico está associada à redução da taxa de diversas causas de mortalidade, sendo atualmente aceita como estratégia não farmacológica para minimizar ou reverter os efeitos degenerativos de doenças associadas ao estresse oxidativo como obesidade, hipertensão, síndrome plurimetabólica, diabetes e câncer (Katzmarzyk & Janssen, 2004; Febbraio & Pedersen, 2005; Tremblay *et al.*, 2007; Fiuza-Luces *et al.*, 2013). Especificamente, doenças crônicas são caracterizadas por persistente resposta inflamatória e desregulação imunológica, o que leva à redução da força e da capacidade oxidativa da célula muscular, pelo comprometimento do potencial de vias regenerativas musculares (Narici & Maffulli, 2010; Akhmedov & Berdeaux, 2013; Pillon *et al.*, 2013; Remels *et al.*, 2013). Nesse contexto, perturbações prolongadas na homeostase metabólica ou imunológica, resultam em menor capacidade funcional do organismo. Paradoxalmente, os benefícios induzidos pelo treinamento físico estão relacionados, pelo menos em parte, às adaptações desencadeados por EROs produzidas durante o exercício físico. Este processo de adaptação ao treinamento físico está intimamente relacionado à ativação de um sistema antioxidante reparador de dano oxidativo, que aumenta a resistência ao estresse oxidativo, aumentando a proteção contra doenças (Alessio & Goldfarb, 1988; Radak *et al.*, 2000; Radak *et al.*, 2002). Portanto, esta ativação cria um sistema que se assemelha em toxicologia à “Teoria de Hormese”, a qual afirma que sistemas biológicos respondem a toxinas numa curva dose-resposta em forma de “U” invertido, caracterizado por baixa dose de estimulação e alta dose de inibição (Calabrese & Baldwin, 2003). Apesar disso, ainda não está claro como a resposta inflamatória acontece em função do treinamento físico, e ao mesmo tempo, pode influenciar o desempenho físico.



## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência do estresse oxidativo sobre o efeito do treinamento físico na resposta inflamatória e no desempenho durante o exercício.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito da intensidade do exercício físico sobre a resposta inflamatória.
2. Padronizar um protocolo de treinamento físico, prescrito com base na avaliação do desempenho em teste incremental e fixo, para estudar a resposta inflamatória induzida pelo exercício.
3. Avaliar o efeito do treinamento físico sobre o recrutamento de leucócitos induzido pelo exercício de intensidade constante até a fadiga e com duração fixa.
4. Avaliar o efeito do treinamento físico sobre o perfil de células inflamatórias do sangue e da medula óssea.
5. Avaliar o efeito do treinamento físico sobre o infiltrado de leucócitos no tecido muscular
6. Avaliar a influência da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o recrutamento de leucócitos induzido pelo exercício físico.
7. Avaliar a influência da produção de EROs sobre o efeito do treinamento físico no recrutamento de leucócitos e no desempenho durante o exercício.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cuidados éticos**

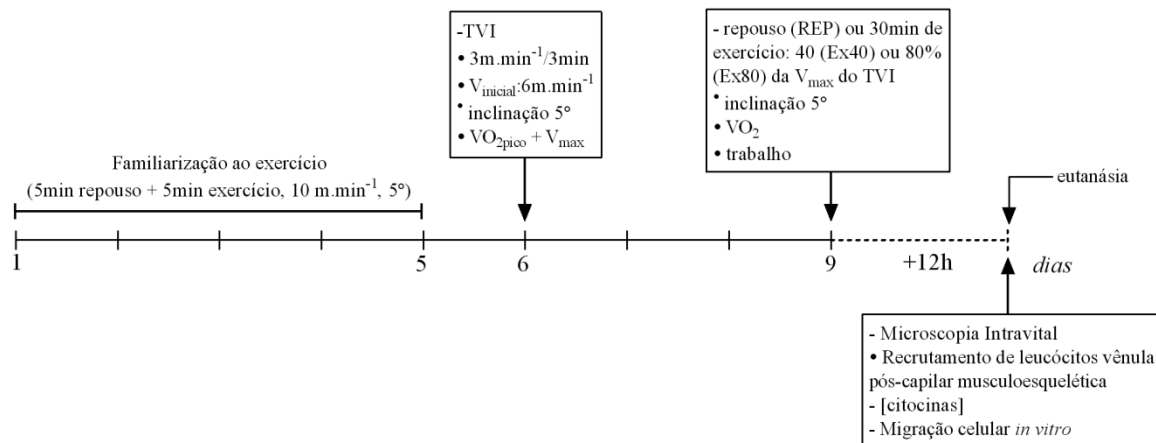
Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 7412/2012) e conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional Brasileiro para o Controle de Experimentação Animal.

#### **3.2. Delineamentos experimentais**

##### **3.2.1. Delineamento experimental 1**

Com o objetivo de avaliar o efeito da intensidade do exercício físico sobre a resposta inflamatória, 16 camundongos C57BL/6 com oito semanas de idade foram primeiramente familiarizados ao exercício em esteira por cinco dias consecutivos. Um dia após o fim da familiarização em esteira, os animais foram submetidos a um teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (TVI) para avaliar o  $VO_{2\text{pico}}$  e a velocidade máxima de corrida ( $V_{\text{max}}$ ). Após cada animal ter sido colocado na esteira, foram aguardados pelo menos 20 minutos, antes do início do exercício, para garantir a estabilização de parâmetros do analisador de gases, devido à abertura da câmara da esteira para colocação do animal. Depois disso, os animais foram distribuídos de maneira homogênea, com base no desempenho no TVI, em três grupos experimentais: repouso (REP), exercício de trinta minutos a 40% da  $V_{\text{max}}$  (Ex40) ou a 80% da  $V_{\text{max}}$  (Ex80) para determinação do  $VO_2$ . Doze horas depois da medida do  $VO_2$  de cada grupo, os camundongos foram anestesiados para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do reto femoral. Em seguida foi feita a colheita de sangue para análise de migração celular. Após a eutanásia o quadríceps foi removido para análises

de citocinas e histológicas. Por fim, os fêmures foram retirados para isolamento de células da medula para avaliação de migração celular (Figura 4).

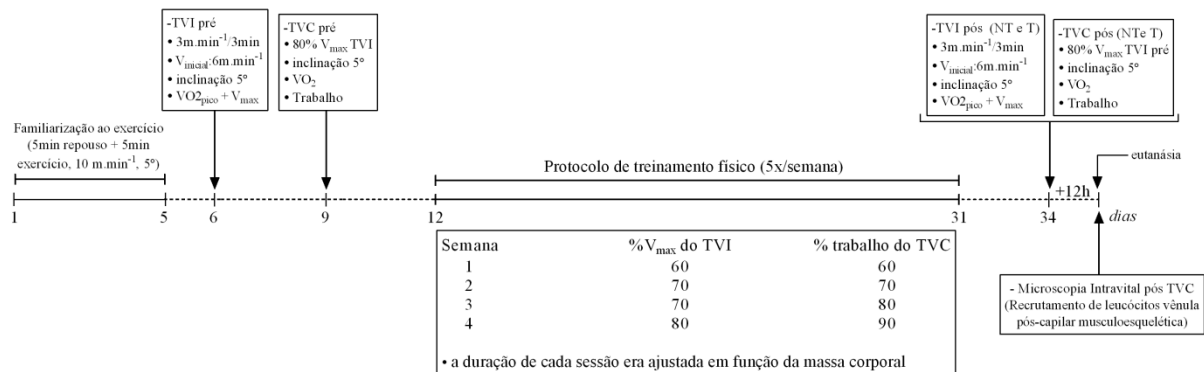


**Figura 4:** Linha do tempo do delineamento experimental 1

### 3.2.2. Delineamento experimental 2

Para avaliar o efeito do treinamento físico sobre a resposta inflamatória induzida pelo exercício até a fadiga, 30 camundongos C57BL/6 com oito semanas de idade foram inicialmente familiarizados ao exercício em esteira. No dia seguinte ao fim da familiarização, todos os camundongos foram submetidos ao TVI para determinação do VO<sub>2</sub><sub>pico</sub> e V<sub>max</sub> antes do treinamento físico. Três dias após o TVI, os camundongos realizaram um teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC) para mensuração do VO<sub>2</sub> e do trabalho total. Assim, os animais foram distribuídos de forma homogênea nos grupos experimentais: não treinado (NT, n=15) e treinado (T, n=15). Então, 72 horas após a última sessão das quatro semanas de treinamento físico, os camundongos de cada grupo experimental foram subdivididos para realização do TVI (NT, n=8; T, n=8) ou TVC (NT, n=7; T, n=7). Doze horas após os testes, os

camundongos foram anestesiados para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do reto femoral. Por conseguinte, os camundongos foram eutanasiados (Figura 5).

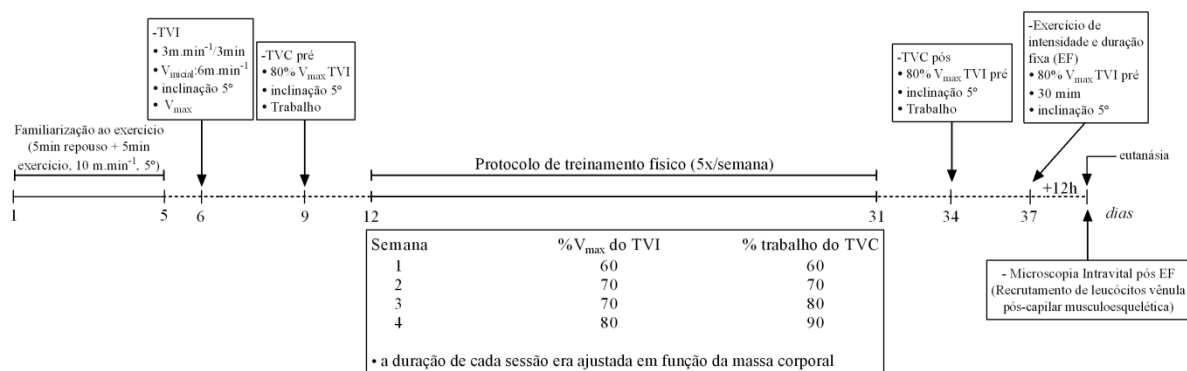


**Figura 5:** Linha do tempo do delineamento 2

### 3.2.3. Delineamento experimental 3

Com o intuito de verificar o efeito do treinamento físico sobre a resposta inflamatória induzida pelo exercício com duração e intensidade fixa (EF), 20 camundongos C57BL/6 com oito semanas de idade foram utilizados neste delineamento. Dos 20 animais, seis camundongos foram separados para comporem o grupo não exercitado (Naive), os quais não passaram pelos procedimentos experimentais que envolviam exercício. Os outros 14 camundongos foram familiarizados à corrida em esteira. Um dia depois do fim da familiarização, os 14 camundongos foram submetidos ao TVI para determinação da V<sub>max</sub>, antes do treinamento físico. Então, 72 horas após o TVI, os mesmos foram submetidos ao TVC antes do treinamento. Após o TVC os camundongos foram distribuídos de forma homogênea nos grupos não treinado (NT, n=7) e treinado (T, n=7). Então, o grupo T

foi submetido a quatro semanas de treinamento. Depois de finalizado o treinamento, um 2º TVC foi novamente aplicado 72 horas após a última sessão. Após três dias deste 2º TVC, os grupos NT e T foram submetidos ao EF. Doze horas após o EF, os camundongos foram anestesiados para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do quadríceps femoral. Por fim, os camundongos foram eutanasiados (Figura 6).

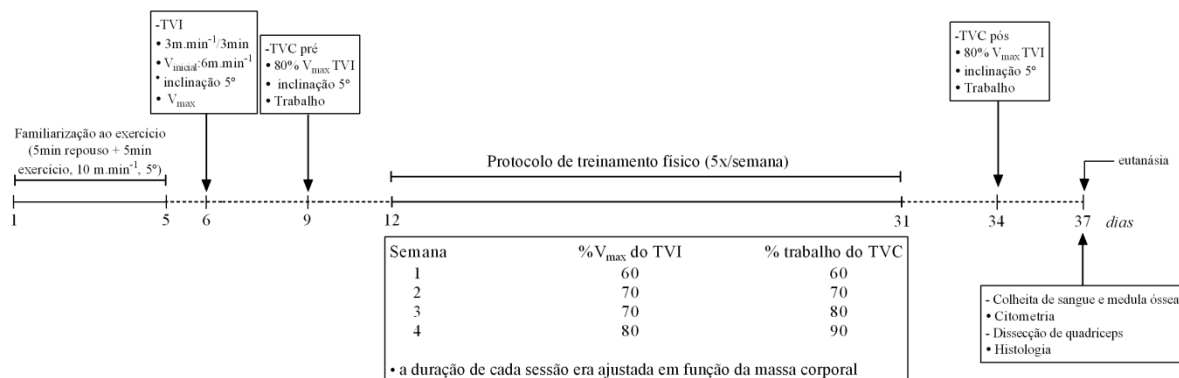


**Figura 6:** Linha do tempo do delineamento 3

### 3.2.4. Delineamento experimental 4

Neste delineamento, o objetivo foi avaliar o efeito do treinamento físico sobre a resposta inflamatória sistêmica e local induzida pelo exercício. Para isso, 15 camundongos C57BL/6 com oito semanas de idade foram familiarizados ao exercício. Um dia após o término da familiarização os camundongos passaram pelo TVI e 72 horas depois, submetidos ao 1º TVC. Após a realização deste 1º TVC, os camundongos foram distribuídos de forma homogênea, com base no desempenho de corrida, nos grupos não treinado (NT, n=7) e treinado (T, n=8). O grupo T foi submetido a quatro semanas de treinamento físico. Três dias depois da última sessão de treinamento, um 2º TVC foi aplicado para todos os camundongos. Depois de mais três dias, os

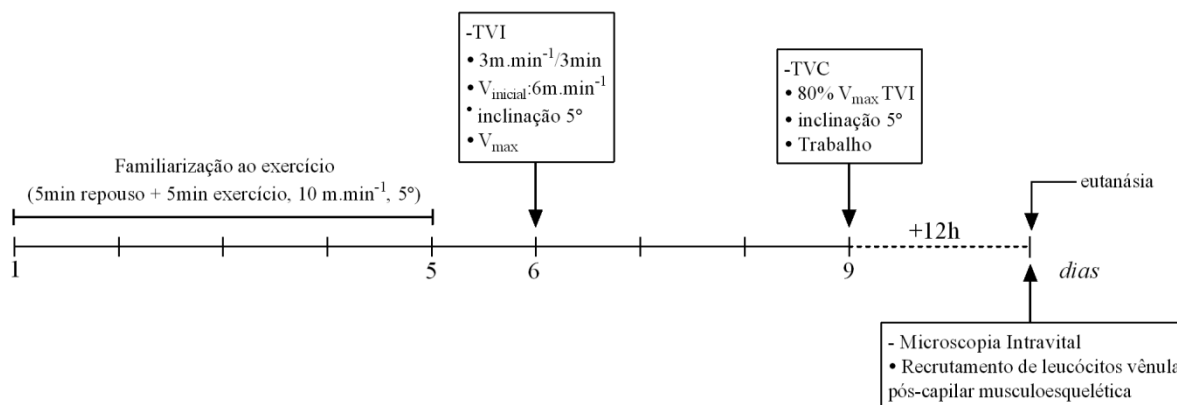
camundongos foram anestesiados profundamente para colheita de sangue. Depois de eutanasiados, o quadríceps e os fêmures foram retirados. As células do sangue e medula foram isoladas para análise do perfil celular e o quadríceps utilizado para a análise histológica (Figura 7).



**Figura 7:** Linha do tempo do delineamento 4

### 3.2.5. Delineamento experimental 5

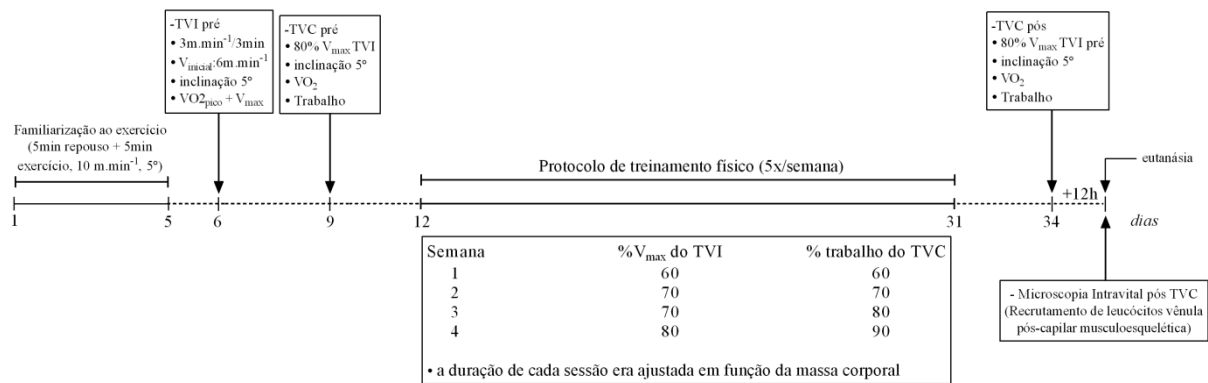
Para investigar a influência da NADPH oxidase sobre a resposta inflamatória induzida pelo exercício físico, 16 camundongos C57BL/6, sendo 11 *wild-type* e cinco Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> com oito semanas de idade. Dos 11 camundongos *wild-type*, cinco foram separados para comporem o grupo Naive, o qual não passou por procedimentos que envolviam exercício. Inicialmente, os demais camundongos foram familiarizados ao exercício em esteira. 24 horas após o término da familiarização, os camundongos foram submetidos ao TVI. Três dias depois foi realizado o TVC e 12 horas depois, todos os camundongos foram anestesiados para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares (Figura 8).



**Figura 8:** Linha do tempo do delineamento 5

### 3.2.6. Delineamento experimental 6

Este delineamento teve o objetivo de avaliar a influência da NADPH oxidase sobre o efeito do treinamento na resposta inflamatória induzida pelo exercício físico. Para tal, 25 camundongos C57BL/6, sendo 13 *wild-type* e 12 Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>, com oito semanas de idade foram familiarizados à corrida em esteira. Um dia depois do fim da familiarização, os camundongos foram submetidos ao TVI. Após 72h do TVI, todos os camundongos passaram pelo TVC, o qual determinou a distribuição homogênea dos camundongos *wild-type* e e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> nos grupos não treinado (NT) e treinado (T). Logo, foi obtida a seguinte configuração: *wild-type* NT (n=7) e T (n=6) e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> NT (n=6) e T (n=6). Os grupos T foram submetidos a quatro semanas de treinamento físico. Três dias depois da última sessão de treinamento, um 2º TVC foi aplicado para todos os camundongos. 12 horas depois, todos os camundongos foram anestesiados para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares (Figura 9).



**Figura 9:** Linha do tempo do delineamento 6



### **3.3. Procedimentos experimentais**

#### **3.3.1. Amostra**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (*wild-type* e Gp91phox<sup>-/-</sup>) com oito semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos em micro isoladores, em *rack* ventilada (Alesco, SP, Brasil) com água e ração (Presence) *ad libitum*. Todos os animais permaneceram pelo menos sete dias nas condições descritas antes de iniciarem nos procedimentos experimentais.

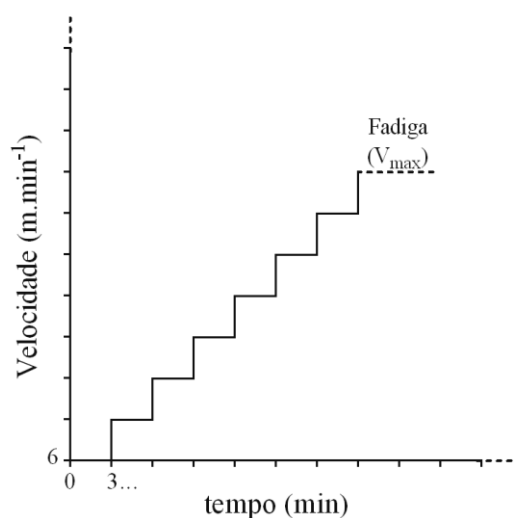
#### **3.3.2. Familiarização à corrida em esteira rolante**

Este procedimento foi realizado em esteiras diferentes (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain ou Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil) de acordo com as necessidades de cada delineamento. Todos os camundongos nos diferentes delineamentos experimentais, com exceção de animais Naive, foram familiarizados por cinco dias consecutivos a um exercício de corrida em esteira rolante para pequenos animais. Esta familiarização consistiu de 5 minutos de repouso na esteira seguidos por 5 minutos de corrida a velocidade de 10 m.min<sup>-1</sup>, e inclinação de 5°, sob leve estimulação elétrica (> 0,2 mA) pela grade localizada ao final da lona de corrida. A familiarização teve a finalidade de reduzir o estresse do animal diante de uma nova condição habitual (Lacerda *et al.*, 2005; Primola-Gomes *et al.*, 2007).

#### **3.3.3. Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (TVI)**

Este procedimento foi realizado em esteiras diferentes (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain ou Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil) de acordo com as necessidades de cada delineamento. O TVI na era iniciado a uma velocidade de

6  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ , com acréscimos de 3  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  a cada 3 minutos até a interrupção. A inclinação da esteira foi mantida em  $5^\circ$ , adaptado de Ferreira (Ferreira *et al.*, 2007) (Figura 10). Assim como no procedimento de familiarização foi utilizado o estímulo elétrico ( $> 0,2 \text{ mA}$ ). O critério adotado para interrupção do TVI foi definido como o momento no qual os camundongos eram incapazes de manterem a corrida na velocidade determinada pela esteira por pelo menos 10s, mesmo quando expostos ao estímulo elétrico.



**Figura 10:** Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (adaptado de Ferreira et al., 2007)

### 3.3.4. Medida do Consumo de Oxigênio

O  $\text{VO}_2$  foi mensurado via calorimetria indireta de circuito aberto (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain). Este equipamento foi previamente calibrado com uma mistura de gases conhecida (*high*  $\text{O}_2= 50,05\%$ , *high*  $\text{CO}_2= 1,51\%$ , *low*  $\text{O}_2= 20,02\%$  e *low*  $\text{CO}_2= 0,00\%$ ). A taxa de fluxo de ar estabelecida foi equivalente  $0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  durante todo os procedimentos. O  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  avaliado durante o TVI consistiu

no maior valor de  $VO_2$  mensurado no último estágio de corrida atingido pelo camundongo. Os dados de  $VO_2$  foram analisados utilizando um sistema computadorizado (*Metabolism software* versão 2.2.01 Panlab, Harvard Apparatus) e transformado para mililitros por minutos e relativizado pela massa corporal dos camundongos ( $mLO_2.kg^{0.75}.min^{-1}$ ). Em todas as situações, após o animal ter sido colocado na esteira, foram aguardados 20 minutos para estabilização dos parâmetros do analisador de gases antes de serem iniciadas as medidas de  $VO_2$ .

### **3.3.5. Exercício físico com intensidade de 40 ou 80% da $V_{max}$ e duração fixa ou repouso**

Este procedimento consistiu em um exercício em esteira (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain) a 40% ou 80% da  $V_{max}$  atingida no TVI para avaliação do  $VO_2$ . Os camundongos foram pesados previamente em uma balança de precisão e depois mantidos dentro da esteira por pelo menos 20 minutos antes do início do exercício nas velocidades correspondentes para cada grupo ou do repouso. No repouso os camundongos foram mantidos por pelo menos 50 minutos dentro da esteira e foi considerada para análise a medida do  $VO_2$  nos 30 minutos finais.

### **3.3.6. Teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)**

Este procedimento foi realizado em esteiras diferentes (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain ou Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil) de acordo com as necessidades de cada delineamento. O TVC consistiu em um exercício de corrida a 80% da  $V_{max}$  atingida no TVI aplicado antes do treinamento físico. A

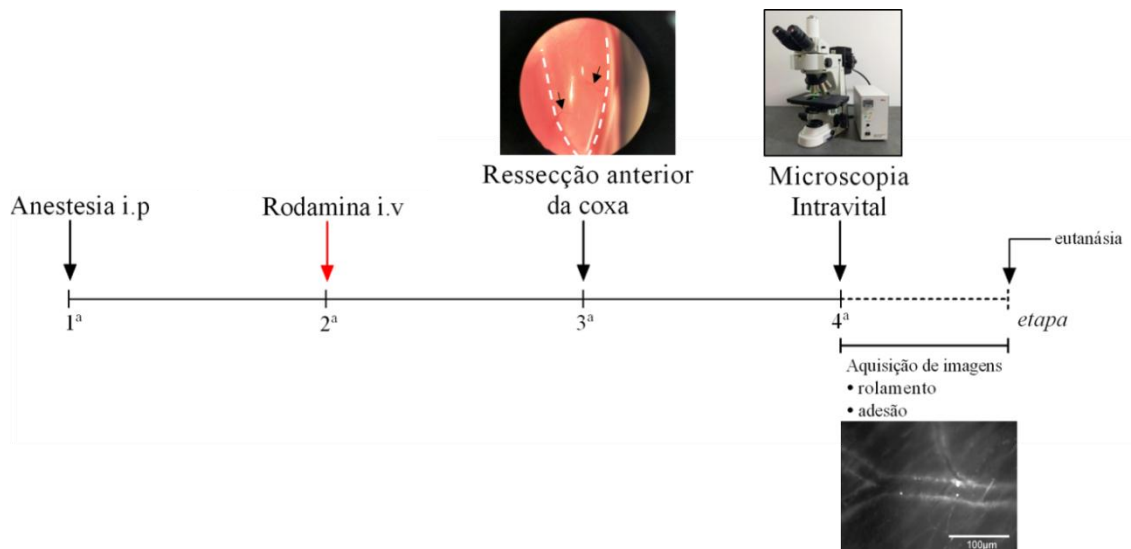
inclinação da esteira foi estabelecida em 5° e como nos demais procedimentos em esteira o estímulo elétrico foi mantido (> 0,2 mA)

### **3.3.7. Protocolo de treinamento físico**

O protocolo de treinamento de corrida em esteira (Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil) teve a frequência de cinco vezes por semana e um total de quatro semanas. A inclinação de 5° da esteira foi mantida ao longo de todo treinamento físico. Para garantir o mesmo manuseio e exposição à esteira motorizada, os camundongos não treinados foram submetidos a uma caminhada de 6m. min<sup>-1</sup> com duração máxima de cinco minutos, a qual era ajustada para menos ou mais, de acordo com o ganho ou redução da massa corporal do camundongo, respectivamente. Antes de cada sessão de treinamento os camundongos eram pesados em uma balança de precisão. A sobrecarga das sessões nas quatro semanas de treinamento foi dada pelo trabalho realizado. O trabalho de cada sessão foi o resultado da multiplicação entre massa corporal dos camundongos, aceleração da gravidade, velocidade, duração e seno do ângulo de inclinação da esteira. O trabalho definido da primeira a quarta semana de treinamento foi equivalente a 60, 70, 80 e 90% do trabalho total desempenhado no TVC, realizado antes do período de quatro semanas. A intensidade relativa do treinamento foi dada pela velocidade de corrida correspondente a 60, 70, 70 e 80% da V<sub>max</sub> alcançada no TVI, da primeira a quarta semana, respectivamente. Já em relação à manipulação do componente duração durante o treinamento, era feito um ajuste do tempo de exercício baseado na massa corporal diária dos camundongos, de acordo com o trabalho a ser realizado na sessão.

### **3.3.8. Recrutamento de leucócitos na microcirculação musculoesquelética por microscopia intravital após o exercício físico.**

Os camundongos foram anestesiados (Cetamina, 100mg/kg + Xilasina 10mg/kg) para avaliação do recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do músculo reto-femoral. Em seguida, os animais receberam uma injeção i.v. de rodamina 6G (0,3 mg.Kg<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Alemanha) para marcação fluorescente de leucócitos. Logo depois, foi feita uma ressecção na parte anterior da coxa, para exposição do músculo reto femoral. Depois disso, os animais foram posicionados em uma placa térmica a 37°C para impedir a redução da temperatura corporal devido à anestesia. Esta placa foi colocada em microscópio (Nikon eclipse 50i, Japão) com lente objetiva de 20x e câmera digital (Nikon DSQIMC, Japão) acoplada para captura e projeção de imagem de vênula pós-capilar do músculo reto-femural em monitor de computador, utilizando o programa *Imaging software* (NIS-Eements Nikon, Japão) (Figura 11). A partir daí, foi feita a quantificação dos eventos de rolamento e adesão celular. O rolamento de leucócitos foi definido como células que se moviam a uma velocidade menor que a de eritrócitos em determinado vaso. O número de leucócitos rolando foi determinado pela contagem de células, que passavam por um ponto pré-demarcado, numa região da vênula escolhida, por minuto. Já a adesão celular foi considerada quando um leucócito permanecia parado por pelo menos trinta segundos na parede do endotélio vascular, dentro do intervalo de um minuto, sendo o número de leucócitos aderidos quantificados em um trecho demarcado com 100µm de comprimento. A contagem foi feita em duplicata de maneira duplo-velada.



**Figura 11:** Etapas do procedimento de microscopia intravital para a avaliação do recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do reto femoral. As setas pretas indicam vênulas no músculo reto femoral.

### 3.3.9. Exercício agudo com intensidade e duração fixa (EF)

Os camundongos foram submetidos a um exercício de corrida em esteira (Gauotec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brasil), com intensidade a 80% da  $V_{\max}$  do TVI realizado antes do treinamento, e duração de 30 minutos. Anteriormente ao EF todos os camundongos eram pesados em uma balança de precisão. Em seguida eram colocados na esteira, onde ficavam por pelo menos cinco minutos até o início do exercício. O EF foi realizado três dias depois do TVC pós-treinamento.

### 3.3.10. Variáveis Calculadas

O trabalho no TVC foi calculado de acordo com a seguinte equação: trabalho (J) =  $mc \cdot g \cdot v \cdot \text{seno } \theta \cdot t$ , onde  $mc$ =massa corporal em kg,  $g$ =força da gravidade ( $9.8\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ),  $v$ =velocidade em  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\theta$ =inclinação da esteira ( $5^\circ$ ), e  $t$ =tempo de exercício. A intensidade das sessões de treinamento foi representada pelo  $\% V_{\max}$ , multiplicando a  $V_{\max}$  alcançada no TVI pelo percentual a ser aplicado na semana, dividido por 100. A duração (D) de cada sessão de treinamento foi estabelecida de acordo com a quantidade

requerida em minutos para atingir o trabalho definido previamente, de acordo com a equação:  $D = \text{trabalho (J)} / \text{mc.g.v. seno}\theta$ . A taxa de variação do  $\text{VO}_2$  ( $\text{mL.kg}^{0.75}.\text{min}^{-2}$ ) no TVC foi calculada da seguinte maneira:  $(\text{VO}_{2\text{final}} - \text{VO}_{2\text{inicial}}) \div t$ , onde  $t =$  tempo de exercício em minutos.

### 3.3.11. Concentração de citocinas no tecido muscular

A concentração de citocinas foi medida em homogenatos de tecido muscular (quadríceps) por técnica de *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Foram separados 100 miligramas da porção do ventre muscular (úmido) e homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 Ki aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm e a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de ELISA com diluição de 1:4. O ensaio de ELISA foi realizado conforme as instruções do fabricante (R&D System) e quantificado a partir do comprimento de onda de 492 nm adquirido em leitor de placas (Spectramax plus 384, Molecular Devices, EUA).

### 3.3.12. Migração de neutrófilos *in vitro*

Foi realizado o isolamento de neutrófilos do sangue e da medula óssea de camundongos para avaliação da capacidade migratória *in vitro* em ensaio de quimiotaxia. Este ensaio de quimiotaxia de neutrófilos foi realizado utilizando câmara de Boyden modificada (Neuroprobe, Pleasanton, EUA) e filtros de policarbonato (4 $\mu\text{m}$ ; Neuroprobe, Pleasanton, EUA) como descrito previamente por Rios-Santos em 2007 (Rios-Santos *et al.*, 2007). Como estímulo quimiotático 28 $\mu\text{L}$  de N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina (FMLP) foram utilizados. De um lado da membrana foi colocado o FMLP, e do outro, uma suspensão de  $1,0 \times 10^6$  neutrófilos/mL. Após sessenta minutos

de incubação a 37°C, o filtro foi retirado, lavado para eliminação de células não aderidas e fixado em metanol. Em seguida, as membranas foram coradas em panótico para contagem em microscópio. A verificação da purificação de neutrófilos foi feita utilizando amostra isolada de neutrófilos com albumina. A amostra foi centrifugada em aparato de Cytospin para fixação em lâmina, a qual foi, em seguida, corada em panótico. Foram selecionados cinco campos aleatórios por amostra na membrana para contagem da migração celular, a qual foi realizada por dois pesquisadores de maneira duplo-velada. Neste procedimento foram utilizados neutrófilos imaturos da medula óssea, pois a purificação de neutrófilos do sangue não foi suficiente para a realização da quimiotaxia.

### **3.3.13. Colheita sanguínea, retirada de tecido muscular e fêmur**

Os animais foram anestesiados profundamente (Cetamina, 200mg/kg + Xilasina 20mg/kg). Depois de confirmada a anestesia foi feito um corte na região abdominal. A cavidade peritoneal foi exposta e a colheita de sangue foi realizada com pipeta de Pasteur após ruptura da veia cava inferior. Depois da eutanásia, os quadríceps femorais foram divulsionados do fêmur e separados do osso por secção distal e proximal. O músculo foi imediatamente pré-congelado com gelo seco. Em seguida, os fêmures foram retirados para isolamento de células da medula óssea. O tecido muscular foi banhado em isopentano pré-resfriado a -80°C para armazenamento em freezer -80°C e posterior microtomia.



### **3.3.14. Confeção de lâminas para coloração de hematoxilina e eosina (HE)**

O quadríceps femoral esquerdo congelado foi seccionado transversalmente ao meio, sendo a metade proximal colocada em composto O.C.T (Tissue-Tek®; Sakura, Holanda) a -25°C. Quatro secções transversais de 10µm por tecido foram adquiridas em criostato (Leica CM1850, Leica Biosystems, Alemanha) e imediatamente colocadas em lâmina silanizada. Subsequentemente, as lâminas com as secções foram fixadas por 1 hora em acetona pré-resfriada a -80°C, em refrigerador -80°C. Posteriormente, as secções foram coradas com HE de acordo com técnica histológica padrão.

### **3.3.15. Observações histológicas**

Os cortes corados com HE foram avaliados histologicamente utilizando-se os critérios definidos por Rizo-Roca *et al.* 2015 (Rizo-Roca *et al.*, 2015). A ferramenta de análise é constituída de seis itens organizados em três domínios: alteração morfológica, necrose/(re) degeneração (domínio da fibra muscular), infiltração endomisial e perimisial (domínio do estado inflamatório) e distensão de endomísio e perimísio (domínio do compartimento intersticial). A alteração morfológica inclui fibras atrofiadas (fibras pequenas, anguladas e arredondadas) e com aparência inchada ou divididas. A necrose e a degeneração foram feitas pela identificação da presença de infiltrado de células inflamatórias (miofagocitose), sarcoplasma fragmentado, coloração escura (fibras hipercontraídas) e fraca coloração (fibras necróticas), enquanto a regeneração foi representada por miotubos basófilicos pequenos e miofibras azuladas com núcleo centralizado. Todos os itens foram pontuados com valor 0, 1 ou 2 indicando, ausência de dano/regeneração, dano/ regeneração moderado(a) ou severo (a),

respectivamente. O avaliador das amostras desconhecia o grupo experimental ao qual elas pertenciam.

### **3.3.16. Isolamento de células do sangue para análise de citometria**

Após a colheita de sangue, o isolamento de células foi feito por subsequente adição de PBS 1X à amostra e posterior centrifugação a 1600rpm a 4°C por 6 min.

### **3.3.17. Isolamento de células da medula óssea para análise de citometria**

Para isolamento das células da medula óssea, os fêmures de cada camundongo foram retirados e suas cabeças cortadas com lâmina de bisturi, possibilitando a inserção de uma agulha 13 x 0,38 mm para lavagem da medula com 3mL de meio RPMI incompleto gelado. Posteriormente, o líquido obtido do lavado contendo as células foi colocado em um tubo *Falcon* e centrifugado a 350 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 1mL de meio RPMI incompleto para a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Após a obtenção do lavado de medula óssea, o líquido obtido do isolamento das células nestes órgãos foi centrifugado a 350 g por 5 minutos na temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e para lise de hemácias foram acrescentados 2mL de ACK sobre o *pellet* que permaneceu 4 minutos nesta solução a 4°C. Em seguida, foi adicionado 8mL de meio RPMI+SFB 10%, centrifugado a 350 g por 5 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 1mL de meio RPMI+SFB a 10%, para contagem total em câmara de Neubauer com o corante Turk na diluição de 1:10.

### 3.3.18. Marcação das células com anticorpos para leitura no citômetro

Após o isolamento das células da medula óssea e sangue,  $1 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 300µl de meio RPMI + 10% de soro fetal bovino e distribuídas em tubos eppendorf. Após centrifugação destes tubos a 350 g, por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e sobre o pellet foram adicionados 10µl de *FC block* diluído em PBS/BSA 1%, na diluição de 1:100. Os tubos foram incubados por 20 minutos, a 4 °C, protegidos da luz. Posteriormente, foram acrescentados também sobre o pellet 10µl dos anticorpos para os marcadores extracelulares a serem analisados, previamente diluídos em PBS/BSA 1%, conforme concentração indicada nos kits. Um grupo de amostras da medula foi incluído para marcação dos controles de isotipo dos anticorpos (isotipos IgG1 e IgG2a), diluídos em PBS/BSA 1%. Todas as amostras foram posteriormente incubadas por 30 minutos, a 4 C°, protegidas da luz. Em seguida, adicionou-se, 200 µl de PBS 1X gelado, ao pellet e os tubos foram centrifugados a 350 g, por cinco minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em formaldeído 4% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente para fixação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, descartados os sobrenadantes e o *pellet* foi ressuspensado em PBS/BSA 1% para posterior leitura no citômetro. Nas amostras em que foram realizadas marcação intracelular, logo após a incubação dos anticorpos para marcação extracelular, lavagem com PBS 1X gelado e centrifugação, o sobrenadante foi descartado e sobre o *pellet* foram adicionados 150µl/tubo de tampão de permeabilização (BD: Becton Dickinson and Company, EUA) e as amostras foram incubadas por trinta minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, centrifugou-se e adicionou-se 20µl/tubo dos anticorpos para marcação

intracelular diluídos em tampão de permeabilização nas concentrações previamente padronizadas. As amostras foram incubadas por 45 minutos e em seguida foram adicionados 200µl/tubo de PBS 1X gelado. Os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes foram descartados e o pellet foi ressuspensionado em formaldeído 4% e incubado por trinta minutos à temperatura ambiente para fixação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, descartados os sobrenadantes e o pellet foi ressuspensionado em PBS/BSA 1% para posterior leitura no citômetro de fluxo (BD Acuri C6, BD Biosciences). Os seguintes anticorpos foram utilizados para marcação das células: CD3 (Alexa 488), CD4 (APC), CD8 (PE), CD11b (Alexa 488) e Ly6G (APC). Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France). A frequência de células positivas foi analisada usando gates específicos para as populações de interesse: linfócitos, granulócitos e macrófagos. Os limites dos quadrantes foram estabelecidos baseados nas populações negativas e controles de isótipo. As células foram adquiridas por citometria e analisadas por meio do programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc.). Para construção dos gráficos, foram utilizadas as frequências das células (porcentagens) no total de eventos adquiridos (mínimo de 30.000 eventos/amostra).

### **3.3.19. Eutanásia**

Os camundongos foram eutanasiados sob o efeito de anestesia profunda (Cetamina, 200mg/kg + Xilasina 20mg/kg) devido aos procedimentos de colheita sanguínea.

### 3.3.20. Análise estatística

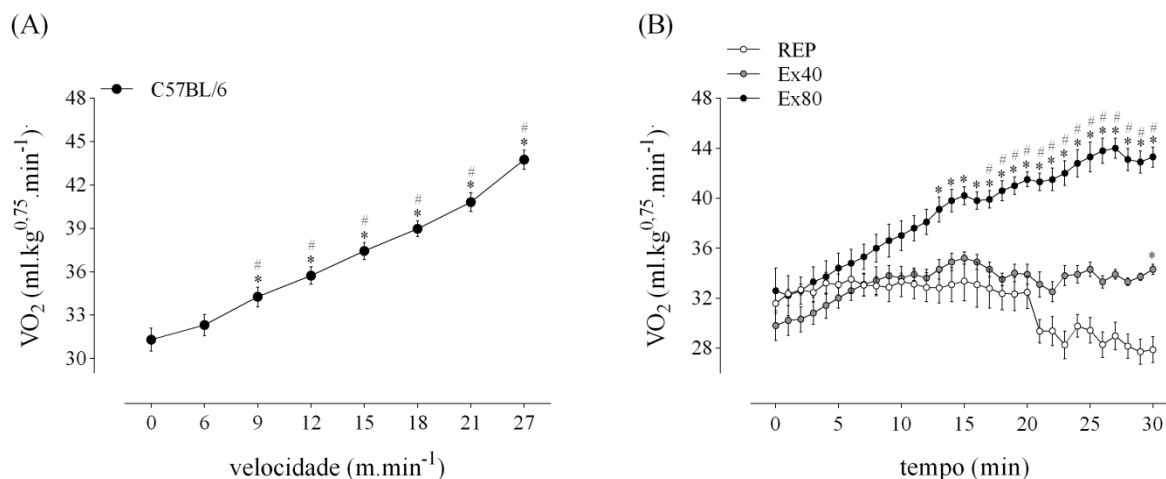
Nas comparações de variáveis ao longo do tempo ( $VO_2$ ) considerando somente o fator tempo foi utilizada ANOVA *one-way* com medidas repetidas. Para comparações com entre mais de dois grupos com apenas um fator de variação foi utilizada ANOVA *one-way* (concentração de citocinas, rolamento e adesão de leucócitos dos grupos REP, Ex40 e Ex80; migração de neutrófilos nos grupos REP e Ex80; rolamento e adesão de leucócitos dos grupos Naive, NT e T; rolamento e adesão de leucócitos dos grupos Naive, WT e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>) No caso de comparações que incluíram os fatores grupo e tempo ( $VO_2$  no REP, Ex40 e Ex80;  $VO_2$  pré e pós treinamento;  $VO_2$  pico pré e pós treinamento;  $V_{max}$  pré e pós treinamento; trabalho pré e pós treinamento; taxa de variação do  $VO_2$  pré e pós treinamento; rolamento e adesão de leucócitos dos camundongos WT e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> dos grupos NT e T) foi utilizada ANOVA *two-way*. Para as comparações entre duas médias ( $\Delta VO_{2pico}$ ; perfil celular no sangue e medula dos grupos NT e T e *score* inflamatório dos grupos NT e T) foi utilizado teste *t-Student*. Nos casos, em que foi observado valor significativo de *F*, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey. Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 5\%$ . O programa estatístico utilizado foi o *GraphPad Prism 6*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Delineamento experimental 1

#### 4.1.1. Efeito da intensidade do exercício sobre o VO<sub>2</sub>

O VO<sub>2</sub> dos camundongos durante a corrida no TVI aumentou progressivamente, a partir do segundo estágio, o qual corresponde à velocidade de 9 m.min<sup>-1</sup>, até a fadiga ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 1A). O VO<sub>2pico</sub> foi considerado o maior valor estimado no último estágio do TVI. O valor do VO<sub>2pico</sub> foi de  $43,8 \pm 0,63 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$  e a V<sub>max</sub> alcançada foi de  $27 \pm 0,7 \text{ m.min}^{-1}$ . A V<sub>max</sub> foi a variável de referência para a prescrição do exercício agudo de 30 minutos. Nesta ocasião, foi feita a comparação entre os três grupos experimentais: REP, Ex40 e Ex80. Foram verificadas interação ( $p < 0,0001$ ) e diferença significativa entre os fatores grupo (REP, Ex40 e Ex80;  $p < 0,0001$ ) e momento (tempo em minutos;  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 1B). O VO<sub>2</sub> do grupo Ex80 foi maior a partir do 13º minuto de exercício em comparação ao repouso (REP:  $33,1 \pm 1,4 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Ex80:  $39,1 \pm 1,0 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) e a partir do 19º comparado ao grupo Ex40 (Ex40:  $33,9 \pm 0,8 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Ex80:  $41,5 \pm 0,6 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ) até o final do exercício (REP:  $27,9 \pm 1,0 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Ex40:  $34,3 \pm 0,4 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Ex80:  $43,3 \pm 0,8 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Entre os grupos Ex40 e REP foi verificada diferença significativa no VO<sub>2</sub> no último minuto (REP:  $27,9 \pm 1,0 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Ex40:  $34,3 \pm 0,4 \text{ mL.Kg}^{0,75} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ).

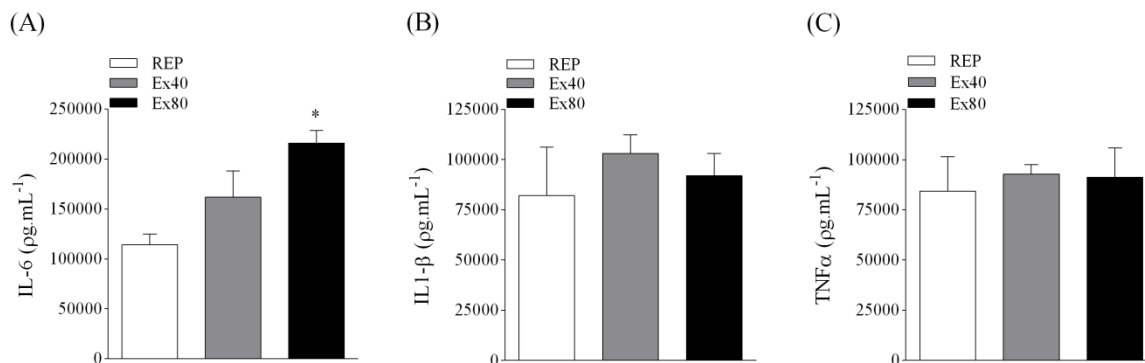


**Gráfico 1:** Em A,  $VO_2$  antes (velocidade  $0 \text{ m.min}^{-1}$ ) e em cada velocidade nos estágios de três minutos até a fadiga. Os círculos pretos representam os valores de  $VO_2$  de 16 camundongos C57BL/6. \* representa diferença significativa em relação ao momento pré-teste (velocidade  $0 \text{ m.min}^{-1}$ ). # representa diferença significativa em relação ao estágio anterior. Em B,  $VO_2$  logo antes (minuto zero) e durante 30 minutos dos três grupos experimentais REP (círculo branco;  $n=5$ ), Ex40 (círculo cinza;  $n=5$ ) e Ex80 (círculo preto;  $n=6$ ). \* representa diferença significativa comparada ao repouso. # representa diferença significativa em comparação ao grupo Ex40. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.1.2. Efeito da intensidade do exercício sobre concentração de citocinas

O grupo Ex80 apresentou maior concentração de IL-6 no tecido muscular avaliada 12 horas após a realização do exercício comparado ao grupo REP (REP:  $1,14 \times 10^5 \pm 0,09 \times 10^5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex80:  $2,17 \times 10^5 \pm 0,11 \times 10^5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ). Porém, não houve diferença nas concentrações de IL-6 entre os grupos Ex40 e Ex80 (Ex40:  $1,62 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex80:  $2,17 \times 10^5 \pm 0,11 \times 10^5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). (Gráfico 2A). Além disso, não foi verificada diferença entre os grupos experimentais nas concentrações de IL-1 $\beta$  (REP:  $8,21 \times 10^4 \pm 0,21 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex40:  $10,3 \times 10^4 \pm 0,81 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex80:  $9,2 \times 10^4 \pm 0,96 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p = 0,673$ ) (Gráfico 2B) e TNF $\alpha$  (REP:  $8,44 \times$

$10^4 \pm 0,15 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex40:  $9,28 \times 10^4 \pm 0,04 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ; Ex80:  $9,13 \times 10^4 \pm 0,13 \times 10^4 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p = 0,894$ ) (Gráfico 2C).



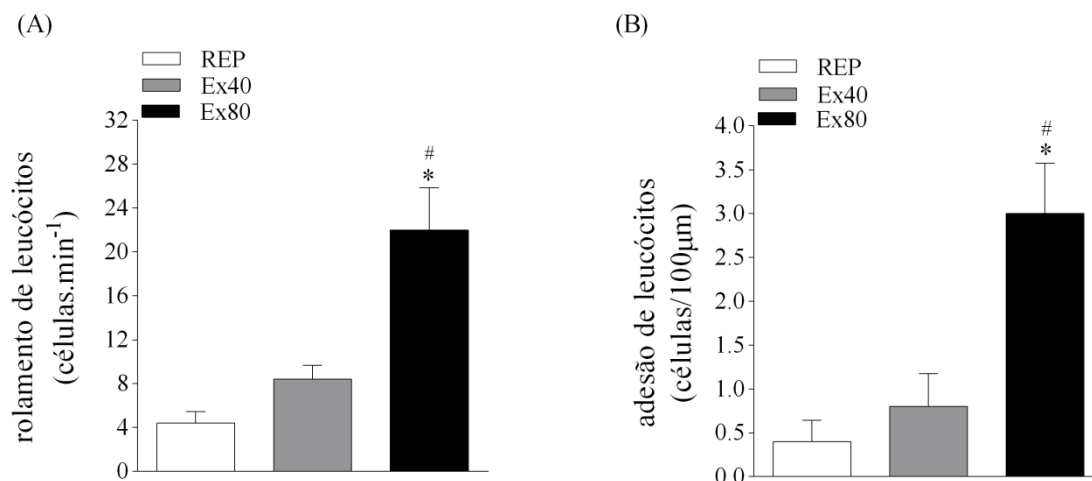
**Gráfico 2:** Concentrações de IL-6 (A), IL1-β (B) e TNFα (C) na musculatura do quadríceps nos grupos REP (barra branca; n=4), Ex40 (barra cinza; n=4) e Ex80 (barra preta; n=4). \* representa diferença significativa comparada ao grupo REP. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.1.3. Efeito da intensidade de exercício sobre o recrutamento de leucócitos no músculo esquelético

O exercício de maior intensidade, representado pelo grupo Ex80, apresentou maior rolamento de leucócitos em vênulas pós-capilares no reto-femoral em comparação aos grupos Ex40 (Ex40:  $8,3 \pm 1,1 \text{ células.min}^{-1}$ ; Ex80:  $22,0 \pm 3,5 \text{ células.min}^{-1}$ ) e REP (REP:  $4,3 \pm 1,1 \text{ células.min}^{-1}$ ; Ex80:  $22,0 \pm 3,5 \text{ células.min}^{-1}$ ). Entretanto, não houve diferença entre os grupos Ex40 e REP (REP:  $4,3 \pm 1,1 \text{ células.min}^{-1}$ ; Ex40:  $8,3 \pm 1,1 \text{ células.min}^{-1}$ ) (Gráfico 3A). Além disso, a adesão de leucócitos também foi maior no grupo Ex80 comparada aos demais grupos REP (REP:  $0,2 \pm 0,1 \text{ células/100}\mu\text{m}$ ; Ex80:  $2,7 \pm 0,5 \text{ células/100}\mu\text{m}$ ) e Ex40 (Ex40:  $0,8 \pm 0,3 \text{ células/100}\mu\text{m}$ ; Ex80:  $2,7 \pm 0,5 \text{ células/100}\mu\text{m}$ ). Porém, assim como na resposta de



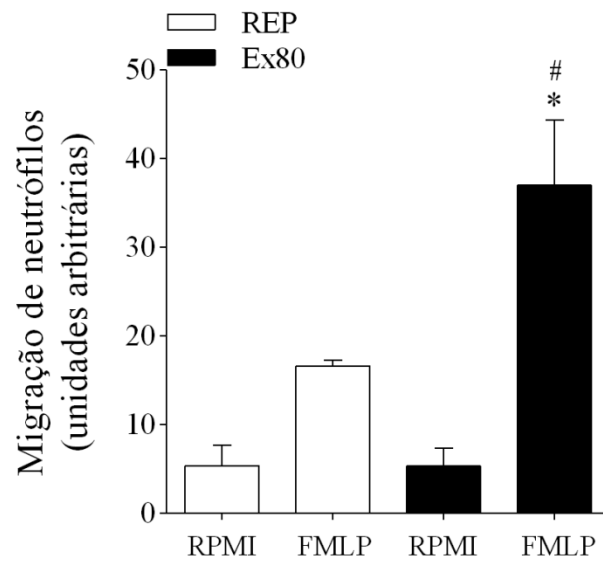
rolamento celular, a adesão não se diferenciou entre os grupos Ex40 e REP (REP:  $0,2 \pm 0,1$  células/100 $\mu\text{m}$ ; Ex40:  $0,8 \pm 0,3$  células/100 $\mu\text{m}$ ) (Gráfico 3B).



**Gráfico 3:** Rolamento (A) e adesão de leucócitos (B) em vênulas pós-capilares do quadríceps nos grupos REP (barra branca; n=5), Ex40 (barra cinza; n=5) e Ex80 (barra preta; n=6). \* representa diferença significativa comparada ao grupo REP. # representa diferença significativa em comparação ao grupo Ex40. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.1.4. Efeito do exercício sobre a migração *in vitro* de neutrófilos

O estímulo com o agente quimiotático FMLP não aumentou a migração de neutrófilos comparado à situação com RPMI no grupo REP (REP RPMI:  $5,1 \pm 2,0$  u.a; REP FMLP:  $16,7 \pm 0,7$  u.a). Entretanto, a migração de neutrófilos foi maior no grupo Ex80 quando estimulados com FMLP comparada à situação com RPMI (Ex80 RPMI:  $5,3 \pm 1,7$  u.a Ex80 FMLP:  $36,7 \pm 6,0$  u.a;  $p < 0,01$ ). Além disso, o aumento de migração *in vitro* de neutrófilos imaturos da medula induzido por FMLP no grupo Ex80 foi maior do que no grupo REP (REP FMLP:  $16,7 \pm 0,7$  u.a; Ex80 FMLP:  $36,7 \pm 6,0$  u.a;  $p < 0,01$ ).

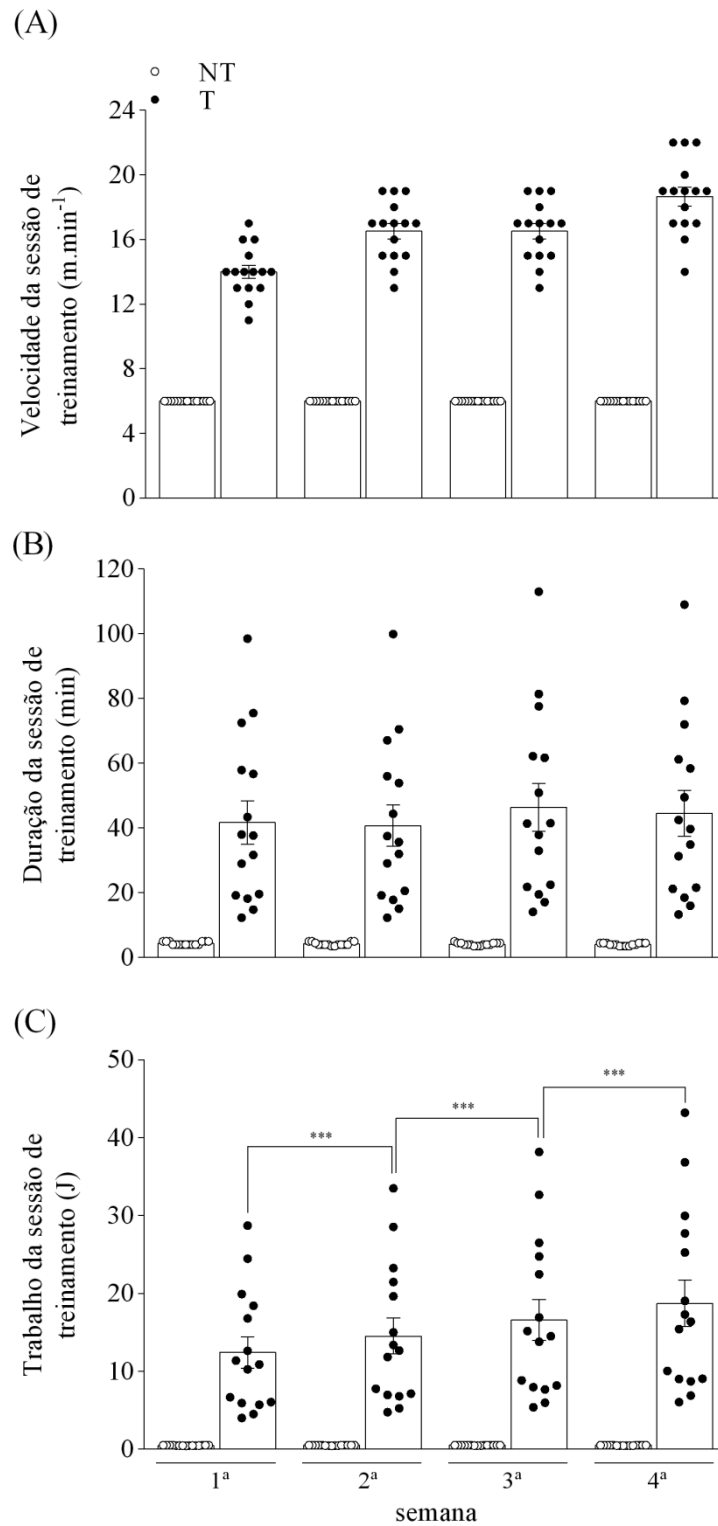


**Gráfico 4:** Migração *in vitro* de neutrófilos isolados da medula de camundongos dos grupos REP (barra branca; n=3) e Ex80 (barra preta; n=3). Os neutrófilos dos dois grupos foram incubados com estímulo quimiotático FMLP ou com RPMI. \* representa diferença significativa comparada ao REP FMLP. # representa diferença significativa em comparação ao Ex80 RPMI. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## **4.2. Delineamento experimental 2**

### **4.2.1. Características da sobrecarga de treinamento físico s**

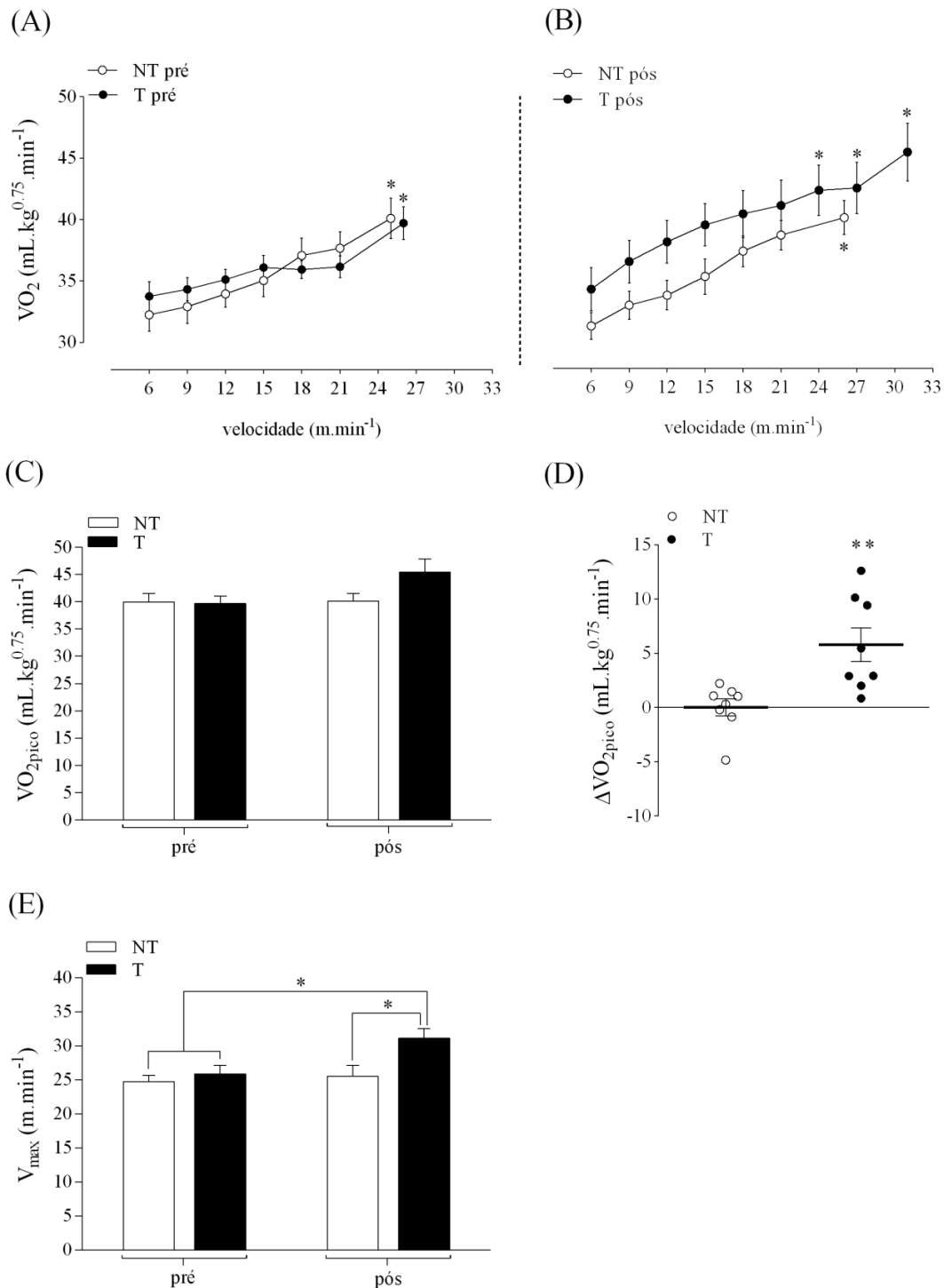
Como planejado, as quatro semanas de treinamento físico foram caracterizadas por um aumento progressivo no trabalho (1<sup>a</sup> semana:  $12,4 \pm 1,9J$ ; 2<sup>a</sup> semana:  $14,5,0 \pm 2,2J$ ; 3<sup>a</sup> semana:  $16,6 \pm 2,6J$  e 4<sup>a</sup> semana:  $18,7 \pm 2,9J$ ) (Gráfico 5C).



**Gráfico 5:** Característica da sobrecarga durante o protocolo de treinamento. Velocidade (A), duração (B) e trabalho (C) das sessões ao longo das quatro semanas nos grupos NT (círculo branco,  $n=15$ ) e T (círculo preto,  $n=15$ ). \*\*\* representa  $p < 0.001$  entre as semanas de treinamento físico. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

#### 4.2.2. Efeito do treinamento físico sobre o desempenho no teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (TVI)

Como esperado, não houve diferença no  $\text{VO}_2$  no início do TVI entre os grupos, pré (NT,  $32,25 \pm 1,23 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T,  $33,75 \pm 1,05 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) ou pós treinamento físico (NT,  $31,26 \pm 1,03 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T,  $34,27 \pm 1,66 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) (Fig. 17A e B, respectivamente). Além disso, o TVI foi capaz de induzir aumento no  $\text{VO}_2$ , evidenciado pelo valor do  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  comparado ao valor inicial para todos os grupos nos diferentes momentos (Gráfico 6A e B). O  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  avaliado pelo TVI não apresentou diferença inter-grupo, pré (NT,  $40,10 \pm 1,52 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T,  $39,70 \pm 1,16 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ), e pós-treinamento (NT,  $40,12 \pm 1,30 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T,  $45,50 \pm 2,20 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) (Gráfico 6C). Entretanto, a variação do  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  no TVI, da situação pré para pós-treinamento físico, foi maior no grupo T em comparação ao grupo NT (NT,  $0,02 \pm 0,72 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T,  $5,79 \pm 1,45 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) (Gráfico 6D). Adicionalmente, o efeito do protocolo de treinamento físico foi evidente quando avaliada a  $V_{\text{max}}$  no TVI. A  $V_{\text{max}}$  aumentou no grupo T após o treinamento, comparada ao grupo NT (NT,  $25,5 \pm 1,5 \text{ m.min}^{-1}$ ; T,  $31,1 \pm 1,3 \text{ m.min}^{-1}$ ) (Gráfico 6E). Esta melhora no desempenho físico foi também observada pelo aumento de 20% na velocidade alcançada no TVI pelo grupo T quando comparado pré (T,  $25,9 \pm 1,1 \text{ m.min}^{-1}$ ) e pós-treinamento físico (T,  $31,1 \pm 1,3 \text{ m.min}^{-1}$ ).



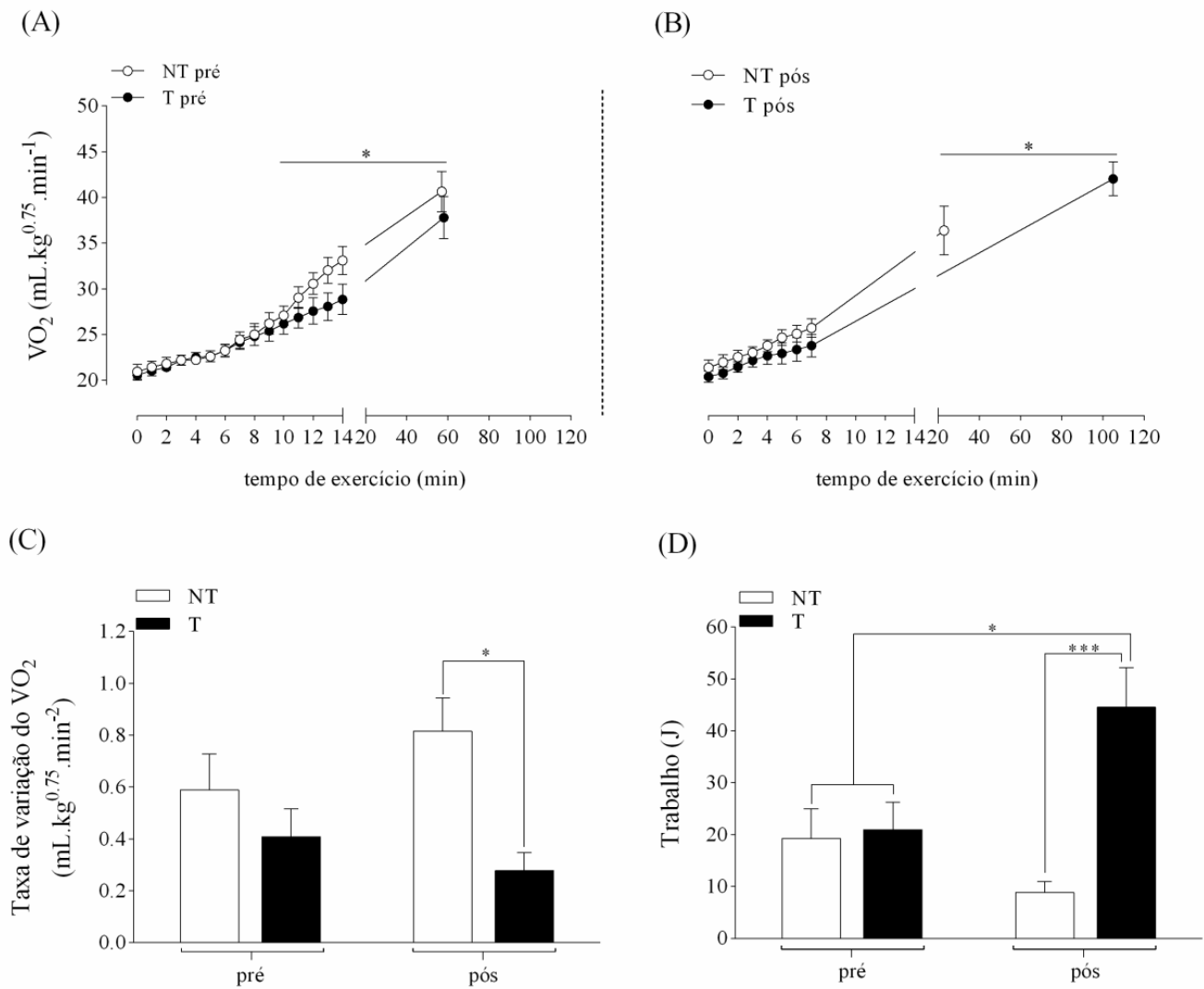
**Gráfico 6:** Desempenho físico no TVI. O  $VO_2$  nos grupos NT (círculo branco, n=8) e T (círculo preto, n=8) durante o TVI em dois momentos, pré (A) e pós-treino físico (B). Os dados foram analisados em conjunto, considerando momento e grupo, apesar de serem mostrados em diferentes painéis. \* indica diferença significativa em comparação ao primeiro estágio de 6m.min<sup>-1</sup>. O  $VO_{2peak}$  alcançado pelos grupos NT (barra branca, n=8) e T (barra preta, n=8) em dois momentos: pré e pós-treino físico (C). A variação do  $VO_{2pico}$  nos grupos NT (círculo branco, n=8) e T (círculo preto, n=8) (D). \*\* representa  $p < 0,01$  entre os grupos. A  $V_{max}$  nos grupos NT (barra branca, n=8) e T (barra preta, n=8) em dois momentos: pré e pós-treino físico (E). \* representa  $p < 0,05$ . Todos os dados estão expressos com média  $\pm$  EPM.

#### 4.2.3. Efeito do treinamento físico no desempenho no teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)

O TVC pré-treinamento físico permitiu uma distribuição homogênea dos grupos experimentais em relação ao  $\text{VO}_2$  e à capacidade de corrida (Gráfico 7A). Como evidenciado, o  $\text{VO}_2$  no repouso (NT:  $20,9 \pm 0,7 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $20,6 \pm 0,5 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ) e na fadiga (NT:  $40,6 \pm 2,0 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $37,8 \pm 2,1 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ) não foram diferentes entre os grupos no momento pré-treinamento físico (Gráfico 7A). Como esperado, o  $\text{VO}_2$  dos camundongos aumentou devido ao exercício nos momentos pré e pós-treinamento físico (Gráfico 7A e B), já que a velocidade de corrida do TVC representou 80% da  $V_{\text{max}}$  mensurada no TVI realizado antes do treinamento físico. Na situação pré-treinamento, este aumento do  $\text{VO}_2$  foi evidenciado a partir do 10º minuto de exercício físico (NT:  $27,1 \pm 1,0 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $26,2 \pm 1,0 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ) em comparação ao minuto zero (NT:  $20,9 \pm 0,7 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $20,6 \pm 0,5 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ). Já, na situação pós-treinamento, a comparação do  $\text{VO}_2$  no TVC entre os grupos foi possível do minuto zero até o 7º minuto e no momento da fadiga, por serem os momentos que incluem todos os camundongos. Logo, foi demonstrado um maior  $\text{VO}_2$  para ambos os grupos no momento da fadiga (NT:  $36,3 \pm 2,4 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $41,9 \pm 1,7 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ) em comparação ao minuto zero ((NT:  $21,4 \pm 0,8 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $20,4 \pm 0,6 \text{ mL.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ ). Ao mesmo tempo, todos os grupos apresentaram trabalho similar no TVC pré-treinamento físico (NT:  $19,3 \pm 4,8\text{J}$ ; T:  $21,0 \pm 5,3\text{J}$ ) (Gráfico 7D). Além disso, o treinamento físico, baseado na manipulação relativa do trabalho, foi eficiente em aumentar o desempenho dos animais ao final das quatro semanas. Como demonstrado, o trabalho avaliado após as quatro semanas de treinamento foi maior no grupo T em comparação ao grupo NT (NT:  $8,8 \pm 2,1\text{J}$ ; T:  $44,6 \pm 7,6\text{J}$ ;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 7D).

Apesar deste aumento no desempenho representado pelo maior trabalho realizado no TVC, não houve diferença no  $\text{VO}_2$  no momento da fadiga entre os grupos NT e T pré (NT:  $40,6 \pm 2,4 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $37,8 \pm 2,1 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) e pós-treinamento físico (NT:  $36,3 \pm 2,4 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ; T:  $41,9 \pm 1,7 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-1}$ ) (Gráfico 7B). Todavia, a taxa de variação do  $\text{VO}_2$ , um índice de desempenho que considera o tempo total de exercício, foi menor durante o TVC no grupo T comparada ao grupo NT após as quatro semanas de treinamento físico (NT:  $0,82 \pm 0,12 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-2}$ ; T:  $0,28 \pm 0,07 \text{ mL.kg}^{0,75}.\text{min}^{-2}$ ;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 7C).

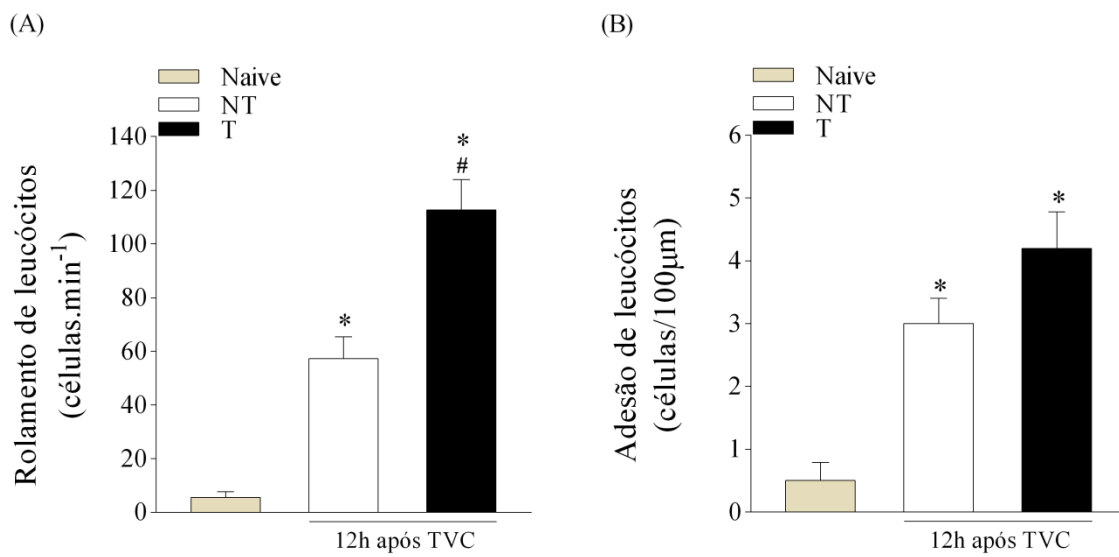




**Gráfico 7:** Desempenho físico no TVC. VO<sub>2</sub> ao longo do TVC nos grupos NT (círculo branco, n=7) e T (círculo preto, n=7) pré (A) e pós-treinamento físico (B). \* representa  $p < 0.05$  em comparação ao minuto zero. A taxa de variação do VO<sub>2</sub> do início até a fadiga no TVC nos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=7) pré e pós-treinamento físico (C). \* representa  $p < 0,05$ . O trabalho (J) realizado pelos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=7) pré e pós-treinamento físico (D). \* representa  $p < 0,05$  e \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

#### **4.2.4. Efeito do treinamento físico sobre o recrutamento de leucócitos no musculoesquelético após o teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC).**

Como já evidenciado, o exercício físico por si só, foi capaz de aumentar o recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar no músculo esquelético. O rolamento de leucócitos foi maior no grupo NT em comparação ao Naive (Naive:  $5,5 \pm 2,0$  células.min<sup>-1</sup>; NT:  $50,7 \pm 2,0$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 8A). E ainda, a adesão de leucócitos nestas vênulas aumentou em camundongos exercitados do grupo NT em comparação àqueles não exercitados (Naive:  $0,5 \pm 0,3$  células. min<sup>-1</sup>; NT:  $3,0 \pm 0,4$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ). Além disso, foi verificado que o treinamento físico induziu aumento no recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar doze horas após o exercício até a fadiga. Os camundongos treinados (grupo T) apresentaram maior rolamento de leucócitos em vênulas pós-capilares no músculo esquelético comparado tanto ao grupo não exercitado (Naive) (Naive:  $5,5 \pm 2,0$  células.min<sup>-1</sup>; T:  $111,8 \pm 10,1$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,0001$ ), quanto ao grupo NT (NT:  $50,7 \pm 2,0$  células.min<sup>-1</sup>; T:  $111,8 \pm 10,1$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 8A). Adicionalmente, no grupo T a adesão de leucócitos também foi aumentada em comparação ao Naive (Naive:  $0,5 \pm 0,3$  células/100 $\mu$ m; T:  $3,8 \pm 0,5$  células/100 $\mu$ m;  $p < 0,001$ ). Porém, não foi verificada diferença na adesão celular entre os grupos T e NT (NT:  $3,0 \pm 0,4$  células. min<sup>-1</sup>; T:  $3,8 \pm 0,5$  células/100 $\mu$ m) (Gráfico 8B).

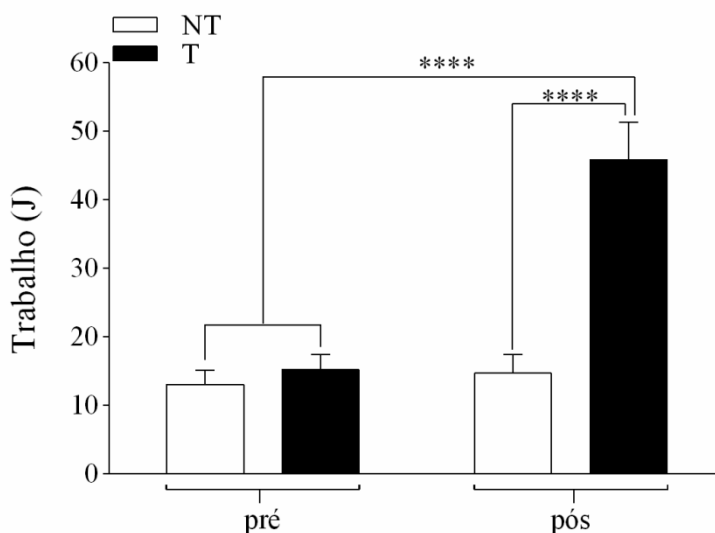


**Gráfico 8:** Recrutamento celular em vênula pós-capilar do musculoesquelético em camundongos Naive e doze horas após o exercício até a fadiga nos grupos NT e T. Rolamento de leucócitos em vênula pós-capilar em camundongos Naive (barra bege, n=4), grupo NT (barra branca, n=4) e grupo T (barra preta, n=5) (A). \* representa  $p < 0,01$  em relação ao grupo Naive. # representa  $p < 0,01$  em relação ao grupo NT. Adesão de leucócitos em vênula pós-capilar em camundongos Naive (barra bege, n=4), grupo NT (barra branca, n=4) e grupo T (barra preta, n=5) (B). \* representa  $p < 0,01$  em relação ao grupo Naive. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

### 4.3. Delineamento experimental 3

#### 4.3.1. Efeito do treinamento físico sobre o desempenho no teste de velocidade constante até a fadiga (TVC)

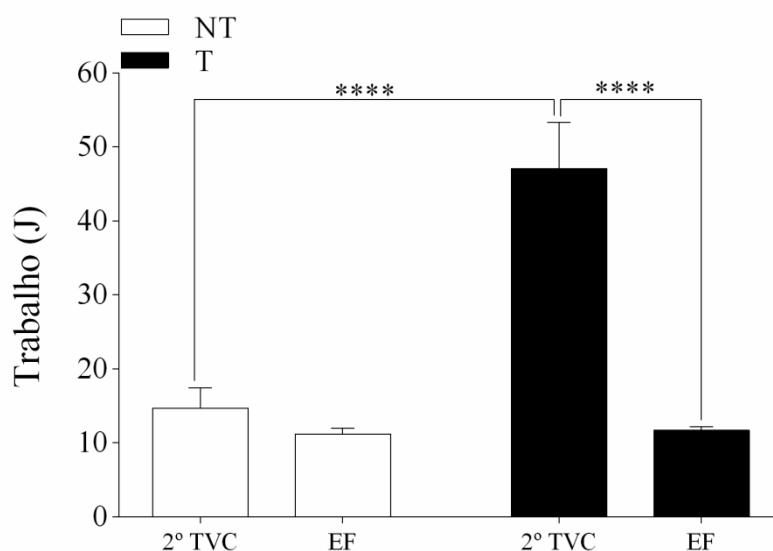
O TVC, realizado antes do treinamento físico, proporcionou uma distribuição homogênea quanto ao desempenho dos camundongos em cada grupo experimental (NT:  $13,1 \pm 1,9\text{J}$ ; T:  $16,0 \pm 2,3\text{J}$ ;  $p < 0,001$ ). O protocolo de treinamento físico, padronizado neste estudo, induziu um aumento no desempenho, como evidenciado pelo maior trabalho no TVC realizado pelo grupo T em comparação ao grupo NT, após quatro semanas (NT:  $14,7 \pm 2,2\text{J}$ ; T:  $47,1 \pm 5,8\text{J}$ ;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 9). Esta melhora na capacidade de corrida após o treinamento físico correspondeu a um aumento de 293% no trabalho realizado no TVC.



**Gráfico 9:** Desempenho físico no teste de velocidade constante até a fadiga. Trabalho (J) realizado pelos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=7) pré e pós-treinamento físico. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

### 4.3.3. Relação entre o desempenho no teste de velocidade constante até a fadiga (TVC) e o trabalho realizado no exercício de duração e intensidade fixa (EF) após o treinamento físico

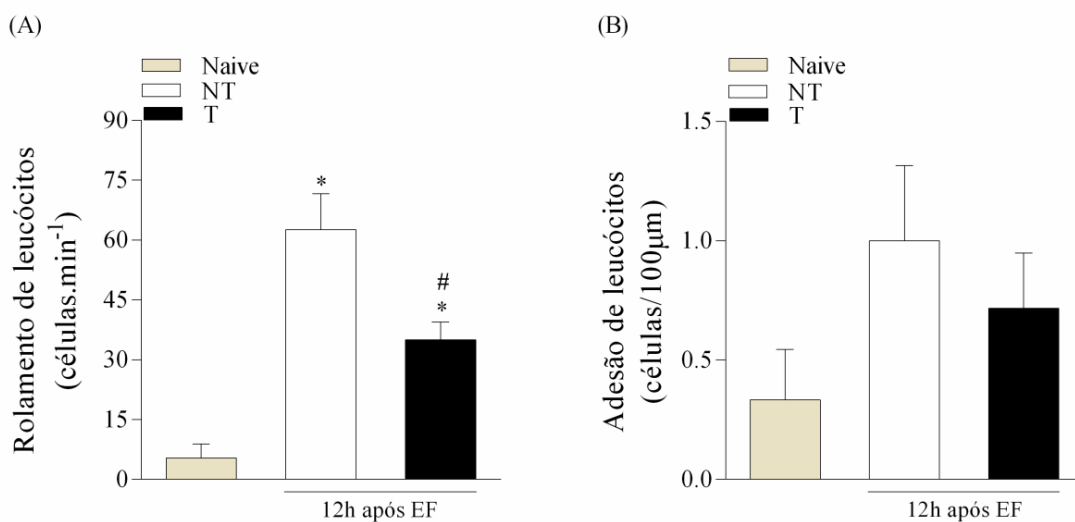
Três dias após a realização do TVC, os camundongos foram submetidos ao EF. O grupo NT não apresentou diferença significativa no trabalho entre o 2º TVC e o EF (2º TVC:  $14,7 \pm 2,5\text{J}$ ; EF:  $11,2 \pm 0,7\text{J}$ ). Porém, devido ao aumento do trabalho induzido pelo treinamento físico, o trabalho no EF realizado pelo grupo T foi menor em comparação ao trabalho deste mesmo grupo no 2º TVC (2º TVC:  $47,1 \pm 5,8\text{J}$ ; EF:  $11,7 \pm 0,4\text{J}$ ;  $p < 0,0001$ ). O trabalho no EF representou 76% em relação àquele realizado no 2º TVC para o grupo NT. No entanto, para o grupo T este percentual foi de 25% (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Comparação entre o trabalho realizado no TVC pós-treinamento físico e no EF. O trabalho (J) realizado pelos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=7) no 2º TVC (depois do treinamento) e no EF. \*\*\*\* representa  $p < 0,0001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

#### 4.3.4. Efeito do treinamento físico sobre o recrutamento de leucócitos no músculoesquelético após o exercício de duração e intensidade fixa (EF).

O EF foi capaz de aumentar o rolamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do reto-femural avaliado 12 horas depois, tanto no grupo NT (Naive:  $5,3 \pm 1,3$  células. $\text{min}^{-1}$ ; NT:  $62,6 \pm 8,1$  células. $\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,0001$ ), quanto no grupo T (Naive:  $5,3 \pm 1,3$  células. $\text{min}^{-1}$ ; T:  $35,0 \pm 4,1$  células. $\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ). Por outro lado, este aumento foi menor em camundongos treinados em relação a não treinados (NT:  $62,6 \pm 8,1$  células. $\text{min}^{-1}$ ; T:  $35,0 \pm 4,1$  células. $\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 11A). Apesar disto, não foi evidenciada diferença na adesão de leucócitos entre os grupos experimentais (Naive:  $0,3 \pm 0,2$  células/ $100\mu\text{m}$ ; NT:  $1,0 \pm 0,3$  células/ $100\mu\text{m}$ ; T:  $0,7 \pm 0,2$  células/ $100\mu\text{m}$ ;  $p = 0,209$ ) (Gráfico 11B).

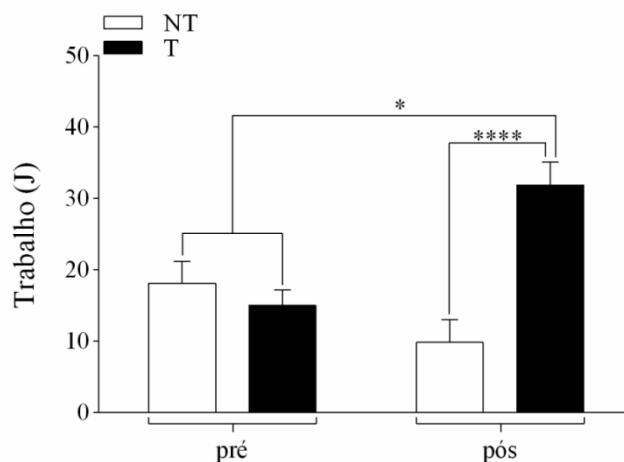


**Gráfico 11:** Recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilar do músculoesquelético em camundongos Naive e doze horas após o EF nos grupos NT e T. Rolamento de leucócitos em vênula pós-capilar em camundongos Naive (barra bege, n=6), grupo NT (barra branca, n=5) e grupo T (barra preta, n=6) (A). \* representa diferença em relação ao grupo Naive. # representa  $p < 0,001$  em relação ao NT. Adesão de leucócitos em vênula pós-capilar em camundongos Naive (barra bege, n=6), grupo NT (barra branca, n=5) e grupo T (barra preta, n=6) (B). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

#### **4.4. Delineamento experimental 4**

##### **4.4.1. Efeito do treinamento físico sobre o desempenho no teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)**

Como esperado, o treinamento físico estabelecido neste estudo foi novamente capaz de induzir um aumento na capacidade de trabalho dos camundongos (Gráfico 12). O TVC realizado pré-treinamento, como já relatado anteriormente, permitiu uma distribuição homogênea dos grupos, quanto à capacidade de corrida, para este delineamento experimental (NT:  $18,1 \pm 2,8J$ ; T:  $14,1 \pm 2,0J$ ). Após as quatro semanas, o trabalho no TVC do grupo T foi maior em relação ao trabalho realizado, por este mesmo grupo (T antes:  $14,1 \pm 2,0J$ ; T depois:  $31,7 \pm 3,2J$ ;  $p < 0,05$ ) e em relação ao grupo NT (NT:  $18,1 \pm 2,8J$ ; T:  $31,7 \pm 3,2J$ ;  $p < 0,05$ ) antes do treinamento. Além disso, o efeito do treinamento sobre o desempenho foi evidenciado por um maior trabalho do grupo T em comparação ao grupo NT, após quatro semanas (NT:  $9,8 \pm 2,8J$ ; T:  $31,7 \pm 3,2J$ ;  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, o grupo T obteve um aumento percentual no desempenho de 223% quando considerado o desempenho antes e depois do treinamento físico. Porém, o grupo NT apresentou uma redução de 54% no trabalho realizado no TVC.



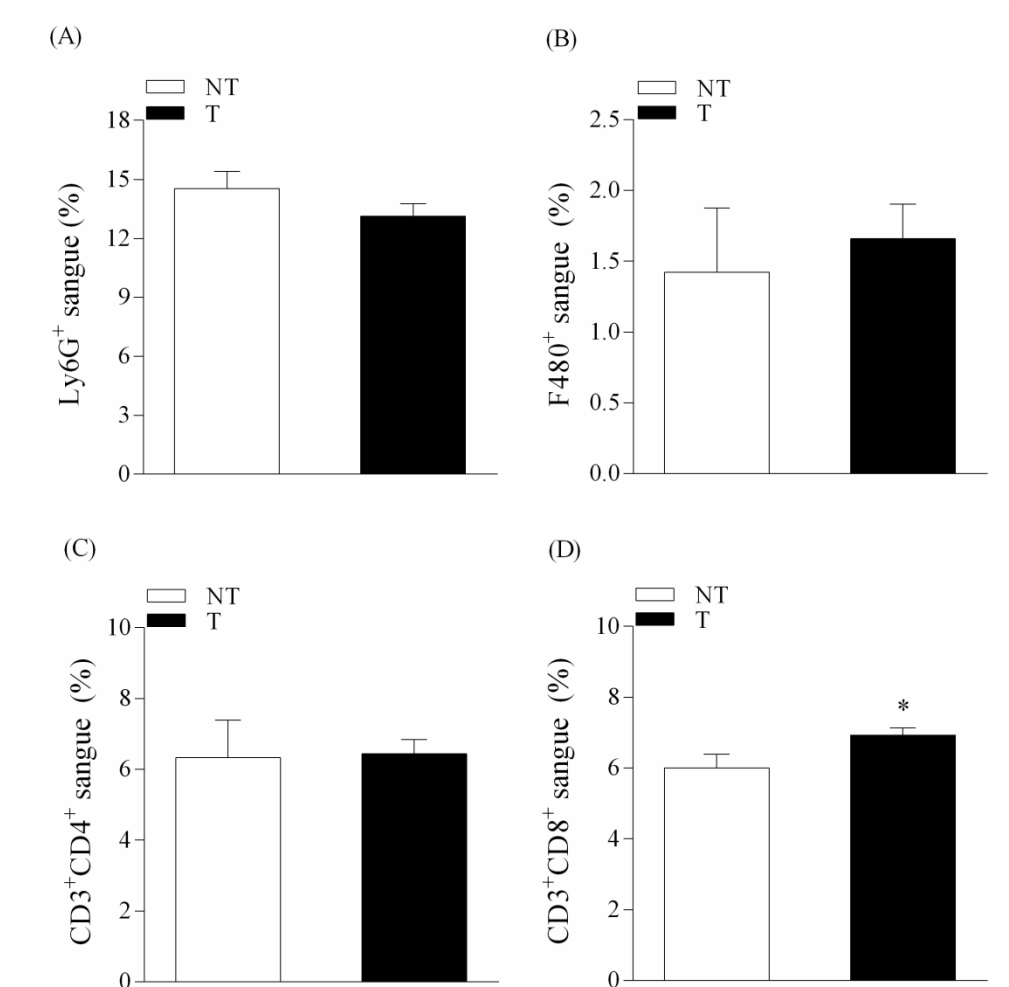
**Gráfico 12:** Desempenho físico no teste de velocidade constante até a fadiga. O trabalho (J) realizado pelos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=8) nos dois momentos: antes e depois do protocolo de treinamento físico. \* representa  $p < 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

#### 4.4.2. Efeito do treinamento físico sobre o perfil celular no sangue e na medula após o teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)

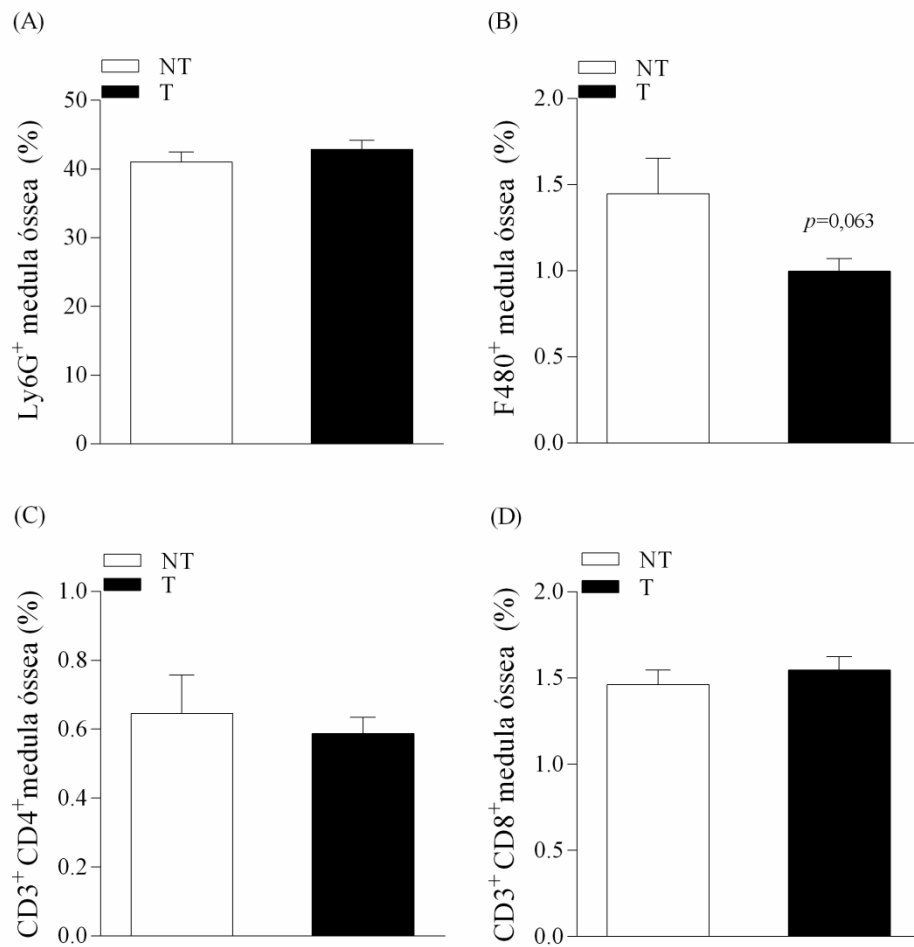
A análise do perfil celular, por citometria de fluxo, demonstrou uma maior quantidade de linfócitos T  $CD3^+CD8^+$  no sangue de animais treinados comparada a não treinados, 72 horas após o TVC realizado ao final do treinamento físico (NT:  $6,0 \pm 0,4\%$ ; T:  $6,9 \pm 0,2\%$ ;  $p = 0,048$ ) (Gráfico 13D). Para as demais células avaliadas no sangue não foram encontradas diferenças entre os grupos treinados e não treinados ( $Ly6G^+$ , NT:  $14,5 \pm 0,8\%$ ; T:  $13,1 \pm 0,6\%$ ,  $p = 0,211$ .  $F480^+$ , NT:  $1,4 \pm 0,4\%$ ; T:  $1,7 \pm 0,2\%$ ,  $p = 0,640$ .  $CD3^+CD4^+$ , NT:  $6,3 \pm 1,0\%$ ; T:  $6,4 \pm 0,4\%$ ,  $p = 0,921$ ) (Gráfico 13A, B e C, respectivamente). Além disso, nenhuma diferença nas células avaliadas por citometria foi verificada na medula óssea entre os grupos ( $Ly6G^+$ , NT:  $41,01 \pm 1,34\%$ ; T:  $42,90 \pm 1,20\%$ ,  $p = 0,034$ .  $F480^+$ , NT:  $1,45 \pm 0,19\%$ ; T:  $1,00 \pm 0,06\%$ ,  $p = 0,063$ ).



CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, NT: 0,65 ± 0,10%; T: 0,59 ± 0,04%, p = 0,622. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, NT: 1,46 ± 0,08%; T: 1,55 ± 0,08%, p = 0,477) (Gráfico 14A, B, C e D, respectivamente).

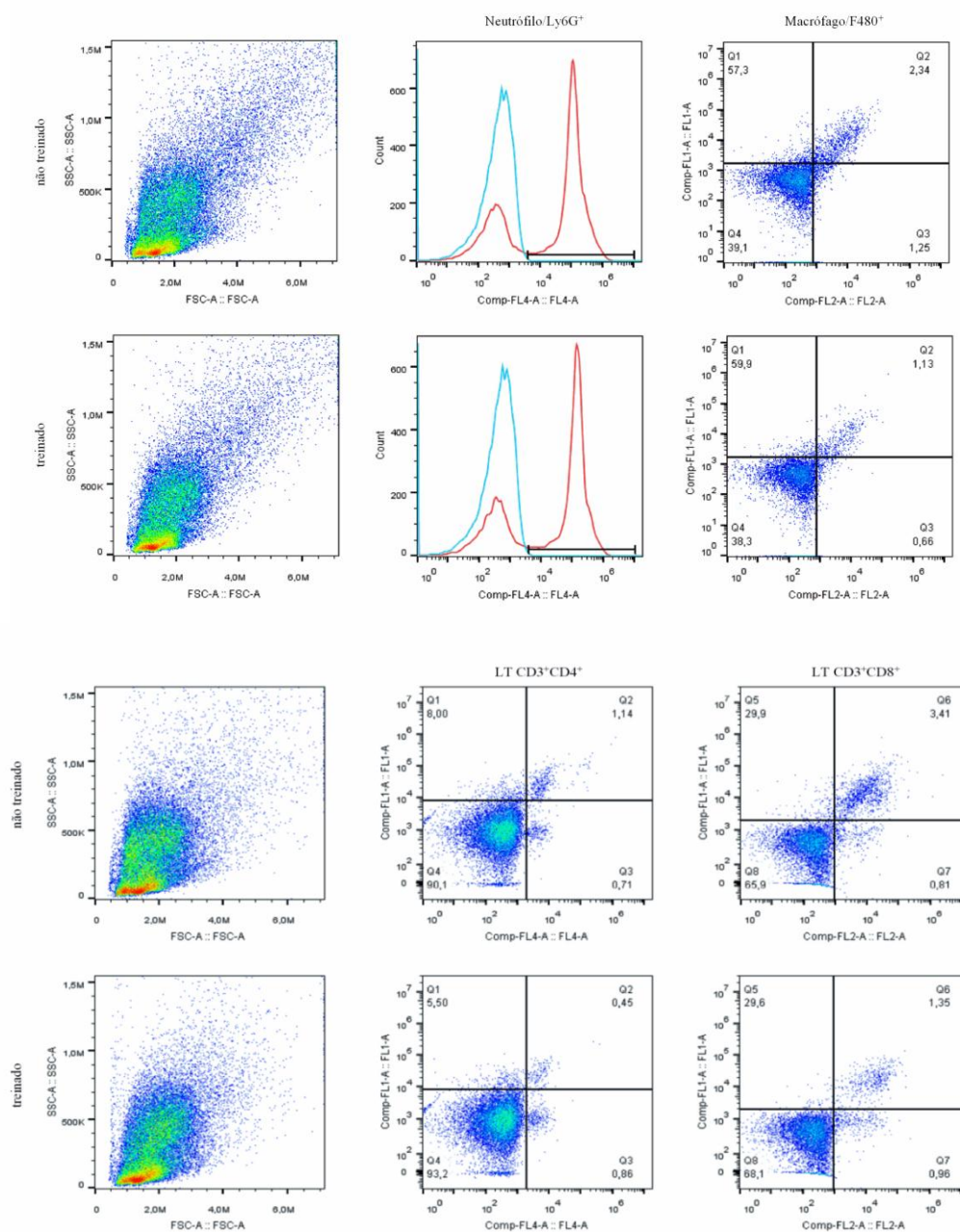


**Gráfico 13:** Perfil de células no sangue. Percentual de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> (A), monócitos F480<sup>+</sup> (B), linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (D) no sangue avaliado 72 horas após o TVC nos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=8). \* representa p < 0,05 em relação ao grupo NT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão.



**Gráfico 14:** Perfil celular da medula óssea. Percentual de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> (A), monócitos F480<sup>+</sup> (B), linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (D) na medula óssea avaliado, 72 horas após o TVC nos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=8). Os dados estão expressos como média ± erro padrão.

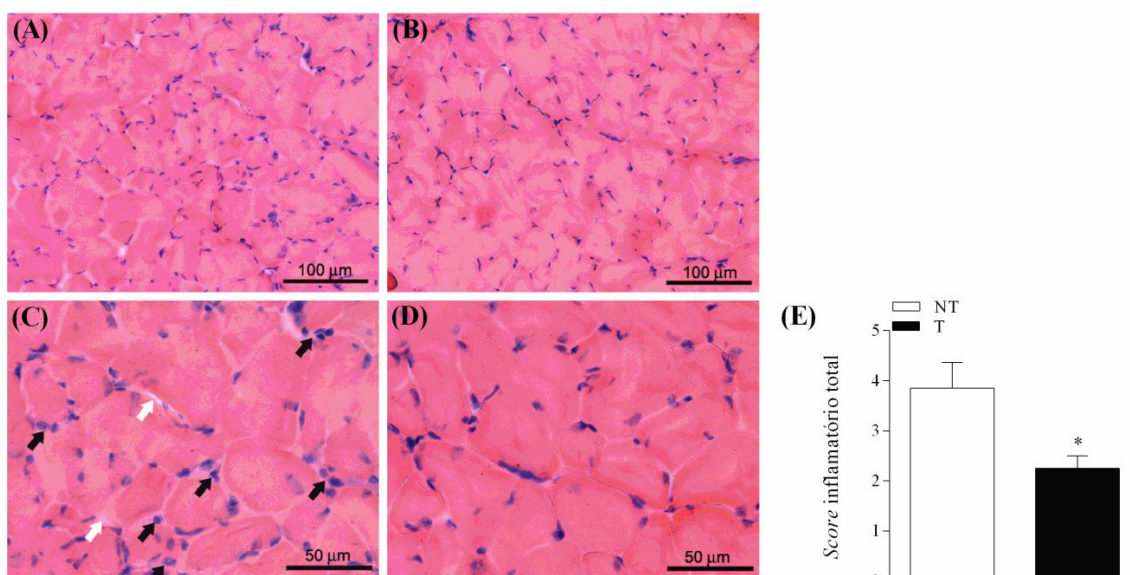
**4.4.3. Dot plot representativo de citometria de fluxo, de sangue e medula, com marcação de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>, monócitos F480<sup>+</sup>, linfócitos CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> de animais treinados e não treinados.**



**Gráfico 15:** Dot plot representativo de citometria de fluxo com marcação de neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>, monócitos F480<sup>+</sup>, linfócitos CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> de animais treinados e o não treinados, 72 horas pós o TVC. Exemplos retirados da análise da medula óssea.

#### 4.4.4. Efeito do treinamento físico sobre a inflamação muscular induzida pelo teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)

Numa análise semi-quantitativa, foi verificada a presença de infiltrado inflamatório misto, com predomínio de células mononucleares na musculatura do quadríceps. Tais células apresentavam-se dispostas em pequenos agrupamentos difusos em todo o tecido. Esses achados foram mais evidentes em animais não treinados em comparação aos treinados. Além disso, observou-se maior frequência de distensão do endomísio no músculo de camundongos não treinados. Desta maneira, a inflamação no tecido muscular, induzida pelo exercício físico até a fadiga, foi atenuada pelo treinamento físico, como demonstrado pelo *score* inflamatório total (NT:  $3,9 \pm 0,2$ ; T:  $2,3 \pm 0,2$ ;  $p = 0,021$ ) (Gráfico 16).

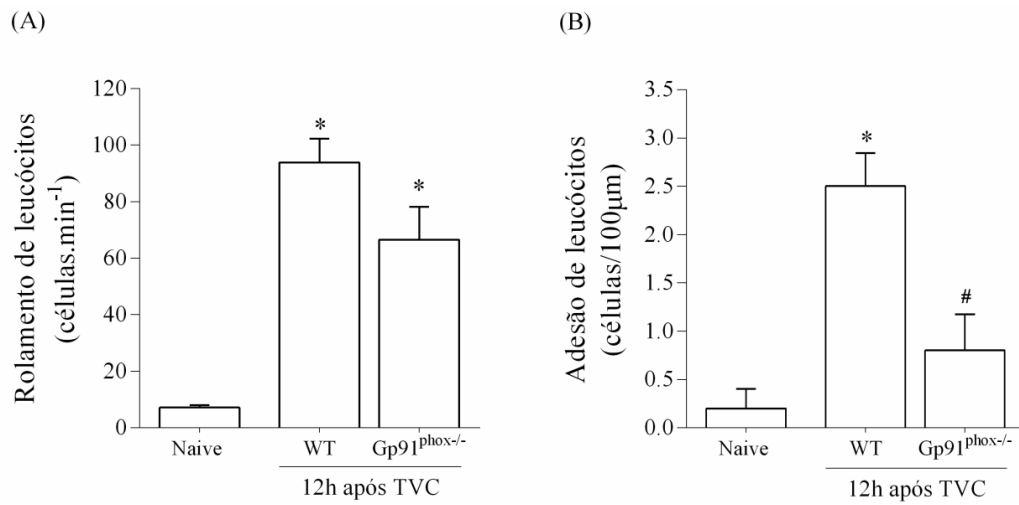


**Gráfico 16:** Cortes representativos histológicos transversais do quadríceps (10µm) corados com hematoxilina e eosina (HE) (A-D). As setas pretas indicam regiões contendo células inflamatórias, com predomínio de células mononucleares. As setas brancas indicam distensão de endomísio. Em E, *Score* total de dano muscular nos grupos NT (barra branca, n=7) e T (barra preta, n=5). Foram excluídas três amostras do grupo T devido à baixa qualidade dos cortes. Um animal não treinado representado nos painéis A (20x) e C (40x) e um treinado nos painéis B (20x) e D (40x). \* representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo NT. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 4.5. Delineamento experimental 5

### 4.5.1. Influência da NADPH oxidase sobre recrutamento de leucócitos induzido pelo teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)

Doze horas após o exercício físico até a fadiga o rolamento de leucócitos em vênula pós-capilar do reto femoral foi maior tanto em animais do grupo WT, quanto do grupo Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> em relação ao grupo não exercitado (Naive:  $7,2 \pm 0,8$  células.min<sup>-1</sup>; WT:  $93,7 \pm 7,8$  células.min<sup>-1</sup>; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $66,4 \pm 10,4$  células.min<sup>-1</sup>). Entretanto, não foi evidenciada diferença entre os grupos WT e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> (WT:  $93,7 \pm 7,8$  células.min<sup>-1</sup>; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $66,4 \pm 10,4$  células.min<sup>-1</sup>) (Gráfico 17A) . Com relação à adesão celular na parede de vênulas no musculoesquelético, o exercício até a fadiga induziu um aumento somente no grupo WT em comparação aos grupos Naive e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> (Naive:  $0,2 \pm 0,2$  células/100µm WT:  $2,3 \pm 0,3$  células/100µm; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $0,7 \pm 0,3$  células/100µm ) (Gráfico 17B).



**Gráfico 17:** Recrutamento de leucócitos 12 horas após o TVC em camundongos WT e Gp91<sup>phox</sup>-. Rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos em vênula pós-capilar no reto-femoral nos grupos Naive (n=5) e 12 horas após o TVC para os grupos WT (n=6) e Gp91<sup>phox</sup>- (n=5). \* representa p < 0,001 em relação ao grupo Naive. # representa p < 0,01 em relação ao grupo WT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão.

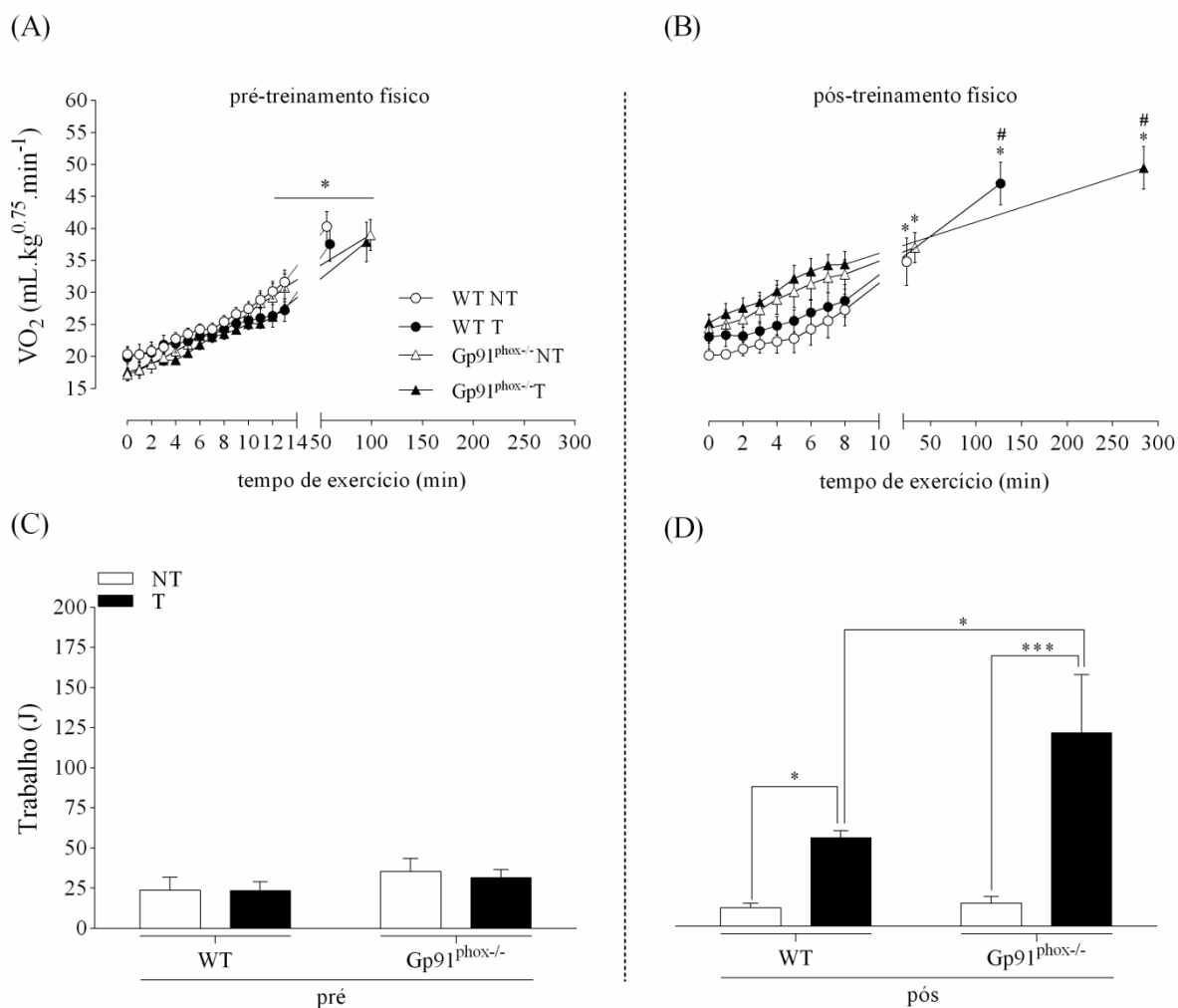
## 4.6. Delineamento experimental 6

### 4.6.1. Influência da NADPH oxidase sobre o efeito do treinamento no desempenho físico no teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (TVC)

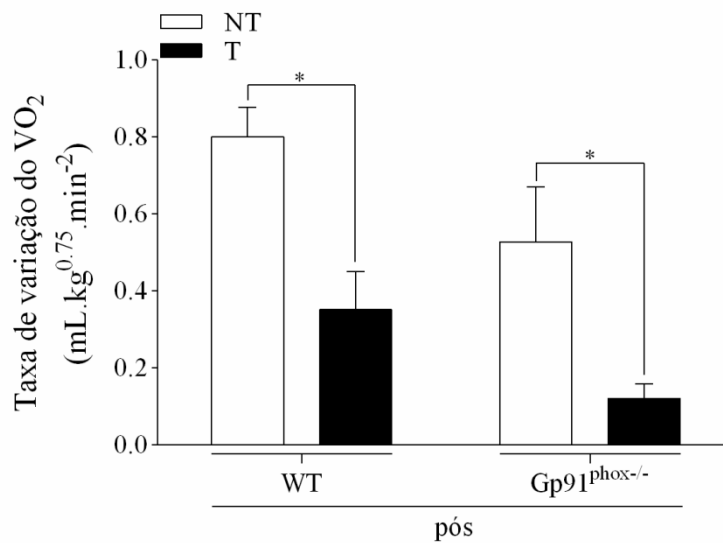
Durante o TVC pré-treinamento físico, o  $VO_2$  dos camundongos foi avaliado e não foram evidenciadas diferenças entre os grupos ao longo de todo o exercício ou no momento da fadiga (Gráfico 18A). Evidentemente, o  $VO_2$  em todos os grupos, por influência do TVC, foi maior a partir do 12º minuto (WT: NT=  $30,2 \pm 1,1$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>; T=  $26,3 \pm 1,6$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>. Gp91<sup>phox-/-</sup> : NT=  $29,3 \pm 2,2$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>; T=  $26,2 \pm 0,6$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>) em comparação ao minuto zero (WT: NT=  $17,8 \pm 0,9$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>; T=  $17,0 \pm 1,6$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>. Gp91<sup>phox-/-</sup> : NT=  $14,3 \pm 0,9$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>; T=  $14,1 \pm 1,1$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>) (Gráfico 18A). Além disso, a avaliação do trabalho realizado no TVC pré-treinamento físico permitiu uma distribuição homogênea dos grupos NT e T, tanto para camundongos WT (NT:  $23,9 \pm 12,1$ J; T:  $23,5 \pm 5,5$ J) quanto para Gp91<sup>phox-/-</sup> (NT:  $35,3 \pm 8,4$ J; T:  $31,6 \pm 5,2$ J). Com isso, não foi verificada diferença no trabalho entre os quatro grupos experimentais antes do início do treinamento físico (Gráfico 18C). Após o período de treinamento físico de quatro semanas, o  $VO_2$  foi avaliado novamente. O TVC foi capaz de induzir um aumento no  $VO_2$ , o qual foi observado no momento da fadiga em comparação ao minuto zero para todos os grupos NT e T, WT (NT:  $32,9 \pm 3,4$ mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup> vs.  $16,4 \pm 0,4$ mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ; T=  $47,0 \pm 2,9$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup> vs.  $18,5 \pm 1,7$ mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,0001$  ) e Gp91<sup>phox-/-</sup> (NT:  $37,1 \pm 2,1$ mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup> vs.  $20,4 \pm 2,0$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ; T=  $49,5 \pm 2,9$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup> vs.  $20,3 \pm 1,1$  mL.kg<sup>0.75</sup>.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 18B). Adicionalmente, o  $VO_2$  no momento da fadiga no TVC foi maior nos grupos T em comparação a NT, tanto em camundongos

WT (NT:  $32,9 \pm 3,4 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; T:  $47,0 \pm 2,9 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,001$ ), quanto em camundongos Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> (NT:  $37,1 \pm 2,1 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; T:  $49,5 \pm 2,9 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 18B). Apesar disto, o VO<sub>2</sub> na fadiga no TVC pós-treinamento físico não foi diferentes entre camundongos *wild-type* e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>, NT (WT:  $32,9 \pm 3,4 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $37,1 \pm 2,1 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ) ou T (T:  $47,0 \pm 2,9 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $49,5 \pm 2,9 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (Gráfico 18B). Em paralelo a estes achados, o trabalho desempenhado no TVC pós-treinamento físico foi maior para os grupos T em relação aos NT, tanto para camundongos WT (NT:  $11,5 \pm 2,9 \text{ J}$ ; T:  $55,1 \pm 4,4 \text{ J}$ ;  $p < 0,05$ ), quanto para Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> (NT:  $14,5 \pm 4,3 \text{ J}$ ; T:  $120,6 \pm 36,2 \text{ J}$ ;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 18D). Além disso, ficou evidente que os camundongos *knockout* treinados apresentaram um maior aumento no desempenho físico em comparação aos camundongos *wild-type* treinados (WT:  $55,1 \pm 4,4 \text{ J}$ ; Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>:  $120,6 \pm 36,2 \text{ J}$ ;  $p < 0,01$ ) (Gráfico 18D). Ainda, o maior desempenho físico de animais treinados foi também demonstrado pela menor taxa de variação do VO<sub>2</sub> em camundongos do grupo T em comparação ao NT, *wild-type* (NT:  $0,80 \pm 0,06 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-2}$ ; T:  $0,35 \pm 0,09 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-2}$ ;  $p < 0,05$ ) e Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> ((NT:  $0,53 \pm 0,13 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-2}$ ; T:  $0,11 \pm 0,03 \text{ mL.kg}^{0.75} \cdot \text{min}^{-2}$ ;  $p < 0,05$ ) (Gráfico 19).





**Gráfico 18:** Desempenho físico no TVC.  $VO_2$  de camundongos WT (NT, círculo branco; T, círculo preto) e  $Gp91^{phox-/-}$  (NT, triângulo branco; T, triângulo preto) no TVC pré (A) e pós-treinamento físico (B). Pré-treinamento WT (NT, n=7; T, n=6) e  $Gp91^{phox-/-}$  (NT, n=5; T, n=4). Pós-treinamento WT (NT, n=6; T, n=4) e  $Gp91^{phox-/-}$  (NT, n=5; T, n=4). \* representa  $p < 0,05$  em relação ao minuto zero. # representa  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo NT na fadiga. Trabalho (J) realizado pelos grupos NT (barra branca) e T (barra preta) em camundongos WT e  $Gp91^{phox-/-}$  pré (A) e pós (B) treinamento físico. Pré-treinamento WT (NT, n=7; T, n=6) e  $Gp91^{phox-/-}$  (NT, n=6; T, n=6). Pós-treinamento WT (NT, n=7; T, n=6) e  $Gp91^{phox-/-}$  (NT, n=5; T, n=4). \* representa  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

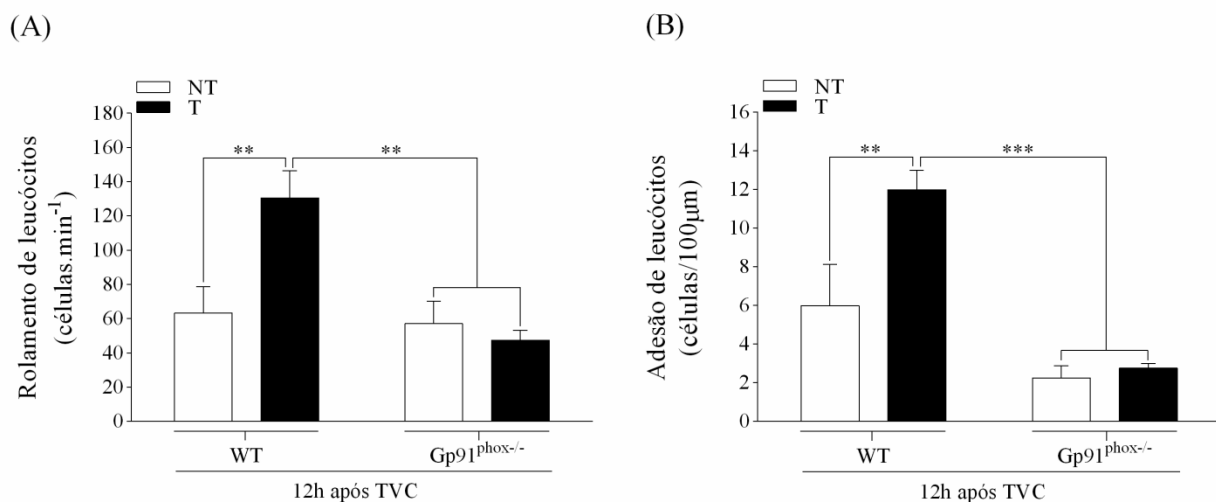


**Gráfico 19:** Desempenho físico no TVC. Taxa de variação do VO<sub>2</sub> no TVC de camundongos *wild-type* e Gp91<sup>phox-/-</sup> nos grupos NT (barra branca) e T (barra preta) pós- treinamento físico. WT NT (n=5); WT T (n=4); Gp91<sup>phox-/-</sup> NT (n=5); Gp91<sup>phox-/-</sup> T (n=4) \* representa p < 0,05. Os dados estão expressos como média ± erro padrão.

#### 4.6.2. Influência da NADPH oxidase sobre o efeito do treinamento físico sobre o recrutamento de leucócitos induzido pelo teste de corrida de velocidade constante até a fadiga (TVC)

A microscopia intravital realizada doze horas após o exercício até a fadiga demonstrou que o treinamento físico e a produção de EROs interferem na interação de leucócitos com o endotélio vascular do musculoesquelético (Figura 20). Como evidenciado, camundongos WT treinados apresentaram maior rolamento de leucócitos na vasculatura do reto femoral após o TVC em comparação aos WT não treinados (NT: 62,9 ± 11,9 células.min<sup>-1</sup>; T: 130,4 ± 12,3 células.min<sup>-1</sup>; p < 0,01). Este efeito do treinamento físico não ocorreu entre camundongos Gp91<sup>phox-/-</sup> (NT: 56,6 ± 10,4 células.min<sup>-1</sup>; T: NT: 47,1 ± 4,6 células.min<sup>-1</sup>; p < 0,01). Além disso, o rolamento de leucócitos

de camundongos WT treinados foi também maior quando comparado ao rolamento de animais  $Gp91^{phox-/-}$ , tanto NT (WT T:  $130,4 \pm 12,3$  células.min<sup>-1</sup>;  $Gp91^{phox-/-}$  NT:  $56,6 \pm 10,4$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ), quanto T (WT T:  $130,4 \pm 12,3$  células.min<sup>-1</sup>;  $Gp91^{phox-/-}$  T:  $47,1 \pm 4,6$  células.min<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ). Em relação à adesão celular, o número de leucócitos aderidos na parede endotelial foi maior em camundongos WT treinados em comparação a WT não treinados doze horas após o exercício até a fadiga (WT T:  $11,6 \pm 0,9$  células/100 $\mu$ m; WT NT:  $5,6 \pm 1,6$  células/100 $\mu$ m; ). Ainda, camundongos WT treinados apresentaram maior adesão celular em comparação a camundongos  $Gp91^{phox-/-}$  tanto treinados (WT T:  $11,6 \pm 0,9$  células/100 $\mu$ m;  $Gp91^{phox-/-}$  T:  $2,5 \pm 0,2$  células/100 $\mu$ m;  $p < 0,001$ ) quanto não treinados (WT T:  $11,6 \pm 0,9$  células/100 $\mu$ m;  $Gp91^{phox-/-}$  NT:  $2,1 \pm 0,4$  células/100 $\mu$ m;  $p < 0,001$ ).



**Gráfico 20:** Recrutamento de leucócitos nos grupos NT e T de camundongos WT e  $Gp91^{phox-/-}$  12 horas após o TVC. Rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos em vênula pós-capilar no reto femoral nos grupos NT e T de camundongos WT e  $Gp91^{phox-/-}$  12 horas após o TVC. \*\* representa  $p < 0,01$ . \*\*\* representa  $p < 0,001$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o estresse oxidativo pode interferir nos efeitos do treinamento físico sobre a resposta inflamatória e o desempenho durante o exercício. Primeiramente, foi demonstrada que a resposta inflamatória induzida pelo exercício físico é dependente da intensidade do exercício representada pelo VO<sub>2</sub> (Gráfico 3). As concentrações de IL-6 no sangue (Gráfico 2), o rolamento e adesão de leucócitos em vênulas pós-capilares (Gráfico 3A e B, respectivamente) foram maiores 12 horas após o exercício a 80% da V<sub>max</sub> realizado durante 30 minutos comparado ao exercício na intensidade de 40% da V<sub>max</sub> e ao repouso. Esses achados corroboram o trabalho de Nunes-Silva e colaboradores (2014) (Nunes-Silva *et al.*, 2014), no qual o pico do recrutamento de leucócitos ocorreu 12 horas após um exercício a 60% da V<sub>max</sub> até a fadiga, com maior infiltrado celular no quadríceps. Diferentemente, no presente estudo o exercício foi realizado com duração fixa, o que permitiu isolar o efeito da intensidade sobre a resposta inflamatória. Assim, esta diferença pode ser explicada pela maior ativação simpática para o exercício, como demonstrada pelo maior VO<sub>2</sub> no exercício a 80% da V<sub>max</sub> (Figura12B). Normalmente, a resposta inflamatória ao exercício é tipicamente acompanhada de um aumento exponencial nas concentrações de IL-6 na circulação sanguínea, seguida de um declínio pós-exercício (Castell *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 1997; Petersen & Pedersen, 2006). Adicionalmente, tem sido demonstrado um aumento na expressão da IL-6 em fibras musculares durante a contração (Penkowa *et al.*, 2003; Hiscock *et al.*, 2004) e a liberação desta citocina pelo músculo durante o exercício (Steensberg *et al.*, 2002). Além disso, sugere-se que este aumento de IL-6 parece estar associado à resposta imune desencadeada pelo dano tecidual local ocasionado pela contração muscular (Bruunsgaard *et al.*, 1997). Entretanto, alguns achados demonstram que apesar de um pronunciado aumento nas concentrações de

creatina quinase (CK) e mioglobina, marcadores de dano muscular na circulação, induzido pelo exercício, a IL-6 no plasma atingiu níveis mais elevados somente no período de recuperação (Toft *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que um aumento nas concentrações de IL-6 em modelos de exercício, nos quais a concentração plasmática de CK não foi alterada, não está diretamente ligado ao dano muscular. Parece provável que o aumento plasmático de IL-6 imediato em resposta ao exercício de longa duração esteja associado principalmente à contração da fibra muscular do que diretamente ao dano no músculo, já que tardiamente a produção de IL-6 pode estar relacionada com mecanismos de reparo do tecido ligados à presença de macrófagos, os quais aumentam a produção desta citocina (Febbraio & Pedersen, 2002). Contudo, o aparecimento de IL-6 na circulação ou a expressão desta proteína no tecido muscular induzidos pelo exercício dependem de diversos fatores como intensidade, duração, quantidade de massa muscular recrutada e o momento de realização da medida. Outro dado relevante deste trabalho, que associa efeitos do exercício agudo, inflamação e recrutamento celular, é o de maior migração de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos, 12 horas após o exercício a 80% da  $V_{max}$  do TVI (Gráfico 4). Este resultado evidencia, pelo menos *in vitro*, que o exercício ativa o potencial migratório de neutrófilos da medula óssea. Este órgão linfóide primário armazena a maior parte de neutrófilos maduros (Cartwright *et al.*, 1964), os quais podem ser mobilizados rapidamente em resposta a infecção ou estresse, sugerindo que esta reserva seja fundamental para os mecanismos de defesa e regeneração do organismo. Uma vez liberados da medula óssea para a circulação periférica, os neutrófilos têm meia vida relativamente curta (6-8h) (Christopher & Link, 2007; Rankin, 2010). Contudo, a maior migração *in vitro* de neutrófilos isolados da medula evidenciada após o exercício, abre perspectiva para o entendimento do processo de liberação de neutrófilos pela medula, e ao mesmo tempo,

do recrutamento destas células pelo tecido muscular sob condições fisiológicas. Os resultados previamente discutidos contribuem principalmente para o entendimento da influência das características dos componentes da sobrecarga sobre a resposta inflamatória induzida pelo exercício.

Este trabalho também investigou o efeito do treinamento físico sobre as respostas inflamatórias ao exercício físico a uma dada intensidade relativa, nas condições com duração fixa e/ou até a fadiga. Para isso, foi previamente estabelecido, um protocolo de treinamento com prescrição da sobrecarga baseada em percentuais relativos da velocidade máxima alcançada em teste incremental e do tempo total atingido em teste constante. Isto proporcionou a individualização dos componentes intensidade e duração de corrida em esteira para camundongos, sem a eventualidade de subestimar ou superestimar a capacidade de corrida, o que poderia influenciar equivocadamente a análise da resposta inflamatória ao treinamento. Esta estratégia diferencia este estudo de qualquer outro na literatura para o modelo de exercício utilizado. Normalmente, a escolha de uma % $VO_{2max}$  para a realização de sessões de exercício ao longo de protocolos de treinamento, tem sido um procedimento comumente utilizado em estudos com roedores (Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2013). Este % $VO_{2max}$  é atingido pela manipulação da velocidade de corrida e da inclinação em esteira, possibilitando a relativização da intensidade durante o exercício. No entanto, devido à existência, já estabelecida na literatura, de animais considerados de baixo, médio e alto desempenho para corrida (Rabelo *et al.*, 2015), não é possível garantir que estes animais tenham a mesma capacidade ou tolerância ao exercício numa mesma intensidade relativa do  $VO_2$ . Como observado, o protocolo de treinamento foi capaz de aumentar o desempenho físico. Isto foi demonstrado por meio do TVI, devido a maiores variações do  $VO_{2pico}$  e da  $V_{max}$  no grupo T em comparação ao NT (Gráfico

6D e 6E, respectivamente) e também pelo TVC, no qual os animais treinados apresentaram maior trabalho e menor taxa de variação do  $VO_2$  (Figura 18D e 18C, respectivamente). Com base nos resultados sobre o efeito da intensidade do exercício sobre a resposta inflamatória e do treinamento físico sobre o desempenho, foi possível estabelecer a forma de avaliar o recrutamento de leucócitos em animais treinados.

Os resultados seguintes mostraram que o desempenho físico determina a interação de leucócitos com o endotélio vascular da musculatura esquelética. Camundongos treinados apresentaram maior rolamento e adesão em vênulas pós-capilares do tecido muscular 12 horas após o exercício até a fadiga (Gráfico 8 A e B, respectivamente). Esta resposta inflamatória exacerbada é correspondente à quantidade de trabalho realizado num teste até a fadiga. Isto pode ser reforçado pelo resultado do  $VO_2$  encontrado no momento da fadiga no TVC, o qual não foi diferente entre os grupos NT e T (Gráfico 18 B). Por conseguinte, foi verificado que houve uma redução do rolamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do reto femoral de animais treinados, para uma mesma intensidade absoluta de exercício físico com duração fixa (EF), em comparação a não treinados (Gráfico 11A). É importante ressaltar que o trabalho realizado no EF representou 76% do máximo para animais não treinados e apenas 25% para animais treinados (Gráfico 10). Particularmente, a decisão de avaliar o desempenho em treinamentos com características aeróbicas utilizando protocolos contínuos até a fadiga ou com duração pré-estabelecida, foi eficiente em demonstrar adaptações no organismo. Na literatura, diferentes modelos são utilizados para investigar o papel da resposta imune na regeneração e remodelamento muscular. A maior parte destes modelos causa dano muscular extremo por trauma, exposição a toxinas, laceração ou esmagamento muscular (Warren, 2007). Já no caso de modelos que utilizam exercício, o dano é causado principalmente por contrações musculares excêntricas (Armstrong *et al.*,

1983; Souza & Gottfried, 2013). Ao contrário dos modelos de trauma muscular extremo, no dano muscular induzido pelo exercício excêntrico, uma proporção relativamente pequena de fibras é afetada, com a maior parte das células musculares permanecendo saudáveis e funcionais (Ogilvie *et al.*, 1988; Duan *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1994; Komulainen & Vihko, 1994). De fato, o modelo de exercício utilizado neste trabalho difere consideravelmente daqueles comumente utilizados na literatura. Contudo, o presente estudo é pioneiro em mostrar, *in vivo*, o efeito do treinamento físico no recrutamento celular induzido pelo exercício, o que evidencia que este processo inflamatório direcionado para o tecido muscular é dependente da quantidade total de trabalho realizada no exercício físico até a fadiga, e também, da quantidade de trabalho relativa ao máximo. Estes resultados proporcionam o estabelecimento de estratégias metodológicas para estudar o efeito do treinamento físico sobre a resposta inflamatória em condições basais ou de estresse fisiológico, permitindo o entendimento do papel da resposta imune inata nas adaptações do organismo.

Além de avaliar o efeito do treinamento sobre a interação de leucócitos com o endotélio vascular da musculatura esquelética após o exercício físico, este trabalho investigou o perfil celular da medula e do sangue de animais treinados. Os resultados da citometria de fluxo mostraram diferença no conteúdo de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, evidenciando um maior percentual destas células no sangue de camundongos treinados, três dias após a realização de um exercício até a fadiga (Gráfico 13D). Muitos trabalhos descrevem sobre as mudanças nos subtipos de mononucleares no sangue, induzidas pelo exercício (Keast *et al.*, 1988; Brines *et al.*, 1996; Pedersen & Nieman, 1998). Apesar disso, as alterações de subpopulações de linfócitos no sangue, a um episódio agudo de exercício, são bastante controversas. Normalmente, uma maior concentração de linfócitos na circulação sanguínea é devido a um aumento do recrutamento de todas as



subpopulações: células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, B CD19<sup>+</sup>, NK (*natural killer*) CD16<sup>+</sup> e NK CD56<sup>+</sup>. Alguns estudos indicam que parece haver uma rápida mobilização de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para o sangue em resposta ao exercício físico, porém com um maior aumento desta última, explicado pela redução na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Gabriel *et al.*, 1993). Este aumento inicial de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> parece estar mais relacionado com uma redistribuição de células ativadas, do que devido a um repovoamento por novas células geradas (Effros *et al.*, 1996). Em contrapartida, apesar de um maior recrutamento de células para o sangue durante o exercício, parece haver uma mudança proporcional nos subtipos celulares e um declínio no percentual de linfócitos T. Após o exercício, ocorre então uma queda na concentração e a resposta de proliferação não é diferente dos valores anteriores ao exercício. Consequentemente, a função de linfócitos totais *in vivo* no sangue pode ser considerada suprimida depois do exercício (Fry *et al.*, 1992; Nielsen & Pedersen, 1997). Devido ao fato, de animais treinados terem apresentado uma maior quantidade de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> três dias após um exercício até a fadiga em comparação aos não treinados, podemos sugerir que o treinamento físico interfere na redistribuição destas células, refletindo numa diminuição da janela de supressão do sistema imune induzida pelo exercício agudo. Ainda não está claro na literatura se linfócitos T possuem algum papel na regeneração muscular em modelos de dano induzido pelo exercício, devido à inabilidade do músculo esquelético ativar a resposta celular, já que o recrutamento destas células implica em resposta imune adaptativa. Células T são encontradas em músculos degenerados após lesão aguda, porém o recrutamento é mais robusto e persistente em doenças crônicas, tais como miosites ou distrofias musculares (Lerario *et al.*, 2010; Salajegheh *et al.*, 2010). Investigações realizadas em camundongos *mdx*, um modelo de distrofia muscular de Duchenne (DMD), mostram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> são as primeiras células a invadir o

músculo distrófico e medeiam mecanismos que contribuem para a patologia. Em pacientes com DMD tratados com prednisona, a redução de necrose e fibrose muscular tem sido correlacionada com a redução de células T (Kissel *et al.*, 1993; Salajegheh *et al.*, 2010). Embora, nosso trabalho não esteja relacionado a modelos patológicos de distrofia, podemos considerar, neste caso, que a utilização de modelos experimentais de treinamento físico e suas adaptações, podem contribuir para o entendimento de mecanismos envolvidos na resposta imune adaptativa. Outro dado na análise por citometria que chamou a atenção foi a comparação de F4/80<sup>+</sup> na medula óssea entre os grupos T e NT (Gráfico 14B). Apesar do  $p=0,063$ , parece que o treinamento leva a uma redução da expressão de F4/80<sup>+</sup> na medula. Como já tem sido descrito, o receptor de quimiocina tipo 2 C-C (CCR2) e seu ligante CCL2 (ou MCP-1) os quais são produzidos por monócitos/macrófagos coordenam o recrutamento dessas células da circulação para o local após o dano tecidual, para disparar a resposta pró-inflamatória (Jetten *et al.*, 2014). No tecido danificado esses macrófagos se diferenciam para o fenótipo M2 e contribuem para os estágios finais da resposta regenerativa tecidual (Forbes & Rosenthal, 2014). Especificamente, evidencia-se que animais CCR2<sup>-/-</sup> possuem um prejuízo no recrutamento de macrófagos para o local do dano (Abbadie *et al.*, 2003) e isso tem sido associado a uma perda da capacidade regenerativa, incapacidade de angiogênese, aumento de fibrose e acúmulo de tecido adiposo no local do dano (Martinez *et al.*, 2010). Por outro lado, o transplante de medula de camundongos *wild-type* para camundongos CCR2<sup>-/-</sup> é capaz de restabelecer a capacidade regenerativa do tecido muscular (Sun *et al.*, 2009). Estes resultados demonstram que o CCR2 liberado por miócitos proliferativos e células imunes recruta monócitos derivados da medula óssea. Então, a partir destes achados podemos inferir que uma provável redução da expressão de F4/80<sup>+</sup> na medula de camundongos treinados três dias pós-exercício pode

estar associada a um maior recrutamento de macrófagos para o tecido, o qual pode estar relacionado ao maior trabalho realizado por estes animais durante o teste até a fadiga. Contudo, são necessários mais experimentos para elucidar a relação entre diferentes nichos de células imunes em resposta ao exercício agudo e ao treinamento físico.

O presente trabalho também avaliou o efeito do treinamento sobre a resposta inflamatória local o infiltrado celular no tecido muscular esquelético de camundongos treinados e não treinados, três dias após o exercício até a fadiga. A escolha deste momento para a realização das comparações se baseia nos resultados da literatura, no qual foi evidenciado um maior *score* inflamatório pós-exercício, caracterizado por morfologia alterada de fibras, fibras em degeneração, necrose e distensão de endomísio em ratos (Rizo-Roca *et al.*, 2015). Em uma análise semiquantitativa, foi verificada a presença de infiltrado inflamatório misto, com predomínio de células mononucleares na musculatura do quadríceps (Gráfico 16E). Tais células apresentavam-se dispostas em pequenos agrupamentos difusos em todo o tecido. Esses achados foram mais evidentes em animais não treinados em comparação aos treinados. Também se observou maior frequência de distensão do endomísio no músculo em camundongos não treinados. Estes dados indicam um provável efeito de atenuação do dano muscular, ou ainda, de uma resposta inflamatória adaptativa, o que pode estar relacionado a um provável aumento na capacidade regenerativa, pós-exercício, induzida pelo treinamento físico. Alguns estudos têm proposto que programas de treinamento podem reduzir a quantidade de dano muscular induzido por contrações excêntricas (McHugh, 2003; Howatson & van Someren, 2008). E ainda, tem sido evidenciado que sessões de contrações excêntricas prévias produzem um tipo de efeito protetivo ao dano, diante de uma nova contração (Hortobagyi *et al.*, 1998). Poucos estudos avaliaram o efeito de outros tipos de treinamento, como modelos de corrida, sobre o dano induzido pelo exercício agudo.

Normalmente, o modelo de corrida em declive (*downhill running*) tem sido utilizado para avaliar o provável efeito protetivo do treinamento contra o dano muscular. Schwane and Armstrong (1983) associaram a reduzida atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e de creatina quinase (CK) na musculatura de animais treinados em comparação a de não treinados, após corrida em declive, ao menor dano muscular (Schwane & Armstrong, 1983).

No presente estudo, como dito anteriormente, animais treinados, os quais realizaram uma maior quantidade de trabalho durante o exercício até a fadiga, apresentam maior recrutamento de leucócitos em vênulas pós-capilares no músculo esquelético. E ainda, foi demonstrado que o treinamento físico reduziu o rolamento e a adesão de leucócitos para uma mesma duração e intensidade absoluta de corrida. Estes achados evidenciam a influência da quantidade de trabalho realizado sobre o recrutamento celular após o exercício. Portanto, o presente estudo foi capaz de estabelecer critérios para investigar o efeito do treinamento físico sobre a resposta inflamatória induzida pelo exercício.

A partir dos resultados descritos anteriormente ficou evidente a influência do treinamento físico sobre variáveis de desempenho e de inflamação durante o exercício. Sendo assim, para responder o objetivo geral proposto neste trabalho, a resposta inflamatória induzida pelo exercício foi avaliada agudamente em animais *wild-type* e  $Gp91^{phox-/-}$  não-treinados e treinados.

O efeito agudo do exercício físico sobre a interação entre leucócitos e endotélio vascular da musculatura esquelética foi atenuado pela deficiência na NADPH oxidase. Apesar de não ter sido observado diferenças no rolamento celular em vênulas pós-capilares entre camundongos *wild-type* e  $Gp91^{phox-/-}$  pós-exercício (Gráfico 17A), a

adesão de leucócitos foi atenuada nestes animais (Gráfico 17B). Estes dados corroboram achados prévios do mesmo grupo de pesquisa deste trabalho, nos quais animais *Knockout* para a Gp91<sup>phox</sup> apresentaram inibição do rolamento, adesão e transmigração de leucócitos após o exercício (Nunes-Silva *et al.*, 2014). Neste trabalho, a administração i.p. prévia de SOD exacerbou a adesão e a transmigração pós-exercício sem alterar o rolamento de leucócitos, o que levou os autores a sugerirem a participação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nestes eventos. Evidências na literatura indicam que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas envolvidas no recrutamento de leucócitos (Cook-Mills *et al.*, 2011). Logo, camundongos Gp91<sup>phox-/-</sup> representam um modelo apropriado para a compreensão da influência do estresse oxidativo sobre o efeito do treinamento físico na resposta inflamatória induzida pelo exercício agudo. Finalmente, foi demonstrado que a menor produção EROs, pela deficiência na NADPH oxidase, influenciou o desempenho físico, já que camundongos Gp91<sup>phox-/-</sup> treinados desempenharam um maior trabalho em comparação aos *wild-type* treinados no teste de corrida com velocidade constante até a fadiga (Gráfico 18D). Este resultado indica a relevância da produção fisiológica de EROs como crucial no controle das adaptações induzidas pelo treinamento físico e na sinalização para interrupção do exercício. Há alguns anos, tem sido sugerido que o estado redox é fundamental na regulação de vários processos metabólicos e de sinalização envolvidos na manutenção das funções e adaptações celulares (Suzuki *et al.*, 1994; Sen & Packer, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Sen, 2000). Apesar de não termos investigado a condição de estresse oxidativo nos camundongos utilizados neste estudo, podemos inferir que a deleção da Gp91<sup>phox</sup> da NADPH oxidase, a maior fonte de produção de EROs no organismo de mamíferos, pode reduzir a produção desta molécula e conseqüentemente a ativação de vias de

sinalização que aumentam o sistema antioxidante com o objetivo de manter a homeostase do organismo.

Como visto anteriormente, ficou evidente que a interação de leucócitos com o endotélio vascular da musculatura esquelética do endotélio vascular é determinada pela quantidade de trabalho desempenhada no exercício. Isto foi confirmado mais de uma vez neste estudo, pelo maior rolamento e adesão de leucócitos em vênulas pós-capilares de camundongos treinados após terem se exercitado até a fadiga, e ao mesmo tempo pela diminuição desta resposta nestes animais quando a intensidade e a duração de exercício foram fixadas. No caso dos animais Gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> o treinamento não modificou a interação de leucócitos com o endotélio vascular, como visto pelos menores valores de rolamento e adesão celular em comparação a *wild-type* treinados (Gráfico 20 A e B). Diante destes achados, os quais envolvem resposta inflamatória induzida pelo exercício e desempenho físico após o treinamento, pode-se sugerir que o estresse oxidativo estimula o recrutamento de células imunes e regula a adaptação do organismo de forma a estabelecer limites fisiológicos para o desempenho. Além disso, a resposta adaptativa diante de uma sobrecarga de exercício regular imposta no treinamento físico parece ser controlada e limitada por um sistema que depende de EROs. É importante ressaltar que o desempenho de camundongos *wild-type* treinados representa uma adaptação em condições fisiológicas de estresse oxidativo. De forma contrária, provavelmente a ausência de uma quantidade adequada de EROs produzida durante o exercício de maneira crônica, pode levar a perda da resposta protetiva dos mecanismos de fadiga pela inibição da resposta inflamatória. Deste modo, é possível inferir que o sistema imune seja fundamental no controle da resposta adaptativa ao treinamento e na regulação dos mecanismos de fadiga.

## **6. CONCLUSÃO**

Diante disso, conclui-se que a magnitude dos eventos de rolamento e adesão de leucócitos em vênula pós-capilar no tecido muscular depende da intensidade relativa e da quantidade de trabalho realizada no exercício. Além disso, esta resposta inflamatória induzida pelo exercício está associada ao nível de desempenho físico e à produção de EROs do organismo. Ressalta-se ainda, que a inflamação induzida pelo exercício cronicamente parece exercer um controle sobre os mecanismos de fadiga.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, Peterson LB, Mudgett JS, Bayne EK, DeMartino JA, MacIntyre DE & Forrest MJ (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7947-7952.

Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A & Pons A (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & behavior* 84, 1-7.

Akhmedov D & Berdeaux R (2013). The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Frontiers in physiology* 4, 371.

Alessio HM & Goldfarb AH (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *Journal of applied physiology* 64, 1333-1336.

Alessio HM, Goldfarb AH & Cutler RG (1988). MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *The American journal of physiology* 255, C874-877.

Allen RG & Tresini M (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free radical biology & medicine* 28, 463-499.

Amani ARS, M.N; Konting, M.M.B; Koch, L.Y (2010). Relationship between body fat percent and maxymal oxygen uptake among young adults. *Journal of American Science* 6, 1-4.

Andrade FH, Reid MB, Allen DG & Westerblad H (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of physiology* 509 ( Pt 2), 565-575.

Armstrong RB, Ogilvie RW & Schwane JA (1983). Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 54, 80-93.

Ashton T, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B & Peters JR (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 77, 498-502.



Baar K (2004). Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *The Proceedings of the Nutrition Society* 63, 269-273.

Banerjee AK, Mandal A, Chanda D & Chakraborti S (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry* 253, 307-312.

Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC & D'Albis A (1996). Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *Journal of applied physiology* 81, 2658-2665.

Billat VL, Flechet B, Petit B, Muriaux G & Koralsztein JP (1999). Interval training at VO<sub>2</sub>max: effects on aerobic performance and overtraining markers. *Medicine and science in sports and exercise* 31, 156-163.

Brines R, Hoffman-Goetz L & Pedersen BK (1996). Can you exercise to make your immune system fitter? *Immunology today* 17, 252-254.

Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA & Pedersen BK (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *The Journal of physiology* 499 ( Pt 3), 833-841.

Calabrese EJ & Baldwin LA (2003). Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421, 691-692.

Cannon JG, Fiatarone MA, Fielding RA & Evans WJ (1994). Aging and stress-induced changes in complement activation and neutrophil mobilization. *Journal of applied physiology* 76, 2616-2620.

Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, Amadeu MA, Felix LB, de Oliveira EM, Cruz JS, Primola-Gomes TN, Mill JG & Natali AJ (2013). The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of molecular and cellular cardiology* 57, 119-128.

Carter GT, Kikuchi N, Abresch RT, Walsh SA, Horasek SJ & Fowler WM, Jr. (1994). Effects of exhaustive concentric and eccentric exercise on murine skeletal muscle. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 75, 555-559.

Cartwright GE, Athens JW & Wintrobe MM (1964). The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Man. *Blood* 24, 780-803.

Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J & Newsholme EA (1997). Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 75, 47-53.

Choi S (2005). Transcriptional profiling. *European*.

Christopher MJ & Link DC (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Current opinion in hematology* 14, 3-8.

Clarkson PM & Thompson HS (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition* 72, 637S-646S.

Cook-Mills JM, Marchese ME & Abdala-Valencia H (2011). Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling* 15, 1607-1638.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA & Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications* 107, 1198-1205.

Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE & Tappel AL (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 45, 927-932.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.

Duan C, Delp MD, Hayes DA, Delp PD & Armstrong RB (1990). Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] and injury from downhill walking. *Journal of applied physiology* 68, 1241-1251.

Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ & Morrice PC (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Archives of biochemistry and biophysics* 282, 78-83.

Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD & Giorgi JV (1996). Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 10, F17-22.

Evangelista FS, Martuchi SE, Negrao CE & Brum PC (2005). Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 38, 1141-1146.

Febbraio MA & Pedersen BK (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 1335-1347.

Febbraio MA & Pedersen BK (2005). Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exercise and sport sciences reviews* 33, 114-119.

Fernando P, Bonen A & Hoffman-Goetz L (1993). Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 71, 854-857.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E & Brum PC (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34, 760-765.

Fielding RA & Evans WJ (1997). Aging and the acute phase response to exercise: implications for the role of systemic factors on skeletal muscle protein turnover. *International journal of sports medicine* 18 Suppl 1, S22-27.

Finaud J, Lac G & Filaire E (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports medicine* 36, 327-358.

Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA & Lucia A (2013). Exercise is the real polypill. *Physiology* 28, 330-358.

Forbes SJ & Rosenthal N (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature medicine* 20, 857-869.

Fry RW, Morton AR, Crawford GP & Keast D (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 64, 218-227.

Gabriel H, Schmitt B, Urhausen A & Kindermann W (1993). Increased CD45RA+CD45RO+ cells indicate activated T cells after endurance exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 25, 1352-1357.

Gandevia SC (1992). Some central and peripheral factors affecting human motoneuronal output in neuromuscular fatigue. *Sports medicine* 13, 93-98.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL & Vina J (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of physiology* 567, 113-120.

Gomez-Cabrera MC, Domenech E & Vina J (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology & medicine* 44, 126-131.

Griffin CA, Apponi LH, Long KK & Pavlath GK (2010). Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *Journal of cell science* 123, 3052-3060.

Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J & Gratas-Delamarche A (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European journal of applied physiology* 89, 14-20.

Guelfi KJ, Casey TM, Giles JJ, Fournier PA & Arthur PG (2006). A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 952-957.

Hawley JA, Myburgh KH, Noakes TD & Dennis SC (1997). Training techniques to improve fatigue resistance and enhance endurance performance. *Journal of sports sciences* 15, 325-333.

Haycock JW, Jones P, Harris JB & Mantle D (1996). Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Acta neuropathologica* 92, 331-340.

Henningsen J, Pedersen BK & Kratchmarova I (2011). Quantitative analysis of the secretion of the MCP family of chemokines by muscle cells. *Molecular bioSystems* 7, 311-321.

Hill A & Lupton H (1923). Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *QJM* 16, 135-171.

Hill AVL, H (1923). Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *QJM* 16, 135-171.

Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, Darby IA & Febbraio MA (2004). Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 992-994.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H & Ji LL (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 442, 426-434.

Holloszy JO (2008). Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 7, 5-18.

Holloszy JO & Coyle EF (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 56, 831-838.

Holloway KV, O'Gorman M, Woods P, Morton JP, Evans L, Cable NT, Goldspink DF & Burniston JG (2009). Proteomic investigation of changes in human vastus lateralis muscle in response to interval-exercise training. *Proteomics* 9, 5155-5174.

Hortobagyi T, Houmard J, Fraser D, Dudek R, Lambert J & Tracy J (1998). Normal forces and myofibrillar disruption after repeated eccentric exercise. *Journal of applied physiology* 84, 492-498.

Howatson G & van Someren KA (2008). The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine* 38, 483-503.

Irrcher I, Ljubcic V & Hood DA (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 296, C116-123.

Jackson MJ (2009). Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free radical biology & medicine* 47, 1267-1275.

Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP & Donners MM (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 17, 109-118.

Joyner MJ & Coyle EF (2008). Endurance exercise performance: the physiology of champions. *The Journal of physiology* 586, 35-44.

Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Hooper SL & Marshall-Gradisnik SM (2010). The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exercise immunology review* 16, 119-137.

Katzmarzyk PT & Janssen I (2004). The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 29, 90-115.

Kayser B (2003). Exercise starts and ends in the brain. *European journal of applied physiology* 90, 411-419.

Keast D, Cameron K & Morton AR (1988). Exercise and the immune response. *Sports medicine* 5, 248-267.

Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U & Ellingsen O (2005). Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovascular research* 67, 161-172.

Kissel JT, Lynn DJ, Rammohan KW, Klein JP, Griggs RC, Moxley RT, 3rd, Cwik VA, Brooke MH & Mendell JR (1993). Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone- and azathioprine-treated Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 43, 532-536.

Koch LG & Britton SL (2001). Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological genomics* 5, 45-52.

Kolaczowska E & Kubes P (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13, 159-175.

Komulainen J & Vihko V (1994). Exercise-induced necrotic muscle damage and enzyme release in the four days following prolonged submaximal running in rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 428, 346-351.

Lacerda AC, Marubayashi U & Coimbra CC (2005). Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. *Brain research bulletin* 67, 110-116.

Lambert MI & Noakes TD (1989). Dissociation of changes in VO<sub>2</sub> max, muscle QO<sub>2</sub>, and performance with training in rats. *Journal of applied physiology* 66, 1620-1625.

Lawler JM, Hu Z & Barnes WS (1998). Effect of reactive oxygen species on K<sup>+</sup> contractures in the rat diaphragm. *Journal of applied physiology* 84, 948-953.

Lawler JM, Powers SK, Van Dijk H, Visser T, Kordus MJ & Ji LL (1994). Metabolic and antioxidant enzyme activities in the diaphragm: effects of acute exercise. *Respiration physiology* 96, 139-149.

Lerario A, Cogiamanian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, Porretti L & Torrente Y (2010). Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC musculoskeletal disorders* 11, 157.

MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM & McKenzie DC (2000). Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *European journal of applied physiology* 81, 47-53.

Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A & Tarnopolsky MA (2005). Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1498-1500.

Malm C, Sjodin TL, Sjoberg B, Lenkei R, Renstrom P, Lundberg IE & Ekblom B (2004). Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *The Journal of physiology* 556, 983-1000.

Markovitch D, Tyrrell RM & Thompson D (2008). Acute moderate-intensity exercise in middle-aged men has neither an anti- nor proinflammatory effect. *Journal of applied physiology* 105, 260-265.

Martinez CO, McHale MJ, Wells JT, Ochoa O, Michalek JE, McManus LM & Shireman PK (2010). Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 299, R832-842.

Marton O, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Boldogh I & Radak Z (2015). Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response

to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467, 779-788.

McClung JM, Judge AR, Talbert EE & Powers SK (2009). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology* 296, C363-371.

McHugh MP (2003). Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 13, 88-97.

McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA & Parise G (2009). Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PloS one* 4, e6027.

Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, Raglin J, Rietjens G, Steinacker J & Urhausen A (2013). Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine and science in sports and exercise* 45, 186-205.

Meyer M, Pahl HL & Baeuerle PA (1994). Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chemico-biological interactions* 91, 91-100.

Mondal H & Mishra SP (2017). Effect of BMI, Body Fat Percentage and Fat Free Mass on Maximal Oxygen Consumption in Healthy Young Adults. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 11, CC17-CC20.

Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, Wisloff U & Brum PC (2013). High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *Journal of applied physiology* 114, 1029-1041.

Nagaraju K, Raben N, Merritt G, Loeffler L, Kirk K & Plotz P (1998). A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clinical and experimental immunology* 113, 407-414.

Narici MV & Maffulli N (2010). Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *British medical bulletin* 95, 139-159.

Nielsen HB & Pedersen BK (1997). Lymphocyte proliferation in response to exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 75, 375-379.



Nieman DC, Davis JM, Henson DA, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Carson JA, Brown A, Lee WJ, McAnulty SR & McAnulty LS (2003). Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *Journal of applied physiology* 94, 1917-1925.

Nieman DC, Dumke CL, Henson DA, McAnulty SR, Gross SJ & Lind RH (2005). Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race. *Brain, behavior, and immunity* 19, 398-403.

Nieman DC, Konrad M, Henson DA, Kennerly K, Shanely RA & Wallner-Liebmann SJ (2012). Variance in the acute inflammatory response to prolonged cycling is linked to exercise intensity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 32, 12-17.

Nieman DC & Pedersen BK (1999). Exercise and immune function. Recent developments. *Sports medicine* 27, 73-80.

Niess AM & Simon P (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4826-4838.

Nikolaidis MG & Jamurtas AZ (2009). Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Archives of biochemistry and biophysics* 490, 77-84.

Noakes TD (2000). Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 10, 123-145.

Nosaka K, Sakamoto K, Newton M & Sacco P (2001). How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Medicine and science in sports and exercise* 33, 1490-1495.

Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, Lima PM, Coimbra CC, Menezes GB, Teixeira MM & Pinho V (2014). Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PloS one* 9, e96464.

Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE & Bottoms CL (1988). Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *The American journal of anatomy* 182, 335-346.

Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y & Walsh K (2008). Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 283, 32802-32811.

Paulsen G, Cramer R, Benestad HB, Fjeld JG, Morkrid L, Hallen J & Raastad T (2010). Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 42, 75-85.

Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T & Peake JM (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review* 18, 42-97.

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. *Medicine and science in sports and exercise* 37, 737-745.

Pedersen BK, Akerstrom TC, Nielsen AR & Fischer CP (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of applied physiology* 103, 1093-1098.

Pedersen BK & Hoffman-Goetz L (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews* 80, 1055-1081.

Pedersen BK & Nieman DC (1998). Exercise immunology: integration and regulation. *Immunology today* 19, 204-206.

Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S & Pedersen BK (2003). Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 2166-2168.

Pereira B, Costa Rosa LF, Safi DA, Medeiros MH, Curi R & Bechara EJ (1994). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiology & behavior* 56, 1095-1099.

Petersen AM & Pedersen BK (2006). The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 57 Suppl 10, 43-51.

Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN & Klip A (2013). Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304, E453-465.

Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA & Dudley G (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *The American journal of physiology* 266, R375-380.

Powers SK & Jackson MJ (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews* 88, 1243-1276.

Powers SK, Talbert EE & Adhihetty PJ (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology* 589, 2129-2138.

Primola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Souza MO, Cruz JS & Natali AJ (2009). Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *Journal of applied physiology* 107, 593-598.

Primola-Gomes TN, Pires W, Rodrigues LO, Coimbra CC, Marubayashi U & Lima NR (2007). Activation of the central cholinergic pathway increases post-exercise tail heat loss in rats. *Neuroscience letters* 413, 1-5.

Proske U & Allen TJ (2005). Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exercise and sport sciences reviews* 33, 98-104.

Raastad T, Risoy BA, Benestad HB, Fjeld JG & Hallen J (2003). Temporal relation between leukocyte accumulation in muscles and halted recovery 10-20 h after strength exercise. *Journal of applied physiology* 95, 2503-2509.

Rabelo PC, Almeida TF, Guimaraes JB, Barcellos LA, Cordeiro LM, Moraes MM, Coimbra CC, Szawka RE & Soares DD (2015). Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. *Brain research bulletin* 112, 7-13.

Rabelo PCR, Cordeiro LMS, Aquino NSS, Fonseca BBB, Coimbra CC, Wanner SP, Szawka RE & Soares DD (2018). Rats with higher intrinsic exercise capacities exhibit greater preoptic dopamine levels and greater mechanical and thermoregulatory efficiencies while running. *Journal of applied physiology*.

Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F & Goto S (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445, 273-278.

Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H & Goto S (2000). Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Archives of biochemistry and biophysics* 376, 248-251.

Rankin SM (2010). The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *Journal of leukocyte biology* 88, 241-251.

Reid MB (2001). Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of applied physiology* 90, 724-731.

Reid MB, Khawli FA & Moody MR (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of applied physiology* 75, 1081-1087.

Remels AH, Gosker HR, Langen RC & Schols AM (2013). The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD. *Journal of applied physiology* 114, 1253-1262.

Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM & Cunha FQ (2007). Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 490-497.

Rivera-Nieves J, Gorfú G & Ley K (2008). Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 14, 1715-1735.

Rizo-Roca D, Rios-Kristjansson JG, Nunez-Espinosa C, Ascensao A, Magalhaes J, Torrella JR, Pages T & Viscor G (2015). A semiquantitative scoring tool to evaluate eccentric exercise-induced muscle damage in trained rats. *European journal of histochemistry : EJH* 59, 2544.

Rodrigues L & Silami-Garcia E (1998). Fadiga: falha ou mecanismo de proteção. *Temas Atuais III: Educação Física e Esportes.*, 29-48.

Rohde T, MacLean DA, Richter EA, Kiens B & Pedersen BK (1997). Prolonged submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *The American journal of physiology* 273, E85-91.

Salajegheh M, Pinkus JL, Amato AA, Morehouse C, Jallal B, Yao Y & Greenberg SA (2010). Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle & nerve* 42, 576-583.

Sale DG (1987). Influence of exercise and training on motor unit activation. *Exercise and sport sciences reviews* 15, 95-151.

Saunders PU, Pyne DB, Telford RD & Hawley JA (2004). Factors affecting running economy in trained distance runners. *Sports medicine* 34, 465-485.

Schefer V & Talan MI (1996). Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental gerontology* 31, 387-392.

Scheiermann C, Frenette PS & Hidalgo A (2015). Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovascular research* 107, 340-351.

Scheler M, Irmeler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, Beckers J, de Angelis MH, Haring HU & Weigert C (2013). Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *American journal of physiology. Cell physiology* 305, C877-886.

Schwane JA & Armstrong RB (1983). Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 55, 969-975.

Sen CK (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Current topics in cellular regulation* 36, 1-30.

Sen CK, Kolosova I, Hanninen O & Orlov SN (1995). Inward potassium transport systems in skeletal muscle derived cells are highly sensitive to oxidant exposure. *Free radical biology & medicine* 18, 795-800.

Sen CK & Packer L (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, 709-720.

Silber DH, Sinoway LI, Leuenberger UA & Amassian VE (2000). Magnetic stimulation of the human motor cortex evokes skin sympathetic nerve activity. *Journal of applied physiology* 88, 126-134.

Souza J & Gottfried C (2013). Muscle injury: review of experimental models. *Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* 23, 1253-1260.

Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA & Pedersen BK (2002). IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E1272-1278.

Sun D, Martinez CO, Ochoa O, Ruiz-Willhite L, Bonilla JR, Centonze VE, Waite LL, Michalek JE, McManus LM & Shireman PK (2009). Bone marrow-derived cell regulation of skeletal muscle regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 382-395.

Suzuki YJ, Forman HJ & Sevanian A (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free radical biology & medicine* 22, 269-285.

Suzuki YJ, Mizuno M & Packer L (1994). Signal transduction for nuclear factor-kappa B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step. *Journal of immunology* 153, 5008-5015.

Teixeira-Coelho F, Fonseca CG, Barbosa NHS, Vaz FF, Cordeiro LMS, Coimbra CC, Pires W, Soares DD & Wanner SP (2017). Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions on the physical performance of rats. *PloS one* 12, e0183763.

Tidball JG & Villalta SA (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 298, R1173-1187.

Toft AD, Jensen LB, Bruunsgaard H, Ibfelt T, Halkjaer-Kristensen J, Febbraio M & Pedersen BK (2002). Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *American journal of physiology. Cell physiology* 283, C289-295.

Tremblay MS, Shephard RJ, Brawley LR, Cameron C, Craig CL, Duggan M, Esliger DW, Hearst W, Hicks A, Janssen I, Katzmarzyk PT, Latimer AE, Ginis KA, McGuire A, Paterson DH, Sharratt M, Spence JC, Timmons B, Warburton D, Young TK & Zehr L (2007). Physical activity guidelines and guides for Canadians: facts and future. *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique* 98 Suppl 2, S218-224.

Veras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrao CE & Krieger EM (1997). Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *The American journal of physiology* 273, H2627-2631.

Vollaard NB, Shearman JP & Cooper CE (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports medicine* 35, 1045-1062.

Warren G (2007). Human and animal experimental muscle injury models.

Watson TA, MacDonald-Wicks LK & Garg ML (2005). Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 15, 131-146.

Wenger HA & Bell GJ (1986). The interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness. *Sports medicine* 3, 346-356.

Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ & Ellingsen O (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280, H1301-1310.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Xu KY, Zweier JL & Becker LC (1997). Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circulation research* 80, 76-81.

Zoladz JA, Koziel A, Woyda-Ploszczyca A, Celichowski J & Jarmuszkiewicz W (2016). Endurance training increases the efficiency of rat skeletal muscle mitochondria. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468, 1709-1724.

## ANEXO

## Anexo I – Protocolo do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

## 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 supervisors 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.

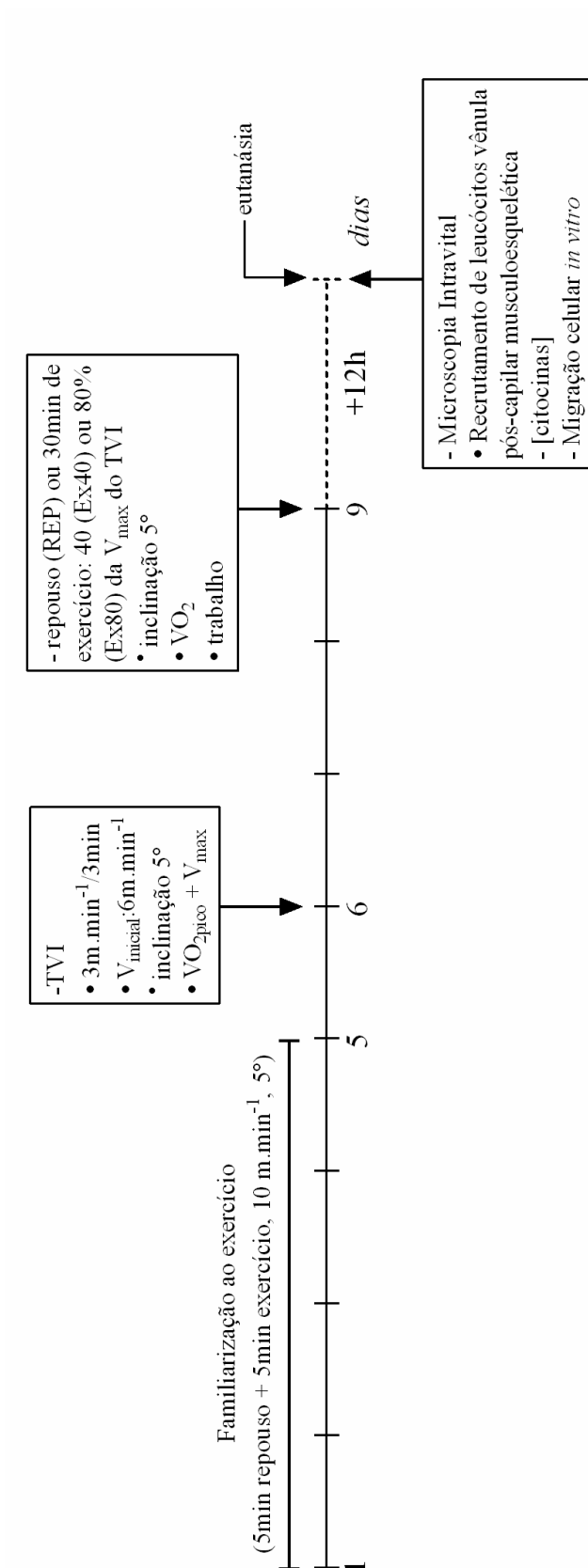
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

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](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)

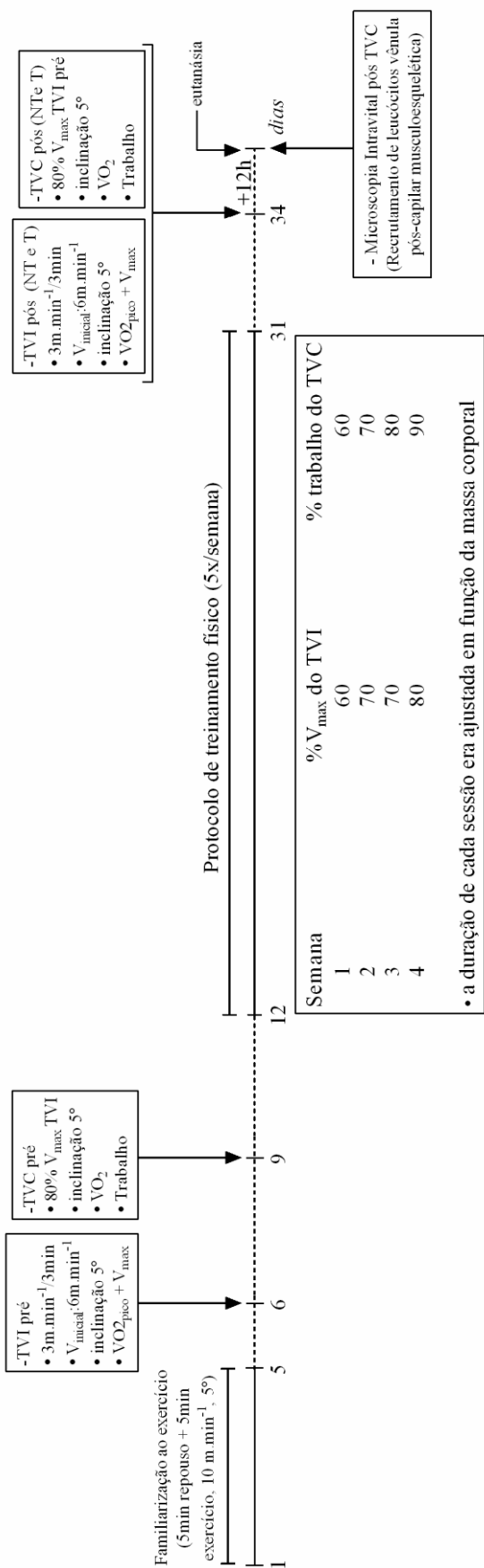


**APÊNDICE**

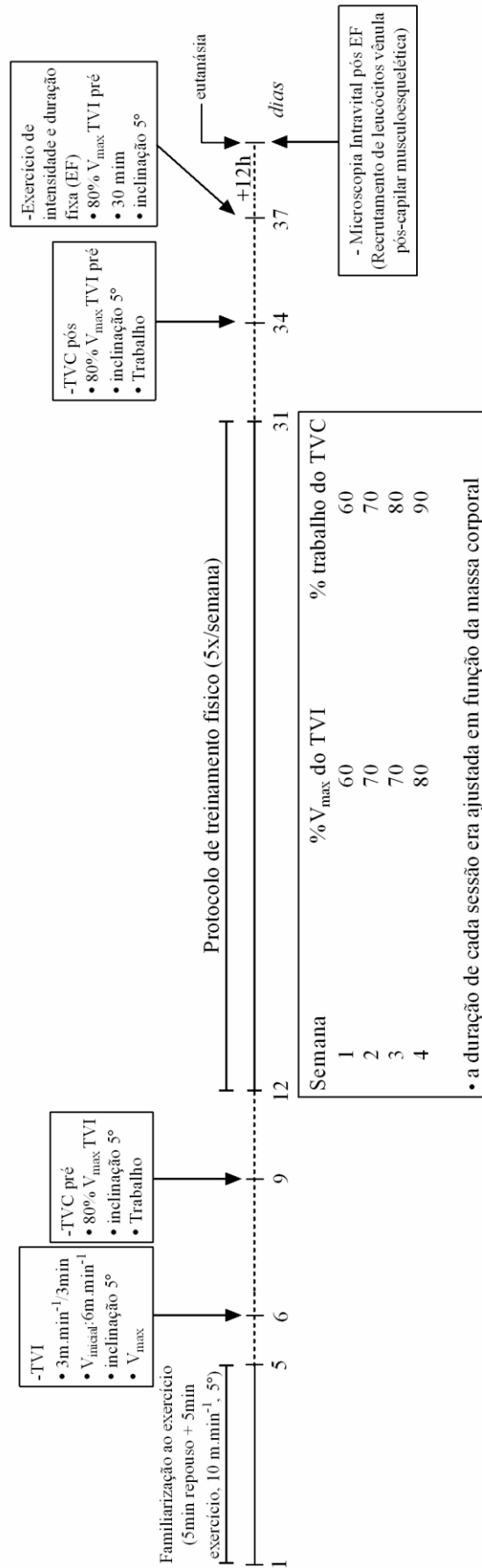
## Linha do tempo do delineamento 1



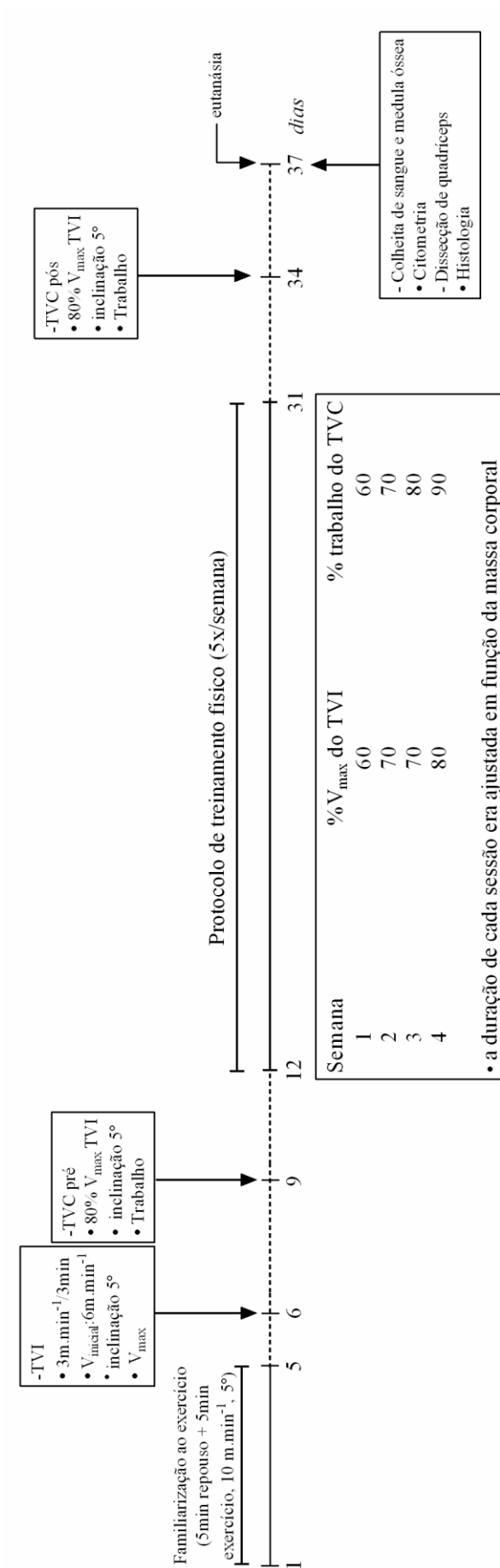
## Linha do tempo do delineamento 2



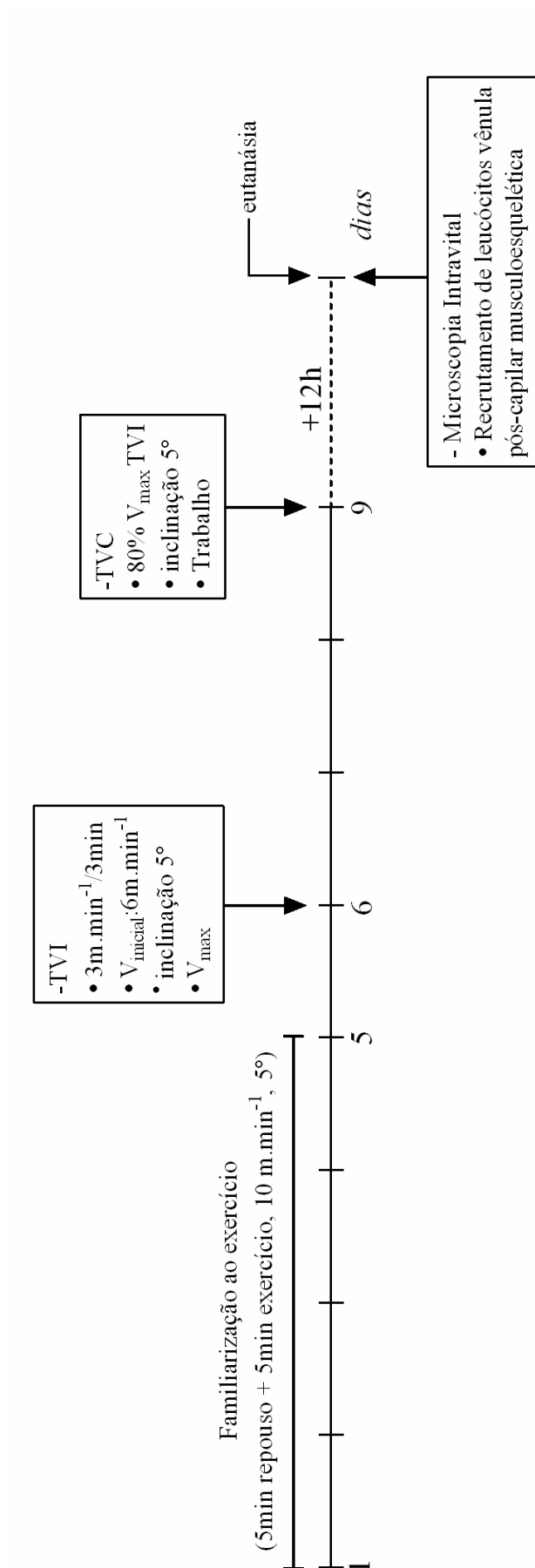
### Linha do tempo do delineamento 3



### Linha do tempo do delineamento 4



## Linha do tempo do delineamento 5



**Linha do tempo do delineamento 6**

