

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

Cinthia Maria Schöler

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO
SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE HSP70 PLASMÁTICA E EXPRESSÃO DE
HSP70 INTRACELULAR EM MONÓCITOS CIRCULANTES DE RATOS:
POSSÍVEL INFLUÊNCIA SOBRE A FUNÇÃO IMUNOINFLAMATÓRIA DE
MONÓCITOS/MACRÓFAGOS.**

Porto Alegre

2011

Cinthia Maria Schöler

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO
SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE HSP70 PLASMÁTICA E EXPRESSÃO DE
HSP70 INTRACELULAR EM MONÓCITOS CIRCULANTES DE RATOS:
POSSÍVEL INFLUÊNCIA SOBRE A FUNÇÃO IMUNOINFLAMATÓRIA DE
MONÓCITOS/MACRÓFAGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.

Porto Alegre

2011

Cinthia Maria Schöler

**EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO
SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE HSP70 PLASMÁTICA E EXPRESSÃO DE
HSP70 INTRACELULAR EM MONÓCITOS CIRCULANTES DE RATOS:
POSSÍVEL INFLUÊNCIA SOBRE A FUNÇÃO IMUNOINFLAMATÓRIA DE
MONÓCITOS/MACRÓFAGOS.**

Conceito final:

Aprovado emde de

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira – UFRGS

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira – UFRGS

Prof. Dr. Lino Pinto de Oliveira Jr – UNISINOS

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, tenho que agradecer a Deus por ter desenhado o meu caminho até aqui, auxiliando-me em todos momentos a erguer-me diante dos obstáculos impostos, sem nunca ter me deixado sozinha.

À minha família, principalmente meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos, desde o árduo início até o tranquilo término, e a meus irmãos, que sempre estiveram presente, apoiando, mesmo que pelo telefone e MSN.

Ao professor Lino, que mesmo após um longo período sem contato, acreditou em minha capacidade e ajudou-me a desenhar este caminho, apresentando-me ao professor Paulo Ivo. Serei eternamente grata por este apoio.

Aos meus colegas de laboratório: Tatiana, professora não só por direito como de fato, me iniciando nas técnicas laboratoriais e científicas, acreditando em mim sempre, em todos os momentos, “merecendo” estar na minha família; Claudinha pelo apoio nos experimentos, a torcida, o apoio psicológico e emocional nos momentos tensos; o Gustavo sempre presente e prestativo em me ajudar em todas as etapas experimentais, socorrendo sempre no PCR e na desestimulante glutatona; Nelson, pelo grande apoio experimental e pessoal; Éder, que sempre demonstrou seu apoio, a seu jeito, e eternizou meu sobrenome no FiscCel; Eber que ajudou nos primeiros passos da técnica que gerou todo o trabalho e o constante “me avisa da banca”; Aline que, com seu jeito desligado, demonstrou estar sempre ligada e sempre disposta a ajudar; Rossana que com sua “delicadeza” estava a apostos para socorrer; Thiago que acompanhou todo o processo de minha entrada no laboratório até o final deste trabalho, sempre apoiando e nunca duvidando de minha capacidade; Sofia que mesmo estando envolvida em outro projeto era prestativa; D. Ritinha com a qual aprendi muito sobre as técnicas de higienização de materiais, e sempre de olho “na gente”; Patrícia Dias e Ana sempre dispostas a ajudar no que fosse necessário e possível, e aos demais companheiros de laboratório e grupo que foram chegando: Vinícius, Mariana, Antônio, Mirna, Maciel, Suheleenn, Augustus, Patrícia Bock, Maycon, que mesmo de longe ou com pouco tempo de convívio, estiveram e continuam torcendo por mim.

Agradeço ao pessoal do apoio técnico, cujo trabalho foi essencial para que eu pudesse finalizar esta caminhada, os bioteristas, secretaria do PPGCMH (André/Ana que sempre socorriam nas dúvidas e apertos), professores (sempre instigando-nos a saber e estudar mais) e colegas (apoio e amizade, “todo mundo no mesmo barco”).

Sem esquecer, é claro, a CAPES pelo “salário” mensal no apoio a pesquisa.

Finalizando, não poderia deixar de agradecer a D. Miriam que sempre demonstrou seu carinho e apoio em todos os momentos e ao nosso Professor Doutor Paulo Ivo, mestre na essência pura da palavra, como professor e orientador da ciência e do profissionalismo, não se abstendo da humildade e preocupação com todos, que me acolheu no laboratório. Como também, por acreditar no meu potencial ao confiar-me um trabalho tão minucioso, com técnicas extremamente elegantes e específicas. O meu eterno agradecimento.

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

RESUMO

O exercício físico, quando realizado de forma moderada apresenta diversos benefícios fisiológicos, principalmente quando relacionado ao sistema imunológico, tanto após o término do esforço quanto a longo prazo. Por outro lado, proteínas de choque térmico da família de 70 kDa estão implicadas na apresentação de antígenos, sinalização pró-inflamatória (quando no meio extracelular) e anti-inflamatória (quando no intracelular). Entretanto, a relação entre a intensidade do exercício e a imunodeteção de HSP70 intra e extracelular em monócitos circulantes não foi estudada. Portanto, utilizando a natação com diferentes intensidades, conforme o sobrepeso atado à base da cauda de ratos (repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal), durante 20 min, verificamos a imunodeteção de HSP70 em monócitos e plasma, fagocitose de monócitos/macrófagos, expressão dos mRNAs codificando para HSP72 e HSP73, produção de peróxido de hidrogênio, concentrações de malondialdeído sorológicos, concentrações de glutatona e dissulfeto de glutatona em eritrócitos, imediatamente após o esforço físico e 12 h após este. Os resultados mostraram que exercícios moderados apresentam incremento na fagocitose de monócitos/macrófagos, preservação do conteúdo intracelular de HSP70, e elevação de seus níveis plasmáticos tanto a curto como longo prazo. Entretanto, nas maiores intensidades, observamos aumentos nos índices de fagocitose, diminuição do conteúdo intracelular de HSP70, elevados aumentos na HSP70 plasmática, diminuição na produção de peróxido de hidrogênio às custas de uma maior produção de malondialdeído e diminuição das reservas antioxidantes de eritrócitos (aumento da relação [GSSG]/[GSH]) permanecendo a longo prazo com discreta diminuição, além de diminuição na avidéz fagocítica de monócitos, segregação de HSP70 destas células e queda dos níveis plasmáticos das proteínas de choque térmico. Concluímos que o exercício em intensidades moderadas promove incremento em algumas das atividades de monócitos, correlacionando-se com a atividade do sistema imunológico inato, ao contrário de exercícios realizados de forma extenuante, que, além de reduzirem a atividade imunoinflamatória de monócitos circulantes, podem induzir estado pró-inflamatório sistêmico.

ABSTRACT

Exercise, when performed in a moderate fashion, has many physiological benefits, especially concerning the immune system, both after the effort and on a long term basis. On the other hand, heat shock proteins of the 70-kDa family are involved in antigen presentation, pro-inflammatory signaling (when extracellularly located) and anti-inflammatory (when intracellularly). However, the relationship between exercise intensity and immunodetection of intra and extracellular HSP70 in circulating monocytes remains unclear. Therefore, by using swimming with different intensities, as overweight attached to base of tail of rats (rest, 2%, 4%, 6% and 8% of body weight) for 20 min, we investigated the immunodetection of HSP70 in monocytes and plasma, phagocytosis of monocytes/macrophages, expression of mRNAs coding for HSP72 and HSP73, production of hydrogen peroxide, malondialdehyde concentrations of serum concentrations of glutathione and glutathione disulfide in erythrocytes, immediately after the exercise and 12 h after this. The results show that moderate exercise enhances monocyte phagocytosis over *Saccharomyces cerevisiae* ghosts (zymosan), with preservation of intracellular content of HSP70, increased plasma levels of both the short and long term. However, at higher intensities, we observed increases in rates of phagocytosis, decreased intracellular content of HSP70, HSP70 high increases in plasma, decreased production of hydrogen peroxide at the expense of an increased production of malondialdehyde and decreased antioxidant reserve of erythrocytes (rise in [GSSG]/[GSH] ratio) persisting in the long term with a slight reduction, and reduction in phagocytic avidity of monocytes, HSP70 segregation of these cells and a decrease in plasma levels of heat shock proteins. We conclude that moderate intensity exercise promotes an increase in some of the activities of monocytes, correlating with the activity of the innate immune system, unlike exercises performed in a strenuous basis, which also promotes harm to circulating monocytes and may cause a state of systemic inflammation.

SUMÁRIO

LISTA DAS FIGURAS	16
INTRODUÇÃO	18
1 REFERENCIAL TEÓRICO	21
1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA RELAÇÃO COM O EXERCÍCIO FÍSICO.....	22
1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.....	26
1.4 HSP E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO	29
1.5 HSP EXTRACELULAR.....	31
1.6 AUMENTO NO CONTEÚDO INTRACELULAR DE HSP INDUZIDO PELO EXERCÍCIO EM VÁRIOS TECIDOS E SEGREGAÇÃO DESTA PROTEÍNA POR CÉLULAS DOS TECIDOS HEPATOESPLÂNCNICOS	35
1.7 HSP70 SINTETIZADA/LIBERADA POR MONÓCITOS/MACRÓFAGOS FRENTE AO EXERCÍCIO.....	36
1.8 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL	37
2 PROBLEMA DA PESQUISA	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA	41
4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	41
4.3 ANIMAIS	41
4.4 DISPOSIÇÃO FINAL DE RESÍDUOS.....	42
4.5 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	42
4.6 DOSAGEM DE LACTATO	43
4.7 SEPARAÇÃO E CULTURA DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS: OBTENÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA	44
4.8 VIABILIDADE DE MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	45

4.9	CONTAGEM DIFERENCIAL DE MONONUCLEARES SANGUÍNEOS PELA TÉCNICA DO VIOLETA CRISTAL-ÁCIDO ACÉTICO.....	46
4.10	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS PARA O RT-qPCR.....	46
4.11	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	46
4.12	IMUNODETECÇÃO DE HSP70	47
4.13	TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	48
	4.13.1 Extração do RNA total	48
	4.13.2 Preparação do DNA complementar (cDNA)	49
	4.13.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)	49
4.14	ANÁLISE DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA PELA TÉCNICA DO ZIMOSAN.....	50
4.15	ÍNDICE DE HISHIKAWA.....	51
4.16	XILENOL LARANJA	51
4.17	AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	52
4.18	DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	53
4.19	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE GLUTATIONA.....	54
4.20	DETERMINAÇÃO DE NITRITOS	55
4.21	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
4.22	APOIO FINANCEIRO	56
5	RESULTADOS	57
5.1	LACTATO SANGUÍNEO.....	57
5.2	IMUNODETECÇÃO DE HSP70	58
	5.2.1 Plasma sanguíneo	58
	5.2.2 Monócitos/macrófagos	64
5.3	REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)	68
5.4	FAGOCITOSE DE ZIMOSAN	70
	5.4.1. Fagocitose de três ou mais partículas	70
	5.4.2 Índice de Hishikawa	72
	5.4.3 Fagocitose de três ou mais partículas com estimulação de PMA	74
	5.4.4. Índice de Hishikawa com estimulação de PMA	76

5.5 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	83
5.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	85
5.7 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	87
5.7.1. Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	88
5.7.2 Técnica do Xilenol Laranja.....	90
5.8 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA E DISSULFETO DE GLUTATIONA.....	92
5.8.1 Concentração de glutathione	93
5.8.2 Concentração de dissulfeto de glutathione	94
5.8.3 Relação dissulfeto de glutathione/glutathione.....	97
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Receptor adrenérgico
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclica (do inglês, <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CCR5	Receptor quimiocina tipo 5 C-C (do inglês, <i>chemokine receptor type 5 C-C</i>)
CD14	Grupo de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CP-PG	Prostaglandina ciclopentenônica (do inglês, <i>cyclopentenone prostaglandins</i>)
CREB	Proteína de ligação do element responsive (do inglês, <i>responsive element binding protein</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DUSP	fosfatase dual-específica (do inglês <i>dual-specificity phosphatase</i>)
EBSS	Do inglês, <i>Earle's balanced salt solution</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
eHSP	Proteína de choque térmico extracelular
eHSP72	Proteínas de choque térmico de 72 kDa extracelular
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)

ERO	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
Grp	Proteínas reguladas por glicose
GSH	Glutationa
GSHr	Glutationa redutase
GSSG	Dissulfeto de Glutationa
HBSS	Hank's balanced salt solution
HSC70	Proteína de choque térmico, constitutiva de 73 kDa
HSE	Elemento de choque térmico (do inglês, <i>heat shock element</i>)
HSF	Fator de choque térmico (do inglês, <i>heat shock factor</i>)
HSP	Proteína de choque térmico
HSP27	Proteína de choque térmico de 27 kDa
HSP60	Proteína de choque térmico de 60 kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HPS75	Proteína de choque térmico de 75 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
iHSP	Proteína de choque térmico intracelular
IFN- γ	Interferon- γ
IRF-1	Fator de regulação do interferon-1(do inglês, <i>interferon regulated factor-1</i>)
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK	Quinase associada ao receptor de IL-1 (do inglês, <i>IL-1R-associated kinase</i>)
JNK	c-Jun quinase
LPS	lipopolissacarídeos de parede bacteriana

MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês, <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
MIP-1	proteína inflamatória macrofágica 1 (do inglês, <i>macrophage inflammatory protein 1</i>)
MPA	Ácido metafosfórico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, <i>messenger Ribonucleic acid</i>)
MyD88	proteína resposta-primária de diferenciação mieloide inflamatória 88 (do inglês, <i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (do inglês, <i>nuclear factor-κB</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>nitric oxide</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>phosphate buffer saline</i>)
PGA	Prostaglandina A
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PBMC	Células mononucleares sanguíneas periféricas (do inglês <i>peripheral blood mononucleares cells</i>)
PMA	Acetato de forbol-miristato (do inglês <i>phorbol-myristate acetate</i>).
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil (do inglês, <i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i>)
RANTES	Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (do inglês, <i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>)

RPMI 1640	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SBD	Domínio-ligado-ao-substrato (do inglês, <i>substrate binding domain</i>)
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
STAT-1	Transdutora de sinal e ativadora da transcrição-1 (do inglês, <i>signal transducers and activators of transcription-1</i>)
TLR2	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor 2</i>)
TLR4	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor 4</i>)
TLR7	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor 7</i>)
TNB	Ácido tionitrobenzoico
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor- α</i>)
Toll/IL-1	Receptor <i>Toll</i> /Interleucina 1
TPP	Trifenilfosfina
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio
XO	Xilenol laranja (do inglês, <i>xylene orange</i>)

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1- Esquema do desenho experimental.....	43
Figura 2 – Dosagem de lactato sanguíneo.....	57
Figura 3 – Imunodeteccção de HSP70 plasmática, imediato.....	59
Figura 4 – Imunodeteccção de HSP72 plasmática, imediato.....	60
Figura 5 – Imunodeteccção de HSP73 plasmática, imediato.....	61
Figura 6 – Imunodeteccção de HSP70 plasmática, 12 h.....	62
Figura 7 – Imunodeteccção de HSP72 plasmática, 12 h.....	63
Figura 8 – Imunodeteccção de HSP73 plasmática, 12 h.....	64
Figura 9 – Imunodeteccção de HSP70 em monócitos/macrófagos, imediato.....	65
Figura 10 – Imunodeteccção de HSP70 em monócitos/macrófagos, 12 h.....	66
Figura 11 – Expressão de mRNA de HSP72 de monócitos, 12 h.....	69
Figura 12 - Expressão de mRNA de HSP73 de monócitos, 12 h.....	70
Figura 13 – Fagocitose de três ou mais partículas, imediato.....	71
Figura 14 – Fagocitose de três ou mais partículas, 12 h.....	72
Figura 15 – Índice de Hishikawa, imediato.....	74
Figura 16 – Índice de Hishikawa, 12 h.....	75
Figura 17 – Fagocitose de três ou mais partículas, com PMA, imediato.....	76
Figura 18 – Fagocitose de três ou mais partículas, com PMA, 12 h.....	77
Figura 19 – Índice de Hishikawa, com PMA, imediato.....	78
Figura 20 – Índice de Hishikawa, com PMA, 12 h.....	79
Figura 21 – Imagem microscópica de monócitos/macrófagos do grupo repouso.....	80
Figura 22 – Imagem microscópica de monócitos/macrófagos do grupo repouso com PMA.....	81
Figura 23 – Imagem microscópica de monócitos/macrófagos do grupo 8%, com PMA	82
Figura 24 – Imagem microscópica de monócitos/macrófagos formando pseudópodos, grupo 8%.....	83

Figura 25 – Imagem microscópica de monócitos/macrófagos lançando pseudópodos, grupo 8%.....	84
Figura 26 – Produção de peróxido de hidrogênio, imediato.....	85
Figura 27 – Produção de peróxido de hidrogênio, 12 h.....	86
Figura 28 – Produção de nitritos, imediato.....	87
Figura 29 – Produção de nitritos, 12 h.....	88
Figura 30 – Técnica das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, imediato.....	90
Figura 31 – Técnica das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, 12 h.....	91
Figura 32 – Xilenol laranja, imediato.....	92
Figura 33 – Xilenol laranja, 12 h.....	93
Figura 34 – Concentração de glutatona eritrocitária, imediato.....	94
Figura 35 – Concentração de glutatona eritrocitária, 12 h.....	95
Figura 36 – Concentração de dissulfeto de glutatona eritrocitário, imediato.....	96
Figura 37 – Concentração de dissulfeto de glutatona eritrocitário, 12 h.....	97
Figura 38 – Relação [GSSG/GSH], imediato.....	98
Figura 39 – Relação [GSSG/GSH], 12 h.....	99

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos surgiram estudos sobre os efeitos anti-inflamatórios das proteínas de choque térmico da família de 70kDa (HSP70) intracelulares, em virtude de sua capacidade de bloquear a fosforilação do complexo I κ B e, portanto, a ativação do NF- κ B (Campisi *et al.*, 2003; Schell *et al.*, 2005), principal fator de transcrição de proteínas pró-inflamatórias, como observado no músculo cardíaco (Milne & Noble, 2002), esquelético (Thompson *et al.*, 2002; Harkins, 2009) e fígado (González & Manso, 2004; Febbraio *et al.*, 2002). A concentração intracelular destas proteínas aumenta quando as células são expostas a condições como hipertermia, estresse oxidativo, redução do conteúdo glicogênio ou diminuição do pH do meio interno. O exercício físico impõe ao organismo condições como estas (McArdle *et al.* 1996) e, de fato, é um poderoso indutor da expressão de HPS70 (González & Manso, 2004; Fehrenbach *et al.*, 2005; Fehrenbach *et al.*, 2000; Febbraio *et al.*, 2002a; Leandro *et al.*, 2007).

Em contraposição ao exposto acima, estudos recentes (González & Manso, 2004; Febbraio *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002; Harkins, 2009; Milne & Noble, 2002) demonstram que as HSP70 podem ser segregadas por diversas células e que essas proteínas, no meio extracelular, estimulam receptores de células do sistema imunológico inato, responsáveis pela deflagração da resposta inflamatória (Binder *et al.*, 2000; Berwin *et al.*, 2003; Radsak *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2001; Kovalchin *et al.*, 2006). Assim, as HSP70 no meio extracelular agem como imunomoduladores que alertam o sistema imunológico da mesma forma que estímulos pró-inflamatórios típicos como interleucinas, TNF- α e CD14 (uma vez que são produzidas em resposta ao estresse da invasão por bactérias e vírus), mas que não deixam que as respostas inflamatórias se tornem excessivas (tipo sepse) (Calderwood & Theriault, 2007; Asea, 2005). Através de sua liberação das células para a corrente sanguínea, elas ativam o sistema imunológico (como os monócitos/macrófagos, células-alvo deste estudo) e, dessa forma, melhoram a capacidade de resposta do sistema imunoinflamatório.

A expressão da forma induzível da HSP70, HSP72, poderia ser um marcador útil para a avaliação da adaptação ao treinamento ou condições térmicas (Fehrenbach *et al.*, 2001). Há uma evidência crescente, que o sistema imunológico pode servir como um importante

indicador fisiológico para uma habilidade individual pessoal, como recuperação de estresse de carga (Büttner *et al.*, 2007). A evidência suporta a ideia de que células mononucleares sanguíneas periféricas realizam um papel não somente na atividade do sistema imunológico clássico de eliminar organismos invasores, mas também no contexto de adaptação para o exercício como agentes de crescimento tecidual e reparo (Connolly *et al.*, 2004).

Assim, acredita-se que o equilíbrio entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória passe pela regulação do balanço entre HSP70 circulantes e intracelular (Heck *et al.*, 2011), e que diferentes intensidades de exercício físico agudo possam interferir na função imunoinflamatória de monócitos/macrófagos. Esta foi nossa proposta investigada no rato, utilizando-se o modelo de natação.

A liberação de HSP70 pelos monócitos/macrófagos induzida pelo exercício e suas possíveis implicações para o controle do sistema imunológico contribui para reforçar a importância da adoção de um padrão de vida ativo como estratégia para a manutenção da saúde. No entanto, considerando que exercícios de intensidade muito alta promovem imunodepressão e que exercícios de intensidade muito baixa não produzem efeitos significativos (Zaldivar *et al.*, 2006), é importante determinar a intensidade adequada para obtenção dos melhores resultados.

Nesse projeto propusemo-nos a determinar, entre algumas intensidades previamente estabelecidas, qual aquela cuja relação intensidade/volume (duração x intensidade) é a mais eficiente em elevar os níveis circulantes de HSP70 e a meia-vida da HSP70 intracelular nessas células após o exercício. Avaliamos, também, a capacidade dos monócitos/macrófagos cultivados em exportar HSP70 para o plasma, fagocitar e produzir e segregar peróxido de hidrogênio estimulados ou não por indutor como PMA e dessa forma, identificar a expressão ideal de HSP70 no plasma ou nas células a fim de provocar uma imunoestimulação relacionada com a carga (potência x tempo = energia) de exercício, promovendo os benefícios indicados por esta proteína.

Este trabalho, em um primeiro momento, apresenta um referencial teórico o qual abordará o sistema imunológico, o histórico e a caracterização das proteínas de choque térmico (sua relação com o sistema imunológico e sua presença no meio extracelular), o aumento do conteúdo intracelular de HSP70 em vários tecidos e sua liberação pelos tecidos

hepatoesplânicos, relação da HSP70 com monócitos/macrófagos (síntese/liberação) e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Após caracterização teórica das proteínas de choque térmico, o trabalho segue em uma segunda parte, descrevendo os objetivos e o problema da pesquisa proposta.

O momento seguinte, apresenta os materiais e métodos da pesquisa, isto é, a descrição dos animais utilizados no estudo, os protocolos de exercício físico, o preparo do sangue para a coleta dos monócitos circulantes e as avaliações de biologia molecular e bioquímicas do estudo.

No item a seguir, os resultados de cada variável analisada são demonstrados para no penúltimo capítulo ocorrer a discussão dos resultados.

O trabalho finaliza com as referências bibliográficas utilizadas.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que em torno de 18% das mortes registradas até então, foram decorrentes de patologias relacionadas a insuficiências relacionadas ao sistema imunológico (doenças infecciosas e parasíticas, câncer, infecções respiratórias e diabetes), representando em torno de 10,4 milhões de óbitos. A entidade faz um prognóstico, estimando aumento dos índices de indivíduos acometidos por câncer. Portanto, pesquisas e alternativas que reforcem o sistema imunológico são idealizadas atualmente.

O tipo específico de resposta define as imunidades inata e adaptativa. A primeira representa a resposta imediata a uma injúria ou infecção e é compreendida por células fagocitárias como: monócitos, macrófagos e neutrófilos; a segunda apresenta uma resposta característica a um determinado patógeno, sendo representada pelos linfócitos, que podem ser classificados basicamente em B ou T (Parham, 2001).

A medula óssea é o local de origem comum de todos os leucócitos. Através de diferenciações, as células tronco hematopoiéticas (células iniciais) tornam-se pro-monócitos que, a seu tempo, também sofrem alterações e posteriormente são caracterizados como monócitos, neutrófilos, granulócitos e alguns tipos de linfócitos (Guyton, 1997). Após sua formação, as células do sistema imunológico alcançam a circulação sanguínea, direcionando-se para as diferentes regiões do organismo nas quais irão atuar. Por esta pesquisa estar relacionada com monócitos/macrófagos, preocuparem-nos a partir deste parágrafo, direcionar a dissertação para este tipo celular.

Monócitos são células do sistema imunológico que participam da imunidade inata, constituindo a segunda linha de defesa contra a invasão de micro-organismos (a primeira linha é constituída pelas barreiras mecânicas, químicas e biológicas que protegem o corpo). Mas, em termos de resposta imunológica, fagócitos representam a primeira linha de defesa contra processos invasivos (Doan *et al.*, 2008).

Na corrente sanguínea, os monócitos estão junto às demais células do sangue ou aderidos ao endotélio vascular. Ao passarem para o interstício, atraídos por mediadores quimiotáticos, liberados pelas células dos tecidos inflamados, os monócitos alteram a sua

função e promovem a sua diferenciação para macrófagos. Diferenciada, esta célula é responsável pela secreção de diversas moléculas que promovem ou inibem a inflamação, regulam o crescimento e a hematopoiese, influenciam a função do linfócito, afetam o reparo e renovação tecidual; liberam substâncias que agem como fatores regulatórios ou que possuem ação microbicida (Woods *et al. apud* Adams & Hamilton, 2000; Doan *et al.* 2008; Kizaki *et al.*, 2008); apresentam capacidade de aderência, quimiotaxia e fagocitose (Leandro *et al.*, 2007; Doan *et al.* 2008) caracterizando-a, dessa forma, como a principal célula mediadora da resposta inflamatória (Heimbach *et al.*, 2001).

Estas células são eficientes em reconhecer, ligar e internalizar fatores potencialmente perigosos através do processo denominado fagocitose. Para destruir patógenos ingeridos, a fagocitose é acompanhada por uma ativação celular que é caracterizada por um aumento dramático nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adicionando, o processo inflamatório é mediado por fatores liberados pelos macrófagos como mediadores lipídicos e citocinas, sendo estes direcionados a destruir patógenos podendo também desencadear a resposta ao estresse (Asea & Maio, 2007).

Monócitos e linfócitos comunicam-se através da apresentação cruzada de antígeno, ou seja, macrófagos realizam o primeiro contato com um invasor e após fagocitá-lo e digeri-lo, apresentam produtos antigênicos em seu citoplasma os quais depois serão apresentados aos linfócitos, resultando em um aumento na população de clones de linfócitos B que apresentam este antígeno (Guyton, 1997), relacionando assim, a resposta associada entre os dois tipos de imunidades.

1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA RELAÇÃO COM O EXERCÍCIO FÍSICO

O tipo e o nível de estresse provocado pelo exercício físico podem determinar o impacto do mesmo sobre o sistema imunológico. Em estudos relacionando exercício e imunidade, pesquisadores consideram uma série de exercício agudo como um modelo de indução de estresse ou “trauma”, enquanto exercício de alta intensidade ou de longa duração é usado como uma via para induzir imunossupressão (Kraemer & Rogol, 2005). Ao executar um exercício, inúmeras mudanças tem sido observadas, incluindo aumentos na mobilização de leucócitos, liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, dano tecidual, produção de radicais livres e ativação de algumas vias, observadas em inflamações (Kraemer & Rogol, 2005).

Uma simples série de exercício (independente do tipo, duração e intensidade) pode: a) induzir o sistema imunológico a um aumento dos níveis de leucócitos circulantes (Natale *et al.*, 2003; Zaldivar *et al.*, 2006; Malm *et al.*, 2000; Starkie *et al.*, 2001) já que a secreção de catecolaminas (agindo diretamente na interação célula-célula) e o desprendimento de células do endotélio vascular estão relacionados com a elevação destes níveis circulantes durante a sessão de exercício físico (Woods *et al.*, 2000; Rhind *et al.*, 1999), estando fortemente ligado à intensidade do exercício já que com o aumento desta, há um maior estresse de cisalhamento intravascular (Natale *et al.*, 2003); b) alterar a capacidade funcional de leucócitos; c) induzir a liberação de um local, moléculas que regulam a função imunológica; produzindo transitória ou prolongada inflamação, e em fazendo só isso, mudanças totais em nível de defesa imunológica que o corpo teve para proteger-se contra infecção e células tumorais, sendo a extensão dessas mudanças tipicamente maior, de acordo com o aumento do estresse do exercício (Kraemer & Rogol, 2005).

Dessa forma, parece existir uma concordância geral de que níveis moderados de exercício ou mesmo treinamento possam estimular completamente defesas imunológicas, enquanto treinamento severo ou extenuante pode suprimir defesas imunológicas contra infecções virais e bacterianas (Nieman *et al.*, 1997). Além disso, o raio de estresse/recuperação pode ser um componente chave ditando a substituição do benefício ao detrimento, como um estresse do aumento do treinamento físico (Kraemer & Rogol, 2005).

A imunidade inata, constituída por macrófagos, monócitos e outras células, é rapidamente ativada quando surge uma infecção no organismo e busca a redução do crescimento ou eliminação do invasor microbiano, existindo um incremento destas funções quando o indivíduo realiza um exercício físico de carga moderada. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que monócitos circulantes de ratos, submetidos a um exercício agudo de intensidade moderada durante uma hora, promovem estímulo à função imunológica de monócitos/macrófagos, através do aumento no número de partículas fagocitadas, produção de peróxido de hidrogênio, nitritos, óxido nítrico e expressão de iNOS, possivelmente em virtude do aumento de catecolaminas circulantes que ativam o monócito, acionando a via do fator nuclear κB (NF- κB do inglês, *nuclear factor κB*) a produzirem fator de necrose tumoral (TNF- α do inglês, *tumoral necrose factor*), que continua ativando o monócito/macrófago, numa estimulação autócrina de retroalimentação positiva (Silveira *et al.*, 2007). Células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado, constituindo-se como o

maior grupo de macrófagos teciduais), macrófagos peritoneais e alveolares pulmonares de ratos submetidos a uma sessão de exercício físico de alta ou moderada intensidade, apresentam fagocitose aumentada (Yano *et al.*, 2004; Sugiura *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2001), podendo ser essa relação dose-dependente quando há aumentos na duração da sessão de exercício físico (Sugiura *et al.*, 2001) e também em efeitos agudos e crônicos, não havendo distinção por gênero ou idade (Ferrandez & De la Fuente, 1999). Em intensidades elevadas de esforço físico, pequenas lesões nas paredes da mucosa intestinal poderão ocorrer, por modificações na permeabilidade da membrana intestinal, liberando altas quantidades de lipopolissacarídeos (LPS) na circulação portal. Dessa forma, a liberação de endotoxina do intestino para o sistema portal expõe a uma situação de perigo as células de Kupffer (Yano *et al.*, 2004) as quais, respondem prontamente a esta possível invasão bacteriana, aumentando seu poder fagocítico, enquanto macrófagos peritoneais demonstraram aumento também nesta função e aumentos na secreção de TNF- α e produção de óxido nítrico (NO do inglês, *nitric oxide*) (Kizaki *et al.*, 2008). Estas moléculas, assim como interleucinas e interferon- γ (IFN- γ), caracterizam-se como as principais responsáveis pela sinalização extracelular sendo denominadas citocinas, as quais são pequenas proteínas ou glicoproteínas, secretadas por muitas células no corpo em resposta a vários estímulos e estão presentes em baixas concentrações no sangue. Estas citocinas são produzidas por células imunológicas, não somente providenciando comunicação entre células do sistema imune, mas, também exercendo uma forma de comunicação entre imunidade, nervos e sistema endócrino, ligando-se a receptores que ativam cascatas, que levam à indução ou à inibição da transcrição de inúmeros genes, relacionados inúmeras vezes ao sistema imunológico (Roitt *et al.*, 2003, Kraemer & Rogol, 2005).

O aumento na liberação de citocinas em resposta ao exercício é dose-dependente, baseado na intensidade e duração do exercício e o impacto do exercício na produção destes sinalizadores pode, em parte, explicar como o exercício pode modular tanto o sistema imune como neuroendócrino. Então, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e NO, aumentam no exercício físico e alertam as demais células imunológicas do perigo eminente e estabelecido (Kraemer & Rogol, 2005; Connolly *et al.*, 2004). A liberação destas citocinas torna-se mais eficaz quando associado ao efeito do treinamento físico há a elevação da temperatura corporal, induzindo assim aumentos em praticamente todas citocinas testadas: interleucina 10 (IL do inglês, *interleukin*), TNF- α , IL-6, IL-1 β e antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-

1ra do inglês *antagonist receptor interleukin 1*), sendo os níveis maiores registrados nos atletas (Selkirk *et al.*, 2009). Ao longo da recuperação há uma queda dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em virtude de um provável equilíbrio entre as respostas anti- e pró-inflamatórias, sendo a resposta a recuperação do organismo dependente da intensidade/duração do esforço físico, ou seja, quanto mais intenso/longo for o exercício físico e quanto maior for o estresse orgânico, um maior tempo de recuperação será exigido a fim de estabilizar novamente a homeostase (Ostrowski *et al.*, 1999). Além disso, havendo uma maior resposta oxidante nas células imunológica provocadas pelo exercício físico, há a ativação dos sistemas antioxidantes enzimáticos como aumentos dos níveis de superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase e catalase, respondendo de forma mais resistente quando posteriormente são expostos a um novo estímulo oxidante (Fisher *et al.*, 2010; Cases *et al.*, 2006).

Após uma meia maratona (21.000 metros), foi observado que indivíduos treinados em endurance apresentavam um aumento na transcrição do gene da óxido nítrico sintase induzível (iNOS do inglês *inducible nitric oxide sintase*) estimulada por IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (suas concentrações encontram-se elevadas em uma sessão de exercício físico), cujo pico ocorria três horas pós-exercício mantendo-se por 48 h após o término da corrida (Niess *et al.*, 2000; Ostrowski *et al.*, 1999).

A concentração de IL-6 (citocina anti-inflamatória produzida no seio de respostas inflamatórias) geralmente apresenta-se aumentada após um exercício físico (Connolly *et al.*, 2004; Zaldivar *et al.*, 2006; Ostrowski *et al.*, 2000; Pedersen & Febbraio, 2008). Já o IL-1ra apresenta um pico de liberação após uma hora do exercício físico, indicando um aumento de 39 vezes em relação aos valores pré-exercício. A concentração de IL-6 reduz de forma progressiva ao longo das quatro horas que seguem após o término de uma atividade exaustiva. Os inibidores de citocinas sTNF-r1 e sTNF-r2 aumentam na primeira hora após o exercício físico, 2,7 e 1,6 vezes respectivamente, em relação aos valores de repouso (Ostrowski *et al.*, 1999).

A citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou sua concentração circulante em 27 vezes após exercício de alta intensidade (Ostrowski *et al.*, 1999), estando também elevada em outros estudos com exercício intenso (Peake *et al.*, 2005). A IL-12, por sua vez, também se elevou após um exercício extenuante, assim como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1 do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*) (Peake *et al.*, 2005).

Assim, conforme os dados colocados acima, o exercício físico (principalmente quando se realiza numa intensidade alta) induz um aumento das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1a. Para equilibrar este desbalanço, os mecanismos dos componentes da resposta anti-inflamatória ainda não estão claros, mas, podem estar relacionados à estimulação associada ao exercício de IL-1ra, sTNF-r1, sTNF-r2, IL-10, IL-6, proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70 do inglês *heat shock protein*) intracelular, fosfatases dual-específica (DUSP, do inglês *dual-specificity phosphatase*) e outros mediadores que podem agir desativando as vias das proteínas ativadoras de mitógeno quinase (MAPK do inglês, *mitogen activated protein kinase*) ou vias de proteínas cinases ativadas pelo estresse com o organismo buscando dessa forma, uma diminuição da magnitude e da duração da resposta inflamatória ao exercício físico (Ostrowski *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2004; Kizaki *et al.*, 2008). Deste modo, o exercício estabelece concomitantemente a inflamação e consequente melhora da imunidade (Pedersen & Toft, 2000).

1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Aproximadamente cinco décadas atrás, o pesquisador italiano Ferruccio Ritossa acidentalmente expôs células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* a um choque térmico e estas, posteriormente a este desafio, demonstraram um novo padrão de espessamento cromossomal, cujos genes foram determinados posteriormente como sendo das HSP (Ritossa, 1962).

As HSPs apresentam uma estrutura altamente conservada, sendo seus homólogos funcionais encontrados desde as bactérias mais primitivas até organismos altamente sofisticados como o ser humano (Beure & Green, 2001; Kiang & Tsokos, 1998), desempenhando papéis fundamentais em diversos processos celulares e representando mais de 2% das proteínas intracelulares de mamíferos (Bangen *et al.*, 2007), além de serem expressas em células humanas através de 13 genes identificados até o momento.

Apesar de o aumento da concentração de HSP poder ser induzido por uma elevação brusca da temperatura acima de um valor limiar (Locke & Noble, 1995; Cvorovic & Matic, 2002; King *et al.*, 2002; Kregel & Moseley, 1996; Thomas *et al.*, 2002; Redaelli *et al.*, 2001), outros estímulos, como análogos de aminoácidos (Li & Laszlo, 1985), metais pesados (Levinson *et al.*, 1980), estimulantes da proteína quinase C (Krishna *et al.*, 2007), agentes elevadores dos níveis de cálcio (Ding *et al.*, 1996), isquemia (Johnson *et al.*, 1980; Mikami *et*

al., 2004), infecções microbianas (Padmini *et al.*, 2010), óxido nítrico (Nath *et al.*, 2010), antibióticos (Yu *et al.*, 2009), hormônios (Heneka *et al.* 2003; Matz *et al.* 1996a; Matz *et al.*, 1996b; Blake *et al.*, 1991; Blake *et al.*, 1994; Maloyan & Horowitz, 2002; Paroo & Noble, 1999; Kiang & Tsokos, 1998), inibidores da ciclo-oxigenase (COX) (Amici *et al.*, 1995), estresse oxidativo (Marini *et al.*, 1996; Calabrese *et al.*, 2001; Wallen *et al.*, 1997), radiação (Calini *et al.*, 2003), privação de glicogênio (Santoro 2000; Febbraio *et al.*, 2002b; Mikami *et al.*, 2004), exercício físico (González & Manso, 2004; Fehrenbach *et al.*, 2005; Fehrenbach *et al.*, 2000; Febbraio *et al.*, 2002a; Leandro *et al.*, 2007) e estresse psicológico (Fleshner *et al.*, 2004) são igualmente eficazes. Além disso, fatores que provocam alterações na composição lipídica da membrana e no estado físico (fluidez) desta, são fatores decisivos no processo de percepção e transdução do estresse, desencadeando a ativação transcricional dos genes destas proteínas (Söti *et al.*, 2005).

As HSPs são usualmente classificadas em famílias de acordo com suas massas moleculares (desde pequenas HSPs de 20-30 kDa a 60, 70, 90 e 110 kDa), sendo a de 70 kDa a melhor caracterizada, por ser a mais abundante e bem conservada durante a evolução. Esta família compreende duas formas citossólicas: a HSC70 (do inglês, *heat shock cognate* ou constitutiva), de 73 kDa, e a HSP70 de 72 kDa, ou simplesmente HSP70. A HSC70 é sintetizada pelas células de forma constitutiva, enquanto a HSP70 tem sua síntese aumentada quando a célula é submetida a condições de estresse. Além dessas duas, a família de 70 kDa ainda inclui uma proteína de 75 kDa, encontrada na matriz mitocondrial, a HSP75, e outra de 78 kDa denominada proteína regulada por glicose ou GRP78 (do inglês, *glucose regulated protein*).

Todos os membros da família HSP70 apresentam dois domínios funcionais principais: um de 45 kDa localizado na extremidade aminoterminal da molécula, também referido como domínio ATPase, e um de 15 a 18 kDa, situado próximo à extremidade carboxiterminal, denominado domínio de ligação ao substrato. Além destes dois domínios, há ainda uma região de 10 kDa, situada na extremidade carboxila da molécula, cuja função ainda não está clara (Asea, 2005).

As HSPs, em conjunto com as GRP, foram as primeiras classes de proteínas de estresse a serem identificadas como protetoras da integridade de proteínas no núcleo, citoplasma e retículo endoplasmático, respectivamente, e como guardiãs da célula contra o

estresse homeostático. Suas ações citoprotetoras compreendem o papel de chaperona (de acompanhamento de moléculas proteicas a seus destinos finais) para as proteínas nascentes ou desnaturadas (Hardtl & Hayer-Hartl, 2002) e a inibição específica de proteínas efetoras na via de morte celular programada (apoptose) (Ravagnan *et al.*, 2001; Beere, 2004). Além disso, estas proteínas são capazes de migrar para a membrana plasmática e compartimentos extracelulares quando o organismo está sob estresse (Calderwood & Theriault, 2007).

A apoptose celular é mediada pela ação de **caspases** (do inglês, *cysteiny-l-aspartate protease* específica), através das vias intrínseca e extrínseca. A primeira caracteriza-se pela ativação de sinais de estresse celular, como dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês, deoxyribonucleic acid) e estresse oxidativo, originando um desequilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, enquanto que a segunda via diz respeito à ligação de sinalizadores apoptóticos a receptores específicos (como, por exemplo, Fas) na membrana celular. A atividade anti-apoptótica da HSP70 na via intrínseca deve-se a inibição de atividade proteolítica e da inibição de caspases (procaspase-3), que resultam em inibição de múltiplas cascatas de sinalização intracelular que levam a apoptose. Além disso, a permeabilidade da membrana mitocondrial a proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 sofre interferência da HSP70 impedindo a liberação destes fatores apoptogênicos. A interrupção/inibição da cascata de sinalização via c-Jun quinase (JNK), NF-κB e Akt pela HSP70 são o mecanismo descrito de inibição de apoptose induzida por elementos extracelulares ligados a receptores específicos na membrana extracelular e consequente aumento da sobrevivência celular. (Beere, 2004; Li *et al.*, 2000; Krammer *et al.*, 2007).

A HSP70 que se encontra no compartimento intracelular (iHSP70) tem funções diferentes daquela encontrada no meio extracelular (eHSP70). A iHSP70 é citoprotetora, induz mecanismos anti-apoptóticos da célula, modula a progressão do ciclo celular, tem ação anti-inflamatória, auxilia no reparo de proteínas danificadas e colabora na degradação de proteínas danificadas irreversivelmente (Simar *et al.*, 2004; Asea, 2007a). Por outro lado, a eHSP70 apresenta função imunoestimulatória, induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, regula moléculas co-estimulatórias e aumenta a vigilância antitumoral (Asea, 2007a). Para a função extracelular da HSP70, Asea (2003) usa-se o termo chaperocina (*chaperokine*), o qual descreve a dupla função desta HSP localizada fora da célula: a de chaperona e a de citocina.

Os tecidos corporais que se destacam, tanto na produção intracelular, como na liberação dessas proteínas, incluem o fígado (González & Manso, 2004; Febbraio *et al.*, 2002), os músculos (Thompson *et al.*, 2002; Harkins, 2009) e o coração (Milne & Noble, 2002). Apesar de células, como as da linhagem de células (linfoblastóides B) (Clayton *et al.*, 2005) e os leucócitos (Lavin-Hunter *et al.*, 2004; Fehrenbach *et al.*, 2000, 2005; Shastri *et al.*, 2002), também sintetizam HSP70, sua capacidade de produção é menor devido ao seu reduzido conteúdo numérico (massa total disponível).

1.4 HSP E SUA RELAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO

As HSP são proteínas extremamente bem conservadas ao longo do processo evolutivo e, em função disso, supõe-se que devam participar de respostas fisiológicas muito primitivas e importantes para a sobrevivência dos organismos. A citoproteção dada pela produção de HSP72 intracelular em resposta ao estresse térmico (Chen *et al.*, 2003; Morimoto & Santoro, 1998) é um bom exemplo. A ligação de eHSP70 a receptores altamente conservados durante a evolução, como os receptores Toll-like (TLR do inglês, *toll-like receptor*), é outro indício de que essas proteínas, além de seu papel de chaperonas moleculares, participam como sinais de alerta (ou perigo) para o sistema imunológico. Entretanto, o fato de que a produção intracelular de HSP72 bloqueia a ativação do NF- κ B (Chen *et al.*, 2005; Homem de Bittencourt Jr & Curi, 2001; Gutierrez *et al.*, 2008; Morimoto & Santoro, 1998) e de que indutores da expressão de HSP70, como prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PG do inglês, *cyclopentenone prostaglandins*) (Ianaro *et al.* 2003; Gutierrez *et al.*, 2008; Morimoto & Santoro, 1998) comportam-se como agentes da resolução fisiológica da inflamação (Ianaro *et al.* 2003; Gutierrez *et al.*, 2008; Morimoto & Santoro, 1998) indicam que as HSPs podem ter um papel dual e imunomodulador na essência da palavra. Isto é, ao mesmo tempo em que funcionam como sinalizadores para "despertar" a resposta imunológica inata (Asea, 2005), são capazes de inativar a fosforilação do I κ B (Chen *et al.*, 2005; Homem de Bittencourt Jr & Curi, 2001; Gutierrez *et al.*, 2008; Morimoto & Santoro, 1998) e, conseqüentemente, de bloquear inteiramente qualquer resposta inflamatória excessiva.

É claro que as HSPs, em sua função como chaperonas moleculares intracelulares são essenciais. Sem elas, a integridade das proteínas nascentes ou parcialmente desnaturadas poderia ser comprometida facilitando a molecular no extremamente denso espaço intracelular.

Isso, sem dúvida, representaria um sério problema para a sobrevivência celular (Mambula *et al.*, 2007).

Além das importantes funções intracelulares desempenhadas pelas HSP70, há evidências de estas proteínas também estejam envolvidas em vários aspectos do sistema imunológico (Binder *et al.*, 2000; Berwin *et al.*, 2003; Radsak *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2001; Kovalchin *et al.*, 2006; Asea, 2007a; Atamaniuk *et al.*, 2008). Sua função citoprotetora, tem sido extensivamente documentada tanto em *in vitro* como em *in vivo* em uma variedade de patologias humanas, incluindo em desordens metabólicas (Singleton *et al.*, 2005), inflamação (Hasegawa *et al.*, 2009) e isquemia (Chen *et al.*, 2009). No tecido cardíaco, diferentes tipos de condições lesivas, incluindo isquemia miocárdica, trauma, e hipertermia, resultam em síntese de HSP70, os quais desempenham papéis importantes na restauração da função cardíaca normal tanto *in vitro*, como em modelos animais (Santoro, 2000). Em pacientes que são submetidos à quimioterapia, por exemplo, a modulação do conteúdo de HSP70 pode funcionar como coadjuvante neste tipo de tratamento e talvez possibilitar a utilização de doses menores de agentes quimioterápicos (Kiang & Tsokos, 1998).

O mais convincente exemplo de benefício *in vivo* do papel protetor da maior concentração da HSP é o maior grau de recuperação de vários tecidos após curtos períodos de isquemia. Vários pesquisadores fornecem evidências de aumentos na HSP70 cardíaca, muscular esquelética e celular podendo resultar em uma melhor recuperação na função cardíaca pós-isquemia, uma redução na extensão da lesão muscular induzida pela contração, e manutenção do rendimento da bomba muscular. (Noble *et al.*, 2008).

Outra possível utilidade da HSP70 como molécula imunorregulatória, seria como agente imunoterápico, purificada de células malignas ou reconstituída com peptídeos virais podendo eliciar imunidade específica ao peptídeo viral e tumoral. Estudos demonstram que a imunização de animais com HSP70 purificada de células tumorais promove imunidade antitumoral e protege os animais de ameaças subsequentes com o mesmo tipo de tumor, mas não de tumores diferentes. Podemos assim visualizar uma variedade de possibilidades para o uso racional da HSP70 em estratégias imunoterapêuticas, tanto para o tratamento de câncer e doenças infecciosas, como para o controle de condições inflamatórias como a autoimunidade (Todryk *et al.*, 2003).

Aumentos nas concentrações de HSP intracelular causada pelo exercício podem proteger as proteínas que são essenciais no controle da cascata apoptótica e podem por analogia providenciar proteção celular em leucócitos. Neste sentido, foi demonstrado um aumento na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA do inglês, *ribonucleic acid*) de HSP70 em células mononucleares em cujo estudo somente voluntários bem treinados participaram, uma vez que esses resultados possam ser interpretados como um mecanismo adicional de trabalho, impedindo dano celular (Atamaniuk *et al.*, 2008).

1.5 HSP EXTRACELULAR

As células são capazes de secretar proteínas por diversas vias. A via clássica de secreção de proteínas envolve a síntese das mesmas pelos ribossomos, ligados ao retículo endoplasmático e liberação do peptídeo nascente para o interior desta organela. A seguir, a proteína é transferida, através de vesículas transportadoras, para o aparelho de Golgi, onde ela pode sofrer modificações antes de ser empacotada em vesículas secretoras que permanecem no citossol à espera do sinal apropriado para liberação. Diante de um estímulo eficaz, as vesículas fundem-se com a membrana plasmática permitindo a saída da proteína da célula e interação da mesma com o ambiente extracelular.

Diversas pesquisas (Johnson & Fleshner, 2006; Asea 2007b; Mambula, 2007; Lancaster & Febbraio, 2005; Vega *et al.*, 2008) foram desenvolvidas com o intuito de caracterizar a forma de como as HSP são liberadas para o meio extracelular. De acordo com Asea (2007b), as HSP72 poderiam ser liberadas da célula por dois mecanismos: um passivo e outro ativo. No processo passivo, a liberação da HSP72 para o meio extracelular ocorre via infecção celular, trauma ou necrose (liberando dessa forma todo seu conteúdo intracelular). O mecanismo de liberação ativa ocorre em resposta ao estresse psicológico ou a um estímulo estressante (calor, radiação ultravioleta), sendo esta estimulação responsável pela indução do fator de choque térmico (HSF, do inglês *heat shock factor*), que se encontra no citoplasma e é de característica monomérica. Este fator trimeriza neste mesmo local e posterior a esta ligação, transloca-se ao núcleo, onde liga-se ao elemento de choque térmico (HSE, do inglês *heat shock element*) e ativa a síntese de HSP, ocorrendo posteriormente a liberação desta proteína para o meio extracelular (Asea & Maio, 2007).

Imunologicamente, proteínas de choque térmico extracelular (Gp96, HSP70 e HSP90) ligam-se a vários receptores de superfície de macrófagos regulando funções-chave

relacionadas a antígenos ou não, como liberação de citocinas, fagocitose, rejeição tumoral e aumento da disponibilidade de moléculas co-estimuladoras (Binder *et al.*, 2000; Berwin *et al.*, 2003; Radsak *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2001; Kovalchin *et al.*, 2006). Estes receptores são de dois tipos: receptores que sofrem internalização, incluindo membros da família *Receptor Scavenger* (SR) e CD91 (do inglês *cluster of differentiation*), e os receptores sinalizadores, representados pelas proteínas do complexo de receptores do tipo TLR (pertencentes à superfamília da interleucina-1/toll-like), TLR2 e TLR4, com seu cofator CD14, ambos apresentando uma maior expressão quando expostos à HSP70 (Bangen *et al.*, 2007), CD40 e o receptor de quimiocina tipo 5 C-C (CCR5 do inglês, *chemokine receptor type 5 C-C*). Os TLR2 e 4, especificamente, quando entram em contato com as eHSP provocam elevação do cálcio intracelular, seguida da fusão de vesículas contendo HSP com a membrana plasmática e liberação das mesmas para o fluído extracelular. Estes mesmos receptores são unidos em uma rede de sinalização intracelular através da proteína de resposta-primária de diferenciação mieloide inflamatória 88 (MyD-88 do inglês, *Myeloid differentiation primary response protein 88*). A ligação TLR/receptores internalizados ativa uma via de sinalização através das cinases reguladas por sinal extracelular (ERK do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*) e MAP quinase p38 assim como o NF- κ B/IKK, um fator de transcrição induzível (Calderwood & Theriault, 2007; Asea, 2005; Campisi *et al.*, 2003; Asea *et al.*, 2000), estimulando a transcrição de citocinas e de moléculas de adesão (Calderwood & Theriault, 2007; Asea, 2005; Campisi *et al.*, 2003; Asea *et al.*, 2000). Assim, as HSP são captadas por estes receptores fazendo com que em situações de infecções bacterianas, por exemplo, induzam os monócitos/macrófagos a liberarem numerosas citocinas com efeitos diversos (Ding *et al.*, 2001), estimulando um fenótipo clássico de macrófago ativado (Henderson & Henderson, 2009).

Nas primeiras 2 a 4 h após exposição das células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen-presenting cells*) à eHSP72, ocorre uma liberação significativa de citocinas incluindo TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-12, fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *colony-stimulating – macrophage and granulocyte factor*) (os quais estimulam um aumento na produção de monócitos na medula óssea), NO, potente mediador apoptogênico responsável pela eliminação de linfócitos que durante seu desenvolvimento apresentaram defeitos, do excesso de células imunológicas que se clonaram após uma infecção e de células anormais ou infectadas; quimiocinas, incluindo proteína

inflamatória macrofágica 1 (MIP-1, do inglês *macrophage inflammatory protein 1*), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*), e a quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES, do inglês *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) (Pajwani *et al.* 2002; Asea, 2007; Kovalchin *et al.*, 2006; Campisi *et al.*, 2003; Karpuzoglu & Ahmed, 2006; Bethke *et al.*, 2002; Arthur Guyton, 1997).

Panjwani (2002) observou que eHSP70 estimula a iNOS e consequente liberação de NO, outra função característica dos monócitos/macrófagos, cujo aumento na concentração desta enzima é crítica para a homeostase do sistema imunológico, inflamação e imunidade. Em geral, níveis moderadamente altos de óxido nítrico podem ser citoprotetores para o sistema imunológico por iniciar uma resposta antibacteriana, anti-parasítica, antiviral e anti-apoptótica (algumas células quando expostas a determinados níveis de óxido nítrico, induzem HSP70 e, portanto previnem a apoptose) por células imunológicas (Karpuzoglu & Ahmed, 2006). Macrófagos, obtidos da cavidade peritoneal de ratos e estimulados com HSP70 ou IFN- γ liberam NO, que providencia uma via de imunomodulação de células *T-helper* (Panjwani *et al.*, 2002) possibilitando a comunicação entre o sistema imunológico inato e adquirido.

Portanto, quando o estresse promove uma elevação na concentração de eHSP72, esta proteína estimula as células imunológicas a produzirem citocinas inflamatórias (Fleshner *et al.*, 2003). Esta produção, associada à liberação contínua de HSP, promoverá uma sinalização de alerta a outras células do sistema imunológico (Todryk *et al.*, 2003; Moseley, 2000) caracterizando uma resposta imune antecipatória e eficiente (Campisi *et al.*, 2003).

Este alerta imunológico ativa a comunicação entre monócitos/macrófagos e linfócitos através da apresentação cruzada de antígeno, na forma de autopeptídeos, peptídeos tumorais ou peptídeos virais, sendo dose-dependente e específica ao tipo peptídico, (Tobian *et al.*, 2004; Udono *et al.*, 1993) naturalmente associados com HSPs. Porém, o fator principal que influencia a junção do peptídeo com a HSP70, é a oxidação local, pois devido a um estresse exógeno, há um ganho de estrutura secundária pela HSP70, sendo traduzida por uma melhor acessibilidade dos peptídeos ao local de ligação da HSP70, portanto, uma chaperona mais efetiva, ao inverso de um local com característica redutora sendo limitada apenas na característica de acompanhante proteica (Callahan *et al.*, 2002). Estes mecanismos

bioquímicos tem consequências imunológicas importantes, primeiro, o estresse oxidativo que induz expressão de HSP70, aumenta a quantidade de chaperonas que podem associar-se à peptídeos imunogênicos. Adicionalmente, sob oxidação ambas, HSP70 e HSC70, poderão carrear uma enorme população de peptídeos e, portanto, afetar diretamente a apresentação de antígenos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC do inglês, *major histocompatibility complex*) (Callahan *et al.*, 2002).

A liberação destes complexos peptídeos-HSP, como resultado de morte celular, permite que estes interajam com as células apresentadoras de antígenos (APC) através da ligação ao receptor CD91 presentes em suas membranas, em microdomínios de balsas lipídicas, as quais providenciam uma plataforma para a ligação e liberação das HSPs (Srivastava, 2002; Binder *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2006, Asea & De Maio, 2007). O CD91 ligado ao complexo peptídeo-HSP é internalizado e o peptídeo liga-se então aos MHC classes I e II. A seguir, o MHC com o antígeno acoplado é levado para a superfície da APC e oferecido aos linfócitos CD4 (MHC II) e CD8 (MHC I) (Moseley, 2000), aumentando a resposta imune via ativação e proliferação celular, ativando linfócitos T citotóxicos, funções de T *helper* e aumento da produção de IL-2 e IFN- γ (Asea *et al.*, 2000; Breloer *et al.*, 2001; More *et al.*, 2001). Assim, a presença de HSP no meio extracelular poderia agir como uma excelente mensagem que alerta as APCs, como no caso de uma lesão celular como consequência de infecções bacterianas e virais ou de lesão mecânica. A capacidade deste sinal para ativar este tipo de células pode conferir uma vantagem imunológica ao organismo (Srivastava, 2002). Estudos também sugerem a existência de um receptor para α 2-macroglobulina (Fleshner *et al.*, 2005), o qual é reconhecido como um ligante natural ao CD91, pois no momento em que se liga na superfície celular deste é internalizado por endocitose mediada por este receptor (Binder *et al.*, 2000).

O macrófago é caracterizado por sua função primordial, a ação fagocítica (Wang *et al.*, 2006), sendo essa habilidade fortemente induzida pela eHSP70 (Kovalchin *et al.*, 2006; Asea *et al.*, 2006) através do contato com membrana via interação com o receptor *Toll-like 7* (TLR7, do inglês *Toll-like receptor 7*) que, via inositol trisfosfato MAPK quinase p38, ativam rapidamente os receptores fagocíticos (Wang *et al.*, 2006).

1.6 As HSPs dão o passo inicial no processo de reparo tecidual de lesão de animais tratados com ela, mostrando um nível impressionante de cicatrização dentro dos primeiros poucos dias

de tratamento e este efeito atinge um platô no meio e ao final deste processo de cicatrização. Este resultado pode ser explicado pelo fato que as HSP manifestam seus efeitos na lesão via recrutamento celular inicial através dos monócitos/macrófagos. Os resultados mostram que HSP70s incrementam algumas destas ações via monócitos/macrófagos ao regular sua função fagocítica. Esta proteína acelera o processo de cicatrização da lesão por completo por regular esta fase de limpeza inicial (Kovalchin *et al.*, 2006).

1.6 AUMENTO NO CONTEÚDO INTRACELULAR DE HSP INDUZIDO PELO EXERCÍCIO EM VÁRIOS TECIDOS E SEGREGAÇÃO DESTA PROTEÍNA POR CÉLULAS DOS TECIDOS HEPATOESPLÂNCNICOS

Aumentos na concentração de HSP em diferentes tecidos, incluindo fígado (González & Manso, 2004; Febbraio *et al.*, 2002), músculo esquelético (Thompson *et al.*, 2002) e cardíaco (Milne & Noble, 2002), células como as células B (Clayton *et al.*, 2005; Asea, 2007a) e leucócitos (Lavin-Hunter *et al.*, 2004; Fehrenbach *et al.*, 2005), são observados após exercício. Uma variedade de condições capazes de induzir a resposta celular de estresse pode ser encontrada durante o exercício, como hipóxia e estresse metabólico, hipertermia, estresse mecânico ou oxidativo, mudanças na concentração do íon cálcio intracelular e redução no conteúdo de glicogênio, são capazes de quebrar a homeostase, induzir a resposta celular de estresse (Meyer e Silva, 1999) e determinar aumento da disponibilidade de HSP70 (González & Manso, 2004; Coyle, 2000), o que poderia justificar as alterações descritas previamente neste parágrafo.

O aumento das HSPs parece ser um mecanismo relevante da defesa celular hepática contra o estresse como indicado pela observação que atenuação da indução da HSP72 com aumento da idade correlaciona-se com redução da termotolerância quando comparado com homólogos jovens (González & Manso, 2004). Os tecidos hepatoesplâncnicos liberam HSP72 durante o exercício (aeróbico) através da via exocitótica e tecidos inervados pela divisão simpática do sistema nervoso neurovegetativo podem ser estimulados a liberar HSP72 (Lancaster & Febbraio, 2005).

Os tecidos hepatoesplâncnicos liberam HSP72 durante o exercício para exercer funções extracelulares vitais e contribuem em parte para elevar HSP72 circulante observada com o exercício (Febbraio *et al.*, 2002a), podendo estar relacionados à elevação da

temperatura corporal e outras alterações induzidas pelo exercício, como acidose sistêmica (Shastry *et al.*, 2002).

A HSP70 na circulação, em resposta ao exercício físico, aumenta antes mesmo de qualquer aumento observável na expressão do gene ou concentração desta proteína no músculo esquelético (Febbraio *et al.*, 2005). Estudos adicionais têm confirmado estes achados e recentemente foi demonstrado que ambas, intensidade e duração do exercício, influenciam a concentração de HSP72 no plasma (Fehrenbach *et al.* 2005; Shastry *et al.*, 2002).

O condicionamento físico também afeta a elevação no conteúdo de HSP72, já que existem estudos relacionando o aumento do consumo máximo de oxigênio (VO₂ máximo) e o percentual de linfócitos contendo HSP70 (Simar *et al.*, 2004) e também maior expressão de HSP72 no coração, provocada por uma adaptação benéfica deste treinamento físico, promovendo prevenção e evitando a progressão de doenças cardíacas crônicas (Noble *et al.*, 2008).

1.7 HSP70 SINTETIZADA/LIBERADA POR MONÓCITOS/MACRÓFAGOS FRENTE AO EXERCÍCIO

O exercício físico determina um aumento na concentração de HSP70 em monócitos/macrófagos (Fehrenbach *et al.*, 2000; Simar *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2001; Atamaniuk *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2007; Thompson *et al.* 2002; Whitham *et al.*, 2004). Além disso, estas células são capazes de liberar HSP70 para o meio extracelular sob uma situação de estresse e/ou quebra da homeostase celular (Mambula *et al.*, 2007; Johnson & Fleshner, 2006; Ireland *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2001, Asea, 2005). Os achados reportam claramente, que monócitos são altamente influenciados em sua síntese de HSP por mudanças na temperatura principalmente quando são expostos a altas temperaturas, como 40 graus Celsius (Vince *et al.*, 2010).

Um treinamento físico moderado (70% do VO₂ máximo) ou intenso (maior que 80% do VO₂ máximo) aumenta a imunodeteção das proteínas HSP70 e HSP90 em leucócitos (Leandro *et al.*, 2007). Como em ambas as intensidades, também ocorre um incremento em uma variedade de funções de macrófagos peritoneais, incluindo quimiotaxia, aderência, atividades fagocítica e antitumor (Woods *et al.*, 2000) é possível que elas estejam relacionadas com o aumento na concentração de HSP70.

Dos poucos estudos já realizados, a maioria (Atamaniuk *et al.*, 2008; Whitham *et al.*, 2004; Fenhrenbach *et al.*, 2001) revela um aumento na imunodeteccção de HSP70 imediatamente após o exercício físico que pode manter-se elevada por até 24 h, outros pesquisadores descrevem um aumento na expressão entre 6 e 15 h (Shastry *et al.*, 2002). Após este período, a imunodeteccção desta proteína diminui. Assim, é possível que este seja o intervalo de tempo necessário para avaliarmos a influência desta proteína no sistema imunológico, apesar de existirem poucos estudos relacionando HSP70 e monócitos circulantes

1.8 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL

Macrófagos são células efetoras que sofrem influência de outras células (incluindo linfócitos T e B) e hormônios produzidos pelo sistema nervoso simpático e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo dessa forma, afetadas pelas modificações impostas pelo exercício físico a estes sistemas de controle (Woods *et al.*, 2000).

A literatura descreve bem o aumento do número de leucócitos no sangue periférico através do exercício agudo (Natale *et al.*, 2003; Zaldivar *et al.*, 2006; Malm *et al.*, 2000; Starkie *et al.*, 2001). A causa mais comum da indução de monocitose pelo exercício é o desligamento destas células do endotélio vascular por alterações hemodinâmicas ou mudanças em interações celulares endotélio-monócito mediados por catecolaminas (Woods *et al.*, 2000). Além de as catecolaminas induzirem o recrutamento de células ativas na primeira linha de defesa imunológica, também podem potencializar as demais reações imunológicas destas e de outras células (Benschop *et al.*, 1996).

Durante o exercício físico, tecidos inervados pela divisão simpática do sistema neurovegetativo podem ser estimulados a liberar HSP72 (Lancaster & Febbraio, 2005), já que este tipo de resposta adrenérgica ocorre mais rapidamente do que respostas imunes a agentes infecciosos (Muthu *et al.*, 2005). O aumento da HSP72 circulante durante a exposição ao estresse parece ser resultado do contato de adrenalina/noradrenalina com receptores alfa-adrenérgicos (α -ADR). Assim, embora a morte celular necrótica possa resultar em liberação extracelular de HSP72 citoplasmática, existem evidências de que outros fatores, como adrenalina/noradrenalina, estimulem a liberação de HSP72 por via excitotica (translocação de exossomos contendo HSP72 para a membrana plasmática via influxo de cálcio) (Johnson & Fleshner, 2006).

A adrenalina e noradrenalina parecem induzir vias pró-inflamatórias intracelulares via ativação e translocação do NFκB, autorregulando o nível de ativação e o potencial inflamatório das células inflamatórias, já que 10^{-10} M de noradrenalina ou adrenalina isoladamente causam um aumento maior ou igual a 50% da quantidade de citocinas liberadas quando as mesmas condições celulares são incubadas com LPS (Flierl *et al.*, 2009). Uma vez ativadas, macrófagos são estimulados à fagocitar através do contato desses mediadores neuroendócrinos com receptores α e β -adrenérgicos (Ortega *et al.*, 2005).

A evidência sugere que IL-6, a principal citocina do exercício (músculo esquelético contraído libera quantidades significativas de IL-6) (Pedersen & Febbraio, 2008), realiza o importante papel na estimulação imunológica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, especialmente em condições de estresse inflamatório crônico (Tsigos & Chrousos, 2002). Peake e colaboradores (2005) encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de IL-1ra e IL-10 que se correlacionavam com mudanças nas concentrações plasmáticas de cortisol e noradrenalina. A produção de IL-10 *in vivo* pode ser aumentada pela resposta simpática a um desafio (exemplo infecção) que em compensação, poderia servir para diminuir a robusta liberação de citocinas pró-inflamatórias (Muthu *et al.*, 2005).

2 PROBLEMA DA PESQUISA

Como diferentes intensidades de exercício físico agudo afetam imediatamente e em longo prazo, a imunodeteção intra e extracelular de HSP70 em monócitos circulantes de rato?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a influência de diferentes intensidades de exercício físico agudo sobre as concentrações de HSP70 circulante e intracelular em monócitos do sangue periférico de ratos, imediatamente após o esforço e 12 h depois.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever a influência imediata e em longo prazo de diferentes intensidades de exercício físico nos seguintes parâmetros:

- imunodeteção de HSP70 no plasma e em monócito/macrófago circulante;
- capacidade de exportação de HSP70 por monócito/macrófago circulante;
- capacidade fagocítica do monócito/macrófago circulante;
- expressão de mRNA de monócito/macrófago para HSP72/73;
- liberação de peróxido de hidrogênio por monócitos (provenientes dos animais) incubados e estimulados ou não por indutor de proteína quinase C (acetato de forbol-miristato, PMA, do inglês *phorbol-myristate acetate*);
- detecção de parâmetros de estresse oxidativo e estado redox através de mensuração de níveis sorológicos de malondialdeído e glutathiona reduzida e oxidada em eritrócitos;
- Correlação HSP70 plasmática/fagocitose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Este estudo se caracteriza por ser experimental, com grupos controle e exercício para as diferentes intensidades de exercício físico aeróbico (natação) de efeito agudo e efeito de longo prazo.

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO

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

4.3 ANIMAIS

Através da aprovação na Comissão de Ética do Uso de Animais desta Universidade (processo número 19.819), foram utilizados neste estudo, 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, Var. *Albinus*), adultos (60 dias), machos de 250g obtidos no biotério central da UFRGS, mantidos em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), quatro animais por caixa, em um ciclo de claro (iluminação artificial) /escuro de 12 h e temperatura de 22±2°C. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (Goldim, 1995) e os protocolos de exercício físico estavam de acordo com o Resource Book for the Animal Exercise Protocols desenvolvido pela Sociedade Americana de Fisiologia (Kregel *et al.*, 2006). As condições experimentais foram às mesmas descritas em metodologias já consagradas em nosso laboratório (Silveira *et al.* 2006; Krause & Homem de Bittencourt Jr, 2008).

Para o sacrifício dos animais, foi utilizado o método de decapitação, sendo este rápido e eficaz para a coleta do sangue, promovendo mínimas alterações fisiológicas. Os animais não foram anestesiados para o sacrifício porque todos os anestésicos utilizados interferem na glicemia (causam hiperglicemia) que é fator de atenuação da produção de HSP72 extracelular (Brown *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2005; Febbraio *et al.*, 2004).

4.4 DISPOSIÇÃO FINAL DE RESÍDUOS

Após a morte e protocolos experimentais, os restos de tecidos e carcaças de animais foram, então, colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20°C) destinado para este objetivo, no próprio Laboratório de Fisiologia Celular. Através de cronograma semanal, este material biológico é encaminhado ao Biotério Central do Campus Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para aguardar nas mesmas condições de armazenamento anteriormente especificadas a coleta do lixo realizada pela prefeitura (Coleta de Resíduos Infectantes) em carros especiais (Aborgama) e destinados a aterros sanitários.

Meios de cultura celulares e células, tudo em garrafas de poliestireno, foram embalados em sacos apropriados, autoclavados, etiquetados como Lixo Biológico e entregues, também, ao serviço de coleta da Aborgama. Resíduos de géis de poliacrilamida foram tratados como Lixo Químico que é coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS. Solventes não biodegradáveis foram tratados como lixo químico.

4.5 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO

Vinte e cinco ratos Wistar machos (250g) foram submetidos a exercício/protocolo de natação de 20 min em tanque de vidro com quatro câmaras (55 cm de profundidade, 20 cm de comprimento e 20 cm de largura, cada) preenchidos 45 cm com água a 31 ± 1 °C. Esta temperatura foi escolhida por ser neutra para o animal (Harri & Kuusela, 1986) evitando que a imersão em água fria ou muito quente (estresse térmico) pudesse interferir nos resultados (lembrando que a principal variável em estudo, HSP70, é dependente da temperatura do animal), conforme já verificado em outros estudos (Fehrenbach & Niess, 1999). Vinte animais foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco cada, tendo adicionados, como modulador da intensidade de nado, contrapeso de chumbinhos de pesca fixados com fita adesiva à base da cauda dos mesmos (para não interromper a circulação da mesma) pesando 2, 4, 6 e 8% do peso corporal total de cada animal. Os ratos restantes, cinco, representaram o grupo controle (sem exercício), que foram mantidos individualmente, no mesmo tanque de natação, com preenchimento de apenas 5 cm de água na mesma temperatura, para simulação do estresse de estar em contato com a água, sendo considerado como nível de severidade leve. Todos os animais foram previamente adaptados ao ambiente de natação em três sessões de oito min sem carga que aconteceram nos dias anteriores ao dia da sessão de exercício físico.

Neste protocolo, imediatamente após o término da sessão aguda de exercício físico, os ratos foram decapitados.

Para a realização do segundo protocolo experimental, vinte e cinco ratos Wistar machos (250g) passaram pelo mesmo protocolo de exercício agudo descrito acima, mas, foram decapitados 12 h após o término da sessão de exercício físico.

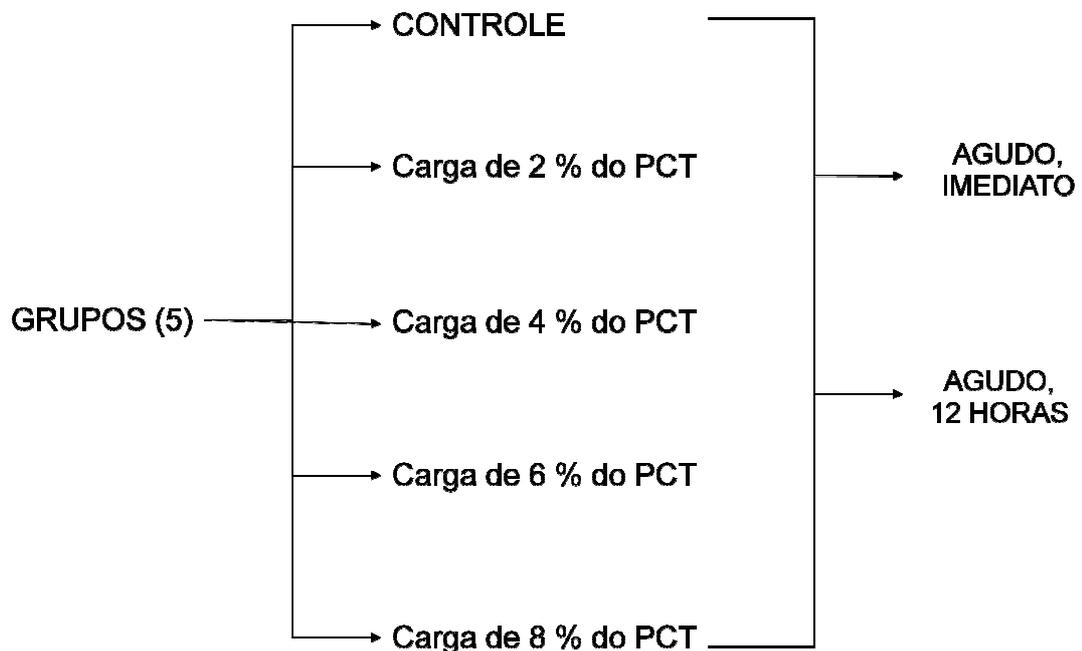


Figura 1 – Esquema representando o desenho experimental do trabalho.

4.6 DOSAGEM DE LACTATO

Amostras de sangue foram coletadas por punção na veia caudal (~25µL) dos animais antes e imediatamente após a sessão de exercício. A concentração de lactato foi determinada em aparelho específico (Accutrend® Lactate, Roche) e os resultados foram expressos em mmol de lactato/litro.

4.7 SEPARAÇÃO E CULTURA DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS: OBTENÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA

Em 1968, Boyum descreveu métodos para a separação de mononucleares do sangue periférico e da medula óssea. Desde então, vários são os estudos que utilizam-se desta técnica para obter células imunológicas circulantes para as mais diversas pesquisas (Hunter-Lavin *et al.*, 2004; Whitham *et al.*, 2004; Vince *et al.*, 2009).

Baseado nisso, a obtenção de mononucleares sanguíneos foi realizada pela técnica de separação isopícnica através de uma solução não comercial, contendo Ficoll (Sigma) e Diatrizoato de Sódio (Sigma) a partir de amostras de sangue periférico inteiro. Esta técnica baseia-se na separação de mononucleares do sangue periférico ou plasma rico em leucócitos pela centrifugação em gradiente descontínuo de polissacarose. Foi adicionados 5 ml da solução em tubos cônicos (Corning ou similar) para centrifugação, de 15 ml. As amostras de sangue heparinizadas 50U/mL (Parinex) e diluídas na proporção 1:1 com solução salina 0,9%, foram depositadas sobre a camada da solução com o auxílio de um pipetador automático, sem misturar. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 15 a 18 min (dependendo do esforço do animal, ou seja, em repouso ou imediatamente após a sessão de exercício físico, sofrendo influência de hormônios plasmáticos alterados pelo exercício físico) em centrífuga com rotor tipo *swinging-bucket* (Universal 320R – Hettich) à temperatura ambiente; a camada opaca (contendo os mononucleares) da interface entre o plasma (camada superior) e a solução (camada média) foi coletada diretamente (sem aspirar o sobrenadante) com o auxílio de uma micropipeta monocanal (Labmate, HT) de 1 mL, com o cuidado de não aspirar a camada inferior (eritrócitos e granulócitos). Os mononucleares foram transferidos para tubo de 50 ml (Corning ou similar) e o conteúdo diluído com tampão salina fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) para um volume de cerca de 10 vezes o volume de mononucleares e centrifugados (*swinging-bucket*) a 250 x g por 10 min à temperatura ambiente para precipitar as células. A preparação final (após as lavagens com PBS) foi ressuspensa em 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma) inativado pelo calor (56°C por 30 min), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 2 g/L de bicarbonato de sódio, pH 7.6, sendo as células semeadas em placas de 96, 24 ou 6 *micropoços* (Corning) (conforme a análise) e incubadas em estufa umidificada (Harris), sob uma atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono/95% ar, por cerca de meia ou 2 h (conforme avaliação necessária) a

37 graus Celsius, para promover a adesão de monócitos em placas. Esta adesão é mediada por receptores de superfície dos monócitos e este processo adesivo promove profundas alterações nas características dos monócitos, o que rapidamente diferencia-os em células mais ativadas, semelhantes aos macrófagos teciduais encontrados *in vivo* (Homem de Bittencourt, 1993, 1994). Portanto, neste texto, o termo monócito/macrófago será utilizado todas as vezes que se fizerem referências aos monócitos circulantes obtidos pelas técnicas descritas acima e incubados até que se comportem como macrófagos (aderidos, com incremento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), com alta capacidade fagocitária).

Após o tempo de adesão celular, o sobrenadante foi descartado e o poço foi lavado 3x com 1 mL de PBS, para evitar qualquer contaminação da amostra de macrófagos. Esta amostra foi obtida por raspagem do fundo das placas com raspadores específicos (*cell scrapers*) (Corning) com adição de 1 mL de PBS, para coletar todas as células. Para finalizar o processo, as amostras celulares foram centrifugadas (Sorval) à 15000 x g, durante um minuto, sendo os seus sobrenadantes descartados.

O precipitado foi homogeneizado (Hielscher *Ultrasound Technology*) durante um ciclo de 30 segundos com potência de 50% em gelo, com 20µl de SDS 0,1% com os inibidores de protease TLCK(2 µg/mL) (Sigma), Leupeptina (5 µg/mL) (Sigma) e Fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF do inglês, *phenylmethylsulphonyl fluoride*) (Sigma) em 100 µM. Posteriormente a homogeneização, as amostras obtidas foram congeladas em *freezer* (-20°C) para posteriormente serem submetidas à SDS-PAGE e *Western Blotting*.

4.8 VIABILIDADE DE MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Trypan Blue (Sigma) é um corante recomendado para o uso em procedimentos para contagem da viabilidade celular levando em consideração o número de células que morreram durante o procedimento de extração. Este método parte do princípio que células mortas absorvem este corante mudando sua coloração para o azul, enquanto que células vivas absorvem e bombeiam para fora o corante não apresentando, portanto, nenhuma coloração. Para observar esta viabilidade utilizou-se, dependendo de cada amostra, determinadas quantidades de amostra, tampão de salina com PBS e *Trypan Blue*. Dessa amostra preparada, 10µl são colocados na câmara de Neubauer para realizar a contagem de células vivas ou mortas por cada mililitro de amostra.

4.9 CONTAGEM DIFERENCIAL DE MONONUCLEARES SANGUÍNEOS PELA TÉCNICA DO VIOLETA CRISTAL-ÁCIDO ACÉTICO

Esta técnica objetiva a contagem de mononucleares sanguíneos através do corante Violeta Cristal ou Violeta Genciana (2% em ácido acético glacial 10%) que colora o núcleo das células analisadas, permitindo dessa forma, uma contagem diferencial das células que compõem a amostra, utilizando-se a câmara de Neubauer para precisar o número de células contido em cada mililitro de amostra obtida.

4.10 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS PARA O RT-qPCR

Anterior à homogeneização das amostras no tampão de *lyse* e inibidores de proteases, foi coletada 1×10^5 de monócitos/macrófagos circulantes de cada intensidade de exercício físico do desenho experimental com sacrifício após 12 h da sessão de exercício físico, diluídos em PBS em microtubos. Estas amostras foram centrifugadas à $15000 \times g$, por um minuto, temperatura ambiente, sendo seu sobrenadante cuidadosamente aspirado. Finalizando, os microtubos eram congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em *freezer* (-20°C) para serem posteriormente processados conforme item a ser descrito posteriormente, RT-qPCR. Todos os procedimentos utilizados para a extração de RNA foram feitos sobre condições estéreis e livres de alguma possível contaminação por DNase ou RNase, como por exemplo, uso de luvas nitrílicas, uso de álcool e água com dietilpirocarbonato (Sigma), dentre outros.

4.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Refere-se à dosagem de proteínas contidas na amostra, através da comparação com uma curva padrão com diferentes concentrações proteicas conhecidas e cujas amostras são lidas em leitora de microplacas (Benchmark Biorad), baseando-se no método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976), no qual as proteínas das amostras ligam-se ao Azul Commassie Brilhante-G-250, sendo este complexo formado, absorvido a 595 nm.

Esta etapa é fundamental em todo o processo para determinação da expressão de HSP70, já que quantidades iguais de proteínas deverão ser carregadas nos géis de eletroforese para apresentarem resultados fidedignos. Em todas as amostras foram adicionadas tampão de amostra (Laemli, 1970) e fervidas em banho termostático (Novusa) durante cinco min, para que todas as ligações dissulfetos das proteínas fossem quebradas e carregadas negativamente, para facilitar a corrida das proteínas por peso molecular e carga elétrica.

4.12 IMUNODETECCÃO DE HSP70

Quantidades iguais de proteína celular (cerca de $\pm 5,25 \mu\text{g}$ de monócitos por poço e $40 \mu\text{g}$ de proteínas plasmáticas por poço) foram separadas em gel de poliacrilamida (10%) - dodecil sulfato de sódio para eletroforese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) em cuba Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) e tampão de corrida constituído de Tris a 25mM, glicina a 192mM e SDS 1% (m/v), pH 8.3, usando-se 1 cm de gel de entrada 4% (m/v) e gel de separação 10% (m/v) em termos de monômeros de acrilamida, para corridas nos géis com tampão de amostra redutor contendo Tris-HCl 62,5mM pH 6.8, glicerol a 10% (m/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Santoro *et al.* (1989). Utilizou-se como marcador de peso molecular uma mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (Biorad) com as seguintes proteínas: miosina (198 kDa), β -galactosidase (125 kDa), albumina sérica (88 kDa), anidrase carbônica (37 kDa), inibidor de tripsina (31 kDa), lisozima (17 kDa) e aprotinina (7 kDa). Por esta técnica, o gel de poliacrilamida separa moléculas em misturas complexas de acordo com seu tamanho molecular e carga. Durante o processo há uma interação intrincada de amostras, tampões de amostra, e corrente elétrica resultando em bandas separadas de moléculas individuais. Após as corridas nos géis, aproximadamente 3h30min, com amperagem constante de 15mA por gel, as amostras contidas no gel foram destinadas ao procedimento de *Western Blotting*, como descrito em Elia e Santoro (1994) sendo transferidas para membranas de nitrocelulose (*GE Health Care*) por eletrotransferência em cuba *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) durante 2 h com voltagem constante de 100V. A seguir, as membranas foram retiradas das cubas de eletrotransferência e mergulhadas em Vermelho Ponceau S, sal de sódio (Sigma) e 0,3% (m/v) em solução de TCA 3% para confirmar o sucesso da eletrotransferência, corando as bandas contendo as proteínas. Feita a confirmação, foram descoradas com tampão de TEN (Tris-EDTA-NaCel)-Tween 20 0,1% ($81,55 \mu\text{mol/L}$) e então submetidas à técnica de *Western Blotting* por SNAP i.d. (Millipore). Foram inicialmente bloqueadas com solução de *blotto* (0,5% de leite em TEN-Tween 0,1%) incubadas por quinze min com anticorpo monoclonal BRM22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM22) contra HSP70 humana (Sigma H5147) diluído 1:1000, que reconhece tanto a forma induzível como a constitutiva. Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes com 15 mL de TEN-Tween 0,1% e incubados mais 15 min com solução contendo o segundo anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma A9044) na diluição 1:10000. Após, as membranas foram novamente

lavadas três vezes com 15 mL de TEN-Tween 0,1%, e a seguir, submetidas à solução para revelação da peroxidase com 5 mL de Tris-HCl pH 8.8 contendo 22µl de Peróxido de Hidrogênio (Fluka) e solução de 5 mL de Tris-HCl pH 8.8 contendo 22µl de ácido *p*-Coumárico (Fluka) e 50µl de luminol (3-aminoftalidrazida, Fluka). As imagens foram captadas pelo programa *ImageQuant 350 Capture* (GE) e analisadas pelo programa *ImageQuant* (GE).

Como normalizador para a expressão de HSP70 em monócitos, incubava-se a mesma membrana com anticorpo Monoclonal Anti-β-Actina conjugado com Peroxidase de rabanete, isolado de ascite de hibridoma AC-15 de camundongo (Sigma A3954) na diluição 1:10000. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com 15 mL de TEN-Tween 0,1%, e a seguir, submetidas novamente à solução para revelação da peroxidase (luminol/ácido *p*-Coumárico). O plasma não contém β-Actina, por esta razão utilizou-se como normalizador, além da mesma quantidade de proteínas por *poço* dosadas pelo método de Bradford, a albumina plasmática visto que esta não se altera com o exercício físico.

4.13 TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A técnica da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada para a quantificação de fragmentos de DNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, já que determina valores durante a fase exponencial da reação. O ciclo limiar (*Cycle Threshold*, CT) é o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial permitindo a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência do reagente SYBR® Green (Stratagene), um reagente que fluoresce quando se liga especificamente à fita dupla do DNA, adicionado à reação.

4.13.1 Extração do RNA total

Monócitos circulantes (1×10^5) foram rompidos com tampão de lise (350 µl) com β-Mercaptoetanol (140,80 µmol/mL) e agitadas em vórtex. Posteriormente, realizou-se uma filtração e centrifugação do lisado à 11000 x *g* durante um minuto. Foi adicionado 350 µl de álcool 70% no filtrado e submetido à vórtex duas vezes durante cinco segundos. A ligação do RNA foi realizada quando a amostra passou por um novo filtro através de uma centrifugação de 8000 x *g* por 30 segundos. Os filtros receberam uma solução para a amostra ser dessalinizada (350 µl) e foram novamente centrifugados durante um minuto à 11000 x *g*. No

mesmo microtubo foi retirado o líquido filtrado e adicionado 90 µl de tampão DNase com 10 µl de DNase reconstituída. Após a aplicação de 95 µl de DNase diretamente no centro da membrana da coluna de filtro, aguardou-se 15 min à temperatura ambiente. A membrana foi submetida a três lavagens: na primeira lavagem, adicionou-se 200 µl de tampão que inativou a DNase na coluna, centrifugou-se durante um minuto à 11000 g e descartou-se o filtrado. Utilizando-se o mesmo microtubo, na segunda lavagem foi adicionado 600 µl de RA3 na coluna, centrifugado durante dois min à 11000 x g. O líquido e o microtubo foram descartados. Na última lavagem, em um novo microtubo, fluiu-se o RNA através da coluna pela adição de 100 µl de água ultrapura livre de RNase e centrifugada durante um minuto à 11000 x g.

4.13.2 Preparação do DNA complementar (cDNA)

Para a transcrição reversa do RNA para cDNA utilizou-se *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. Preparado o tampão, adicionou-se 10 µl à amostra (10 µl) na placa de 96 wells específica para PCR (Axygen), feita uma breve centrifugação e posteriormente o ciclo termal no termociclador MX3005-P (Stratagene), para que ocorra a reação da transcriptase reversa. Após este processo, dosou-se a pureza dessas amostras e as quantidades de proteína e cDNA espectrofotometricamente (*Nanovue – GE Health Care*), para que todas as amostras sejam carregadas com a mesma quantidade de cRNA (85 ng/ µl) em uma nova placa.

4.13.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

Na placa para proceder à quantificação do cDNA preparado a parti do mRNA total das amostras, prepararam-se soluções com SYBR® Green (12,5 µl), os primers específicos (*forward* e *reverse*) (1,5 µl cada) na concentração de 400 nM/*well* e o ROX (*Reference Dye* passivo) na concentração de 30 nM/*well* (0,375 µl). Para HSP72 foi utilizada a seguinte sequência de nucleotídeos: *primer forward* (5' – GCT GCG GAT CAT CAA CG – 3') e *primer reverse* (5' – AGA TGA GCA CGT TGC GC – 3'), para HSP73: *primer forward* (5' – GAT TTG CTG CTC TTG GAT GTC – 3') e *reverse* (5' – GCT TGA TGA CGA CAG TCA TGA C – 3') e finalizando, o normalizador utilizado: β-Actina com *primer forward* (5' – GTG CTA TGT TGC CCT AGA CTT CG – 3') e o *primer reverse* (5' – GAT GCC ACA GGA TTC CAT ACC C – 3'). A solução total (16µl) era associada a 10 µl de amostra diluída (85 ng/ µl) que passou pelo ciclo térmico. A reação era processada em três segmentos: o

primeiro consistia no aquecimento das amostras à 95°C durante 10 min; o segundo segmento apresentava 50 ciclos, de 30 segundos à 95°C para um minuto à 60°C; o último segmento finalizava com um ciclo contendo um minuto à 95°C, 30 segundos à 55°C e 30 segundos à 95°C.

Todos os processos foram realizados no termociclador (MX3005-P Stratagene) utilizando o programa (MxPro, Stratagene) para quantificar as expressões gênicas das amostras avaliadas.

4.14 ANÁLISE DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA PELA TÉCNICA DO ZIMOSAN

Para a realização do experimento, 50 mg de Zimosan (células de *Saccharomyces cerevisiae* desprovidas de conteúdo citoplasmático) foram diluídos em 100 mL de PBS sob agitação. Após a diluição, esta preparação foi fervida por trinta min e posteriormente lavada três vezes com PBS (15.000 x g por 10 segundos) descartando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado com PBS para uma concentração de 40x a concentração inicial.

As partículas de zimosan foram incubadas sob agitação por 10 min, à 37°C com vermelho neutro (200 mg/mL) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para marcação. A preparação foi ressuspendida em 20 volumes de PBS. Após a centrifugação (1000 x g, 10 min), lavou-se este precipitado 3x com PBS na mesma centrifugação anterior. Depois de lavadas, o *pellet* foi ressuspendido em 2,5 mL de PBS e essa preparação foi passada em seringa de insulina com agulha de insulina para obter partículas unitárias. Após a finalização deste processo, essas partículas apresentam-se avermelhadas sendo facilmente visualizadas no microscópio óptico.

Para permitir a fagocitose (que é dependente do sistema complemento ligado às partículas a serem fagocitadas), 50 µL de suspensão de partículas de zimosan coradas com vermelho neutro (20 mg/mL) foram misturadas em igual volume de soro homólogo (contendo o complemento) para opsonização e incubadas por 30 min à 37°C sob agitação em banho termostático. Após este período, esta preparação foi centrifugada e lavada 3x com PBS a 15.000 x g por 10 segundos para depois ser ressuspendida em 650 µL de meio RPMI 1640.

Após a separação dos mononucleares sanguíneos, estes foram ressuspendidos em torno de 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de estreptomicina (v/v). Este volume celular total foi dividido e semeado em dois micropoços

para posteriormente os monócitos/macrófagos aderidos serem submetidos ou não ao estímulo do PMA. Após a incubação das placas de cultura, os poços foram lavados 3x com PBS aquecido à 37°C para retirar células e hemácias contaminantes. Executado este processo, adicionou-se meio RPMI com 10% de soro homólogo mais PBS contendo etanol a uma concentração de 2 µM em um grupo e no outro PMA na mesma concentração e diluente. Aguardou-se 15 min para ocorrer a atividade oxidativa e adicionou-se 10% do volume total do poço de zimosan marcado com vermelho neutro e aquecido previamente à 37°C, sendo ambas as incubações realizadas em estufa de CO₂. Para interromper o processo de fagocitose, lavaram-se os poços com PBS gelado e colocaram-se as placas de cultura no gelo para então contar as partículas fagocitadas pelos macrófagos no microscópio digital IX-81 (Olympus) utilizando o programa *Cell*.

4.15 ÍNDICE DE HISHIKAWA

Índice proposto por Hishikawa e colaboradores (1991), no qual o resultado da proporção das partículas totais fagocitadas pelo número total de células é multiplicado pela proporção das células que fagocitaram mais de uma partícula pelo total de células e posteriormente multiplicado por 100 para expressar o dado em porcentagem.

4.16 XILENOL LARANJA

Esta técnica caracteriza-se pela oxidação de Fe²⁺ a Fe³⁺ na presença de hidroperóxidos lipídicos (lipoperóxidos) e formação de complexos de Fe³⁺ com xilenol laranja (*xylenol orange*, XO) segundo a técnica descrita originalmente por Jiang *et al.* (1991) e adaptada para plasma e soro por Arab & Steghens (2004). A versão com *blanks* de ROOH reduzidos com trifetilfosfina (TPP) é de Södergren *et al.* (1998): onde são preparados blanks para cada amostra, contendo a amostra mais TPP (que reduz especificamente os hidroperóxidos) e os valores obtidos são descontados das demais leituras.

A concentração de proteínas no soro foi inicialmente quantificada pela dosagem de proteínas via método de Bradford (vide item 4.11), para que todas as amostras fossem diluídas, a fim de que fossem analisadas com 1mg de proteína por mL.

O reagente de trabalho é composto por metanol 90% (v/v), Xilenol laranja (2 mM, ácido *o*-cresolsulfonoftaleína-3,3'-*bis*-metilimino-diacético, sal tetrassódico), ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M e hidroxitolueno butilado (BHT) 40 mM.

As amostras e uma curva de concentração de hidroperóxido obtida a partir de tert-Butil hidroperóxido (em diferentes concentrações: 0,5, 1, 2, 4, 10 e 20 μ M) (10 μ l) foram pipetadas em placas de 96 *wells* e separadas igualmente em dois grupos: um que foi adicionado metanol absoluto (10 μ l) que demonstrava o contato dos lipoperóxidos presentes nas amostras e o outro que se colocou trifetilfosfina 1mM (10 μ l) para reduzirem-se os hidroperóxidos. As amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Após esse período foi pipetado o reagente de trabalho (90 μ l) e depois 10 μ l de sulfato ferroso 10mM e a placa foi pré-incubada por mais 30 min a temperatura ambiente. Para o branco utilizou-se água deionizada. A seguir foi realizada a leitura a 560nm.

Os valores de absorbância (abs) utilizados para os cálculos foram: $\Delta\text{abs} = \text{abs}_{\text{ROOH-total}} - \text{abs}_{\text{TPP}}$ tanto para as curvas como para as amostras, isto é, os valores a serem utilizados nos cálculos já devem vir descontados dos blanks com TPP. Para soro o resultado foi obtido diretamente: concentração (mM = μ mol/ml) = $[\Delta\text{abs}/8,5085] \times 11$ (diluição de 10 μ L em 120 μ L finais no ensaio) = 1,2928 x abs.

4.17 AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A peroxidação de lípidos (lipoperoxidação) é considerada um índice de estresse oxidativo em vários territórios (Llesuy, 2002). Uma vez que estas substâncias podem ser produzidas em vários tecidos vindo a ganhar a circulação sanguínea, a determinação de lipoperóxidos é muito útil para que se estabeleça o nível de estresse oxidativo. Para a avaliação destas substâncias utiliza-se a medida indireta do malondialdeído, uma espécie química que sempre é gerada quando ocorre lipoperoxidação. Para a avaliação do estresse oxidativo sistêmico utilizou-se a técnica do TBARS, sendo considerada um bom índice para lipoperoxidação (Bello-Klein, 2002). A técnica foi adaptada de BUEGE & AUS (1978) e DRAPER *et al.* (1993) no qual foram pipetados 50 μ L de amostra de soro a cerca de 1mg/ml (50 μ g) em microtubo de 1,5 mL, adicionando: 10 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês butylated hydroxytoluene), 200 μ L de ácido tricloroacético 30% (TCA, do inglês trichloroacetic acid) e 200 μ L de Tris-HCl 10mM pH 7,4, sendo realizado um vórtex a cada adição de reagente. A amostra foi levada ao banho termostatizado à 100°C por 15 min. Após, as amostras ainda quentes foram centrifugadas por dois min a 15.000 x g (Sorval). Coletou-se 400 μ L de sobrenadante e misturou-se na mesma proporção com ácido tiobarbitúrico 0,73%

(TBA, do inglês *tiobarbitúrico acid*) levou-se novamente as amostras para ferver em banho aquecido à 100°C por trinta min. Pipetou-se 200µL do sobrenadante fervido de cada amostra em duplicata em placas de 96 micropoços para ler a 540nm na leitora de ELISA.

4.18 DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Utilizou-se o método clássico de Pick & Mitzel (1981) descrito em Silveira e colaboradores (2007) para determinação da produção de peróxido de hidrogênio pela oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase de rabanete (HRP do inglês, *horseradish peroxidase*) (Sigma) por macrófagos cultivados/incubados *in situ* (sem a retirada das células ou sobrenadantes). Como o peróxido de hidrogênio vai reagindo com os corantes à medida que vão sendo produzidos, a presente técnica, apesar de perder em sensibilidade para outros métodos, fluorescentes, por exemplo, tem a compensação de ser facilmente executada.

Monócitos circulantes respondem a estímulos de membrana (particularmente os ativadores da proteína quinase C) produzindo uma atividade oxidativa, especialmente via NADPH *oxidase*, que reduz o oxigênio molecular a superóxido que, por sua vez, na presença da catalase intracelular, é convertido a peróxido de hidrogênio que pode ser mensurado.

Para atingir este objetivo, os mononucleares sanguíneos obtidos do sangue periférico foram ressuspensos em 1,5 mL de meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (v/v) sendo que cada amostra foi plaqueada em três poços, cada um contendo 500 µL de células ressuspensas em meio, em placas de cultura de 24 poços para promover a adesão dos monócitos, durante trinta min a 37 graus, em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono. Após este período, aspiraram-se as células não aderentes e lavou-se três vezes com PBS previamente aquecido à 37°C. Em seguida, as células foram tratadas com EBSS (do inglês, *Earle's balanced salt solution*) completo na presença ou ausência de PMA (200 nM final) para que as células fossem ativadas para a produção do peróxido de hidrogênio. Todos os poços foram tratados com solução de fenol vermelho (fenolsulfoftaleína, a 200 µg/mL finais) e peroxidase de rabanete a 1,9 U/ml finais no poço). No tempo zero, os poços destinados a servir de controle interno negativo do experimento foram tratados com solução de hidróxido de sódio 1 N, o que mata as células e muda a cor do corante para um roxo forte. Em paralelo à produção de peróxido pelas células a serem incubadas, foram pipetadas curvas de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio para calibração do experimento, em placas de 96 micropoços. As placas contendo as células e as curvas de calibração foram,

então, incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por uma hora para permitir a produção de peróxido de hidrogênio estimulada ou não pelo PMA. Após este período, todos os poços (com exceção dos controles de tempo zero e os *blanks* espectrofotométricos das placas, onde pipetou-se apenas EBSS) foram também tratados com hidróxido de sódio. O sobrenadante de todas as amostras celulares foi repassado para as placas de cultura de 96 micropoços junto com as curvas de calibração e *blanks*. Este procedimento foi realizado, pelo cuidado inicial de que a adesão dos monócitos fosse feita em uma superfície ampla para que as células contaminantes deste processo (linfócitos, neutrófilos) não interferissem na queda das células de interesse para o fundo da placa. Após este procedimento, a placa de 96 micropoços foi analisada em leitora de microplacas (Biorad) com leitura a 600 nm.

4.19 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE GLUTATIONA

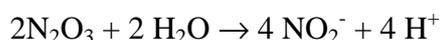
A formação do ácido tionitrobenzoico (TNB) pode ser monitorada espectrofotometricamente a 412 nm (ou 415 nm, dependendo do equipamento). Na presença da redutase de dissulfeto de glutathione (GSSG) e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), o GSSG resultante da primeira reação (ou aquele que já estava presente na amostra) é reconvertido em glutathione reduzida (GSH) que é reoxidado a GSSG formando mais TNB. Como a quantidade de GSSG redutase é constante e os demais substratos (como NADPH e DTNB) são adicionados em quantidade saturantes, a velocidade de formação de TNB é proporcional à quantidade inicial de GSH (e de GSSG) nas amostras. Conforme a reação prossegue, o DTNB (e o NADPH que também poderia ser monitorado) vai sendo consumido enquanto que a GSH (e/ou o GSSG) é reciclada, ou seja, volta para a primeira reação.

Para determinação intracelular de GSH e GSSG, foi coletado um volume conhecido de sangue (por exemplo, 1 mL) e separado o plasma heparinizado. A “papa de hemácias” obtida (cerca de 0,1 mL no caso) foi misturada com 5 volumes de ácido metafosfórico (MPA do inglês *metaphosphoric acid*) (0,5 mL). Coletou-se o sobrenadante e na razão 1:8 foi diluído diretamente com MPA e homogeneizado. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 4°C em microcentrífuga (15.000 x g) e o sobrenadante coletado para as análises cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB) e glutathione redutase (GSRd) numa adaptação do método de Anderson, (1985)

conforme descrito em Kolberg *et al.* (2006). A determinação dos conteúdos de GSH e GSSG em eritrócitos, que fornecem um quadro do potencial redox sistêmico, foi efetuada segundo metodologia descrita em Silveira *et al.* (2006). A primeira parte do ensaio consiste na determinação de glutatona total (GSH+GSSG) medida em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem de DTNB, levando a oxidação da GSH em GSSG com formação TNB e posterior restituição da GSH, pela redução altamente específica da GSSG redutase na presença de NADPH. Sendo a taxa de formação de TNB proporcional a soma inicial de GSH e GSSG monitorada a 412nm.

4.20 DETERMINAÇÃO DE NITRITOS

Utilizamos a produção de nitritos para avaliar a capacidade do macrófago em produzir óxido nítrico, visto que o primeiro é o produto de várias reações que o segundo sofre por estar na forma gasosa e reagir com diversas moléculas presentes no microambiente. Dentre elas, destacamos:



Após a obtenção dos monócitos circulantes, estes foram semeados em placas de 24 poços com meio RPMI 1640 e 10% soro fetal bovino (v/v) e submetidos a incubação em estufa de CO₂ durante duas h. Passado este período, as células foram lavadas 3x com PBS pré-aquecido a 37°C e ressuspensas em 200 µl deste mesmo tampão, incubadas durante uma hora novamente na estufa de CO₂. Ao término deste, foi adicionado 100 µl do reagente de GRIESS I (Sulfanilamida) e 100 µl do reagente de GRIESS II (Naftiletlenodiamina). Esses sobrenadantes foram passados para uma placa de 96 micropoços, a qual possuía uma curva de nitrito de sódio com diferentes concentrações e que também recebiam esses dois reagentes nas mesmas concentrações das amostras. Esperou-se 10 min a temperatura ambiente e efetuou-se a leitura da placa em ELISA utilizando um filtro de 540 nm.

4.21 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tamanho de amostra foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os

grupos (de acordo com a literatura, 20 ± 10 ng/ml (Febbraio *et al.*, 2002a) para a principal variável dependente do estudo (expressão de HSP70). Foi utilizado para o cálculo um poder estatístico de 80% para um nível de significância de 0,05%. Posteriormente a coleta de dados, estes foram submetidos à procedimentos descritivos (medidas de tendência central e dispersão) e inferenciais iniciando com a realização do teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($n < 50$) e de homocedasticidade de Levene para verificar a variância entre os grupos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As comparações entre os vários parâmetros, entre os grupos controle, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda dos animais, foram realizados pelo teste ANOVA de uma via ou teste de correlação de Pearson para dados paramétricos. Quando os valores de F eram significativos, realizaram-se os pós-testes complementares de Student-Newman-Keuls. Caso os resultados fossem não paramétricos utilizamos o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Friedman e índice de correlação de Spearman. O nível de significância para a probabilidade α de erros do tipo I no teste de hipóteses foi determinado em, no mínimo, $P < 0,05$. Os cálculos foram efetuados através do programa SPSS para Windows, versão 13.0.

4.22 APOIO FINANCEIRO

Este projeto contou com suporte financeiro do MCT/CNPq, MS/DECIT, FNDCT, CT-CIOTEC CT-Saúde (Edital Bioinova CNPq) e INCT de Hormônios e Saúde da Mulher (CNPq).

5 RESULTADOS

5.1 LACTATO SANGUÍNEO

Utilizamos a avaliação da concentração de lactato sanguíneo para comprovar o uso de diferentes intensidades, com valores crescentes de carga, durante um mesmo período de realização de exercício físico, visto que a concentração deste metabólito nos fornece uma estimativa da intensidade do esforço (Silveira & Denadai, 2002). Para tanto, as dosagens foram realizadas através de uma pequena incisão na cauda do animal antes e imediatamente após o término da sessão de exercício físico agudo, a fim de verificar alterações nas concentrações de lactato sanguíneo. Houve uma diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos, estando totalmente correlacionada com o aumento de intensidade do exercício físico, ou seja, quanto maior a carga de trabalho, maior era a produção de lactato sanguíneo (figura 2).

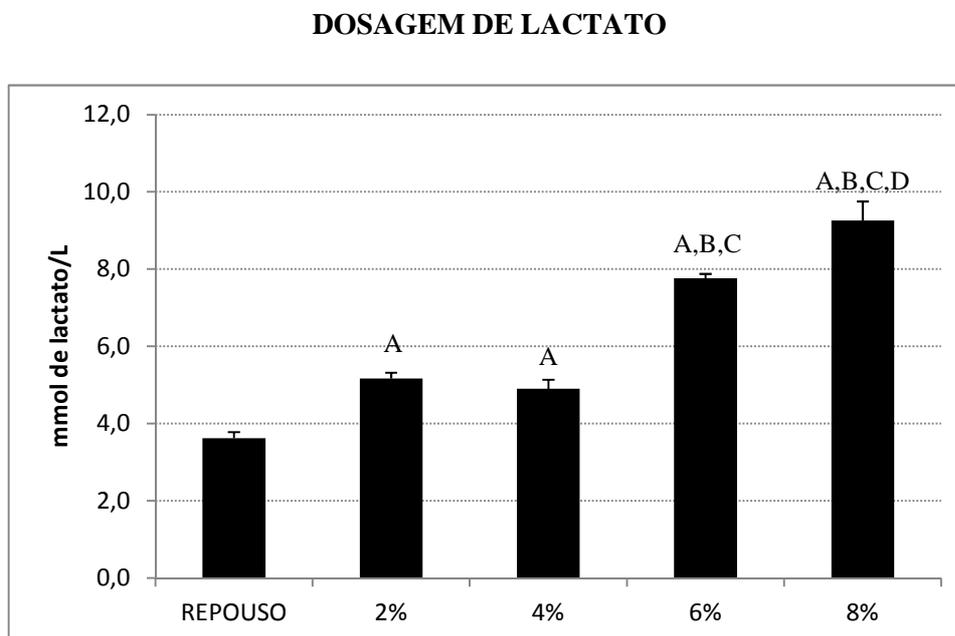


Figura 2 – Dosagem do lactato sanguíneo obtido de animais após serem submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,0001$).

- A. Relacionado ao grupo repouso: 2% ($p < 0,01$), 4% ($p < 0,05$); 6% e 8% ($p < 0,001$);**
- B. Relacionado ao grupo 2%; ($p < 0,001$);**
- C. Relacionado ao grupo 4%; ($p < 0,001$);**
- D. Relacionado ao grupo 6%; ($p < 0,05$).**

5.2 IMUNODETECÇÃO DE HSP70

Proteínas de choque térmico apresentam como principal função intracelular a citoproteção. Assim, a célula quando exposta a um estímulo que poderia resultar em algum dano celular, promove transcrição gênica e posterior síntese de HSP70 para que esta realize um papel citoprotetor. No papel inverso, quando liberada para o meio extracelular esta proteína apresenta papel pró-inflamatório, busca alertar o sistema imunológico frente a um estresse estabelecido, causador do desequilíbrio homeostático.

5.2.1 Plasma sanguíneo

Numa relação dose-dependente, quanto maior for a intensidade de exercício físico, maior foi a taxa de liberação para o sangue de HSP70. A literatura atual esclarece as origens dessas proteínas, dentre elas: tecidos hepatoesplâncnicos, sistema nervoso central, leucócitos, dentre outros (González & Manso, 2004; Febbraio *et al.*, 2002a; Lavin-Hunter *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo, os plasmas demonstraram um aumento crescente na quantidade de HSP70 quando relacionados à característica da intensidade, ou seja, leve, moderada ou intensa (figura 3). Dessa forma, os grupos repouso e 2% apresentaram valores semelhantes. Entretanto, quando comparados aos grupos de intensidades moderada (4%) e intensa (6% e 8%) apresentaram-se 131% e 231%, respectivamente, menores nos valores de imunodeteção, valores estes considerados com diferença estatística ($p = 0,0131$).

IMUNODETECÇÃO DE HSP70 PLASMÁTICA, IMEDIATO

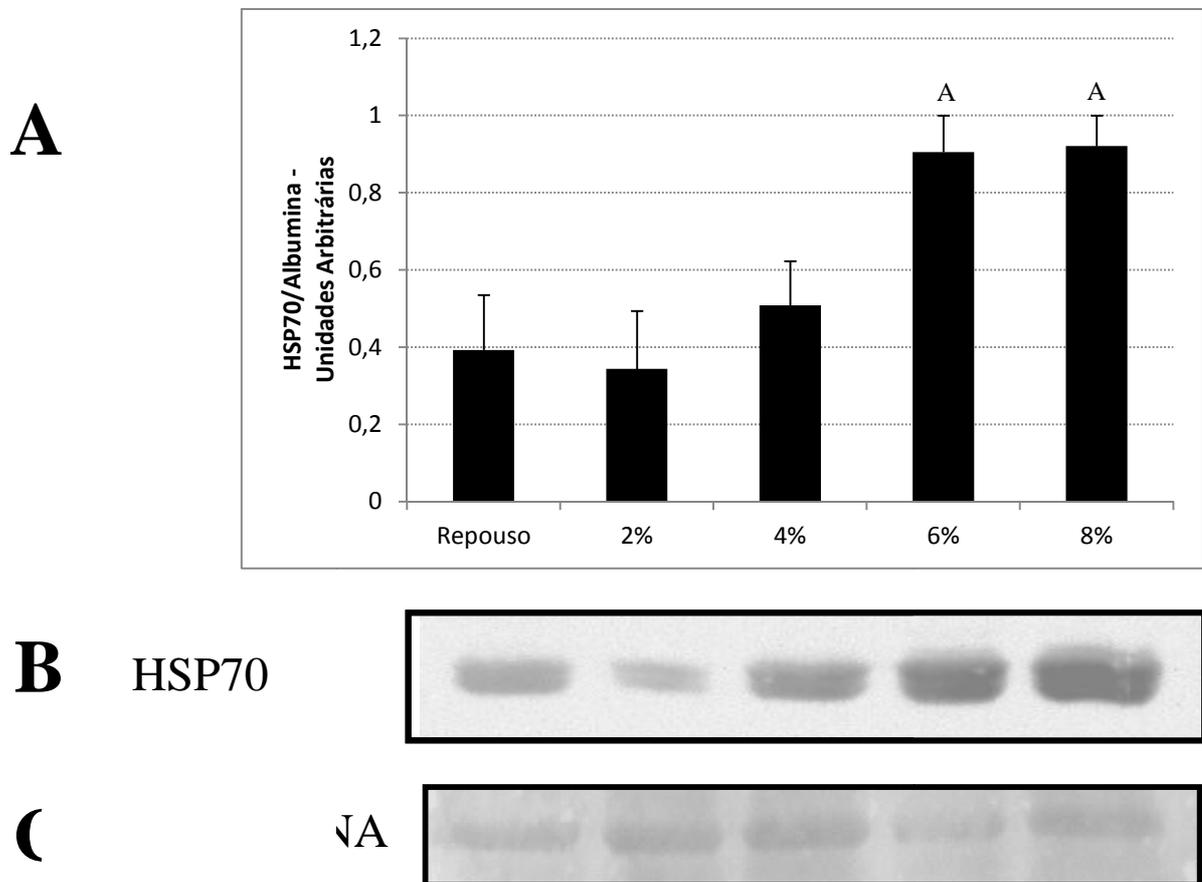


Figura 3 - Imunodeteccção da HSP70 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0133$) ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls. (A) Histograma representando a expressão de HSP70 normalizado pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.) (B) Imagem representativa da HSP70. (C) Imagem representativa da albumina.

A. Relacionado ao grupo 2% ($p < 0,05$).

Quando se cita HSP70, estão subentendidas as duas formas desta proteína, a induzível associada com a constitutiva. A literatura embasa de forma robusta a liberação da HSP72 e HSP70 para a circulação sanguínea, tanto em situações de exercício como em patologias (Wey *et al.*, 2009; Whitham *et al.*, 2007; Krepuska *et al.*, 2011), mas até o momento não demonstra a liberação da HSP73 provocada pelo exercício físico, para o meio extracelular. Ao

descrevermos a liberação da HSP 72 para o plasma imediatamente após um exercício físico de efeito agudo, observamos que a liberação desta proteína para o plasma obedece uma relação dose-dependente nos três primeiros grupos e atinge um platô nas intensidades de 6% e com uma discreta queda no grupo 8%, sendo então 541%, 247% e 370% maiores que os grupos repouso, 2% e 4%, respectivamente (figura 4). Considerando os valores com elevada diferença significativa ($p < 0,01$).

IMUNODETECÇÃO DE HSP72 PLASMÁTICA, IMEDIATO

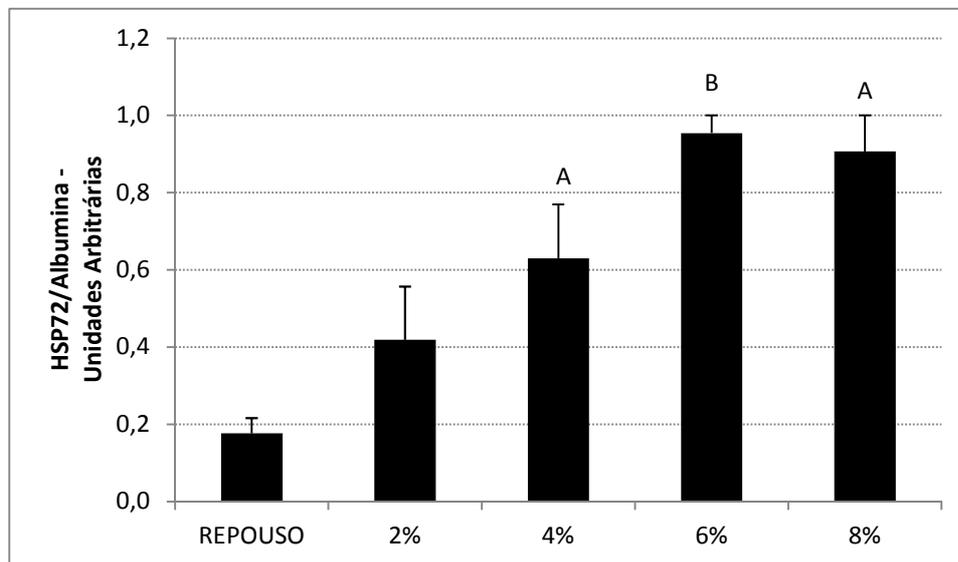


Figura 4 - Imunodeteccção da HSP72 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0047$, ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls). Histograma representando a expressão de HSP72 normalizado pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.).

A. Relacionado ao grupo repouso: 4% e 8% ($p < 0,05$) e 6% ($p < 0,01$);

B. Relacionado ao grupo 2% ($p < 0,05$).

Por sua vez a liberação de HSP73 para o plasma sanguíneo (figura 5) também ocorre com o mesmo desenho da HSP70, ou seja, grupos intensos muito semelhantes e com maior

liberação proteica em relação aos demais (em torno de 341%), considerados com elevada diferença estatística ($p < 0,0001$).

IMUNODETECÇÃO DE HSP73 PLASMÁTICA, IMEDIATO

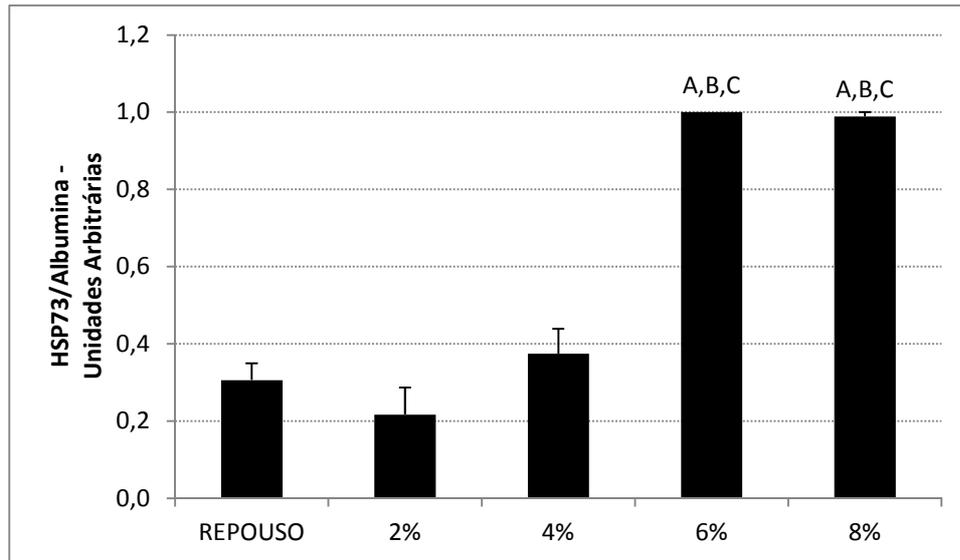


Figura 5 - Imunodeteccção da HSP73 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças extremamente significativas entre si ($p < 0,0001$, ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls). Histograma representando a imunodeteccção de HSP73 normalizada pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.).

- A. Relacionado ao repouso; $p < 0,001$.**
- B. Relacionado ao grupo 2%; $p < 0,001$.**
- C. Relacionado ao grupo 4%; $p < 0,001$.**

Verificamos a imunodeteccção de HSP70 no plasma sanguíneo de animais 12 h após uma sessão aguda de exercício físico (figura 6). Estes níveis apresentaram entre os grupos, uma diferença considerada significativa ($p = 0,0154$), sendo os níveis dose-dependente, ou seja, quanto maior a intensidade, maior a liberação plasmática de HSP70 com exceção do grupo mais intenso, que apresentou níveis semelhantes ao grupo 2%. Portanto, em relação ao

repouso, o grupo 2% apresentou o sinal de imunodeteção 2x mais intenso, o 4% 3x, o 6% 5X e o 8% 2x, confirmando uma queda descrita anteriormente.

IMUNODETECÇÃO DE HSP70 PLASMÁTICA, APÓS 12 h

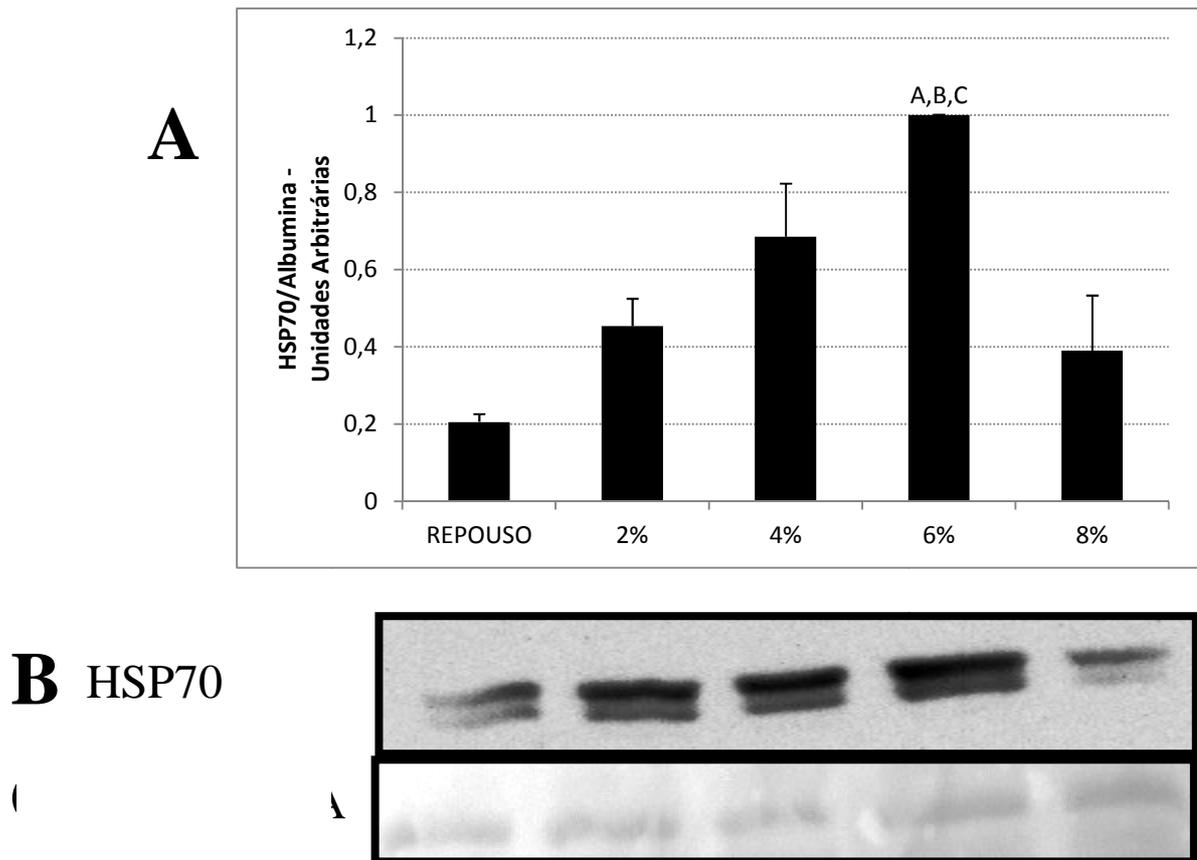


Figura 6 - Imunodeteção da HSP70 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0154$, ANOVA de uma via, *post-hoc Student-Newman-Keuls*). (A) Histograma representando a imunodeteção de HSP70 normalizada pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.). (B) Imagem representativa da HSP70. (C) Imagem representando a normalizadora, albumina.

- A. Relacionado ao grupo repouso ($p < 0,05$);**
- B. Relacionado ao grupo 2% ($p < 0,05$);**
- C. Relacionado ao grupo 8% ($p < 0,05$).**

Ao descrevermos a imunodeteccção da HSP72 plasmática, ela apresenta o mesmo desenho gráfico da HSP70 plasmática, inclusive os valores das unidades arbitrárias da quimiluminescência da imunodeteccção da proteína (figura 7). Então, em relação ao repouso, respeitando a intensidade crescente do exercício físico, os grupos apresentaram um aumento: 2x, 2,5x, 5x e 2,5x maior. Novamente ocorrendo uma queda no grupo mais intenso, de valores próximos ao 4%. Esses valores foram considerados extremamente significativos ($p = 0,0030$).

IMUNODETECCÇÃO DA HSP72 PLASMÁTICA, 12 h

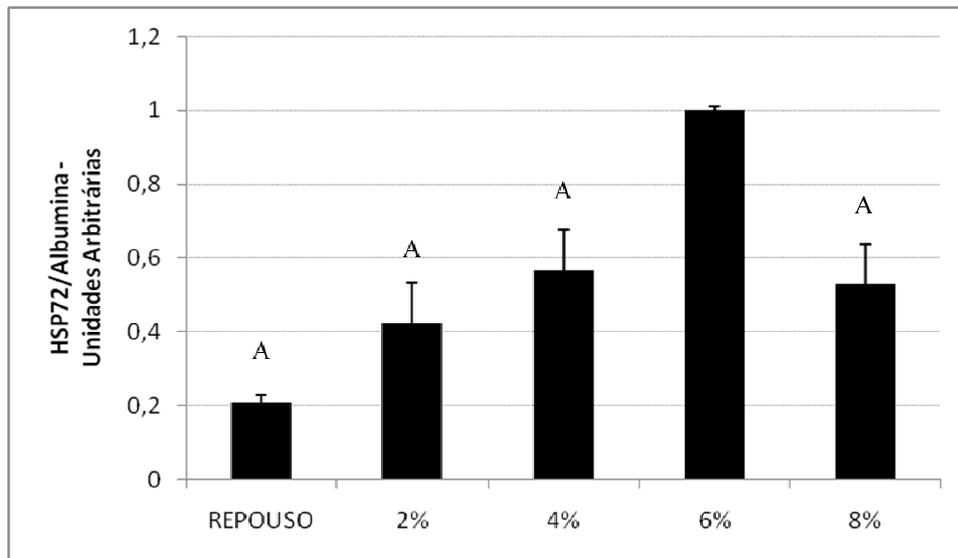


Figura 7 - Imunodeteccção da HSP72 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0030$, ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls). Histograma representando a imunodeteccção de HSP72 normalizada pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.).

A. Relacionado ao grupo 6%: repouso, 2% e 4% ($p < 0,01$) e 8% ($p < 0,05$).

Na figura 8, a HSP73 neste desenho experimental, apresenta diferenças em relação à HSP72, pois apresenta uma elevação crescente de sua concentração plasmática à medida que o esforço aumenta (2% e 4%, 4x maior que o repouso) atingindo um pico máximo na

intensidade leve e moderada e a partir daí uma queda nos grupos mais intensos (grupo 6% 3,5x e grupo 8% 2x maiores que o repouso). Os valores apresentam diferenças muito significativas ($p = 0,0087$).

IMUNODETECÇÃO DA HSP73 PLASMÁTICA, IMEDIATO

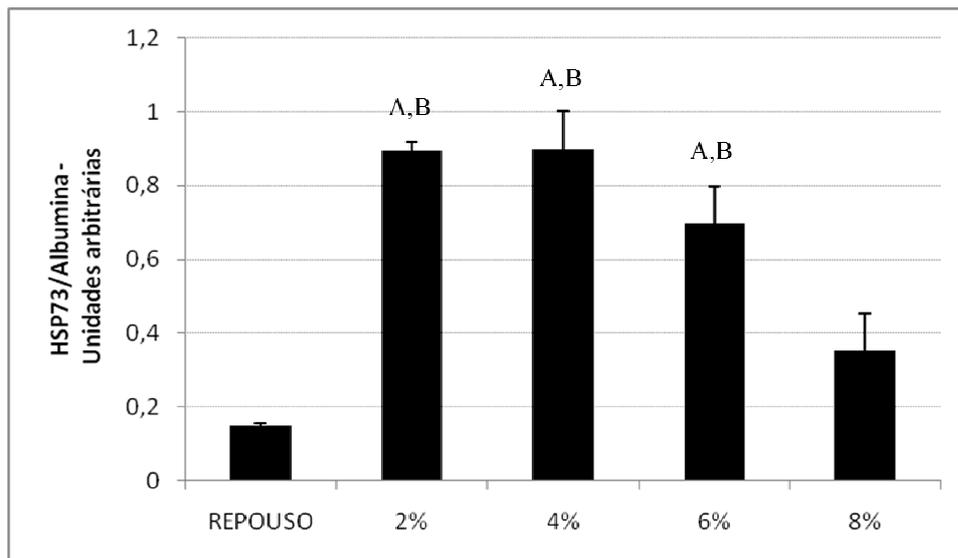


Figura 8 - Imunodeteção da HSP73 plasmática dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,0021$, ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls). Histograma representando a imunodeteção de HSP73 normalizada pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.).

A. Relacionado ao grupo repouso: 2% e 4% ($p < 0,01$); 6% ($p < 0,05$);

B. Relacionado ao grupo 8%: 4% ($p < 0,01$); 2% e 6% ($p < 0,05$).

5.2.2 Monócitos/macrófagos

Células da primeira linha de defesa de nosso sistema imunológico, monócitos apresentam a capacidade de sintetizar HSP70 frente a um exercício físico (Fehrenbach *et al.*, 2000; Simar *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2001). Entretanto, demonstramos na figura 9 que monócitos circulantes de ratos coletados imediatamente após o término de uma sessão aguda

de exercício físico com diferentes intensidades de esforço não apresentaram alterações no conteúdo intracelular, frente às sobrecargas impostas, não apresentando diferenças significativas entre si ($p = 0,9455$).

IMUNODETECÇÃO DE HSP70 EM MONÓCITOS, IMEDIATO

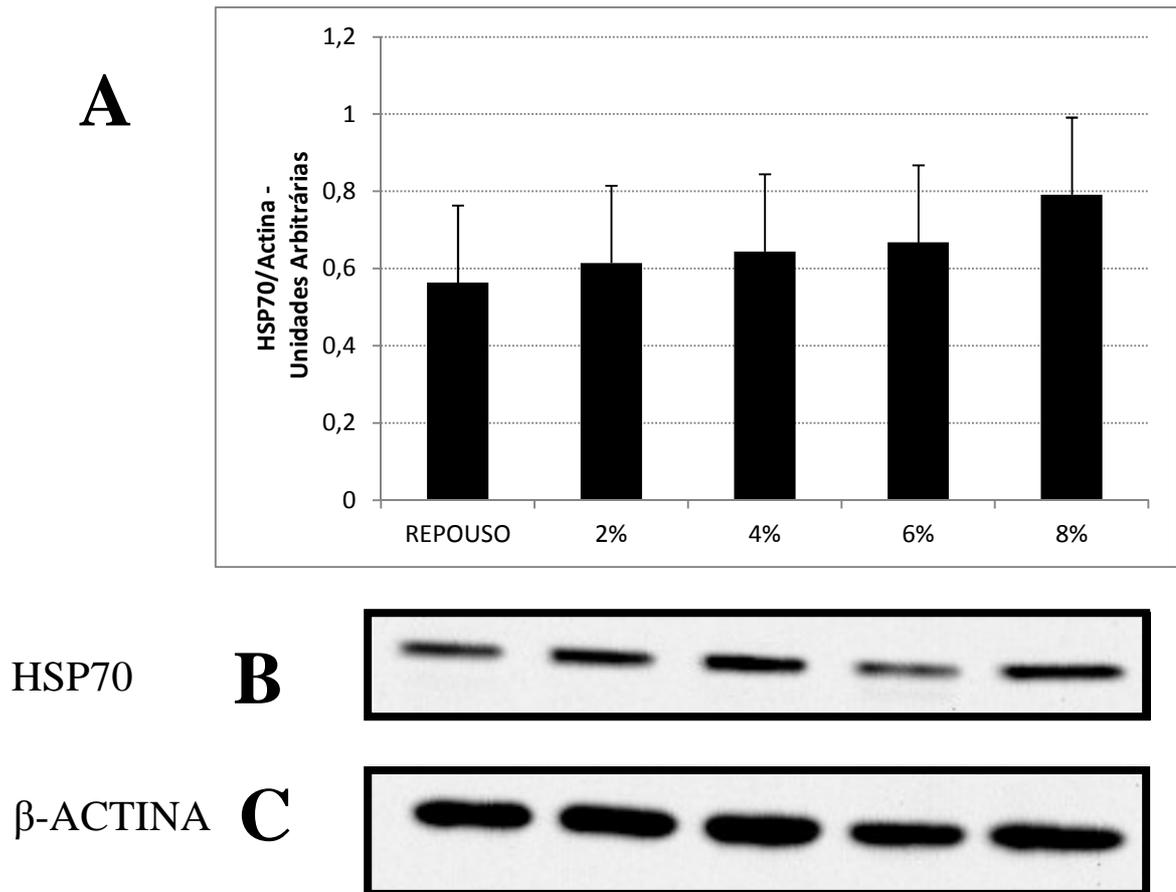


Figura 9 - Imunodeteccção da HSP70 em monócitos circulantes dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos não apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,9455$) ANOVA de uma via e *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. (A) Histograma representando a expressão de HSP70 normalizado pelos valores de albumina em unidades arbitrárias (u.a.) (B) Imagem representativa da HSP70. (C) Imagem representativa da β -Actina.

Para decorrer o tempo necessário para a síntese da proteína intracelular, verificamos o conteúdo intracelular de HSP70 em monócitos circulantes de ratos submetidos a uma sessão aguda de exercício físico em diferentes intensidades e decapitados 12 h após o término da mesma (figura 10). Interessantemente, observamos que além do grupo 2% ter aumentado seu conteúdo intracelular desta proteína em relação ao repouso, os grupos 4%, 6% e 8% apresentaram quedas de aproximadamente 30%, 15% e 70%, respectivamente em relação ao rato que permaneceu em repouso sem exercício físico. Os dados apresentam diferença significativa entre si ($p = 0,0444$).

IMUNODETECÇÃO DE HSP70 EM MONÓCITOS, APÓS 12 h

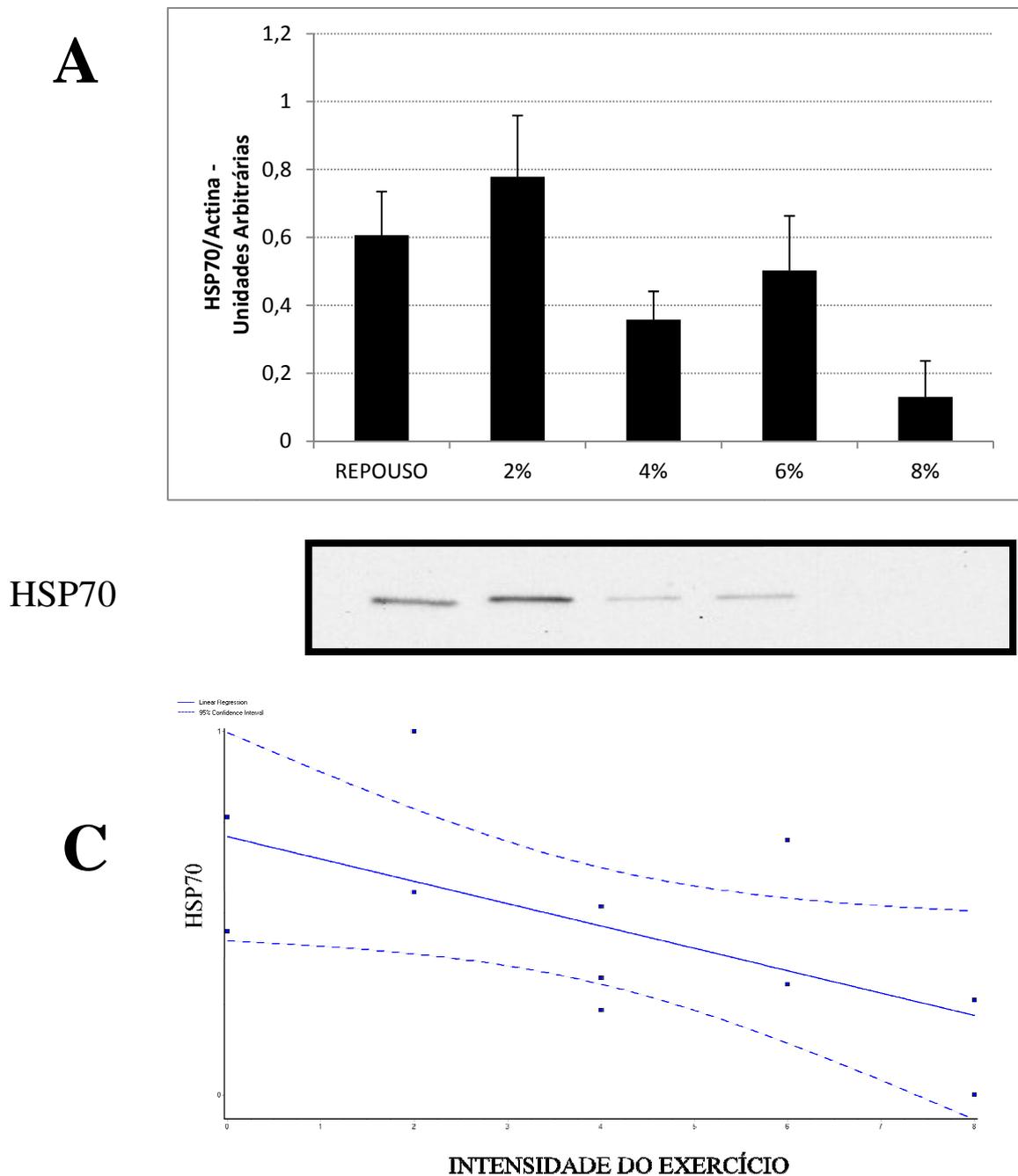


Figura 10 – Correlação entre a imunodeteccção da HSP70 em monócitos circulantes e a intensidade de exercício nos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0444$) ANOVA de uma via, índice de correlação de Pearson ($R^2 = -0,6142$). (A) Histograma representando a expressão de HSP70 normalizado pelos valores de albumina em unidades

arbitrárias (u.a.) (B) Imagem representativa da HSP70. (C) Histograma representando o índice de correlação de Pearson.

5.3 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A célula ao ser estimulada/estressada promove transcrição gênica das HSP70s via HSF1 e posteriormente, apresenta um aumento na síntese destas proteínas (Morimoto & Santoro, 1998). Assim, foi analisada a expressão dos genes da HSP72 e HSP73 após doze h de uma sessão de exercício físico aguda em monócitos circulantes.

A resposta do RNA total destas células após 12 h em relação à HSP72 mostrou-se mais elevada, nos grupos mais intensos. Sendo assim, o grupo 6% demonstrou ser 0,7x maior que os grupos de intensidades inferiores a ele e o grupo 8% apresentou-se 1,3x maior que os grupos repouso, 2% e 4%, aproximadamente.

Os resultados gráficos (Figura 11) parecem apontar para um discreto aumento na resposta celular na expressão gênica da HSP72, tendo como principal objetivo aumentar a quantidade de proteínas intracelulares promovendo uma citoproteção mais intensa em relação aos grupos com maiores cargas de exercício físico. Entretanto, estes dados não apresentam diferença significativa entre si ($p = 0,4339$).

EXPRESSÃO DE mRNA HSP72 EM MONÓCITOS/MACRÓFAGOS, APÓS 12 h

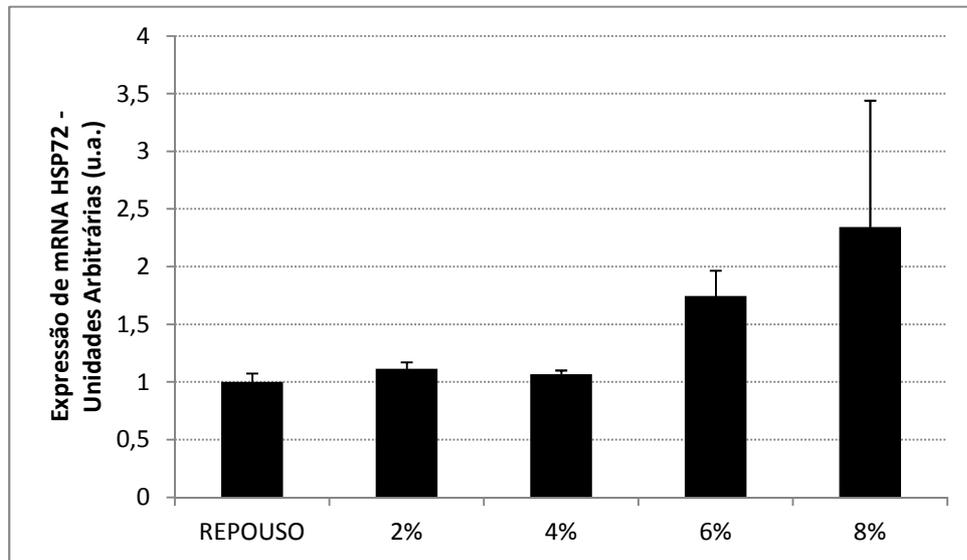


Figura 11 – Expressão de mRNA de HSP72 de monócitos de ratos pertencentes aos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,4339$, ANOVA de uma via). Histograma representando a expressão de HSP72 normalizada pelos valores de β -actina em unidades arbitrárias (u.a.).

Após um longo período da sessão de exercício físico, monócitos circulantes expressam aumentos discretos nos níveis de mRNA de HSP73 em relação às células que permaneceram em repouso (figura 12), também não apresentando diferença estatística significativa ($p = 0,5938$). Os níveis demonstram ser mais elevados principalmente nos níveis mais intensos (6% 0,7x e 8% 1,5x, em relação ao grupo repouso) muito semelhantes aos valores apresentados pela HSP72. Os dados demonstram que em um período de 12 h há pouca síntese de mRNA de HSP70, talvez sendo mais intensa em períodos menores que o testado.

EXPRESSÃO DE mRNA HSP73 EM MONÓCITOS/MACRÓFAGOS, APÓS 12 h

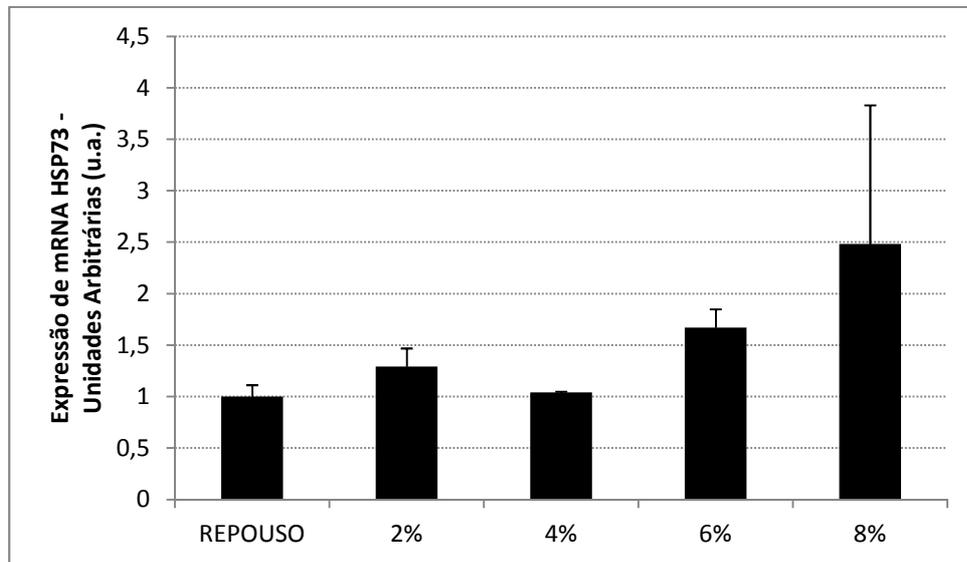


Figura 12 - Histograma representando a expressão da HSP73 de monócitos circulantes de ratos coletados 12 h após terem sido submetidos a diferentes intensidades de natação (2%, 4%, 6%, 8%) em relação ao repouso. Não há diferença estatística entre os grupos ($p = 0,5938$) de acordo com o teste ANOVA de uma via. Histograma representando a expressão de HSP73 normalizada pelos valores de β -actina em unidades arbitrárias (u.a.).

5.4 FAGOCITOSE DE ZIMOSAN

A fagocitose é considerada função primordial do macrófago (Wang *et al.*, 2006), sendo avaliada neste estudo pela fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas (Zimosan), estando estimulados ou não por PMA, um ativador da proteína quinase C, o qual estimula a atividade oxidativa.

5.4.1. Fagocitose de três ou mais partículas

Ao avaliarmos o poder fagocítico dos macrófagos submetidos às diferentes intensidades de exercício físico, imediatamente após o término da sessão de exercício físico, podemos observar na figura 13, a supremacia dos grupos de intensidade alta (6% e 8%) em relação ao número de três ou mais partículas capturadas (índice de avides), sobre o repouso, grupos 2% e 4%. Portanto estes grupos com maior intensidade engolfaram mais partículas que o repouso e os grupos 2% e 4%, sendo este dado considerado extremamente significativo ($p = 0,0004$).

FAGOCITOSE DE ZIMOSAN – 3 OU MAIS PARTÍCULAS, IMEDIATO

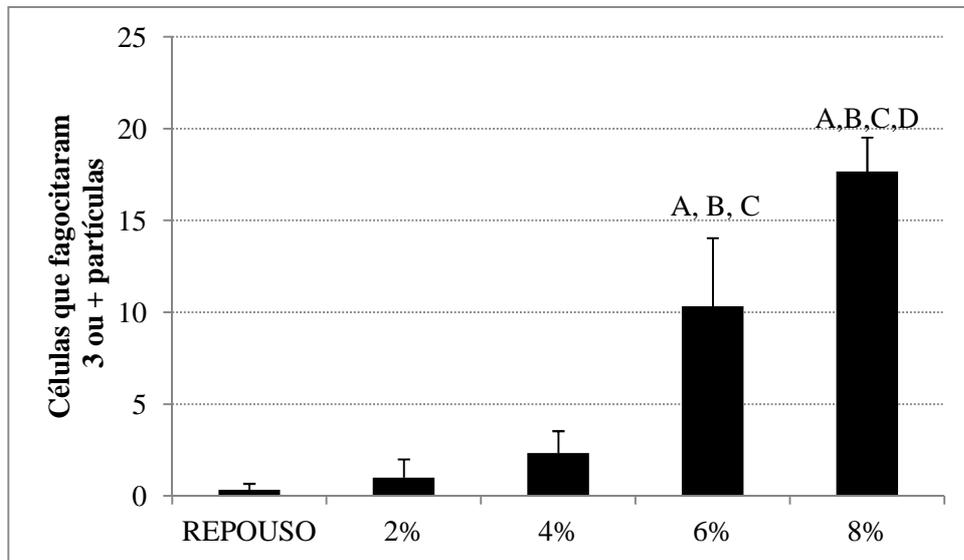


Figura 13 – Total de partículas fagocitadas por monócitos/macrófagos de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos imediatamente após o término da sessão de exercício. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0004$) via ANOVA de uma via e *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

- A. Relacionado ao grupo repouso: 6% ($p < 0,05$); 8% ($p < 0,001$)**
- B. Relacionado ao grupo 2%: 6% ($p < 0,05$); 8% ($p < 0,001$)**
- C. Relacionado ao grupo 2%: 6% ($p < 0,05$); 8% ($p < 0,001$)**
- D. Relacionado ao grupo 6%: 8% ($p < 0,05$).**

Com a finalidade de verificar o quanto intenso a sessão de exercício físico foi para os monócitos/macrófagos dos animais e o quanto esta situação afetou a principal função desta célula, doze h após a sessão aguda de exercício físico analisamos a avidéz destas células em capturar três ou mais partículas. A figura 14 demonstra os grupos que apresentaram maior poder fagocítico em relação à avaliação imediatamente após a sessão de exercício físico e esta resposta foi dose-dependente em relação ao aumento da intensidade, com exceção do grupo 8% que apresentou queda em relação ao grupo 6% e menor avidéz quando comparado aos níveis imediatamente após a sessão de exercício físico. Os dados avaliados apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0024$).

FAGOCITOSE DE ZIMOSAN – 3 OU MAIS PARTÍCULAS, APÓS 12 h

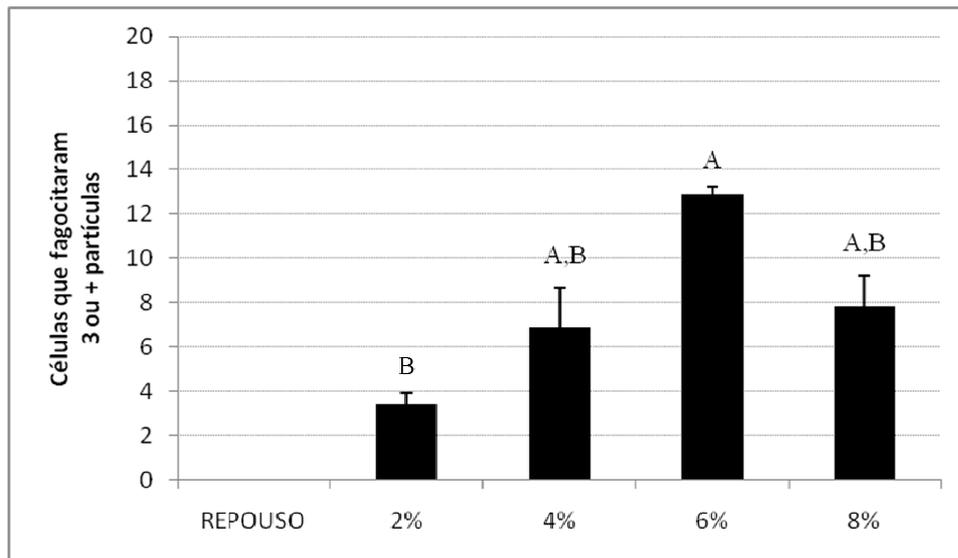


Figura 14 – Total de partículas fagocitadas por monócitos/macrófagos de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos doze h após o término da sessão de exercício. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0024$) através de ANOVA de uma via e *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

- A.** Relacionado ao grupo repouso: 4% e 8% ($p < 0,05$) e 6% ($p < 0,01$);
- B.** Relacionado ao grupo 6%: 2% ($p < 0,01$) e 4% e 8% ($p < 0,05$).

5.4.2 Índice de Hishikawa

Utilizando o índice proposto por Hishikawa *et al.* (1991), imediatamente após uma sessão aguda de exercício físico (figura 15), os monócitos/macrófagos apresentaram uma resposta dose-dependente a partir do grupo 4%, isto é, quanto maior a intensidade do exercício físico maior é a sua resposta em fagocitar as partículas de zimosan, sendo esta resposta considerada como sendo significativamente diferente ($p = 0,0015$).

ÍNDICE DE HISHIKAWA, IMEDIATO

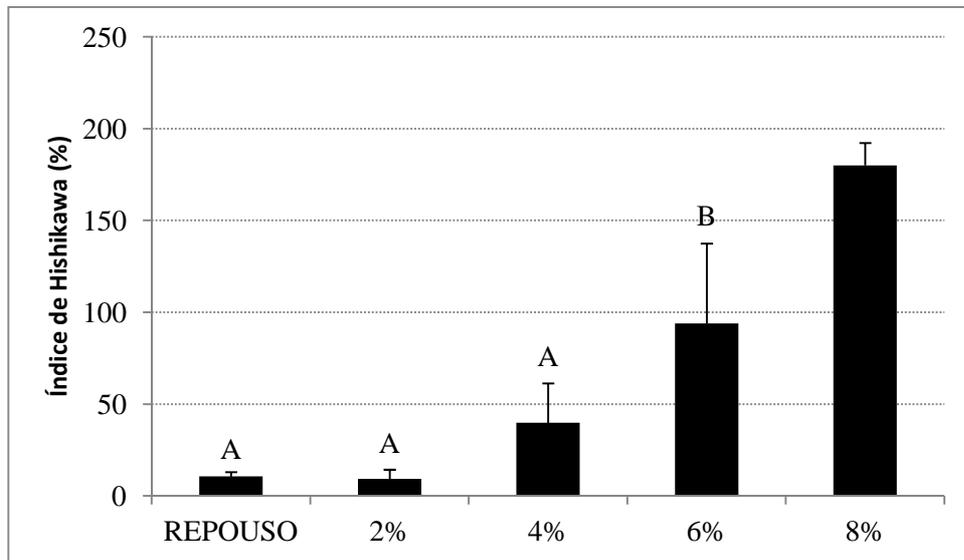


Figura 15 – Índice de Hishikawa de monócitos/macrófagos de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos imediatamente após o término da sessão de exercício. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0015$) via ANOVA de uma via.

Utilizando este mesmo índice, 12 h após o término da sessão de exercício físico (figura 16), observamos o mesmo desenho gráfico da avaliação de três ou mais partículas, ou seja, aumento do poder fagocítico relacionado ao aumento da intensidade do exercício físico. Semelhante a avaliação de imediatamente após o exercício, mas, com queda no grupo 8% em relação ao grupo 6% sendo que estes dados são extremamente significativos ($p = 0,0008$).

ÍNDICE DE HISHIKAWA, APÓS 12 h

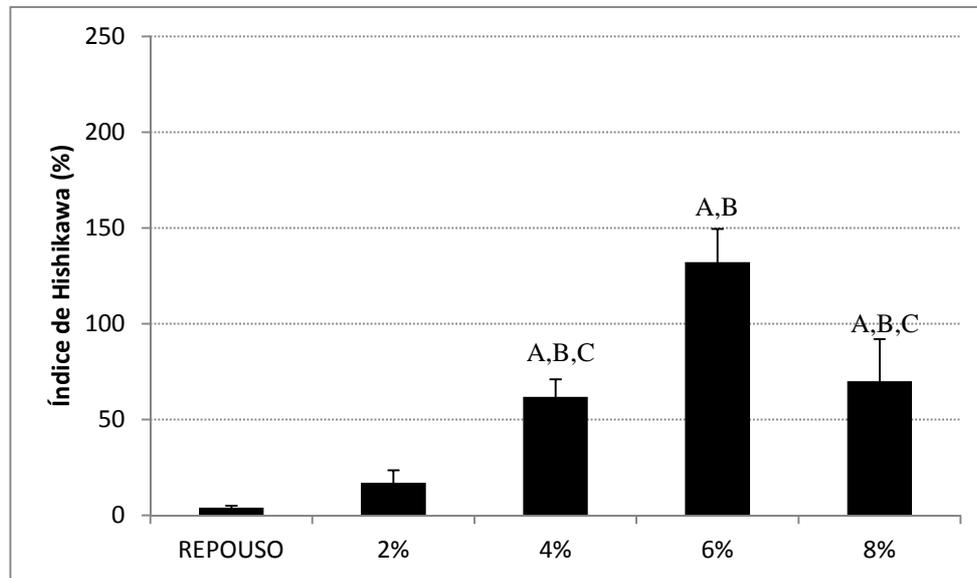


Figura 16 – Índice de Hishikawa de monócitos/macrófagos de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos 12 h após o término da sessão de exercício. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0008$) via ANOVA de uma via e *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

- A. Relacionado ao grupo repouso: 4% e 8% ($p < 0,05$) e 6% ($p < 0,001$);**
- B. Relacionado ao grupo 2%: 4% e 8% ($p < 0,05$) e 6% ($p < 0,01$);**
- C. Relacionado ao grupo 6%, ($p < 0,05$).**

5.4.3 Fagocitose de três ou mais partículas com estimulação de PMA

Na fagocitose de três ou mais partículas, verificadas após o término da sessão de exercício físico e estimuladas com PMA (figura 17), observou-se nos grupos repouso e 2% um discreto aumento, o grupo 4% aumentou sua capacidade fagocítica em aproximadamente 100%, o grupo 6% demonstrou valores próximos em relação ao grupo sem estimulação e o grupo 8% apresentou um discreto aumento. Esses resultados demonstraram diferença significativa ($p = 0,0051$).

FAGOCITOSE DE TRÊS OU MAIS PARTÍCULAS, IMEDIATO

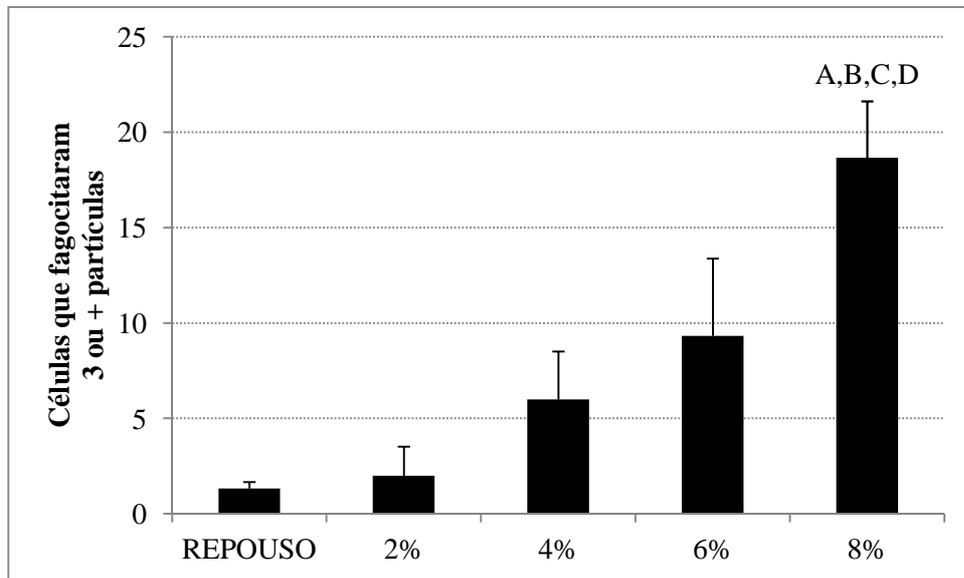


Figura 17 – Total de partículas fagocitadas por monócitos/macrófagos de animais estimulados por PMA e submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos imediatamente após o término da sessão de exercício. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0051$) via ANOVA de uma via e *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

- A. Relacionado ao grupo repouso: 8% ($p < 0,01$);**
- B. Relacionado ao grupo 2%: 8% ($p < 0,01$);**
- C. Relacionado ao grupo 4%: 8% ($p < 0,05$);**
- D. Relacionado ao grupo 6%: 8% ($p < 0,05$).**

Na avaliação da recuperação do exercício físico a longo prazo, em relação ao mesmo parâmetro avaliado logo após a sessão de exercício físico, há um aumento da avidéz dos monócitos/macrófagos em todos os grupos, com exceção do mais intenso que apresentou queda em relação ao grupo 6% (figura 18). Entretanto, o PMA quando comparado ao grupo avaliado sem outro estímulo, aumentou apenas no grupo que permaneceu em repouso, os demais apresentaram valores semelhantes e o grupo 8% teve queda de rendimento. Os dados apresentam diferença significativa entre si ($p = 0,0029$).

FAGOCITOSE DE TRÊS OU MAIS PARTÍCULAS, APÓS 12 h

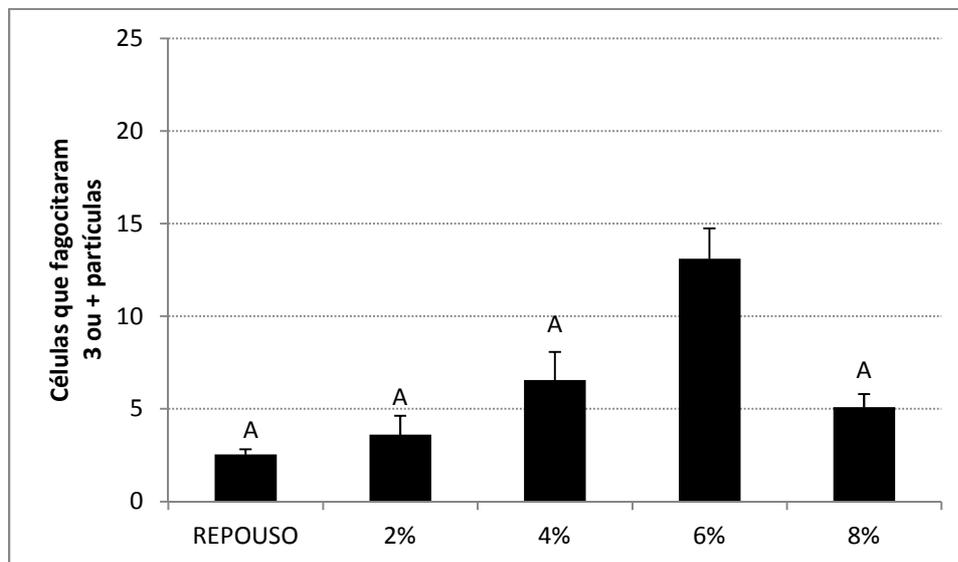


Figura 18 – Células de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos doze h após o término da sessão de exercício que fagocitaram três ou mais partículas. Dados estão relacionados com o grupo de maior avidez, 6%. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0029$) através de ANOVA de uma via e *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

A. Relacionado ao grupo 6%, ($p < 0,01$).

Interessantemente, parece-nos que o PMA nos grupos exercitados nas duas situações temporais, não apresenta uma elevação na capacidade de fagocitar um maior número de partículas (muitas vezes diminuindo) pelo macrófago, parecendo que o estímulo do exercício é suficiente para ativar a função destas células.

5.4.4. Índice de Hishikawa com estimulação de PMA

Quando utilizamos o índice de Hishikawa para avaliar o desempenho dos monócitos/macrófagos, após o término de uma sessão de exercício físico e estimulados com PMA, verificamos que este estimulador pequenas alterações tanto no desenho gráfico (figura 19) como nos valores apresentados. Verificou-se um aumento significativo ($p = 0,0021$).

ÍNDICE DE HISHIKAWA, IMEDIATO

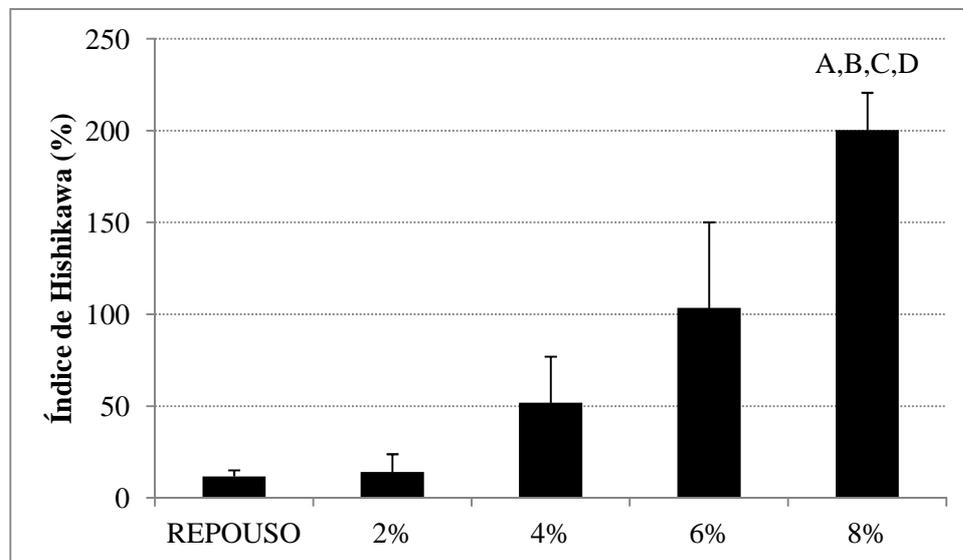


Figura 19 – Índice de Hishikawa de monócitos/macrófagos (estimulados com PMA) de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos logo após o término da sessão de exercício. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0021$) através de ANOVA de uma via.

- A. Relacionado ao grupo repouso: 8% ($p < 0,01$);**
- B. Relacionado ao grupo 2%: 8% ($p < 0,01$);**
- C. Relacionado ao grupo 4%: 8% ($p < 0,01$);**
- D. Relacionado ao grupo 6%: 8% ($p < 0,05$).**

Ao analisarmos este índice em monócitos/macrófagos, 12 h após o término da sessão de exercício e estimulados com PMA (figura 20), constatamos que o grupo 6% apresentou o melhor desempenho seguido dos grupos 4% e 8%. Relacionando este resultado com a avaliação sem estimulação, observa-se um aumento nos grupos repouso e 6% (neste, próximo de 50%) e diminuição nos grupos 2%, 4% e 8%. Comparando os índices de resposta imediata com a de 12 h, há uma elevação dose-dependente em todos os grupos, exceto no grupo 8% que diminuiu o desempenho. Os dados apresentam diferença significativa ($p = 0,0036$).

ÍNDICE DE HISHIKAWA, APÓS 12 HORAS

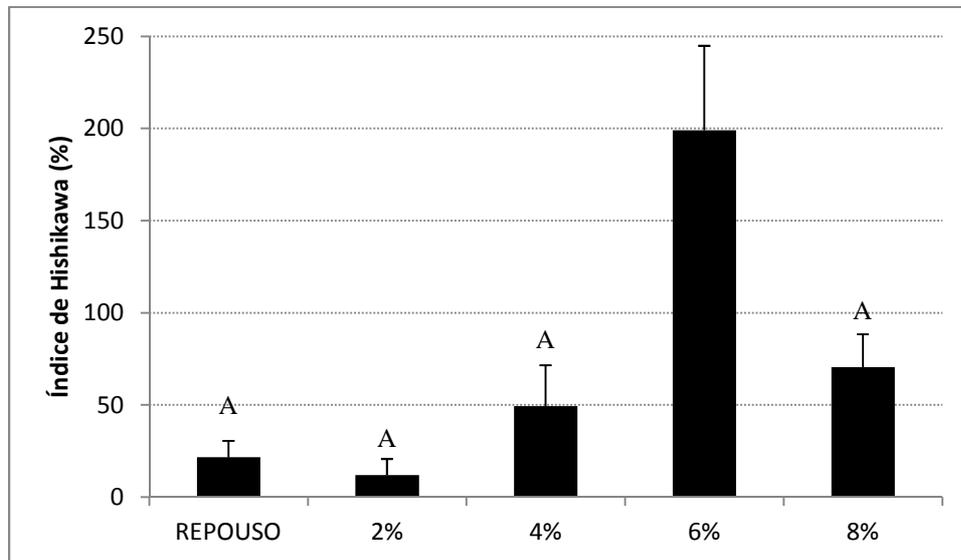


Figura 13 – Índice de Hishikawa de monócitos/macrófagos de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e mortos 12 h após o término da sessão de exercício. Células foram estimuladas com PMA. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0036$) via ANOVA de uma via e *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

A. Relacionado ao grupo 6%: repouso, 2% e 4% ($p < 0,01$) e 8% ($p < 0,05$).

Os resultados são facilmente demonstrados por imagens obtidas no momento da contagem de células e partículas para serem adicionadas aos resultados. É claro o elevado número de macrófagos que não fagocitaram nenhuma partícula de zimosan incubadas com eles (figura 21) e também sua falta de interesse, mesmo sendo estimulado com PMA (fig. 22) representando o grupo repouso. Ao contrário, observa-se uma elevada disposição dos macrófagos em fagocitar o zimosan no grupo 8% (após o término da sessão de exercício físico, tanto no grupo estimulado com PMA como no grupo sem estimulação), já que além do grande número de partículas engolfadas (figura 23), observa-se o lançamento dos pseudópodos em direção ao zimosan (figuras 24 e 25).

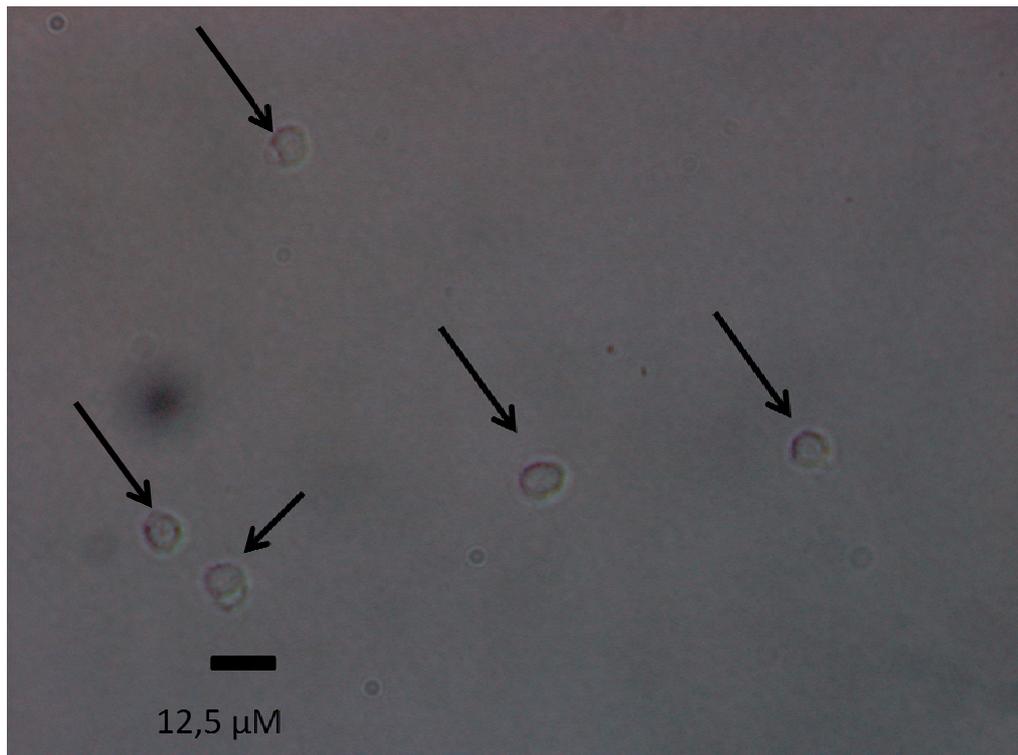


Figura 21 – Imagem microscópica (aumento de 640x) de macrófagos (identificados pelas setas de cor preta) que não fagocitaram nenhuma partícula de zimosan marcado com vermelho neutro, representando o grupo repouso.

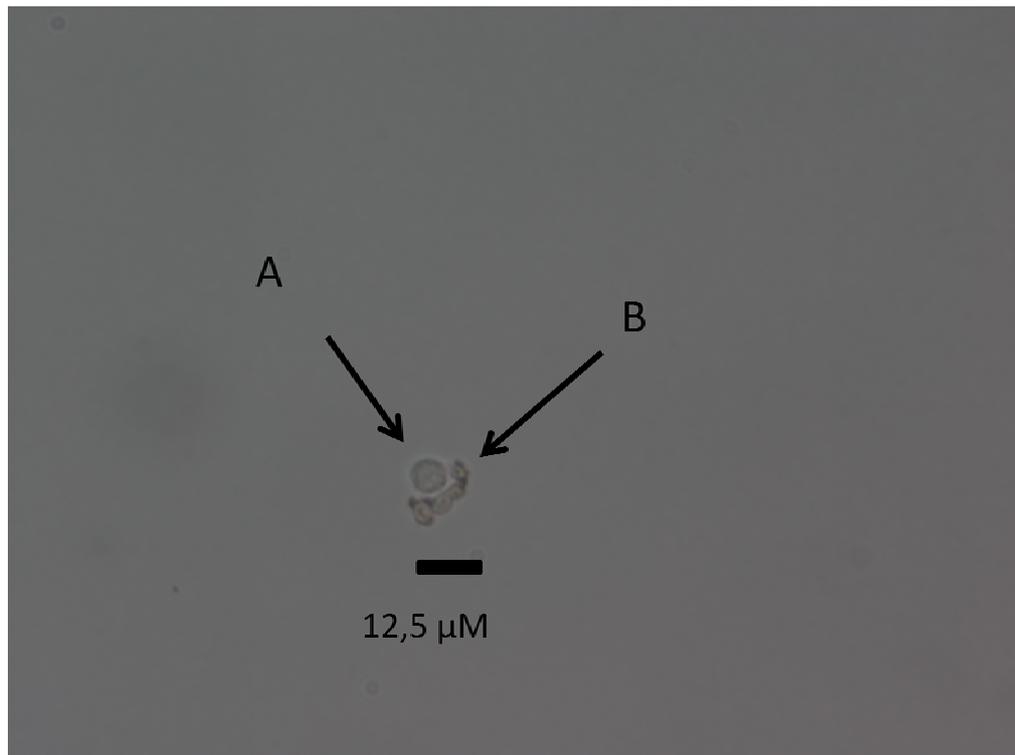


Figura 22 – Imagem microscópica (aumento de 640x) de macrófago (A) que não fagocitou nenhuma partícula de zimosan marcada com vermelho neutro (B), apesar de estarem próximo a ele, representando o grupo repouso ativado com PMA.

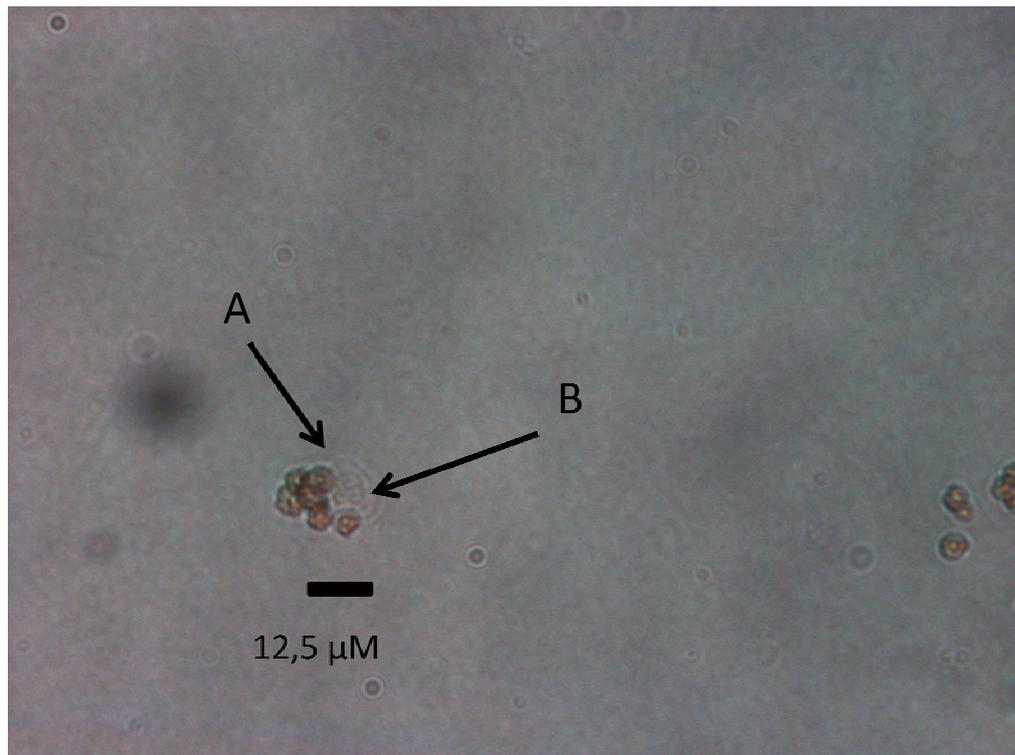


Figura 23 – Imagem microscópica (aumento de 640x) de macrófago (A) que fagocitou quatro partículas de zimosan marcado com vermelho neutro (B), visualizadas em seu citoplasma e, ainda assim, objetivando fagocitar mais partículas próximas a ele, representando o grupo 8% estimulado com PMA.



Figura 24 – Imagem microscópica (aumento de 640x) de macrófagos (A) que lançam seus pseudópodos em direção às partículas de zimosan marcado com vermelho neutro (B), representando o grupo 8% estimulado apenas com o exercício físico.

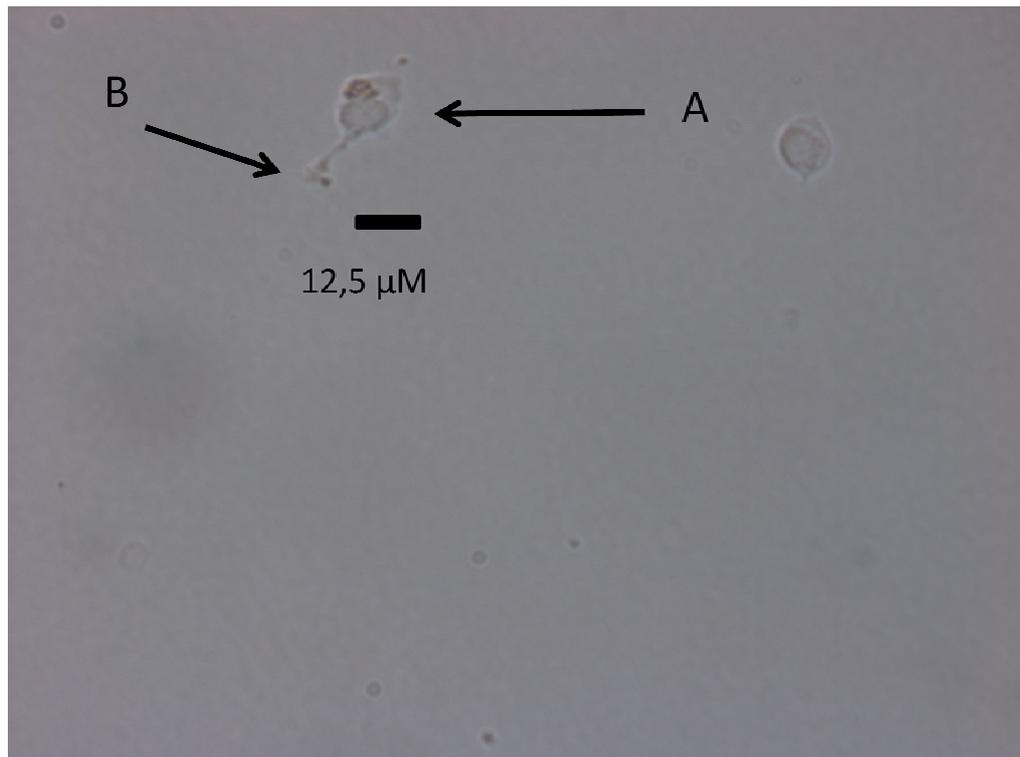


Figura 25 – Imagem microscópica (aumento de 640x) de macrófago (A) que lança seu pseudópode em direção às partículas de zimosan marcado com vermelho neutro (B), representando o grupo 8% estimulado apenas com o exercício físico.

5.5 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Considerando o aumento provocado via intensidade do esforço na fagocitose dos monócitos/macrófagos, investigamos outra função característica desta célula, a produção de peróxido de hidrogênio quando está ativada. Para este parâmetro utilizamos a subtração dos valores das células estimuladas com PMA e das não estimuladas. Observamos que imediatamente após o término da sessão aguda de exercício físico há uma diminuição na produção deste peróxido, sendo dose-dependente, maior a sobrecarga de exercício, menor foi a produção (figura 26). Os dados apresentam diferenças significativas ($p = 0,0188$).

PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, IMEDIATO

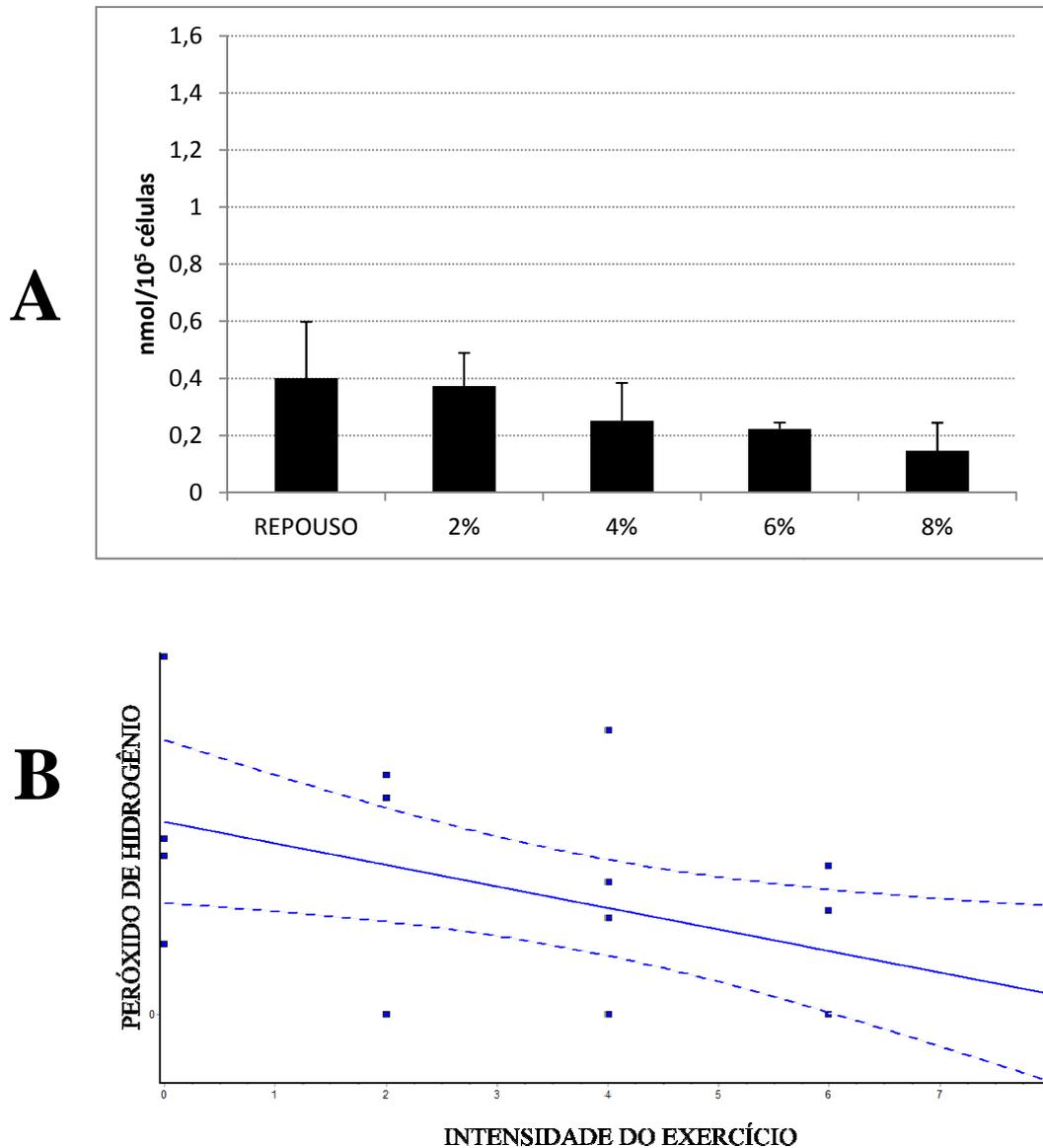


Figura 26 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmol/10⁵células) por monócitos/macrófagos de ratos dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0188$) através de ANOVA de uma via e índice de correlação de Pearson ($R^2 = -0,5471$). (A) Histograma representando a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos/macrófagos nas diferentes intensidades de exercício físico. (B) Histograma representando o índice de correlação de Pearson.

Após 12 h de uma sessão aguda de exercício físico (figura 27), monócitos/macrófagos quando avaliados da mesma forma (PMA – controle) apresentam aumento no grupo 2%, o grupo 4% permanece com os valores semelhantes e não há produção deste oxidante nos grupos mais intensos. Os dados são considerados diferentes com significância ($p = 0,0490$) através do teste de Kruskal-Wallis e índice de correlação de Spearman.

PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, APÓS 12 HORAS

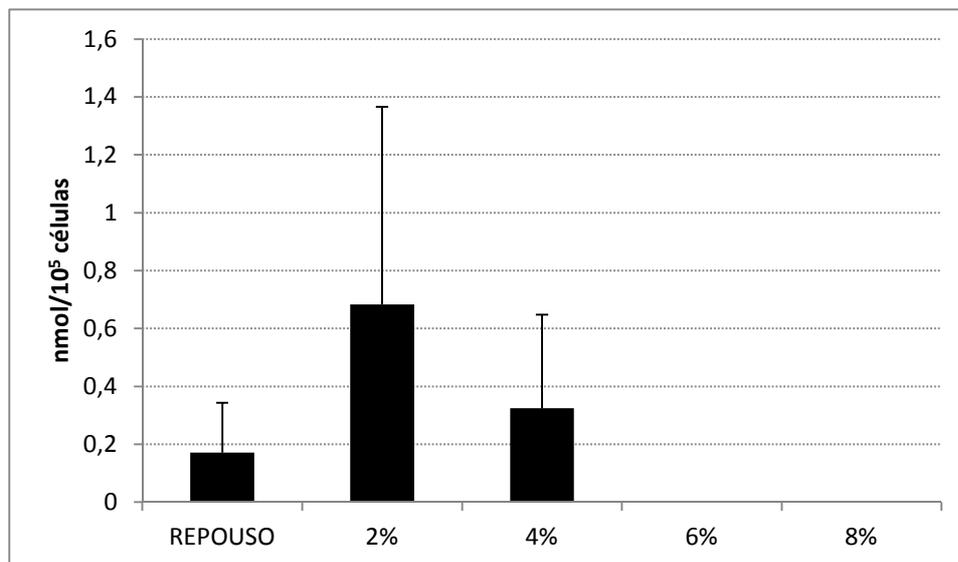


Figura 27 – Produção de peróxido de hidrogênio (nmol/10⁵ células) por monócitos/macrófagos de ratos dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0490$) através de do teste de Kruskal-Wallis e índice de correlação de Spearman ($R^2 = -0,6425$).

5.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Outro produto liberado por monócitos/macrófagos e que também caracteriza-se por exercer uma atividade microbicida/bactericida é o óxido nítrico. Esse óxido reage com diversas moléculas para formar nitritos. Quando analisamos este produto imediatamente após o término da sessão de exercício físico (figura 28), não observamos nenhuma diferença significativa.

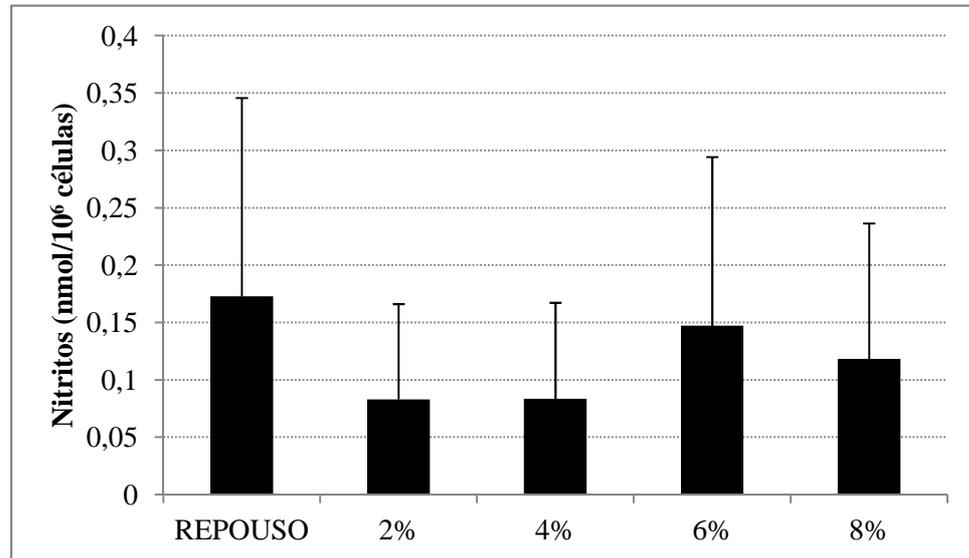
PRODUÇÃO DE NITRITOS, IMEDIATO

Figura 28 – Produção de nitritos (nmol/10⁶ células) por monócitos/macrófagos de ratos dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,9786$) através de ANOVA de uma via.

Entretanto na figura 29, ao observarmos esse dado 12 h após a sessão de exercício físico, detectamos aumentos na produção desse metabólito nos grupos 6 e 8% e ausência nos grupos repouso, 2 e 4%. Esses dados foram considerados com diferença significativa ($p = 0,0372$).

PRODUÇÃO DE NITRITOS, APÓS 12 HORAS

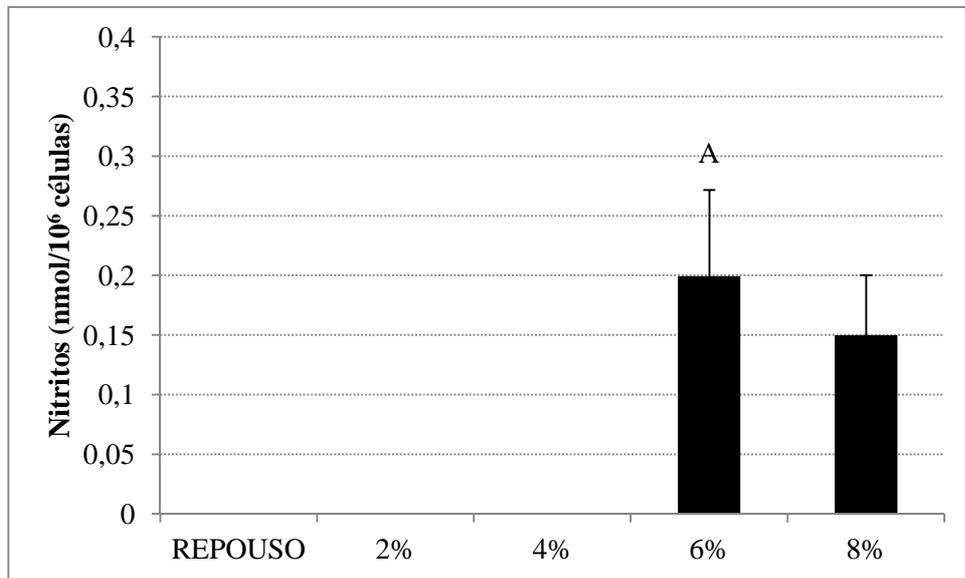


Figura 29 – Produção de nitritos (nmol/10⁶ células) por monócitos/macrófagos de ratos dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após uma sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,0372$) através de ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

A. Relacionado ao grupo repouso ($p < 0,05$).

5.7 LIPOPEROXIDAÇÃO

Em estudo anterior de nosso laboratório (Silveira *et al.*, 2006), usando a técnica do TBARS para avaliar a formação de lipoperóxidos, não foi encontrado estresse oxidativo no plasma de animais submetidos a uma sessão aguda de natação durante uma hora com intensidade moderada (5% do peso corporal atado à base da cauda do animal). Em nosso estudo, utilizamos duas técnicas para avaliar a formação de lipoperóxidos (os quais são responsáveis por dano ao DNA celular, membrana plasmática): avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a técnica da oxidação do xilenol laranja por lipoperóxidos, mais específica que a primeira.

Para avaliação da formação de lipoperóxidos sorológicos, o sangue dos animais que foram imediatamente decapitados após a sessão aguda de exercício físico, assim como o dos

animais que foram mortos 12 h após a sessão de exercício físico agudo foi coletado sem a presença de anticoagulantes. Estas amostras, foram centrifugadas e os soros formados durante este processo, foram coletados e congelados (-80°C) para serem submetidos às análises posteriores.

Após o descongelamento, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976), sendo todas as amostras diluídas de forma que fossem processadas com a mesma quantidade de proteínas, 1 mg/mL.

5.7.1. Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O soro dos animais que foram sacrificados após uma sessão aguda de exercício físico não apresentou diferença significativa ($p = 0,1234$) entre os grupos em relação à formação de malondialdeído. O desenho gráfico dos valores encontrados (figura 30) apresenta uma diminuição nos níveis mais intensos, por provável efeito da intensidade do esforço físico, visto que estes grupos apresentam um valor de lactato plasmático acima do limiar anaeróbico, considerando a atividade destes animais de características anaeróbicas e, portanto, sendo pouco propícia para o estabelecimento de um estresse oxidativo sistêmico, visto que esta característica é mais proeminente em atividades aeróbicas.

TBARS EM EQUIVALENTES DE MDA, IMEDIATO

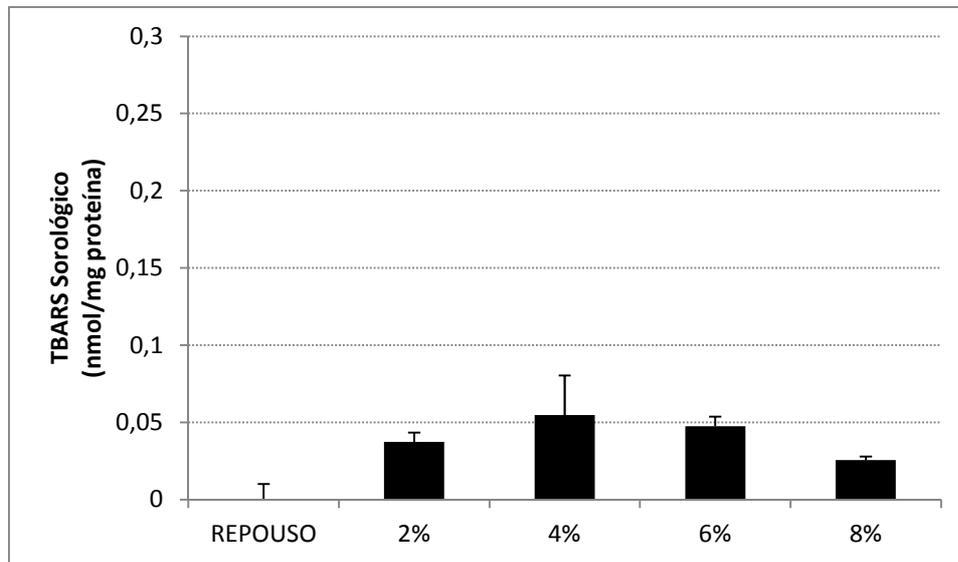


Figura 30 – Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do soro de animais submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e sacrificados imediatamente. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,1234$).

Após 12 h da realização da sessão aguda de exercício físico, o grupo mais intenso do estudo, apresentou uma maior concentração de malondialdeído em relação às demais cargas de intensidade, conforme observado na figura 31. Ou seja, após um período de recuperação apreciável (12 h), o exercício realizado de forma intensa (8%) apresentou uma elevação na concentração de malondialdeído, o qual determina a intensidade de um estresse oxidativo sistêmico, sendo este dado considerado com uma diferença extremamente significativa ($p = 0,0068$).

TBARS EM EQUIVALENTES DE MDA, APÓS 12 HORAS

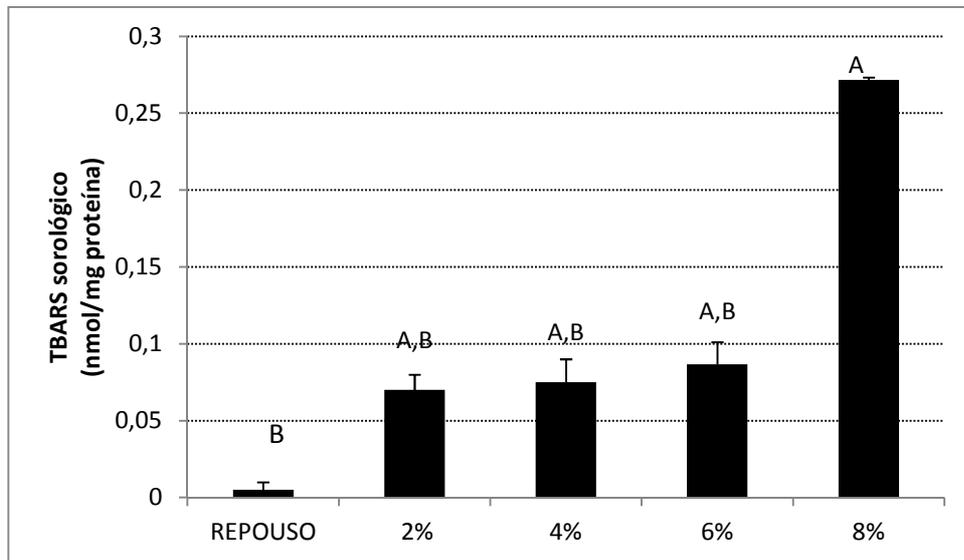


Figura 31 – Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do soro de animais coletado 12 h após estes serem submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,001$) utilizando ANOVA de uma via e *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

- A. Relacionado ao grupo repouso: 2%, 4% e 6% ($p < 0,05$) e 8% ($p < 0,001$);**
- B. Relacionado ao grupo 8%: ($p < 0,001$).**

5.7.2 Técnica do Xilenol Laranja

Para avaliarmos com maior eficácia a formação de lipoperóxidos, utilizamos a técnica do xilenol laranja nas diferentes intensidades de exercício físico e estas não apresentaram diferença significativa ($p = 0,4451$) quando a coleta de sangue foi obtida imediatamente após o exercício de efeito agudo (figura 32).

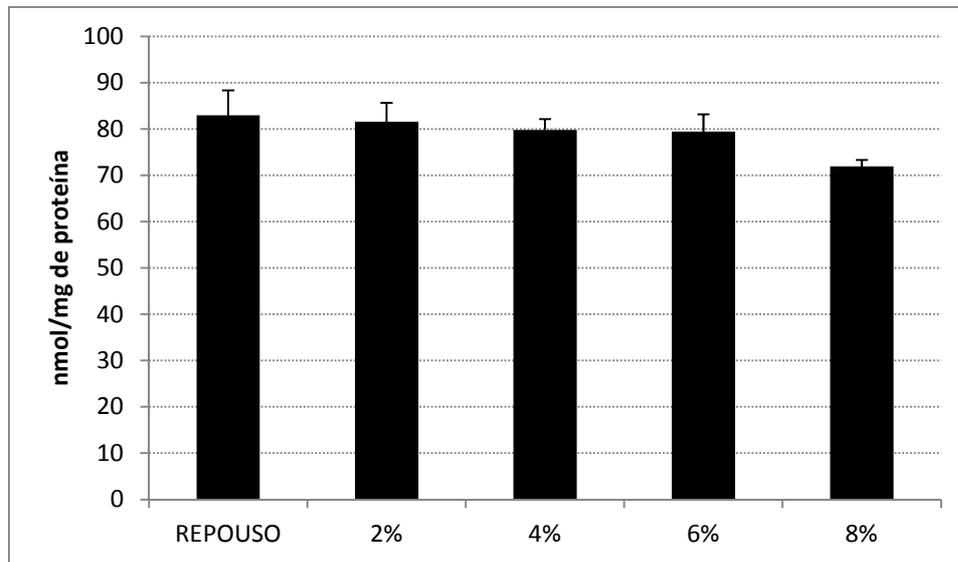
DETERMINAÇÃO DE LIOPERÓXIDOS, IMEDIATO

Figura 32 – Dosagem de lipoperóxidos sorológicos de animais coletado imediatamente após estes serem submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,4451$).

Após 12 h da sessão de exercício físico (figura 33) ocorreu uma diminuição na concentração de todos os grupos avaliados, não existindo diferença significativa entre os grupos em relação à quantidade de lipoperóxidos produzida ($p = 0,7465$).

DETERMINAÇÃO DE LIPOPERÓXIDOS, APÓS 12 HORAS

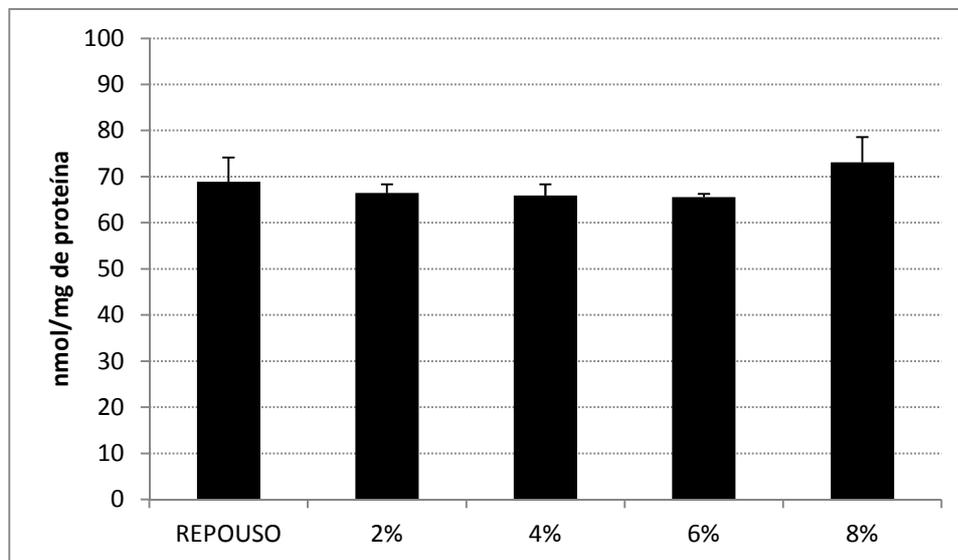


Figura 33 – Dosagem de lipoperóxidos sorológicos de animais coletado 12 h após estes serem submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,7214$).

5.8 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA E DISSULFETO DE GLUTATIONA

Glutationa reduzida é a mais abundante fonte de tiol não proteico celular que realiza funções múltiplas na proteção celular contra o dano oxidativo e mantém o organismo em um estado equilibrado nem oxidante, nem reduzido. Toda via, dependendo da intensidade/duração do exercício físico, uma determinada quantidade de GSH diminui na célula, porque é oxidada à dissulfeto de glutathione (cuja concentração intracelular aumenta), devido a aumentos na produção de radicais livres. Entretanto, via enzima glutathione reductase e peroxidase a célula pode reduzir esta glutathione oxidada para a forma reduzida (Li Li Ji, 1999). A mensuração do estado redox em eritrócitos determina o estado redox sistêmico já que estas células percorrem todos os tecidos e células do organismo via corrente sanguínea, agindo como um tampão-redox.

A relação entre as duas formas de glutathione (GSSG/GSH) determina a “voltagem” redox da célula, sendo esta relação considerada um índice do estado redox celular (Akerboon & Sies, 1981).

5.8.1 Concentração de glutatona

Ao término da sessão do exercício, a papa de hemácias (que fornece um índice do estado redox sistêmico) apresentava um conteúdo de glutatona decrescente quando relacionada com a intensidade do exercício (figura 34), ou seja, a partir do grupo 4% (considerado como tendo algum efeito sobre a intensidade do nado) os níveis de defesa antioxidante do organismo diminuía em relação ao grupo repouso, 12,5%, 53,4% e 90,8%, respectivamente. Demonstrando o quanto os níveis mais intensos de exercício eram pró-oxidantes ao organismo, considerados significativamente diferentes ($p = 0,0088$).

GSH – CONCENTRAÇÃO ERITROCITÁRIA, IMEDIATO

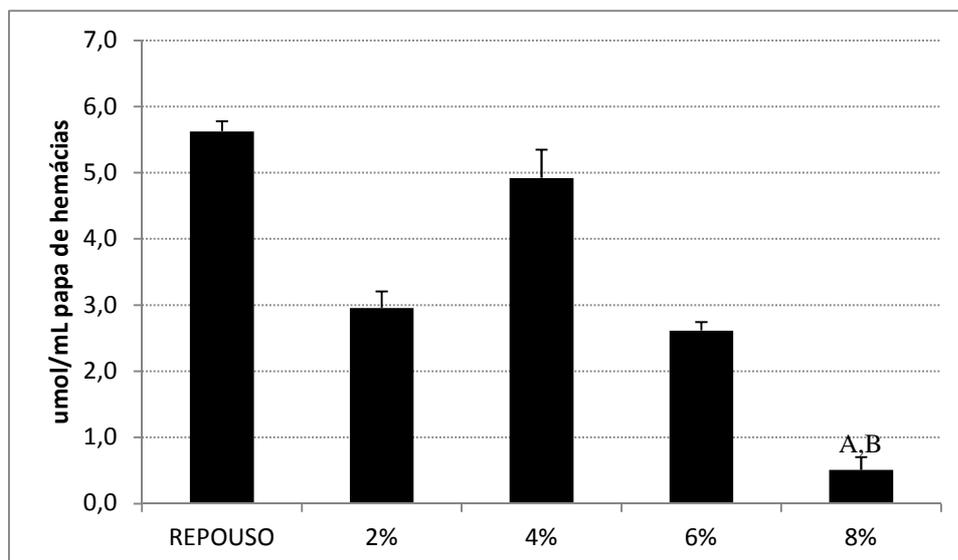


Figura 34 – Concentração de glutatona (GSH) em papa de hemácias de ratos submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda. Os valores GSH foram obtidos após subtração da quantidade de GSSG a partir das determinações de GSH_{TOTAL}, conforme descrito na seção de Métodos. Valores apresentam diferença significativa através de ANOVA de uma via, *post-hoc* Student-Newman-Keuls ($p = 0,0088$).

A. Relacionado ao grupo repouso ($p < 0,05$);

B. Relacionado ao grupo 4% ($p < 0,01$).

Observamos que após 12 h da sessão de exercício físico (figura 35), os grupos exercitados não conseguiram recuperar totalmente suas defesas antioxidantes, com exceção do grupo mais intenso que apresentou a recuperação mais rápida dessa reserva, igualando-se ao valor de repouso de seu grupo. Porém, os dados não apresentam diferença significativa nesta variável analisada ($p = 0,1299$).

GSH – CONCENTRAÇÃO ERITROCITÁRIA, APÓS 12 HORAS

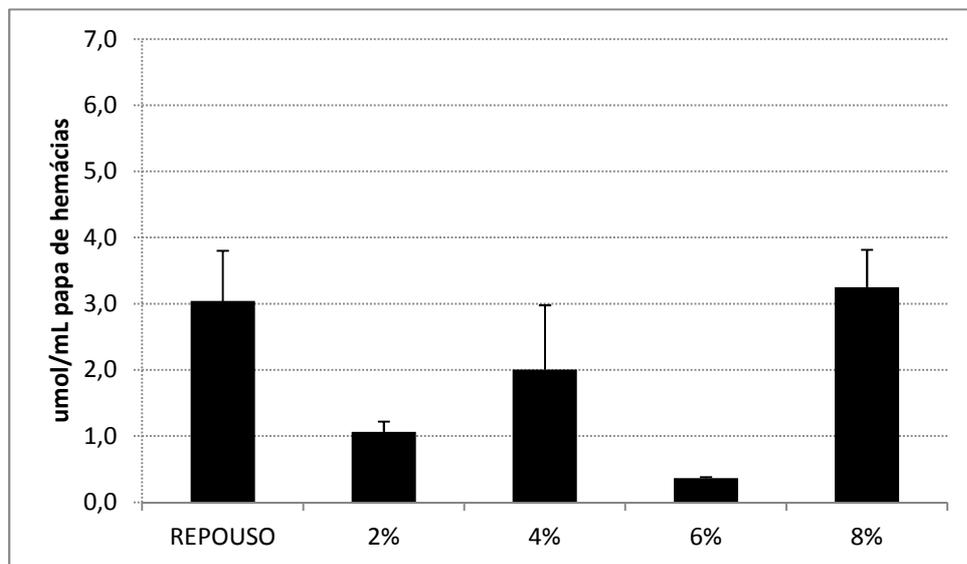


Figura 35 – Concentração de glutathiona (GSH) em papa de hemácias de ratos submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e sacrificados 12 h após esta. Os valores GSH foram obtidos após subtração da quantidade de GSSG a partir das determinações de GSH_{TOTAL}, conforme descrito na seção de Métodos. Valores não apresentam diferença significativa através de ANOVA de uma via ($p = 0,1299$).

5.8.2 Concentração de dissulfeto de glutathiona

Ao analisarmos o conteúdo do dissulfeto de glutathiona no momento imediato ao término da sessão aguda de exercício físico (figura 36), remete-nos claramente ao gráfico da glutathiona reduzida de modo inverso a partir da intensidade moderada, isto é, ao passo que a glutathiona está sendo utilizada, há a formação de dissulfeto de glutathiona, uma resposta do

organismo contra o estabelecimento de um estresse com formação de radicais livres. Embora os valores apresentados não demonstrem diferença significativa entre si ($p = 0,8589$), visualizamos no gráfico um aumento crescente na produção de GSSG à medida que há a elevação da intensidade de exercício físico.

GSSG – CONCENTRAÇÃO ERITROCITÁRIA, IMEDIATO

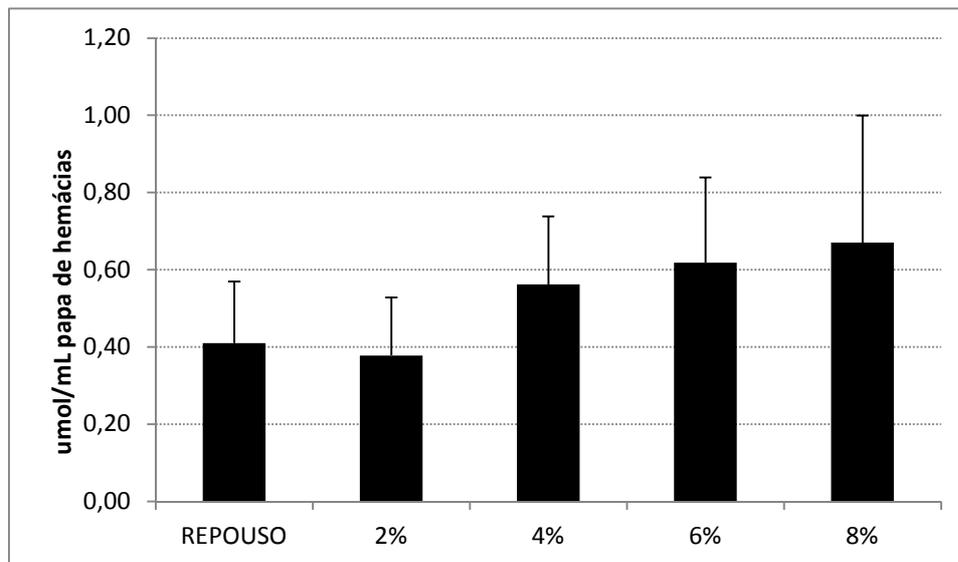


Figura 36 – Concentração de dissulfeto de glutatona (GSSG) em papa de hemácias de ratos submetidos a uma sessão aguda de 20 min de exercício físico em diferentes intensidades, repouso, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal atado à base da cauda e decapitados no momento imediato ao término desta. Valores não apresentaram diferença significativa através de ANOVA de uma via ($p = 0,8589$).

Ao analisarmos os valores de GSSG após 12 h da sessão de exercício físico (figura 37), observamos uma discreta diminuição nos valores dos grupos de 6% e 8% em relação aos valores imediatos após a execução do exercício físico, o que poderia significar um forte estresse oxidativo, no qual permaneceram elevados os conteúdos de GSSG dos grupos mais intensos por 12 h após o estresse imposto, ocorrendo uma discreta redução. Os dados são considerados estatisticamente diferentes ($p = 0,0384$).

GSSG – CONCENTRAÇÃO ERITROCITÁRIA, APÓS 12 HORAS

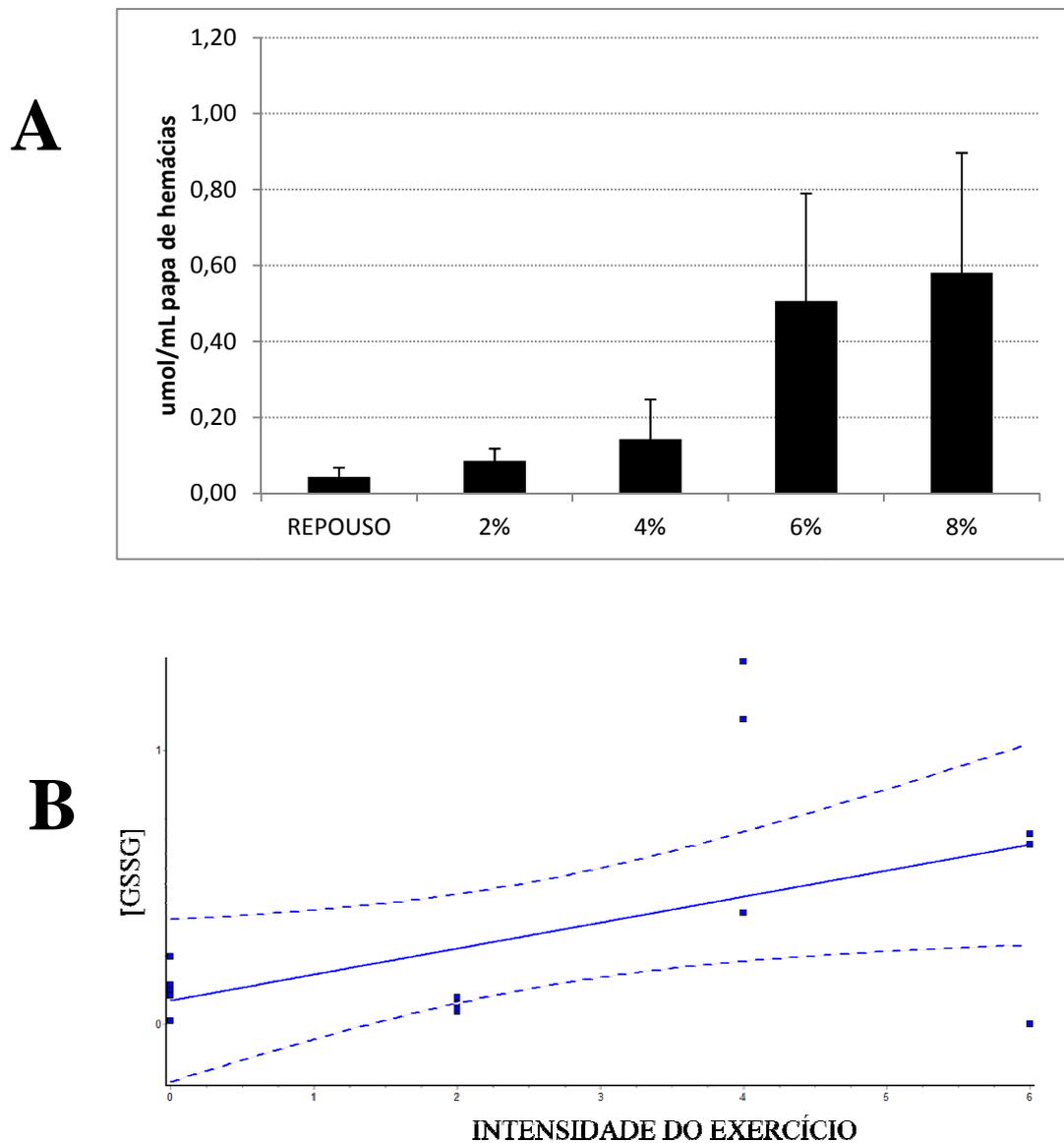


Figura 37 – Correlação entre a concentração eritrocitária de GSSG em papa de hemácias de ratos e as intensidades de exercício nos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0384$) ANOVA de uma via, índice de correlação de Pearson ($R^2 = 0,2748$). (A) Histograma representando a concentração de GSSG em $\mu\text{mol/mL}$ (B) Histograma representando o índice de correlação de Pearson.

5.8.3 Relação dissulfeto de glutathiona/glutathiona

O resultado para análise da relação [GSSG/GSH] no momento imediato após o término da sessão de exercício físico demonstrou-se bem mais elevado nos grupos mais intensos, em torno de 3x e 4x maior em relação ao repouso (figura 38), sendo estes valores considerados estatisticamente diferentes ($p = 0,0202$) e revelando o alto estresse sistêmico ao qual os animais foram impostos durante o exercício físico.

RELAÇÃO [GSSG/GSH], IMEDIATO

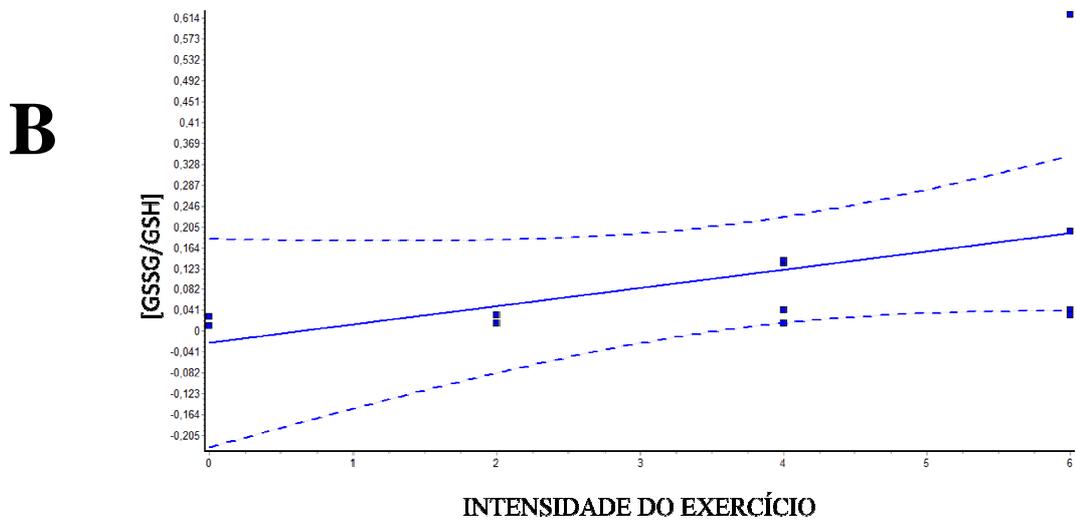
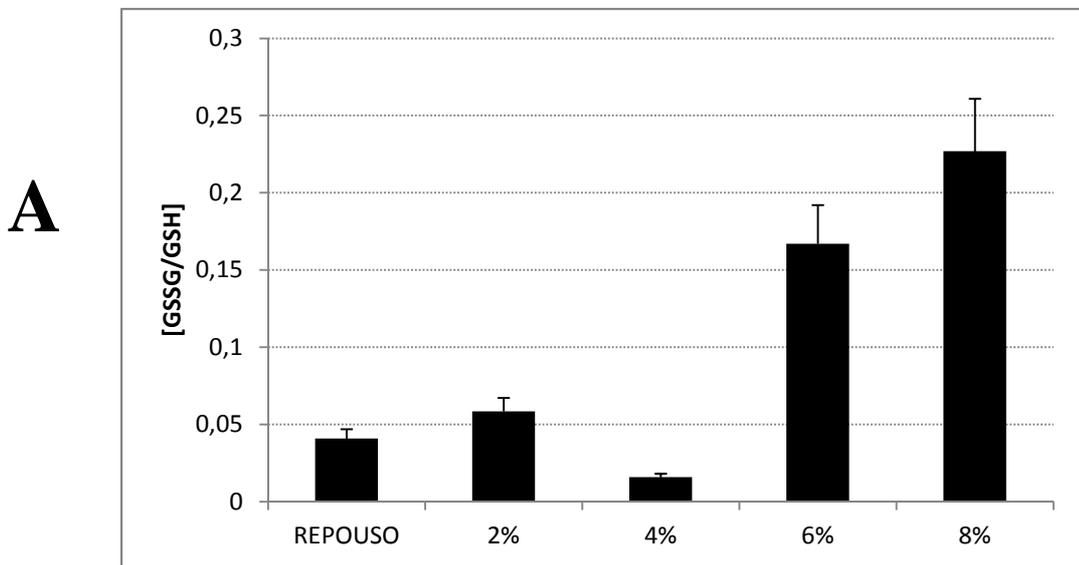


Figura 38 – Correlação entre o índice [GSSG/GSH] em papa de hemácias de ratos e as diferentes intensidades de exercício nos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, imediatamente após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,0202$) teste de Kruskal-Wallis, índice de correlação de Spearman ($R^2 = 0,7730$). (A) Histograma representando a relação [GSSG/GSH]. (B) Histograma representando o índice de correlação de Spearman.

Verificando o efeito do exercício após 12 h do término da sessão (figura 39), podemos observar o quão intenso o estímulo foi, pois mesmo após este longo período de recuperação os grupos mais intensos apresentaram-se com a relação [GSSG/GSH] elevada, da grandeza maior que 0,1 o que denota uma incontestável situação de estresse sistêmico, visto que valores abaixo de 0,1 são considerados normais. Entretanto, os dados não apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,8178$).

RELAÇÃO [GSSG/GSH], APÓS 12 HORAS

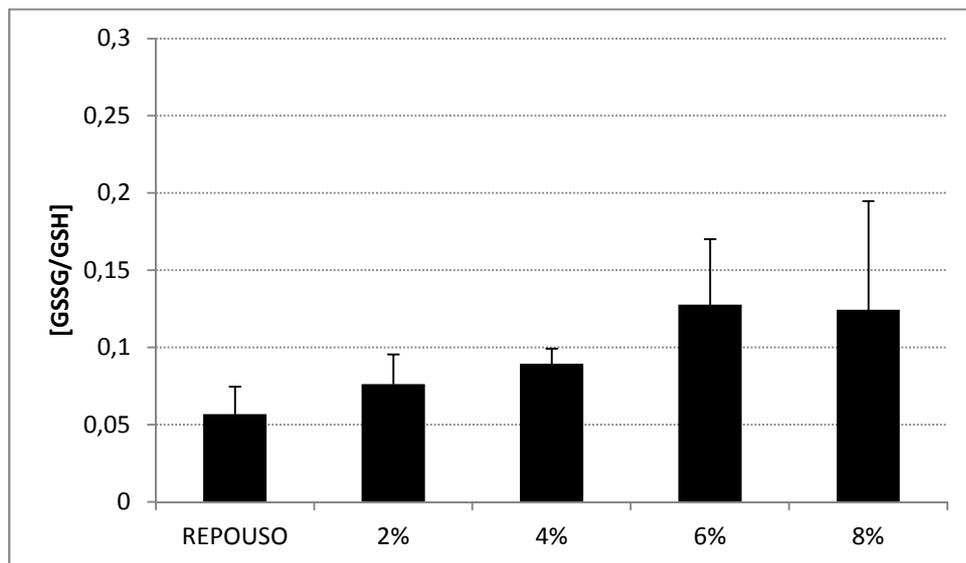


Figura 39 – Índice [GSSG/GSH] em papa de hemácias de ratos dos grupos repouso, 2%, 4%, 6% e 8%, 12 h após a sessão de exercício físico agudo. Os animais realizaram 20 min de natação com suas respectivas cargas de intensidade atadas à cauda. Os grupos não apresentam diferenças significativas entre si ($p = 0,8178$) teste de ANOVA de uma via.

DISCUSSÃO

O presente trabalho surgiu de hipóteses geradas em pesquisa anterior de nosso laboratório (Silveira *et al.*, 2006) a qual demonstrava que o exercício físico realizado com intensidade e duração moderada (4% de sobrepeso em 60 min) promovia uma potente estimulação imunológica via monócitos circulantes, sem induzir estresse oxidativo sistêmico. Um dos questionamentos elaborados tornou-se hipótese neste trabalho, ou seja, como o sistema imunológico e sua resposta ao estresse sistêmico se apresentaria frente a uma sessão aguda de exercício físico com intensidades mais elevadas.

Estudos relacionando o sistema imunológico e o exercício físico iniciaram nos primeiros anos do século XX (Walsh *et al.*, 2011) e do passado para a atualidade, muito se postulou sobre o efeito do exercício físico e sua correta prescrição (intensidade, duração, frequência, tempo de recuperação) na saúde, no sistema imunológico, no aumento da resistência à doenças e/ou patógenos, culminando em diversas teorias que buscam esclarecer esses questionamentos. Como a curva em forma de J, na qual a base da curva relaciona-se ao exercício de intensidade moderada e a baixa incidência de infecções enquanto que o ponto mais alto desta curva representa os exercícios mais intensos e sua alta probabilidade de infecção (Luís F.B.P.Costa Rosa; 2004) ou também a curva em formato de U invertido na qual, o exercício prescrito de intensidade moderada pode responder contra uma série de estressores impostos pelo exercício físico, assim como prevenir contra infecções (Zaldivar *et al.*, 2006). E os dois extremos dessa curva, sedentarismo/exercício de intensidade leve e exercício intenso/árido podem levar a leucopenia, diminuição da proliferação celular de células imunológicas e causar dano muscular relacionado a uma resposta inflamatória (Mars *et al.*, 1998). Participando deste sistema imunológico destacam-se os monócitos circulantes, células que posteriormente migram para tecidos e exercem funções características como fagocitose, produção de ERO e citocinas inflamatórias (Leandro *et al.*, 2007), sendo considerados como a principal célula mediadora da resposta inflamatória (Heimbach *et al.*, 2001), já que promove a secreção de várias moléculas que promovem ou inibem a inflamação (Woods *et al.*, 2000).

Relacionado ao sistema imunológico, destacamos as HSPs, as quais realizam papéis intracelulares, que buscam citoproteção, resposta anti-apoptótica e bloqueio de vias de

inflamação, e extracelulares, que visa gerar uma resposta pró-inflamatória alertando o organismo e, principalmente o sistema imunológico, frente ao desafio presenciado. Estas proteínas são categoricamente influenciadas pelo exercício físico numa resposta dose-dependente, a intensidade do exercício significativamente influencia o nível de HSP72 extracelular (Fehrenbach *et al.*, 2005) bem como níveis intracelulares (Simar *et al.*, 2007). Contudo, o efeito de diferentes intensidades de exercício físico nos monócitos/macrófagos, associado à relação intra/extracelular da HSP70 permanece desconhecido.

Os resultados do presente trabalho sugerem que, ao final de uma sessão aguda de exercício físico de curta duração, monócitos circulantes não apresentam alteração em seu conteúdo intracelular de HSP70. Em compensação, ao analisarmos o plasma desses animais, observamos um aumento crescente nas concentrações desta proteína na circulação sanguínea, correspondente à intensidade do esforço físico, alcançando um platô nos grupos mais intensos. Esta foi uma resposta dose-dependente também encontrada em outros estudos (Fehrenbach *et al.*, 2005). A liberação desta proteína para o meio extracelular, que ocorre via exossomos, estabelece como prováveis fontes responsáveis por seu aumento na concentração plasmática os tecidos hepatoesplâncnicos (Febbraio *et al.*, 2002a). Assim, num primeiro momento não verificamos nenhuma correlação entre o conteúdo intracelular de HSP70 em monócitos e a concentração plasmática desta mesma proteína. De forma surpreendente, no entanto, quando analisamos a imunodeteção de HSP70 intracelular em monócitos 12 h após o término da sessão de exercício físico, observamos queda nos valores intracelulares dos grupos com intensidade moderada e intensa, apesar do discreto aumento nos níveis de mRNA de HSP72/73 destas células. Isto sugere uma inédita liberação de HSP70 para o meio extracelular por monócitos circulantes estimulados com exercício físico, visto que o conteúdo plasmático aumenta numa proporção maior que a análise anterior, apresentando uma queda no grupo mais intenso, provavelmente pela HSP70 estar realizando seu papel de chaperona, ligando-se em alguma proteína indesejada ou até mesmo em células para desencadear alguma resposta imunológica, por exemplo, (Calderwood & Theriault, 2007; Asea, 2005; Radsak *et al.*, 2003). Estudos prévios sugerem que a liberação da HSP70 para o meio extracelular objetive alertar o sistema imunológico frente ao estresse que foi estabelecido (Campisi *et al.*, 2003; Srivastava, 2002) não sendo diferente nesta situação, pois exercícios realizados de forma intensa acabam promovendo um maior estresse oxidativo do organismo (Krüger *et al.*, 2009) e imunossupressão (Mars *et al.* 1998; Krüger *et al.*, 2009). Assim, mesmo numa

proporção bem inferior a produção da proteína de choque térmico de 70kDa pelos tecidos hepatoesplâncnicos, monócitos parecem demonstrar uma segregação desta proteína na situação de exercício físico para promover uma autoestimulação e dessa forma, secretar uma maior quantidade de citocinas pró e anti-inflamatórias (Campisi & Fleshner, 2003; Srivastava, 2002), para alertar todo o sistema imunológico e desencadear uma resposta imunológica antecipatória buscando balancear o estresse inflamatório sistêmico ou frear uma quebra homeostática causada por um desequilíbrio pró-oxidante.

Outro fato que chamou nossa atenção foi a presença de HSP73 nos plasmas desses animais, porque, até então, havia evidências apenas sobre a presença de HSP72 no plasma (Whitham *et al.*, 2007; Milne & Noble, 2002). Imediatamente após o exercício físico, a quantidade de HSP73 mostra-se aumentada nos grupos mais intensos e nesses mesmos grupos após as 12 h da sessão apresenta-se diminuída. É possível especular-se, portanto, que, na situação aguda extrema, monócitos/macrófagos possam liberar o “sinal” de perigo homeostático, mas, após um determinado período, talvez, o foco modifique-se, na busca da manutenção dos conteúdos citoplasmáticos e/ou uma possível queda na síntese de novas proteínas com esse peso molecular.

A estimulação adrenérgica surge como um dos possíveis responsáveis pela liberação de HSP70 para a circulação sanguínea (Fleshner *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005; Lancaster & Febbraio, 2002) assim como melhora das funções de macrófagos (Flierl *et al.*, 2009, Ortega *et al.*, 2005). Ao fazer uma correlação das concentrações de lactato e adrenalina sanguíneos, quanto maior a concentração de lactato maior é a concentração de catecolaminas (Podolin *et al.*, 1991; Mazzeo & Marshall, 1989), esta nos leva a sugerir uma alta concentração de adrenérgicos nas últimas intensidades de exercício físico de nosso estudo (de Vries *et al.*, 2000). Isto, portanto, explicaria os aumentos na concentração de HSP70 plasmática relacionados com as intensidades crescentes do exercício físico, porque as células apresentam receptores β -adrenérgicos que uma vez estimulados, provocam um influxo celular de cálcio e deslocamento dos exossomos para a periferia celular, os quais se fundem com a membrana plasmática e segregam seu conteúdo para o meio extracelular (Johnson & Fleshner, 2006). Entretanto, após o término de uma sessão de exercício físico, os níveis adrenérgicos diminuem e retornam aos níveis anteriores ao exercício físico (de Vries *et al.*, 2000; van Aggel-Leijssen *et al.*, 2001) parecendo que o estímulo hormonal não é o responsável pela manutenção na elevação dos níveis de HSP70 após 12 h do término do esforço físico,

podendo ser um outro parâmetro como, por exemplo, estresse oxidativo (Marini *et al.*, 1996; Calabrese *et al.*, 2001; Wallen *et al.*, 1997), necrose celular (Asea, 2007b), dentre outros.

Funções características do macrófago como fagocitose e atividade microbicida são influenciadas pela presença de adrenérgicos ou HSP70 ou a associação de ambas, o exercício físico (Kovalchin *et al.*, 2006; Sugiura *et al.*, 2001; Rincón *et al.*, 2001). Não sendo diferente, nosso estudo demonstrou que, conforme a intensidade do exercício aumentava, maior era a presença de HSP70 plasmática e conseqüentemente mais intensa tornava-se a fagocitose do monócito/macrófago, tanto em uma maior quantidade de células fagocitando partículas, quanto uma elevação no número de partículas engolfadas. Interessantemente, o exercício apresentou um caráter fagocitário correlacionado com a presença de HSP70 plasmática, pois após 12 h do término da sessão de exercício físico, há aumentos crescentes de acordo com a intensidade do exercício físico tanto na HSP70 plasmática quanto na avidéz dos macrófagos em fagocitar três ou mais partículas oferecidas e uma queda no grupo mais intenso também nestas duas variáveis, não concebendo a possibilidade da presença de catecolaminas, já que estas retornam rapidamente aos seus níveis de repouso (de Vries *et al.*, 2000; van Aggel-Leijssen *et al.*, 2001). A fagocitose induzida pela HSP70 ocorre via ligação ao receptor TLR2, TLR4 e TLR-7, que estão associados ao microdomínio lipídico na membrana plasmática do macrófago, desencadeando cascatas via inositol trifosfato e MAP quinase p38, promovendo alterações nas membranas, rearranjando o citoesqueleto e fagocitando diversas substâncias (Wang *et al.*, 2006).

Macrófagos apresentam uma forte atividade microbicida e bactericida via dismutação do radical superóxido pela superóxido dismutase formando peróxido de hidrogênio. Imediatamente após o término do esforço físico, a produção deste oxidante apresentou-se diminuída conforme aumentava a intensidade do exercício. Mesmo após 12 h do esforço físico, os grupos que realizaram exercício físico até a intensidade moderada apresentavam alguma produção deste oxidante, ao contrário de intensidades mais exaustivas que não apresentavam produção de peróxido de hidrogênio provavelmente, pelas células ainda estarem recuperando-se do estresse a qual foram submetidas. Entretanto, nossos resultados são contrários em relação aos apresentados pela literatura.

O gás óxido nítrico produzido pelo macrófago sofre diversas reações, que culminam com a produção de nitritos, cuja ação caracteriza-se por ser fortemente

bactericida/microbicida. Imediatamente após a sessão de exercício físico, a produção de nitritos pelos macrófagos dos diferentes grupos testados não apresentou diferenças significativas entre si, conforme o esperado, pois para uma maior produção deste radical deve ocorrer a estimulação de sua enzima promotora, a sintase óxido nítrico induzível (iNOS). Entretanto, o tempo de recuperação do exercício no desenho experimental de 12 h foi suficiente para a transcrição do gene desta enzima e dessa forma, posterior produção de nitritos. A ativação desta enzima ocorre somente via ativação do NF- κ B que é estimulado pelo contato da eHSP70 com os TLR 2 e 4 (Srivastava, 2002), a qual interessantemente apresenta-se aumentada no plasma do grupo 6% e diminuída no grupo 8%, ou seja, estando altamente correlacionada com a produção de nitritos. Além disso, para que a produção de nitritos ocorra é necessário que a concentração intracelular de HSP70 em monócitos circulantes esteja diminuída, conforme demonstrado nos grupos mais intensos (6 e 8%), ou seja, há pouca HSP70 para promover citoproteção e inativação do NF- κ B, permitindo então nesses grupos a ativação desta via e produção final de nitritos.

Exercícios intensos são conhecidos por provocarem dano oxidativo em DNA, membranas celulares e oxidação de diversas moléculas biológicas (Berzosa *et al.*, 2011; Sureda *et al.*, 2005), provocando modificações estruturais e funcionais (Berzosa *et al.*, 2011). Em nosso estudo, essa resposta foi considerada tardia por uma das técnicas utilizadas para avaliarmos esse dano oxidativo (uma largamente utilizada, mas pouco específica e outra menos conhecida e mais específica, que não detectou dano oxidativo nas duas situações temporais). Através da concentração de malondialdeído no soro desses animais, observamos que este parâmetro modificou-se somente após um longo período do término da execução do exercício físico, com alterações mais significativas no grupo mais exaustivo, o 8%. Provavelmente, em virtude da diminuição no conteúdo intracelular de HSP70 (citoproteção), diminuição das defesas antioxidantes e da produção de radicais livres (que por sua vez provocaram aumentos nos conteúdos de malondialdeído e ligações tiol de proteínas no soro) (Broome *et al.*, 2006; Smolka *et al.*, 2000) caracterizando-se por apresentar estresse oxidativo em relação aos demais grupos.

Outros parâmetros avaliados foram os níveis de GSH, GSSG e relação GSSG/GSH de eritrócitos. Tanto imediatamente após, como 12 h depois da sessão de exercício físico, somente os grupos 6% e 8% demonstraram um alto estado sistêmico pró-inflamatório que se manteve de forma mais atenuada após um longo período de término do esforço físico,

confirmando dados de nosso estudo anterior de que a realização de um exercício físico de intensidade moderada não apresentava um estado pró-oxidante (Silveira *et al.*, 2007). Como GSH e GSSG atuam diretamente no controle do estado redox celular, não é difícil entender que a HSP70 também possa influenciar suas concentrações e enzimas (glutathion redutase e peroxidase) (Guo *et al.*, 2007; Filomeni *et al.*, 2005), como faz no controle da produção de malondialdeído e ligações tiol de proteínas. Portanto, nos grupos mais intensos 6% e 8% do exercício físico encontramos um alto índice redox imediatamente após o exercício, que se mantém após as 12 h com discreta redução.

Na verdade, o organismo frente a um estresse extremo tem que decidir em relação à sua proteção ou alerta para o sistema imunológico, optando pelo aviso deste para incrementar ou ativar sua defesa. Portanto, a partir dos parâmetros avaliados neste estudo, concordamos com a extensa literatura sobre exercício físico e imunidade, optando pela intensidade moderada (Silveira *et al.*, 2007; Mooren *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2004), à qual pode ativar o sistema imunológico através de funções chaves dos monócitos (fagocitose/produção de peróxido de hidrogênio/produção de nitritos), citoproteção e alerta ao sistema imunológico geral através da liberação de HSP70 para o plasma, promovendo a adaptação e incremento nesta função à longo prazo, sem provocar estresse oxidativo local e sistêmico, favorecendo as defesas antioxidantes celulares.

CONCLUSÃO

- 1) É possível que monócitos/macrófagos sejam responsáveis por parte da HSP70 exportada para o meio extracelular em cargas intensas de exercício físico, é uma observação por enquanto inédita na literatura científica, podendo estar relacionada à sinalização autócrina do macrófago para estimular suas funções fagocítica, microbicida e liberação de citocinas anti- e pró-inflamatórias;
- 2) Exercício físico de intensidade moderada aumenta as funções do monócito/macrófago sem causar dano ao organismo, como estresse oxidativo e diminuição das capacidades antioxidantes, incrementando a resposta imunológica perante o estresse imposto;
- 3) Por outro lado, uma única sessão de exercício realizado sob condições de intenso esforço físico alertam o sistema imunológico, porém, ao longo da recuperação após este estresse físico, há dano oxidativo e celular;
- 4) O exercício físico quando realizado de forma moderada, promove citoproteção do monócito e alerta imunológico via síntese de HSP70 intracelular e liberação desta mesma proteína para a circulação sanguínea, respectivamente;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amici, C; Rossi, A; Santoro, MG. Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response. **Cancer Res.** v. 55, n. 19, 4452-7, 1995.
- Anderson, ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.** v. 113, 548-55, 1985.
- Arab, K & Steghens, J-P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. **Anal. Biochem.** v. 325, 158-63, 2004.
- Asea, Alexander. Chaperokine-induced signal transduction pathways. **Exerc Immunol Rev.** v. 9, 25-33, 2003.
- Asea, Alexander. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. **Exerc Immunol Rev.** v. 11, 34-45, 2005.
- Asea, Alexander. HSP 72 release: mechanisms and methodologies. **Methods.** v. 43, 194-8, 2007a.
- Asea, Alexander. Mechanisms of HSP 72 release. **J. Biosci.** v. 32, 579-84, 2007b.
- Asea, Alexander; De Maio, Antonio. **Heat shock proteins: potent mediators of inflammation and immunity.** Holanda: Springer, 2007.
- Atamaniuk, J; Stuhlmeier, KM; Vidotto, C; Tschan, H; Dossenbach-Glaninger, A; Mueller, MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. **Eur J Appl Physiol.** v. 104, 711-7, 2008.
- Bangen, JM; Schade, FU; Flohé, SB. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communication.** v. 359, 709-15, 2007.
- Basu, S; Binder, RJ; Ramalingam, T; Srivastava, PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity.** v. 14, 303-13, 2001.
- Beere, Helen M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **Journal of Cell Science** v. 117, 2641-51, 2004.
- Belló-Klein, Adriane. **Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Estresse oxidativo e antioxidantes.** MARRONI NP. Canoas: ULBRA, 2002.
- Benschop, RJ; Rodriguez-Fenerhahn, M; Schedlowski, M. Catecholamine- induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. **Brain, behavior, and immunity.** v. 10, 77-91, 1996.
- Berzosa, C; Gómez-Trullén, E; Piedrafita, E; Cebrián, I; Martínez-Ballarín, E; Miana-Mena, FJ; Fuentes-Broto, L; García, JJ. Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. **Eur J Appl Physiol.** v. 111, 1127-33, 2011.

- Berwin, B; Hart, JP; Rice, S; Gass, C; Pizzo, SV; Post, SR; Nicchitta, CV. Scavenger receptor-A mediates Gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. **The EMBO Journal**. v. 22, n. 22, 6127-36, 2003.
- Bethke, K; Staib, F; Distler, M; Schmitt, V; Jonuleit, H; Enk, AH; Galle, PR; Heike, M. Different efficiency of HSP70 to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. **The Journal of Immunology**. v. 169, 6141-8, 2002.
- Beure, HM & Green, DR. Stress Management – HSP70 and the regulation of apoptosis. **Cell Biology**. v. 11, n. 4, 2001.
- Binder, RJ; Han, DK; Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. **Nature**. v. 1, n. 2, 151-5, 2000.
- Blake, MJ; Buckley, AR; LaVoi, KP; Bartlett T. Neural and endocrine mechanisms of cocaine-induced 70-kDa heat shock protein expression in aorta and adrenal gland. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 268, 522-9, 1994.
- Blake, MJ; Udelsman, R; Feulner, GJ; Norton, DD; Holbrook, NJ. Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 88, 9873-7, 1991.
- Böyum, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**. v. 97, 31-50, 1968.
- Bradford, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v. 72, 248-54, 1976.
- Breloer, M; Dorner, B; Moré, SH; Roderian, T; Fleischer, B; Von Bonin, A. Heat shock proteins as “danger signals”: eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. **Eur J Immunol**. v. 31, n. 7, 2051-9, 2001.
- Broome, CS; Kavani, AC; Palomero, J; Dillmann, WH; Mestril, R; Jackson, MJ; McArdle, A. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. **FASEB J**. v. 20, E855-60, 2006.
- Brown, ET; Umino, Y; Loi, T; Solessio, E; Barlow, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/B6 mice. **Visual Neuroscience**, v. 22, 615-8, 2005.
- Buege, JA; Aust, SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**. v. 52, 302-10, 1978.
- Büttner, P. Mosig, S; Lechtermann, A; Funke, H; Mooren, FC. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. **Journal Applied of Physiology**. v. 102, 26-36, 2007.
- Calabrese, V; Scapagnini, G; Catalano, C; Bates, TE; Geraci, D; Pennisi, G; Giuffrida, SAM. Regulation of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: role of vitamin E. **Int. J. Tissue React**. v. 23, 127-35, 2001.

- Calderwood, SK; Theriault, J; Gray, PJ; Gong J. Cell surface receptors for molecular chaperones. **Methods** v. 43, 199-206, 2007.
- Calini, V; Urani, C; Camatini, M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H10T1/2 cells and protects from DNA damage. **Toxicol In Vitro**. v. 17, n. 5-6, 561-6, 2003.
- Callahan, MK; Chaillot, D; Jacquin, C; Clark, PR. Differential acquisition of antigenic peptides by HSP70 and HSC70 under oxidative conditions. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 37, 33604-9, 2002.
- Campisi, J; Fleshner, M. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. **J Applied Physiol**. v. 94, 43-52, 2003.
- Campisi, J; Leem, TH; Greenwood, BN; Hansen, MK; Moraska, A; Higgins, K; Smith, TP; Fleshner, M. Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** v. 284, 520-30, 2003.
- Cases, N; Sureda, A; Maestre, I; Tauler, P; Aguiló, A; Córdova, A; Roche, E; Tur, JÁ; Pons, A. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. **Eur J Appl Physiol**. v. 98, n. 3, 263-9, 2006.
- Chen, H; Hsu, C; Lu, T; Wang, S; Yang, R. Heat shock pretreatment prevents cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. **Shock** v. 20, n. 3, 274-9, 2003.
- Chen, H; Kuo, H; Wang, S; Lu, T; Yang, R. *In vivo* heat shock protein assembles with septic liver NF- κ B /I- κ B complexes regulating NF- κ B activity. **Shock** v. 24,n. 3, 232-8, 2005.
- Chen, ZC; Wu, W-S, Lin M-T, Hsu, C-C. Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. **BMC Neuroscience**. v. 10,111-20, 2009.
- Clayton, A; Turkes, A; Navabi, H; Mason, MD; Tabi, Z. Induction of heat shock protein in β -cells exosome. **Journal of Cell Science**. v. 118, 3631-8, 2005.
- Connolly, PH; Caiozzo, VJ; Zaldivar, F; Nemet, D; Larson, J; Hung, S; Heck, JD; Hatfield, GW; Cooper, DM. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal Applied of Physiology**. v. 97, 1461-9, 2004.
- Costa Rosa, Luís FBP. Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. **eCAM**. v. 1, n.1, 63-70, 2004.
- Coyle, Edward F. Physical activity as a metabolic stressor. **Am J Clin Nutr**. v. 72, 512S-20S, 2000.
- Cvoro, A; Matić, G. Hyperthermic stress stimulates the association of both constitutive and inducible isoforms of 70 kDa heat shock protein with rat liver glucocorticoid receptor. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 34, n. 3, 279-285, 2002.

- De Vries, WR; Bernards, NTM; Rooji, MH; Koppeschaar, HPF. Dynamic exercise discloses different time-related responses in stress hormones. **Psychosomatic Medicine**. v. 62, 866-72, 2000.
- Ding, XZ; Fernandez-Prada, CM; Bhattacharjee, AK; Hoover, DL. Over-expression of HSP 70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. **Cytokine** v. 16, n. 6, 210-9, 2001.
- Ding, XZ; Smallridge, RC; Galloway, RJ; Kiang, JG. Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]$. **J. Investig. Med.** v. 44, 144-53, 1996.
- Doan, T; Melvold, R.; Viselli, S.; Waltenbaugh, C. **Imunologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- Draper, HH; Squires, EJ; Mahmoodi, H; Wu, J; Agarwal, S; Hadley, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free radical biology and medicine**. v. 15, 353-63, 1993.
- Elia, G; Santoro, MG. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukemia cells. **Biochemical Journal**. v. 300, 201-9, 1994.
- Febbraio, MA & Lancaster, IL. Mechanisms of stress-induced cellular HSP 72 release: Implications for exercise-induced increases in extracellular HSP 72. 2005.
- Febbraio, MA; Mesa, JL; Chung, J; Steensberg, A; Nielsen, HB; Krstrup, P; Ott, P; Secher, NH; Pedersen, BK. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 4, 390-6, 2004.
- Febbraio, MA; Ott, P; Nielsen, HB; Steensberg, A; Keller, C; Krstrup, P; Secher, NH; Pedersen, BK. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. **J Physiol** v. 544, 957-62, 2002a.
- Febbraio, MA; Steensberg, A; Walsh, R; Koukoulas, I van Hall, G; Saltin, B; Pedersen, BK. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. **J Physiol** v. 538, 911-7, 2002b.
- Fehrenbach, E; Niess, AM. Role of heat shock proteins in the exercise response. **Exerc Immunol Rev**. v. 5, 57-77, 1999.
- Fehrenbach, E; Niess, AM; Veith, R; Dickhuth, HH; Northoff, H. Changes of HSP72-expression in leukocytes are associated with adaptation to exercise under conditions of high environmental temperature. **J Leukoc Biol**. v. 69, n. 5, 747-54, 2001.
- Fehrenbach, E; Niess, AM; Voelker, K; Northoff, H; Mooren, FC. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. **Int J Sports Med**. v. 26, 552-7, 2005.
- Fehrenbach, E; Passek, F; Niess, AM; Pohla, H; Weinstock, C; Dickhuth, HH; Northoff, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 32, 592 – 600, 2000.

- Ferrandez MD, De la Fuente M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiol. Scand.** v. 166, 47-53, 1999.
- Fischer, N; Haug, M; Kwok, WW; Kolbacher, H; Wernet, D; Dannecker, GE; Holzer, U. Involvement of CD91 and scavenger receptors in HSP70-facilitated activation of human antigen-specific CD4⁺ memory T cells. **Eur J Immunol.** v. 40, 986-97, 2010.
- Filomeni, G; Aquilano, K; Rotilio, G; Ciriolo, MR. Antiapoptotic response to induced glutathione depletion involvement of HSP and NFκB activation. **Antioxidants and Redox Signaling.** v. 7, n. 3-4, 446-55, 2005.
- Fleshner, M; Campisi, J; Amiri, L; Diamond, DM. Cat exposure induces both intra e extracellular HSP72: the role of adrenal hormones. **Psychoneuroendocrinology** v. 29, 1142-52, 2003.
- Fleshner, M; Johnson, JD. Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: releasing signal(s) and function. **Int J Hyperthermia.** v. 21, n. 5, 457-71, 2005.
- Flierl, MA; Rittirsch, D; Nadeau, BA; Sarma, JV; Day, DE; Lentsch, AB; Huber-Lang, MS; Ward, PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. **PlosOne.** v. 4, n. 2, e4414, 2009.
- Goldim, José Roberto. **Pesquisa em Saúde: Leis Normas e Diretrizes.** Porto Alegre: HCPA, 1995.
- Gonzalez, B & Manso, R. Induction, modification and accumulation of HSP70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. **J Physiol** v. 556, 369-85, 2004.
- Guo, S; Wharton, W; Moseley, P; Shi, H. HSP70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. **Cell Stress and Chaperones.** v. 12, n. 3, 245-54, 2007.
- Gutierrez, LLP ; Maslinkiewicz, A ; Curi, R ; de Bittencourt Jr, PIH. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. **Bioch Pharmacol.** v. 75, 2245-62, 2008.
- Guyton, Arthur C. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- Harri, M; Kuusela, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand.** v. 126, n. 2, 189-97, 1986.
- Hartl FU & Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science.** 295, 5561, 1852-8, 2002.
- Harkins, MS. Exercises regulates heat shock protein and nitric oxide. **Exerc Sport Sci Rev.** v. 37, n. 2, 73-7, 2009.
- Hasegawa, A ; Iwasaka, H ; Hagiwara, S ; Noguchi, T. Relationship between HMGB1 and tissue protective effects of HSP72 in a LPS-induced systemic inflammation model. **J Surg Res.** 2009.

- Heck, TG; Schöler, CM, de Bittencourt, PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signaling factor from immune system to the brain? **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 3, 215-26, 2011.
- Heimbach, JK; Reznikov, LL; Calkins, CM; Robinson, TN; Dinarello, CA; Harken, AH; Meng, X. TNF receptor I is required for induction of macrophage heat shock protein 70. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 281, 241-7, 2001.
- Henderson, B & Henderson, S. Unfolding the relationship between secreted molecular chaperones and macrophage activation states. **Cell Stress and Chaperones**. v. 14, 329-41, 2009.
- Heneka, MT; Gavriilyuk, V; Landreth, GE; O'Banion, MK; Weinberg, G; Feinstein, DL. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression. **J. Neurochem**. v. 85, 387-98, 2003.
- Hishikawa,T; Cheung, JY; Yelamarty, RV; Knutson, DW. Calcium transients during Fc Receptor-mediated and nonspecific phagocytosis by murine peritoneal macrophages. **The Journal of Cell Biology**. v. 115, 59-66, 1991.
- Homem de Bittencourt Jr, PI & Curi, R. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS-X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. **Bioch Pharmacol** . v. 62, 811-9, 2001.
- Hunter-Lavin, C; Davies, EL; Bacelar, MM; Marshall, MJ; Andrew, SM; Williams JH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochem Biophys Res Commun** v. 324, 511-7, 2004.
- Ianaro, A; Ialenti, A; Maffia, P; Meglio, P; Rosa, M; Santoro, MG. Anti-inflammatory activity of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ and 2-Cyclopenten-1-one: role of the heat shock response. **Mol Pharmacol**. v. 64, 85-93, 2003.
- Ireland, HE; Leoni, F; Altaie, O; Birch, CS; Coleman, RC; Hunter-Lavin, C; Williams JH. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. **Methods**. v. 43, 176-83, 2007.
- Jiang, Z-Y; Woollard, ACS; Wolff, SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. v. 26, 853-6, 1991.
- Ji, Li Li. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **P.B.E.B.M**. v. 222, 283-92, 1999.
- Johnson, D; Oppermann, H; Jackson, J; Levinson, W. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. **J. Biol. Chem**. v. 255, 6975-80, 1980.
- Johnson, JD & Fleshner, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **J Leukoc Biol** v. 79, 425-34, 2006.
- Karpuzoglu, E & Ahmed, SA. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide**. v. 15, n. 3, 177-86, 2006.

- Kiang, JG & Tsokos, GC. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacol. Ther.** v. 80, n. 2, 183–201, 1998.
- King YT, Lin CS, Lin JH, Lee WC. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of heat shock protein 70 in mice. **J Exp Biol.** v. 205, (Pt 2), 273-278, 2002.
- Kizaki, T; Takemasa, T; Sakurai, T; Izawa, T; Hanawa, T; Kamiya, S; Haga, S; Imaizumi, K; Ohno, H. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 372, 152-6, 2008.
- Kolberg, A; Rosa, TG; Puhl, MT; Scola, G; Janner, DR; Maslinkiewicz, A; Lagranha, DJ; Heck, TG; Curi, R; de Bittencourt Jr PIH. Low expression of *MRP1/GS-X* pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. **Cell Biochemistry and Function.** v. 24, 23-39, 2006.
- Kovalchin, JT; Wang, R; Wagh, MS; Azoulay, J; Sanders, M; Chandawarkar, RY. *In vivo* delivery of HSP 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. **Wound Rep Reg.** v. 14, 129-37, 2006.
- Kraemer, WJ; Rogol, AD. **The Endocrine System in Sports and Exercise.** Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
- Krammer, PH; Arnold, R; Lavrik, I. Life and death in peripheral T cells. **Nature reviews.** v. 7, 532-42, 2007.
- Krause, MS & de Bittencourt Jr, PIH. Type 1 diabetes: can exercise impair the autoimmune event? The L-arginine/glutamine coupling hypothesis. **Cell Biochem Funct.** v. 26, 1-28, 2008.
- Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner M, Henricksen E, Musch TI, O'Leary DS, Parks CM, Poole DC, Ra'anan AW, Sheriff DD, Sturek MS & Toth LA (2006). **Resource Book for the Animal Exercise Protocols.** American physiological Society.
- Kregel KC, Moseley PL. Differential effects of exercise and heat stress on liver HSP70 accumulation with aging. **J Appl Physiol.** v. 80, n. 2, 547-551, 1996.
- Krepuska, M; Szeberin, Z; S6tonvi, P; Sarkadi, H; Feh6rv6ri, M; Apor, A; Rimely, E; Proh6szka, Z; Acs6dy, G. Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification. **Cell Stress Chaperones.** v. 16, n. 3, 257-65, 2011.
- Krishna, SB; Alfonso, LF; Thekkumkara, TJ; Abbruscato, TJ; Bhat, GJ. Angiotensin II induces phosphorylation of glucose-regulated protein-75 in WB rat liver cells. **Arch Biochem Biophys.** 457, 1, 16-28, 2007.
- Kr6ger, K; Frost, S; Most, E; V6lker, K; Pallauf, J; Mooren, FC. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and fas-dependent signaling pathways. **Am J Physiol.** v. 296, 1518-27, 2009.
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature.** v. 227, 680-5, 1970.

- Lancaster, GI & Febbraio, MA. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. **Exerc Immunol Rev.** v. 11, 46-52, 2005.
- Lavin-Hunter, C; Davies, EL; Bacelar, MMFVG; Marshall, MJ; Andrew, SM; Willians, JHH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and biophysical research communications.** v. 324, 551-7, 2004.
- Leandro, CG; Castro, RM; Nascimento, E; Pithon-Curi, TC; Curi, R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esp.** v. 13, n. 5, 343-8, 2007.
- Levinson, W; Oppermann, H; Jackson J. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 606, 170-80, 1980.
- Li, CY; Lee, JS; Ko, YG; Kim, JI; Seo, JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. **J Biol Chem.** v. 275, 25665-71, 2000.
- Li, GC & Laszlo, A. Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage. **J. Cell Physiol.** v. 122, 91-7, 1985.
- Llesuy, SF. Introducción y especies activas de oxígeno. In: **Estresse Oxidativo e Antioxidantes.** MARRONI NP. Canoas: ULBRA, 2002.
- Locke, M; Noble, EG; Tanguay, RM; Field, MR; Ianuzzo, SE; Ianuzzo, CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. **Am J Physiol** v. 268, C1387-94, 1995.
- Malm C, Nyberg P, Engström M, Sjödin B, Lenkei R, Ekblom B, Lundberg I. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. **Journal of Physiology.** v. 529, n. 1, 243-62, 2000.
- Maloyan, A & Horowitz, M. β -Adrenergic signaling and thyroid hormones affect HSP72 expression during heat acclimation. **J. Appl. Physiol.** v. 93, 107-15, 2002.
- Mambula, SS; Stevenson, MA; Ogawa, K; Calderwood, SK. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. **Methods.** v. 43, 168-75, 2007.
- Marini, M; Frabetti, F; Musiani, D; Franceschi, C. Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 70, 337-50, 1996.
- Mars, M; Govender, S; Weston, A; Naicker, V; Chuturgoon, A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 249, 366-70, 1998.
- Matz, JM; LaVoi, KP; Blake, MJ. Adrenergic regulation of the heat shock response in brown adipose tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 227, 1751-8, 1996a.
- Matz, JM; LaVoi, KP; Moen, RJ; Blake, MJ. Cold-induced heat shock protein expression in rat aorta and brown adipose tissue. **Physiol. Behav.** v. 60, 1369-74, 1996b.

- Mazzeo, RS; Marshall, P. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. **J Appl Physiol.** v. 67, n. 4, 1319-22, 1989.
- McArdle, WD; Katch, FI, Katch, VL. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- Meyer, TN & Silva, AL da. Resposta celular ao estresse. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 45, n. 2, 181-8, 1999.
- Mikami, T; Sumida, S; Ishibashi, Y; Ohta S. Endurance exercise training inhibits activity of plasma got and liver caspase-3 of rats exposed to stress by induction of HSP70. **J Appl Physiol.** v. 96, 1776-81, 2004.
- Milne, KJ & Noble, EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. **J Appl Physiol.** v. 93, 561-8, 2002.
- Mooren, FC; Blöming, D; Lechtermann, A; Lerch, MM; Völker, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **J Appl Physiol.** v. 93, 147-53, 2002.
- Moré, SH; Breloer, M; von Bonin, A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. **Int Immunol.** v. 23, n. 3, 130-5, 2001.
- Morimoto, RI & Santoro, MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature.** v. 16, 833-8, 1998.
- Moseley, Pope. Stress protein and the immune. **Immunopharmacology.** 48, 299-302, 2000.
- Murphy, EA; Davis, JM; Brown, MD; Carmichael, MD; Rooijen, NV; Ghaffar, A; Mayer, EP. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. **Am J Physiol Integr Comp Physiol.** v. 287, R1354-58, 2004.
- Muthu, K; Ding, J; Gamelli, R; Shankar, R; Jones, SB. Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. **Journal of Neuroimmunology.** v. 158, 50-7, 2005.
- Natale, VM; Brenner, IK; Moldoveanu, AI; Vasiliou, P; Shek, P; Shephard, RJ. Effects of three different types of exercise on blood leukocytes count during and following exercise. **Sao Paulo Med J.** v. 121, n. 1, 9-14, 2003.
- Nath, N; Chattopadhyay, M; Kodela, R; Tian, S; Vlismas, P; Boring, D; Crowell, JA; Kashfi, K. Modulation of stress genes expression profile by nitric oxide-releasing aspirin in Jurkat T leukemia cells. **Biochem Pharmacol.** v. 79, n. 12, 1759-71, 2010.
- Navarro, A; Gomez, C; López-Cepero, JM; Boveris, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 286, R505-11, 2004.
- Nieman, DC. Exercise Immunology: practical applications. **Int J Sports Med.** v. 18,1, S91-100, 1997.

- Niess, AM; Sommer, M; Schlotz, E; Northoff, H; Dickhuth, H-H; Fehrenbach, E. Expression of the iNOS in human leukocytes: responses to running exercise. **Medicine Science Sports Exercise**. v. 32, 7, 1220-5, 2000.
- Noble, EG; Milne, KJ; Melling, CWJ. Heat shock proteins and exercise: a primer. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 33, 1050-65, 2008.
- Ortega, E; Marchena, JM; García, JJ; Barriga, C; Rodríguez, AB. Norepinephrine as mediator in the stimulation of phagocytosis induced by moderate exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 2005; 93, 714-8.
- Ostrowski, K; Rohde, T; Aps, S; Schjerling, P; Pedersen, BK. Pro and antiinflammatory cytokine balance in strenuous exercise en humans. **Journal of Physiology**. v. 515, 287-91, 1999.
- Ostrowski, K; Schjerling, P; Pedersen, BK. Physical activity and plasma IL-6 in humans – effect of intensity of exercise. **Eur J Appl Physiol**. v. 83, 512-5, 2000.
- Padmini, E; Uthra, V; Lavanya, S. HSP70 overexpression in response to ureaplasma urealyticum-mediated oxidative stress in preeclamptic placenta. **Hypertens Pregnancy**. 2010.
- Pajwani, NN; Popova, L; Srivastava, PK. Heat shock protein Gp96 and HSP70 activate the release of nitric oxide by APCs. **Journal of Immunology**. v. 168, 2997-3003, 2002.
- Parham, Peter. **The Immune System**. New York: Garland Publishing, 2000.
- Paroo, Z & Noble, EG. Isoproterenol potentiates exercise-induction of hsp70 in cardiac and skeletal muscle. **Cell Stress Chaperones**. v. 4, 199-204, 1999.
- Peake, JM; Suzuki, K; Hordern, M; Wilson, G; Nosaka, K; Coonbes, JS. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. **European Journal Applied of Physiology**. v. 95, 514-21, 2005.
- Pedersen, BK & Febbraio, MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived IL-6. **Physiol. Rev.** v. 88, 1379-1406, 2008.
- Pedersen, BK & Toft, AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med**. v. 34,4, 246-51, 2000.
- Peres, CM & Curi, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- Pickel, E & Mitzel, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol.** v. 46, 211-26, 1981.
- Podolin, DA; Munger, PA; Mazzeo, RS. Plasma catecholamines and lactate response during graded exercise with varied glycogen conditions. **J Appl Physiol**. v. 71, n. 4, 1427-33, 1991.
- Radsak, MP; Hilf, N; Singh-Jasuja, H; Braedel, S; Brossart, P; Rammensee, H-G; Schild, H. The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. **Blood**. v. 101, 2810-5, 2003.

- Ravagnan, L.; Gurbuxani, S.; Susin, S.A.; Maise, C.; Daugas, E.; Zamzami, N.; Mak, T.; Jäättelä, M.; Penninger, J.M.; Garrido, C.; Kroemer, G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. **Nature Cell Biology**. v. 3, 839 – 843. 2001.
- Redaelli CA, Wagner M, Kulli C, Tian YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, Wagner AC, Schilling MK. Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors. **Transpl. Int.** v. 14, 351-360, 2001.
- Rhind SG, Gannon GA, Shek PN, Brenner IKM, Severs Y, Zamecnik J, Buguet A, Natale VM, Shephard RJ, Radomski, MW. Contribution of exertional hyperthermia to sympathoadrenal-mediated lymphocyte subset redistribution. **J. Appl. Physiol.** v. 87, n. 3, 1178–85, 1999.
- Rincón, EO; Marchena, JM; García, JJ; Schmidt, A; Schulz, T; Malpica, I; Rodríguez, AB; Barriga, C; Michna, H; Lötzerich, H. Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol. **J Appl. Physiol.** v. 91, 1067-72, 2001.
- Ritossa, Ferruccio. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**. v. 13, 571-3, 1962.
- Roit, I; Brostoff, J; Male, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 2003.
- Saha, JK; Xia, J; Grondin, JM; Engle, SK; Jakubowski, JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Exp Biol Med**. v. 230, 777-84, 2005.
- Santoro, MG; Garaci, E; Amici, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. **Proceedings of National Academic Science**. v. 86, 8407-11, 1989.
- Santoro, Maria Gabriella. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol**. v. 59, 55-63, 2000.
- Schell, MT; Spitzer, AL; Johnson, JA; Lee, D; Harris, HW. Heat Shock inhibits NFκB activations in a dose- and time-dependent manner. **Journal of Surgical Research**. v. 129, 90-3, 2005.
- Selkirk GA, McLellan TM, Wright HE, Rhind SG. Expression of intracellular cytokines, HSP72, and apoptosis in monocyte subsets during exertional heat stress in trained and untrained individuals. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 296, R575-R586, 2009.
- Shastry, S; Toft, DO; Joyner, MJ. HSP70 e HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. **American Physiology Society**. v. 175, 139-46, 2002.
- Silveira, EMS; Rodrigues, MF; Krause, MS; Vianna, DR; Almeida, BS; Rossato, JS; de Oliveira Jr., LP; Curi, R; de Bittencourt Jr., PIH. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-κB pathways. **Cell Biochem Function**. v. 24, 1-11, 2007.
- Silveira, LR; Denadai, BS. Efeito modulatório de diferentes intensidades de esforço sobre a via glicolítica durante o exercício contínuo e intermitente. **Revista Paulista de Educação Física**. v. 16, 186-97, 2002.

- Simar, D; Malatesta, D; Badiou, S; Dupuy, AM; Caillaud, C. Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60-90 years. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v. 62, 1413-9, 2007.
- Simar, D; Malatesta, D; Koechlin, C; Cristol, JP; Vendrell, JP; Caillaud, C. Effect of age on Hsp72 expression in leukocytes of healthy active people. **Exp Gerontol.** v. 39, n. 10, 1467-74, 2004.
- Singleton, KD; Serkova, N; Beckey, VE; Wischmeyer, PE. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. **Critical Care Medicine.** v. 33, n. 6, 1206-13, 2005.
- Smolka, MB; Zoppi, CC; Alves, AA; Silveira, LR; Marangoni, S; Pereira-Da-Silva, L; Novello, JC; Macedo, DV. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 279, R1539-45, 2000.
- Södergren, E; Nourooz-Zadeh, J; Berglund, L; Vessby, B. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **J Biochem Biophys Methods.** v. 7, 137-46, 1998.
- Söti, C; Nagy, E; Giricz, Z; Vigh, L; Csermely, P; Ferdinandy, P. Heat shock protein as emerging therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology.** v. 146, 769-80, 2005.
- Srivastava, Pramod. Roles of heat shock protein in innate and adaptive immunity. **Nature.** v. 2, 185-94, 2002.
- Starkie RL, Rolland J, Febbraio MA. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. **Am J Physiol Cell Physiol** v. 281, C1233-40, 2001.
- Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J App Physiol.** v. 90, 789-794, 2001.
- Sureda, A; Tauler, P; Aguiló, A; Cases, N; Fuentespina, E; Córdova, A; Tur, JÁ; Pons, A. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. **Free Radical Research.** v. 39, n. 12, 1317-24, 2005.
- Su S-H, Chen H-I, Jen CJ. Severe exercise enhances phagocytosis by murine bronchoalveolar macrophages. **J Leukoc. Biol.** v. 69, 75-80, 2001.
- Thomas G, Souil E, Richard MJ, Saunier B, Polla BS, Bachelet M. Hyperthermia assists survival of astrocytes from oxidative-mediated necrotic cell death. **Cell Mol. Biol.** v. 48, 191-198, 2002.
- Thompson, HS; Clarkson, PM; Scordilis, The repeated bout effect and HSP: intramuscular HSP72 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. **Acta Physiologica Scandinavica.** v. 174, 47-56, 2002.
- Tobian, AAR; Canaday, DH; Boom, H; Harding, CV. Bacterial HSP promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8⁺ T cells by

- cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophage. **The Journal of Immunology**. v. 172, 5277-86, 2004.
- Todryk, SM; Goughy, MJ; Pockleyz, AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. **Immunology**. v. 110, 1-9, 2003.
- Tsigos, C & Chrousos, GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**. v. 53, 865-71, 2002.
- Udono, H & Srivastava, PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. **J Exp Med**. v. 178, n. 4, 1391-6, 1993.
- Van Aggel-Leijssen, DPC; Saris, WHM; Hul, GB; van Baak, MA. Short-term effects of weight loss with or without low-intensity exercise training on fat metabolism in obese men. **Am J Clin Nutr**. v. 73, 523-31, 2001.
- Vega, VL; Rodríguez-Silva, M; Frey, T; Gehrman, M; Diaz, JC; Steinem, C; Multhoff, G; Arispe, N; De Maio, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 180, 4299-307, 2008.
- Vince, RN; Oliver, K; Midgley, AW; McNaughton, LR; Madden, LA. *In vitro* heat shock of human monocytes results in a proportional increase of inducible HSP70 expression according to the basal content. **Amino acids**. v. 38, n. 5, 1423-8, 2010.
- Wallen, ES; Buettner, GR; Moseley, PL. Oxidants differentially regulate the heat shock response. **Int. J. Hyperthermia**. v. 13, 517-24, 1997.
- Walsh, NP; Gleeson, M; Shephard, RJ; Woods, MGJA; Bishop, NC; Fleshner, M; Green, C; Pedersen, BK; Hoffman-Goetz, L; Rogers, CJ; Northoff, H; Abbasi, A; Simon, P. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exercise Immunology Review**. v. 17, 2011.
- Walsh, RC; Koukoulas, I; Garnham, A; Moseley, PL; Hargreaves, M; Febbraio, MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. **Cell Stress Chaperones**. v. 6, 386-93, 2001.
- Wang, R; Town, T; Gokarn, V; Flavell, RA; Chandawarkar, RY. HSP70 enhances macrophage phagocytosis by interaction with lipid raft-associated TLR-7 and upregulation p38 MAPK and PI3K pathways. **Journal of Surgical Research**. v. 136, 58-69, 2006.
- Wei, YJ; Huang, YX; Shen, Y; Cui, CJ; Zhang, XL; Zhang, H; Hu, SS. Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Mol Cell Biochem**. v. 332, n. 1-2, 103-11, 2009.
- Whitham, M & Fortes, MB. Effect of blood handling on extracellular HSP72 concentration after high-intensity exercise in humans. **Cell Stress and Chaperones**. v.11, n. 4, 304-8, 2006.

- Whitham, M; Halson, SL; Lancaster, GI; Gleeson, M; Jeukendrup, AE; Blannin, AK. Leukocyte heat shock protein expression before and after intensified training. **Int J Sports Med.** v. 25, 522-7, 2004.
- Whitham, M; Laing, SJ; Jackson, A; Maossen, N; Walsh, NP. Effect of exercise with and without a thermal clamp on the plasma HSP72 response. **Journal Applied Physiology.** v. 103, 1251-6, 2007.
- Woods, J; Ceddia, MA; Lowder, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology and Cell Biology.** v. 78, 545-53, 2000.
- Yano H, Kinoshitaz S, Kira S. Effects of acute moderate exercise on the phagocytosis of Kupffer cells in rats. **Acta Physiol. Scand.** v. 182, 151-160, 2004.
- Yu, Y; Szczepek, AJ; Haupt, H; Mazurek, B. Geldanamycin induces production of heat shock protein 70 and partially attenuates ototoxicity caused by gentamicin in the organ of Corti explants. **J Biomed Sci.** v. 2, n. 16,79, 2009.
- Zaldivar, F; Wang-Rodrigues, J; Nemet, D; Schwindt, C; Gallasetti, P; Mills, PJ; Wilson, LD; Cooper, DM. Constitutive pro and anti-inflammatory cytokines and growth factor response to exercise in leukocytes. **Journal Applied of Physiology.** v. 100, 1124-33, 2006.

