Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Educação e Humanidades
Instituto de Educação Física e Desportos

Thiago Teixeira Guimarães

Treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos e infecção de camundongos Balb/c por *Leishmania major*

Rio de Janeiro
2019

Thiago Teixeira Guimarães

Treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos e infecção de camundongos Balb/c por *Leishmania major*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Exercício e do Esporte da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Aspectos Biopsicossociais do Exercício Físico.

Orientadora: Prof[a]. Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CEH/B

G963 Guimarães, Thiago Teixeira.
Treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos e infecção de camundongos Balb/c por Leishmania major/ Thiago Teixeira Guimarães. – 2019.
122 f.: il.

Orientadora: Patrícia Maria Lourenço Dutra.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Educação Física e Desportos.

1. Treino aeróbico – Teses. 2. Sistema imunológico– Teses. 3. Macrófagos – Teses. 4. Leishmania major – Teses. 5. Natação – Teses. I.Dutra, Patrícia Maria Lourenço. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Educação Física e Desportos. III. Título.

CDU 796.015.572: 616-097

Bibliotecária: Mirna Lindenbaum. CRB7 4916

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____
Assinatura Data

Thiago Teixeira Guimarães

Treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos e infecção de camundongos Balb/c por *Leishmania major*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Exercício e do Esporte da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Aspectos Biopsicossociais do Exercício Físico.

Aprovada em 02 de outubro de 2019.

Banca Examinadora:

_____
Prof[a]. Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médica – UERJ

_____
Prof[a]. Dra. Juliana Pereira Borges
Instituto de Educação Física e Desportos – UERJ

_____
Prof. Dr. Ricardo Brandão de Oliveira
Instituto de Educação Física e Desportos – UERJ

_____
Prof[a]. Dra. Alda Maria da Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

_____
Prof[a]. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva
Faculdade de Ciências Médica – UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico cada palavra desta tese à minha mãe Fatima, ao meu pai Soria e à minha avó Alice (*in memoriam*). Sinto-me honrado pela oportunidade divina de retribuir a dedicação e o acolhimento que sempre conferiram aos seus pacientes, amigos e/ou familiares, sobretudo à minha irmã Paola e a mim. A luz de vocês é sobrenatural, transformadora e jamais se apagará.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grato a Deus por cada anjo que cruzou meu caminho trazendo luz e abrindo portas, além de cada demônio que tentou me confundir e perturbar, levando-me a aprimorar o melhor antídoto contra a hipocrisia, soberba, vaidade e infelicidade: o amor.

Segundo Hipócrates, Platão e Aristóteles, qualquer exagero no treinamento pode se voltar contra a natureza humana *(Evangelos Albandis*, *2013).*

RESUMO

GUIMARÃES, Thiago Teixeira. *Treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos e infecção de camundongos Balb/c por Leishmania major*. 2019. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências do Exercício e do Esporte) - Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Introdução: A inatividade física é uma das principais causas atribuídas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, cargas extenuantes de exercício podem provocar imunossupressão celular, prejudicando o desempenho e a saúde. **Objetivo**: Investigar o efeito do treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos infectados com *Leishmania major in vitro* e no desenvolvimento da infecção no modelo *in vivo* com camundongos Balb/c. **Métodos**: A amostra total consistiu de 89 camundongos BALB/c machos jovens, com seis semanas de idade em média. Dois experimentos semelhantes com infecção *in vitro* foram realizados com 71 camundongos. Um terceiro experimento com infecção *in vivo* foi realizado com 18 camundongos. Os 71 camundongos dos experimentos *in vitro* foram divididos em cinco grupos experimentais: controle sedentário (SED), baixo volume (BV), médio volume (MV), alto volume (AV) e muito alto volume (MAV). Com exceção do SED, os demais grupos foram submetidos a 10 semanas de treinamento de natação, variando a carga de zero a 3,5% da massa corporal, duração de 20 a 120 minutos por sessão e frequência de duas a cinco vezes por semana. O grupo polimento (POL) foi constituído ao final da décima semana de treinamento a partir do grupo MAV. O descanso ativo neste grupo teve a duração de duas semanas, onde a frequência, duração e intensidade das sessões foram reduzidas. O teste de capacidade física foi realizado antes, no meio e ao final do período de 10 semanas de treinamento, assim como ao final do período de polimento para o grupo POL. Após a eutanásia, macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal e mantidos *in vitro* na presença de promastigotas de *Leishmania major*. Foram mensurados os níveis das citocinas TNF, MCP-1, IL-10 e IL-6 nos sobrenadantes de células cultivadas em macrófagos, além do fator de infecção. Os 18 camundongos do treinamento com infecção *in vivo* foram divididos em três grupos experimentais: controle sedentário (n=5), alto volume (n=7) e alto volume não periodizado (n=6). O período de treinamento de natação teve a duração total de 12 semanas. Foram analisadas as seguintes variáveis: produção de óxido nítrico, desenvolvimento da lesão, resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), carga parasitária e peso dos linfonodos. **Resultados**: Nos experimentos *in vitro*, o teste de capacidade física após cinco semanas revelou o melhor desempenho para o grupo MAV ($P<0,01$). Entretanto, ao final das 10 semanas, não houve diferença estatística entre os grupos MAV, MV e AV, além de que o grupo POL piorou o desempenho em relação ao grupo MAV ($P=0,011$). O grupo MV apresentou o menor índice de infecção na condição sem LPS ($P<0,01$), enquanto o grupo MAV, na condição com LPS, exibiu o maior índice de infecção ($P<0,001$) quando comparados aos demais. O padrão nas concentrações de citocinas obtidas *in vitro* sugere um perfil predominante da resposta celular no grupo MV. No experimento *in vivo*, o treinamento de alto volume provocou uma maior vulnerabilidade à infecção por *L. Major*. **Conclusão**: O treinamento aeróbio de muito alto volume e a inatividade física aumentam a suscetibilidade de infecções em macrófagos, além de que a distribuição moderada das cargas de treinamento promove o equilíbrio imunológico e desempenho.

Palavras-Chave: Sistema imunológico. *Overtraining. Ovearreaching. Leishmania major*. Natação.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Thiago Teixeira. *Aerobic training at different volumes in modulation of macrophage function and in vivo infection of Balb/c mice by Leishmania major*. 2019. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências do Exercício e do Esporte) - Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Introduction: Physical inactivity is one of the main causes attributed to the development of chronic noncommunicable diseases. However, strenuous exercise loads can develop cellular immunosuppression, impairing performance and health. **Aim**: To investigate the effect of aerobic training at different volumes on the modulation of function of macrophages function infected *in vitro* with *Leishmania major* and on the development of infection in the Balb/c *in vivo* model. **Methods**: The total sample consisted of 89 young male BALB/c mice, with an average age of six weeks. Two similar experiments with *in vitro* infection were performed with 71 mice. A third experiment with *in vivo* infection was performed with 18 mice. The 71 mice from the *in vitro* experiments were divided into five experimental groups: sedentary control (SED), low volume (BV), medium volume (MV), high volume (AV) and very high volume (MAV). With the exception of SED, the other groups underwent 10 weeks of swimming training, ranging in intensity from zero to 3.5% of body mass, duration of 20 to 120 minutes per session and frequency of two to five times a week. The tapering group (POL) was formed at the end of the tenth week of training from the MAV group. Active rest in this group lasted two weeks, in which the frequency, duration and intensity of the sessions were reduced. The physical capacity test was performed before, in the middle and at the end of the 10 week training period, as well at the end of the tapering period for the POL group. After euthanasia, macrophages were obtained by peritoneal wash and maintained in the presence of *Leishmania major* promastigotes *in vitro*. The levels of cytokines TNF, MCP-1, IL-10 and IL-6 were measured in macrophage cultured cell supernatants, besides the infection index. The 18 training mice with in vivo infection were divided into three experimental groups: sedentary control (n=5), high volume (n=7) and high non-periodized volume (n=6). The swimming training period had a total duration of 12 weeks. The following variables were analyzed: nitric oxide production, lesion development, late hypersensitivity response (DTH), parasitic load and lymph node weight. **Results**: In the *in vitro* experiments, the physical capacity test after five weeks revealed the best performance for the MAV group ($P<0.01$). However, at the end of 10 weeks, there was no statistical difference between the MAV, MV and AV groups, besides that the POL group worsened the performance compared to the MAV group ($P=0.011$). The MV group presented the lowest infection rate in the condition without LPS ($P <0.01$), while the MAV group presented the highest infection rate ($P<0.001$) when compared to the others. The standard of in vitro cytokine concentrations suggests a predominant profile of cellular response in the MV group. In the *in vivo* experiment, high volume training caused a greater vulnerability to *L. Major* infection. **Conclusion**: Very high-volume aerobic training and physical inactivity increase the susceptibility of macrophage infections, and the moderate distribution of training loads promotes immune balance and performance.

Keywords: Immune system. Overtraining. Ovearreaching. Leishmania major. Swimming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 – Desenho experimental 46

Tabela 1 – Distribuição das cargas de treinamento no grupo BV..... 44

Tabela 2 – Distribuição das cargas de treinamento no grupo MV..... 44

Tabela 3 – Distribuição das cargas de treinamento no grupo AV..... 45

Tabela 4 – Distribuição das cargas de treinamento no grupo MAV..... 45

Tabela 5 – Distribuição das cargas de treinamento (modelo *in vivo*) AVi..... 47

Tabela 6 – Distribuição das cargas de treinamento (modelo *in vivo*) AViNP..... 47

Tabela 7 – Consumo alimentar semanal 55

Tabela 8 – Massa corporal semanal 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Testes de capacidade física 1, 2 e 3 59

Figura 2 – Testes de capacidade física 3 (MAV) e 4 (POL) 60

Figura 3 – Fatores de infecção 61

Figura 4 – Produção de óxido nítrico 62

Figura 5 – Citocina TNF 63

Figura 6 – Quimiocina MCP-1 64

Figura 7 – Citocina IL-6 65

Figura 8 – Citocina IL-10 66

Figura 9 – Razão TNF/IL-10 67

Figura 10 – Desenvolvimento da infecção *in vivo* 68

Figura 11 – Resposta DTH 69

Figura 12 – Carga parasitária 71

Figura 13 – Visceralização da infecção 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CBA	*Cytometric Bead Array*
DAMPs	*Damage-associated molecular pattern*
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio de cultura)
EGF	Fator de crescimento endotelial
Grupo AV	Alto volume de treinamento (grupo experimental)
Grupo BV	Baixo volume de treinamento (grupo experimental)
Grupo MAV	Muito alto volume de treinamento (grupo experimental)
Grupo MV	Médio volume de treinamento (grupo experimental)
Grupo POL	Polimento (grupo experimental)
Grupo SED	Grupo controle sedentário
HSPs	*Heat shock protein*
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A (anticorpo)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL	Interleucina (citocina)
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M1	Macrófagos 1
M2	Macrófagos 2
MC	Massa corporal
MCP-1	Citocina quimiotática de monócitos 1
NK	*Natural killers*
NO	Óxido nítrico
$O2^-$	Ânion superóxido
PAMPs	*Pathogen-associated molecular pattern*
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PRRs	Receptores de repetição de padrões

RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
T $CD4^+$	Linfócito T auxiliar
T $CD8^+$	Linfócito T citotóxico
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta
Th0	Linfócito T auxiliar imaturo
Th1	Linfócito T auxiliar Tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar Tipo 2
TLRs	*Toll-like receptors*
TLRs	*Toll-like receptor*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular
$VO_{2\ pico}$	Consumo de oxigênio pico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 15

1 **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA** 17

1.1 **Supertreinamento** 17

1.2 **Prevalência** 20

1.3 **Resposta imune** 23

1.3.1 Resposta imune inata 25

1.3.2 Resposta imune adaptativa 28

1.4 **Excesso de exercício e resposta imune** 32

1.5 **Leishmaniose** 36

1.5.1 Resposta imune à leishmaniose 37

1.6 **Justificativa e relevância** 38

1.7 **Hipóteses** 39

2 **OBJETIVOS** 41

3 **MÉTODOS** 42

3.1 **Amostra** 42

3.2 **Adaptação ao treinamento e teste de capacidade física** 42

3.3 **Desenho experimental e protocolos de treinamento *in vitro*** 43

3.4 **Desenho experimental e protocolos de treinamento *in vivo*** 46

3.5 **Consumo alimentar** 48

3.6 **Avaliação da massa corporal** 48

3.7 **Microrganismos** 48

3.8 **Manutenção da infecção *in vivo*** 48

3.9 **Modelo de infecção com *L. major in vivo*** 49

3.10 **Eutanásia** 49

3.11 **Obtenção de macrófagos peritoneais e infecção com *L. Major*** 49

3.12 **Dosagem de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos** 50

3.13 **Quantificação da carga parasitária na pata infectada e em linfonodos poplíteos** 50

3.14 **Obtenção de células do baço** 51

3.15 **Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA)** 52

3.16 **Análise estatística** 52

4 **RESULTADOS** 54

4.1 **Morte experimental** 54

4.2 **Consumo alimentar e massa corporal** 54

4.3 **Capacidade física** 58

4.4 **Efeito do exercício físico na infecção de macrófagos por *L. majorin*** .. 60

4.5 **Efeito do exercício físico na produção de óxido nítrico por macrófagos** 62

4.6 **Efeito do exercício físico na produção de citocinas por macrófagos** .. 62

4.7 **Efeito do treinamento com infecção *in vivo* no desenvolvimento da infecção de camundongos Balb/c por *L. major*** 67

5 **DISCUSSÃO** 74

CONCLUSÃO 88

REFERÊNCIAS 89

APÊNDICE A – Trabalho premiado: XI Congresso Sul-Americano de Medicina do Esporte (2019) 98

APÊNDICE B – Revisão publicada na Revista Motricidade (2017) 100

APÊNDICE C – Resumo publicado: XVII SIAFIS (2016)..... 111

APÊNDICE D – Liga Acadêmica de Medicina Esportiva da UERJ 112

ANEXO A – Fases da resposta imune a uma infecção inicial 113

ANEXO B – Componentes do sistema imune inato 114

ANEXO C – Receptores de reconhecimento do sistema imune inato 115

ANEXO D – Receptores de reconhecimento em macrófagos 116

ANEXO E – Sumário da polarização de macrófagos 117

ANEXO F – Polarização de macrófagos 118

ANEXO G – Diferenciação de células $TCD4^+$ 119

ANEXO H – Células $TCD4^+$ sob diferentes estímulos 120

ANEXO I – Ciclo de vida da *Leishmania sp*. 121

ANEXO J – Resposta imune à LTA 122

INTRODUÇÃO

O engajamento em programas de exercícios físicos regulares e adequadamente orientados é reconhecido como determinante para a promoção e manutenção de saúde e qualidade de vida (FIUZA-LUCES; GARATACHEA; BERGER; LUCIA, 2013; HEINONEN; KALLIOKOSKI; HANNUKAINEN; DUNCKER *et al.*, 2014). Nos últimos anos, estudos vêm demonstrando que um estilo de vida moderadamente ativo está associado à promoção da saúde e à prevenção de doenças (FIUZA-LUCES; GARATACHEA; BERGER; LUCIA, 2013; HALLAL; ANDERSEN; BULL; GUTHOLD *et al.*, 2012; HEINONEN; KALLIOKOSKI; HANNUKAINEN; DUNCKER *et al.*, 2014). Pessoas que praticam exercício físico por no mínimo 30 minutos, cinco dias por semana, em intensidade moderada podem reduzir em 14% o surgimento de doença coronariana e em 20%, no caso de 300 minutos por semana (SATTELMAIR; PERTMAN; DING; KOHL *et al.*, 2011).

Embora a expectativa média de vida no mundo tenha aumentado, cada vez mais pessoas são acometidas por doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo, doenças cardiovasculares, diabetes, diversos tipos de câncer, transtornos mentais, dos ossos e das articulações (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008; LEE; SHIROMA; LOBELO; PUSKA *et al.*, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2014) (ORGANIZATION, 2014), além de causarem sofrimento, dependência funcional, gastos intangíveis nos sistemas de saúde e redução da qualidade de vida, essas doenças são responsáveis por 58,5% de todas as mortes ocorridas no mundo. No Brasil, constituem o problema de saúde de maior magnitude, correspondendo a 72% das causas de mortes e 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SAÚDE, 2011). A inatividade física figura como uma das principais causas atribuídas à mortalidade (HALLAL; ANDERSEN; BULL; GUTHOLD *et al.*, 2012).

Por outro lado, pessoas que se exercitam dez vezes acima de 150 minutos semanais em intensidade moderada ou acima de 75 minutos semanais em intensidade vigorosa apresentam o mesmo risco de morte em relação a pessoas pouco ativas fisicamente (AREM; MOORE; PATEL; HARTGE *et al.*, 2015). O exercício parece produzir benefícios à saúde em doses moderadas (AREM;

MOORE; PATEL; HARTGE *et al.*, 2015). Ainda que o esforço intenso seja capaz de aperfeiçoar o desempenho e a saúde (GOHIL; BROOKS, 2012; SOBRAL-MONTEIRO-JUNIOR; MAILLOT; GATICA-ROJAS; ÁVILA *et al.*, 2019), cargas extenuantes de estresse físico e mental podem os comprometer. Atletas amadores, profissionais ou de recreação são frequentemente acometidos por desordens de origem metabólica, imunológica, neurológica, endócrina, cardiovascular, muscular e esquelética (GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017; MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013).

A linha tênue entre prejuízos e benefícios de sucessivas sessões fatigantes de esforço não depende exclusivamente do entendimento de conceitos e princípios metodológicos do treinamento. O exercício físico pode apresentar uma relação paradoxal e sua prescrição consistente depende de uma melhor compreensão sobre seus mecanismos celulares (CADEGIANI; KATER, 2019; GUIMARÃES, 2016; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017). Neste sentido, a investigação sobre as adaptações do treinamento físico no sistema imunológico é um assunto promissor e pode contribuir com a elucidação de tais mecanismos.

1 **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

1.1 **Supertreinamento**

Desde anos antes de Cristo, especula-se que o excesso de exercício físico impacta negativamente no desempenho e saúde. Hipócrates, Platão e Aristóteles alertaram não apenas para as possíveis complicações deletérias da inatividade física, como também para a cultura da dor sem moderação, uma realidade observada desde a antiguidade (ALBANIDIS, 2013). Os antigos ideais gregos, incluindo os relacionados ao exercício e saúde, influenciaram a cultura ocidental moderna e desempenharam um papel importante na prática da higiene preventiva (ALBANIDIS, 2013; KLEISIARIS; SFAKIANAKIS; PAPATHANASIOU, 2014).

Passados alguns séculos, ainda não existe um consenso sobre a melhor forma de se definir e diagnosticar os sintomas e complicações da exaustão crônica provocada pelo excesso de estresse/exercício físico (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). *Overtraining*, síndrome do *overtraining*, *overreaching* (funcional e não funcional), síndrome inexplicável do baixo desempenho (*unexplained underperformance syndrome*) e síndrome de descondicionamento paradoxal são termos recorrentes na literatura científica (CADEGIANI; KATER, 2019; MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013; MEEUSEN; DUCLOS; GLEESON; RIETJENS *et al.*, 2006). No senso comum parece prevalecer o paradigma de que apenas atletas de elite são suscetíveis aos sintomas de *overtraining*. Porém o “descondicionamento paradoxal” não é uma exclusividade das ciências dos esportes e performance, e precisa ser repensado em outras áreas, sobretudo a da saúde (CADEGIANI; KATER, 2019).

Entende-se como supertreinamento ou *overtraining* a condição de má adaptação a um período crônico de estresse excessivo provocado pelo esforço físico, que resulta em perda de desempenho e desenvolvimento de sua síndrome (KREHER; SCHWARTZ, 2012). Os sinais e sintomas que caracterizam a síndrome do *overtraining* são os transtornos de humor e ansiedade, depressão, apatia geral, instabilidade emocional, perda de apetite, distúrbio de sono, alterações hormonais, aumento da frequência cardíaca de repouso e aumento da vulnerabilidade a infecções e lesões, além de dores musculares e articulares

(KELLMANN, 2010; MATTA MELLO PORTUGAL; CEVADA; SOBRAL MONTEIRO-JUNIOR; TEIXEIRA GUIMARÃES *et al.*, 2013; REARDON; FACTOR, 2010; SCHAAL; TAFFLET; NASSIF; THIBAULT *et al.*, 2011). Diferenças individuais no tempo de recuperação, capacidade de realizar e tolerar o esforço físico, além de outros estímulos estressores não relacionados ao treinamento (sono, dieta, família, estudos, trabalho, lazer e outros) podem explicar porque cada praticante apresenta uma resposta diferente para uma mesma rotina ou planejamento de treinamento (FREITAS; MIRANDA; BARA FILHO, 2009).

Outra definição de *overtraining* é um acúmulo de treinamento e/ou estresse sem treinamento resultando no decréscimo, a longo prazo, da capacidade de desempenho, com ou sem sinais fisiológicos e psicológicos relacionados, além de sintomas de má adaptação nos quais a restauração da capacidade de desempenho pode levar várias semanas ou meses (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Enquanto *overtraining* caracteriza um processo de treinamento intensificado, a expressão "síndrome" é utilizada para enfatizar a etiologia multifatorial de forma a reconhecer que o exercício (treinamento) não é necessariamente o único fator causal da síndrome (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013).

Entretanto, o exercício físico, através de durações prolongadas, cargas extremas e/ou frequência elevada pode apresentar benefícios, caracterizando um paradoxo (CADEGIANI; KATER, 2019; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017). Há uma linha tênue entre riscos e benefícios induzidos por excesso de exercício. Como benefícios potenciais, há praticantes que podem experimentar ativações no sistema límbico de recompensas cerebral, sensações de prazer e bem-estar, além de aumentos no gasto energético e reduções ou manutenções na distribuição da gordura corporal (GUIMARÃES, 2016; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017). Se a perturbação da homeostase for devidamente programada, monitorada e avaliada ao longo de um ciclo de treinamento, ainda que ocorra uma exaustão temporária induzida pelo excesso de treinamento, é possível reverter o status de esgotamento, recuperar a constância interna e aprimorar o rendimento através da supercompensação fisiológica (CADEGIANI; KATER, 2019). *Overreaching* é justamente a exaustão temporária seguida da supercompensação fisiológica, porém, ao contrário do *overtraining* que requer meses, sua recuperação é

relativamente fácil de ocorrer em curto prazo, entre uma a quatro semanas (HALSON; JEUKENDRUP, 2004), período conhecido como *tapering* ou polimento.

Segundo o Colégio Europeu de Ciências do Esporte (2006), o *overtraining* pode ser resultado de dois estados diferenciados em relação ao desempenho: *overreaching* de curta duração, funcional, ou *overreaching* extremo, não-funcional (MEEUSEN; DUCLOS; GLEESON; RIETJENS *et al.*, 2006). O estado funcional é caracterizado por uma queda rápida no desempenho seguido por uma eventual melhora, em um processo que se assemelha à teoria da supercompensação de adaptações fisiológicas (MEEUSEN; DUCLOS; GLEESON; RIETJENS *et al.*, 2006). Ainda de acordo com o posicionamento, no estado não-funcional, a queda na performance tem recuperação mais prolongada. Normalmente, é acompanhada de fadiga e alterações bioquímicas, imunológicas, fisiológicas e comportamentais (MEEUSEN; DUCLOS; GLEESON; RIETJENS *et al.*, 2006). O estado não-funcional desencadearia a síndrome do *overtraining*, que por sua vez afetaria negativamente diversos sistemas biológicos, sendo de recuperação muito lenta (MEEUSEN; DUCLOS; GLEESON; RIETJENS *et al.*, 2006).

Apesar dos inúmeros esforços para tentar classificar operacionalmente os diferentes termos, a distinção entre o *overreaching* não-funcional e a síndrome do *overtraining* é muito difícil e depende do resultado clínico e diagnóstico por exclusão (CADEGIANI; KATER, 2019; MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Ainda assim, de acordo com um comunicado especial publicado pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte e Colégio Europeu de Ciências do Esporte em 2013, não existe evidência científica para se confirmar ou refutar essa sugestão (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013).

No Reino Unido, o termo síndrome inexplicável do baixo desempenho (*unexplained underperformance syndrome* – UUPS) tem sido adotado, ao invés de síndrome do *overtraining*, para descrever um episódio de baixo desempenho com fadiga persistente, ou seja, má adaptação. Esse constructo, síndrome inexplicável do baixo desempenho, reflete a complexidade da síndrome, a etiologia multifatorial e o supertreinamento ou um desequilíbrio entre a carga de treinamento e a recuperação pode não ser a principal causa do desempenho insuficiente (LEWIS; COLLINS; PEDLAR; ROGERS, 2015).

De uma forma geral, independentemente da definição operacional, diferentes causas têm sido associadas ao baixo desempenho: lesões

musculoesqueléticas como traumas, tendinopatias e estresses ósseos; causas fisiológicas como sobrecarga funcional, alteração do ritmo biológico após mudanças do fuso horário em longas viagens de avião (*jet lag*), sono insuficiente, gravidez, calor, frio, altitude, desidratação; infecções do trato respiratório superior e inferior, doença semelhante à gripe, diarreia/gastroenterite, febre, asma, alergias; deficiências nutricionais de proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas (por exemplo, D), deficiência de ferro (anemia), doença celíaca; outras condições como menorragia, abuso de antiinflamatório não esteroidal, abuso de drogas, concussão, estresse mental, ansiedade e depressão (LEWIS; COLLINS; PEDLAR; ROGERS, 2015).

Cargas de treinamento internas e externas podem fornecer uma visão melhor sobre o estresse provocado pelo treinamento. As medidas de carga de treinamento podem ser categorizadas como internas ou externas. As cargas internas de treinamento são definidas como os estressores biológicos (fisiológicos e psicológicos) impostos ao atleta durante o treinamento ou competição. Medidas como frequência cardíaca, lactato sanguíneo, consumo de oxigênio e percepção subjetiva de esforço são comumente utilizadas para avaliar a carga interna. Por outro lado, as cargas externas de treinamento são medidas objetivas do trabalho realizado pelo atleta durante o treinamento ou competição e são avaliadas independentemente das cargas interna de trabalho. Medidas comuns de carga externa incluem potência, velocidade, aceleração, análise de tempo-movimento parâmetros do sistema de posicionamento global (GPS), por exemplo (BOURDON; CARDINALE; MURRAY; GASTIN et al., 2017). Entretanto, as inúmeras formas de se controlar as distribuições de cargas têm se mostrado insuficientes para prevenir o desenvolvimento de sinais e sintomas da exaustão crônica.

1.2 **Prevalência**

A prevalência dos sintomas do excesso de treinamento é raramente estudada, mas estima-se que 60% dos maratonistas, 50% dos jogadores de futebol e 33% dos jogadores de basquete já os experimentaram (ARMSTRONG; VANHEEST, 2002). Dentre os corredores de elite 60% das mulheres e 64% dos homens indicaram ter experimentado pelo menos um episódio de *overtraining*,

enquanto para a não elite a ocorrência foi verificada em 33% de corredores. Nadadores colegiais que completaram um ciclo de treinamento relataram uma prevalência média de 10% (variação de 7% a 21%) de sinais e sintomas de *overtraining* (RAGLIN; MORGAN; LUCHSINGER, 1990), mas outro estudo longitudinal com nadadores britânicos revelou que 29% desenvolveram *overtraining* pelo menos uma vez, com o risco positivamente relacionado ao nível de habilidade (MATOS; WINSLEY; WILLIAMS, 2011). Em um estudo com nadadores universitários dos Estados Unidos, verificou-se que 91% da amostra que desenvolveu a síndrome do *overtraining* durante sua primeira temporada de treinamento colegial foi diagnosticada com a síndrome do *overtraining* novamente em um ou mais dos três anos seguintes de treinamento (SINGER; MURPHEY; TENNANT, 1993).

O excesso de exercício físico parece não acometer apenas atletas de alto rendimento. Com frequência, programas de condicionamento físico para pessoas que não objetivam a competição envolvendo exercícios de *endurance*, força e velocidade também provocam danos e efeitos colaterais agudos ou crônicos indesejáveis (CADEGIANI; KATER, 2019; GUIMARÃES; COSTA; ALONSO; RUBINI *et al.*, 2018; ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005). O estresse severo provocado pelo esforço físico no ambiente não competitivo também pode levar a complicações extremas, como no estudo de caso apresentado em 2011, durante o congresso anual do Colégio Americano de Medicina Esportiva (MATTHEW; HADEED; KUEHL, 2011). Três dias após uma sessão de exercícios intensos, baseada no método CrossFit®, um homem de 33 anos, previamente assintomático e fisicamente ativo, experimentou um quadro de rabdomiólise, síndrome grave que pode levar ao óbito e ocorre devido à morte das fibras musculares, que liberam seu conteúdo para a corrente sanguínea, provocando insuficiência renal aguda, letargia, fraqueza, náuseas e tontura, por exemplo (MATTHEW; HADEED; KUEHL, 2011).

Entre crianças e adolescentes, o sucesso de jovens atletas pode ser definido por convites para competições nacionais ou internacionais, ou para bolsas de estudo. Apesar de apenas 0,02% a 0,5% dos atletas do ensino médio continuar a participar em nível profissional, o número de jovens atletas que se torna especialista em único esporte continua a crescer (SOLOMON; WEISS KELLY, 2016). O aumento da dedicação a regimes intensos de treinamento apresenta

desafios físicos, emocionais e cognitivos ao jovem atleta que podem colocar em risco a saúde geral (SOLOMON; WEISS KELLY, 2016). Não é do nosso conhecimento a existência de dados na literatura que permitam uma discussão mais aprofundada sobre a epidemiologia do supertreinamento nessa população.

Apesar de controverso o assunto em função de dados ainda inconsistentes, o exercício de *endurance* praticado por pessoas com diferentes níveis de aptidão física pode induzir o remodelamento patológico de estruturas do coração e artérias adjacentes (O'KEEFE; PATIL; LAVIE; MAGALSKI *et al.*, 2012). Maratonas, ultramaratonas, triátlons, corridas de bicicleta muito longas, podem causar sobrecarga aguda de volume nos átrios e ventrículo direito, com reduções transitórias na fração de ejeção do ventrículo direito e elevação de biomarcadores cardíacos. Cronicamente, o estresse repetitivo pode resultar em fibrose do miocárdio, fibrilações e arritmias (O'KEEFE; PATIL; LAVIE; MAGALSKI *et al.*, 2012; PATIL; O'KEEFE; LAVIE; MAGALSKI *et al.*, 2012).

Embora haja evidências de que o exercício físico intenso possa promover o desempenho e a saúde (GOHIL; BROOKS, 2012), considerado uma “polipílula” (FIUZA-LUCES; GARATACHEA; BERGER; LUCIA, 2013) capaz de promover inúmeros benefícios biológicos e funcionais, não se pode descartar a existência de uma linha tênue entre seus riscos e benefícios. Existem efeitos colaterais, inclusive entre as populações mais frágeis fisicamente, ainda que estudos epidemiológicos sejam escassos. Sinais e sintomas de *overtraining*, rabdomiólise, dores e lesões musculoesqueléticas, síndrome da mulher atleta envolvendo distúrbios na alimentação, ciclo menstrual e densidade mineral óssea (JAVED; TEBBEN; FISCHER; LTEIF, 2013), doenças crônicas não transmissíveis, infecções bacterianas e virais (doenças transmissíveis) (CAMPBELL; TURNER, 2018) são alguns exemplos de seus efeitos colaterais.

Como exemplo de que sintomas de exaustão física e mental não acometem exclusivamente a população de atletas de alto rendimento, um estudo envolvendo 186 universitários de diversas áreas da saúde evidenciou que o grupo de insuficientemente ativos apresentou maior pontuação no Questionário de Sintomas Clínicos do *Overtraining* em relação aos grupos de moderadamente ativos e superativos (GUIMARÃES; COSTA; ALONSO; RUBINI *et al.*, 2018). Os autores sugerem que existem questões relacionadas ao desenvolvimento da síndrome do *overtraining* que não são justificadas exclusivamente pela frequência,

intensidade, duração e o intervalo das sessões de exercício físico (GUIMARÃES; COSTA; ALONSO; RUBINI *et al.*, 2018). Dados ainda não publicados pelos mesmos autores, de dois diferentes estudos com universitários do curso de medicina (Apêndice 05) e militares, respectivamente, revelaram resultados semelhantes. Existe ainda a recomendação de que pacientes com doenças neuromusculares de caráter crônico, progressivo e muitas vezes inexorável, necessitem de uma abordagem com enfoque no gerenciamento da fraqueza muscular, e não no incremento da força, para evitar o estado de *overtraining* (ORSINI; HASUE; LEITE; MENEZES *et al.*, 2014).

Um programa de condicionamento ou treinamento físico, portanto, se mal gerenciado pode provocar sinais e sintomas de exaustão ou esgotamento físico e mental, lesões celulares e funcionais, redução da adesão ao exercício físico e, consequentemente, aumento das estatísticas de inatividade física e doenças crônicas não transmissíveis (GUIMARÃES, 2016; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017).

1.3 **Resposta imune**

O sistema imunológico é um sistema baseado na cooperação, responsável pelo reconhecimento do que é próprio e não próprio do organismo. Sua função geral é reparar danos e preservar a homeostase (MURPHY, 2014; TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012). No desempenho de suas funções, em resposta aos desequilíbrios apresentados pelo organismo, o sistema imune pode apresentar dois tipos principais de resposta: resposta imune inata e resposta imune adaptativa (MURPHY, 2014).

A resposta inata inclui barreiras físicas (ex.: pele), químicas (ex.: lágrima, sistema complemento) e a participação de células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *natural killers* (NK) e moléculas microbicidas como o óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O2^{-}$). A resposta imune adaptativa envolve principalmente linfócitos T (T $CD4^{+}$ e T $CD8^{+}$) e B, além de seus produtos como citocinas e anticorpos, respectivamente. Pode ser dividida em resposta imune humoral (mediada por anticorpos) e resposta imune celular (mediada por células, tais como linfócitos T e macrófagos) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Geralmente os microrganismos são detectados e destruídos rapidamente por mecanismos menos específicos apresentados pela resposta imune inata. Para sua detecção, esses microrganismos precisam ser reconhecidos e tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo são capazes de distinguir entre o próprio e o não próprio. Contudo, eles diferem na maneira como fazem esse reconhecimento. Na imunidade inata existe um número limitado de receptores e proteínas secretadas que são codificadas na linhagem germinativa e que reconhecem características comuns a muitos patógenos. São os chamados receptores de repetição de padrões (PRRs). Já na imunidade adaptativa os receptores para o reconhecimento do organismo invasor são formados por um processo de rearranjo gênico. Ainda assim, a resposta imune inata é muito eficiente na discriminação entre células hospedeiras e patógenos, proporcionando as defesas iniciais e também contribuindo para a indução da resposta imune adaptativa através da ação das células apresentadoras de antígenos (APCs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Podemos dizer que a resposta imunológica a uma infecção inicial ocorre em três fases: resposta imune inata, resposta imune induzida precocemente e resposta imune adaptativa (ANEXO A). As primeiras duas fases fazem o reconhecimento do patógeno por meio dos PRRs. Na terceira fase, o reconhecimento é feito por meio de receptores variáveis para antígenos específicos formados por um processo de rearranjo gênico nas células somáticas que produz um enorme repertório de receptores de antígenos, os quais são capazes de distinguir perfeitamente entre moléculas muito relacionadas. Deste modo, a imunidade adaptativa ocorre posteriormente, porque as poucas células B e células T precisam sofrer expansão clonal antes de se diferenciarem em células efetoras que eliminam a infecção. Contudo, os mecanismos efetores que eliminam os agentes infecciosos são similares ou idênticos em todas as fases (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Apenas os mecanismos que envolvem os componentes solúveis e celulares da imunidade inata não são capazes de promover uma memória imunológica protetora de longo tempo. Deste modo, a imunidade inata, quando o patógeno rompe as duas primeiras fases de sua resposta, é responsável pela indução da resposta imune adaptativa, a terceira fase da resposta à infecção inicial por um patógeno. Essa indução leva à expansão dos linfócitos antígeno-específicos que têm como alvo os patógenos específicos e a formação de células

de memória, que proporcionam uma imunidade específica persistente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

1.3.1 Resposta imune inata

A resposta inata é aquela com a qual já nascemos. É pronta, imediata e inclui barreiras físicas (como a pele, por exemplo), químicas (lágrima, sistema complemento) e a participação de células fagocíticas como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, além dos linfócitos conhecidos como células *natural killers* (NK) e de moléculas microbicidas como o óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ($O2^-$) (MURPHY, 2014) (ANEXO B).

As primeiras defesas apresentadas incluem várias classes de moléculas solúveis pré-formadas presentes no sangue, nos líquidos extracelulares e nas secreções epiteliais. Podemos citar as enzimas antimicrobianas, como a lisozima, que inicia a digestão da parede celular bacteriana; os peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, que são capazes de lisar diretamente a membrana da célula bacteriana; e um sistema de proteínas plasmáticas muito importantes, conhecido como sistema do complemento, que promove a lise do microrganismo ou a sua fagocitose por células fagocíticas do sistema imune inato, como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas como importantes exemplos (MURPHY, 2014).

O reconhecimento dos patógenos pelas células da imunidade inata na segunda fase da resposta é feito por meio de moléculas típicas dos microrganismos, as quais não são compartilhadas pelas células do hospedeiro. As moléculas específicas dos microrganismos que são reconhecidas pelas células da imunidade inata são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*). Os PAMPs são reconhecidos pelos já citados PRRs. Eles reconhecem estruturas como oligossacarídeos ricos em manose, peptideoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular bacteriana. Também podem reconhecer DNA CpG não metilado. Essas moléculas são comuns a muitos patógenos e têm sido conservados durante a evolução.

Além dos PAMPs, os receptores PRRs também são capazes de reconhecer moléculas próprias ao organismo que surgem em situações onde há comprometimento do equilíbrio, denominadas padrões moleculares associados a

danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular pattern*). São exemplos as proteínas induzidas por estresse (proteínas de choque térmico HSPs, do inglês *heat shock protein*), cristais e proteínas nucleares (MURPHY, 2014) (ANEXO C).

Os macrófagos ("*makros*" = grande, "*phagein*" = comer) são células fagocíticas que desempenham a função de células apresentadoras de antígenos. Seu papel central no sistema imunológico inato pode estar no controle da fagocitose, na promoção da morte de microrganismos, na produção de citocinas ou mesmo na apresentação de antígenos aos linfócitos T virgens para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Estas células foram identificadas pela primeira vez pelo zoólogo russo Elie Metchnikoff em 1883, que descobriu que muitos microrganismos poderiam ser engolfados e digeridos por células fagocíticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Os macrófagos expressam vários PRRs que os permitem reconhecer componentes específicos dos microrganismos. Aqueles que se ligam a carboidratos da parede celular das bactérias, das leveduras e dos fungos são os receptores de manose e de glicano e os receptores de varredura. Os receptores semelhantes ao Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) são uma importante família de receptores PRRs que estão presentes nos macrófagos e em outras células imunes. Os TLRs são capazes de se ligarem a diferentes tipos de microrganismo, como por exemplo, TLR-2 liga-se aos componentes da parede celular das bactérias gram-negativas, enquanto TLR-4 se liga aos componentes da parede celular das bactérias gram–positivas. O CD14 é o receptor de LPS, o lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias gram-negativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). O LPS é muito utilizado experimentalmente para a ativação clássica de macrófagos (ANEXO D).

Os macrófagos consistem em duas importantes classes principais: macrófagos residentes nos tecidos e macrófagos infiltrantes. Como macrófagos residentes em tecidos podemos citar as células de Kupffer hepáticas, micróglia, macrófagos peritoneais, macrófagos alveolares, macrófagos da polpa esplênica e da medula. Em seus tecidos específicos esses macrófagos mantêm a integridade e a homeostase dos sistemas através da remoção de patógenos invasores, de células apoptóticas e de detritos de células (*debris* celular) (MURPHY, 2014). Por outro lado, os macrófagos infiltrantes são encontrados somente após uma patologia, sendo eles oriundos da diferenciação dos monócitos clássicos (também

conhecidos como monócitos "inflamatórios" ou classicamente ativados). Esses macrófagos geralmente são encontrados em contextos patológicos, como o câncer, aterosclerose e doença metabólica (MURPHY, 2014).

Quando um processo inflamatório é desencadeado pela perturbação da homeostase tecidual, monócitos derivados da medula óssea que circulam na corrente sanguínea são atraídos para local da inflamação, através da atração realizada por quimiocinas inflamatórias secretadas por macrófagos residentes, células do tecido conjuntivo e endoteliais (ITALIANI; BORASCHI, 2014; VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019). No local da inflamação, monócitos se diferenciam em macrófagos, que cooperam com células residentes para manter a imunidade ou promover a resolução de inflamação e regeneração tecidual, dependendo do fenótipo de macrófago no qual o monócito se diferencie (MURPHY, 2014). Este processo de diferenciação de macrófagos em um determinado fenótipo é chamado de polarização e ocorre em resposta a estímulos provenientes do microambiente local. De acordo com essa polarização, os macrófagos podem ser classificados em classicamente ativados (pró-inflamatórios ou M1) e alternativamente ativados (anti-inflamatórios ou M2)(ITALIANI; BORASCHI, 2014). Esses fenótipos são baseados em programas específicos de expressão gênica que levam à aquisição de diferentes marcadores de superfície celular, à secreção de determinadas citocinas, bem como às adaptações metabólicas dos macrófagos (VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019). Os macrófagos pró-inflamatórios (M1) são ativados por produtos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) e outros ligantes de TLRs, ou por ação de citocinas secretadas por linfócitos Th1, como IFN-γ e TNF. São caracterizados por sua capacidade de eliminar patógenos e apresentar seus antígenos aos linfócitos T virgens, iniciando o desenvolvimento de respostas adaptativas. Assim, eles expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e CD 14, o receptor de LPS. Eles também produzem altos níveis de citocinas inflamatórias, como TNF, IL1-β, IL-6, IL-12 e IL-23 e induz respostas do tipo Th1 (ITALIANI; BORASCHI, 2014; VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019) (ANEXOS E e F).

Macrófagos M2 são alternativamente ativados por ação das citocinas IL-4 ou IL-13 secretadas por mastócitos, basófilos (imunidade inata) e linfócitos Th2

(imunidade adaptativa) (ITALIANI; BORASCHI, 2014; VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019). Esse fenótipo é caracterizado por um perfil anti-inflamatório, que permite a resolução da inflamação e a reparação tecidual. Eles expressam altos níveis de receptor de manose (CD206), bem como o antagonista da IL-1R, e produzem fatores pró-fibróticos, como o fator de crescimento e transformação beta (TGF-β) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), suprimindo ativamente a inflamação e promovendo o reparo tecidual. Macrófagos M2 induzem angiogênese e linfangiogênese por produção do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-8 (VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019). O fenótipo M2 pode ser subdividido em 4, dependendo do estímulo que promova sua diferenciação. Esse fenótipo induzido por IL-4/IL-13 é conhecido como M2a. Outros estímulos, incluindo imune complexos/ligantes de TLR/agonistas de IL-1R (M2b), glicocorticóides/IL-10 (M2c) ou ligantes de TLR/agonistas de A2R/IL-6 (M2d) também promovem a polarização deste fagócito (ANEXOS E e F) (VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019). Considerando a complexidade do microambiente tecidual e a plasticidade dos macrófagos, uma visão estática da polarização M1 – M2 adotada em experimentos *in vitro* pode não descrever completamente a polarização de macrófagos *in vivo*, o que deve ser considerado um processo extremamente dinâmico e específico do organismo vivo (VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019).

1.3.2 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa envolve, principalmente, células como linfócitos T e B e seus produtos, como citocinas e anticorpos, respectivamente. Citocinas são proteínas glicosiladas ou não, que, em geral, apresentam baixo peso molecular (entre 5.000 e 30.000) e desempenham um papel central na mediação e regulação das respostas imunológicas (MURPHY, 2014). Elas atuam como mensageiras entre as células do sistema imune, hematopoiético e neuroendócrino. As citocinas têm sido classificadas como pró ou anti-inflamatórias, de acordo com as funções desempenhadas (TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012).

Os linfócitos T podem apresentar diferentes marcadores na superfície celular. Os principais são os chamados *cluster* de diferenciação (CD), que representam um conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular usado para diferenciar variados tipos de células. Dois deles são considerados bastante importantes e dividem os linfócitos T em $CD4^+$ e $CD8^+$. Os linfócitos $TCD4^+$ são chamados de auxiliares (*helper* - Th) enquanto os linfócitos $TCD8^+$ são os conhecidos linfócitos T citotóxicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Por sua vez, a resposta imune adaptativa pode se dividir em resposta imune celular (mediada por células, tais como linfócitos T e macrófagos) e resposta imune humoral (mediada por anticorpos, produzidos por linfócitos B) (MURPHY, 2014). Ambas precisam da participação de linfócitos T auxiliares (T *helper*) para a produção de citocinas que criam o microambiente favorável a um tipo ou outro de resposta. Os linfócitos Th0 (T $CD4^+$ virgens) podem diferenciar-se em diversas subpopulações dentre as quais se destacam as células Th1 (T *helper* tipo 1), as células Th2 (T *helper* tipo 2), as células Th17 (T *helper* tipo 17) e as células Treg (T regulatórias) (Esquema 4). Cada um desses tipos celulares produz diferentes padrões de citocinas e sua diferenciação nesses diversos fenótipos depende da presença das citocinas que predominam no microambiente de ativação, moléculas co-estimulatórias e do tipo de antígeno a ser apresentado (DEL PRETE, 2008). Para que esta diferenciação ocorra, é necessário que o linfócito T *helper* seja ativado através da apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe II presente nas células apresentadoras de antígeno como os macrófagos e as células dendríticas (WU; FAN; CHEN; CHEN *et al.*, 2019).

A diferenciação de Th0 em Th1 está relacionada à ação e à responsividade a IL-12, citocina que pode ser produzida por células dendríticas e por macrófagos durante a resposta imune inata, na fase aguda de uma infecção por microrganismos intracelulares. Além de estimular os linfócitos Th0 a se diferenciarem em células Th1 e a produzirem IFN-©, a IL-12 também estimula as células *Natural Killer* (NK) a produzirem esta importante citocina inflamatória (STAFFORD; NEUMANN; BELOSEVIC, 2002).

Os linfócitos Th0 apresentam receptores (IL-12Rβ2), que se ligam a IL-12 permitindo sua sinalização intracelular, a qual envolve moléculas transdutoras e ativadoras de transcrição como a STAT 1 e STAT 4. Além destas, a diferenciação

em Th1 também passa pela ativação do fator de transcrição Tbet (ANEXO G). O interferon gama (IFN-γ) é a citocina predominantemente produzida pelo fenótipo Th1. Esta citocina atua sobre macrófagos estimulando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), a qual oxida o átomo de nitrogênio guanidínico terminal da L-arginina à citrulina com a concomitante liberação de óxido nítrico (NO) (STUEHR; CHO; KWON; WEISE *et al.*, 1991). O óxido nítrico representa o principal mecanismo microbicida capaz de destruir microrganismos cuja célula hospedeira seja o macrófago, como por exemplo vários patógenos, incluindo *T. cruzi*, *T. musculis*, *M. avium*, M. leprae, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans* e *L. major* .

Além do NO, as espécies reativas de oxigênio (ROS) também podem participar como mecanismo microbicida em macrófagos induzidos por IFN-γ ou receptores do tipo Toll. ROSs derivam da redução de oxigênio, gerando um grupo de íons, moléculas e radicais altamente reativos e podem ser geradas nas mitocôndrias como produtos da cadeia respiratória e podem participar da sinalização celular e destruição de patógenos intracelulares. Deste modo, em resumo, as células Th1 produzem predominantemente IFN-γ que ativam classicamente os macrófagos, e estão relacionadas à resposta imune celular e ao controle de infecções causadas por microrganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

O padrão apresentado pelo fenótipo Th2 inclui as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e está associado com a resposta às infecções extracelulares, sendo tipicamente uma resposta imune humoral. A diferenciação neste fenótipo ocorre por estímulo pela IL-4 em decorrência da interação com helmintos e bactéria extracelulares (MURPHY, 2014). A IL-4 pode ser produzida por mastócitos, eosinófilos e, possivelmente, outras populações de células (como células linfoides inatas) ou as próprias células $TCD4^+$ estimuladas pelo antígeno que secretam pequenas quantidades de IL-4 a partir de sua ativação inicial (MURPHY, 2014). A diferenciação em Th2 passa pela ativação dos fatores de transcrição GATA3 e STAT6. A resposta imune humoral está associada às respostas anti-inflamatórias, promovendo a ativação alternativa de macrófagos, além da ativação de mastócitos e de eosinófilos, que auxiliam na defesa contra helmintos (MURPHY, 2014) (ANEXO H).

A transformação de Th0 em Th17 é estimulada pelas citocinas IL-1, IL-6 e IL-23 produzidas em resposta às infecções por bactérias e fungos (REVU; WU; HENKEL; RITTENHOUSE *et al.*, 2018). Essas citocinas ativam o fator de transcrição órfão gama relacionado a RAR (RORγt), fazendo com que os linfócitos diferenciados em Th17 secretem as citocinas IL-17, IL-21, IL-22. A IL-17 tem um papel protetor contra infecções a bactérias extracelulares e fungos, devido a sua capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas de infecção (REVU; WU; HENKEL; RITTENHOUSE *et al.*, 2018) (ANEXO H).

A diferenciação de Th0 em linfócitos T regulatórios (Treg) ocorre a partir da ativação do fator de transcrição FoxP3 realizada pelas citocinas IL-2, IL-10 e TGF-β (MARTINEZ-SANCHEZ; HUERTA; ALVAREZ-BUYLLA; VILLARREAL LUJÁN, 2018). Esses linfócitos foram inicialmente descritos na década de 1970, como linfócitos T supressores. Posteriormente, essas células foram redescobertas por Sakaguchi e colaboradores (1995), os quais mostraram que havia um pequeno grupo de linfócitos T *helper* que co-expressavam o marcador CD25 e exibiam atividade supressora em cobaios adultos. Desde então, vários grupos descreveram linfócitos $TCD4^{+}CD25^{+}$ com ação regulatória em humanos (MARTINEZ-SANCHEZ; HUERTA; ALVAREZ-BUYLLA; VILLARREAL LUJÁN, 2018).

As células Treg são encontradas na periferia e suas citocinas são responsáveis por inibirem a proliferação de Linfócitos T efetores. Inibem a secreção de IL-12 e prejudicam sua capacidade de promover a ativação de células T e diferenciação em Th1. Sua deficiência está envolvida no desenvolvimento de síndromes autoimunes severas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A diferenciação das células T CD4 é mais variada do que as células T CD8, que possuem um fenótipo citotóxico uniforme. Células T citotóxicas contêm lisossomas especializados chamados de grânulos líticos, que apresentam proteínas citolíticas. As células T $CD8^{+}$ citotóxicas efetoras são essenciais na defesa do hospedeiro contra os agentes patogênicos que vivem no citosol, como os vírus, por exemplo. As células T citotóxicas podem induzir as células-alvo a sofrer morte celular programada, exterminando seletivamente e de forma seriada os alvos que expressam um antígeno específico. O principal mecanismo de ação das células T citotóxicas é a liberação, dependente de cálcio, de proteínas citotóxicas (granzinas e perforinas, por exemplo) após o reconhecimento do

antígeno na superfície de uma célula-alvo. As células T citotóxicas também atuam liberando citocinas IFN-gama, TNF, por exemplo (MURPHY, 2014).

1.4 **Excesso de exercício e resposta imune**

O estresse é fundamental em processos adaptativos, sejam eles físicos ou psicológicos. Ele pode ser considerado um conjunto amplo de eventos, consistindo de um estímulo estressor, uma reação processada no sistema nervoso central, e respostas de luta ou fuga a partir da ativação de diversos sistemas fisiológicos (DICKERSON; KEMENY, 2004). Praticamente todas as células do corpo respondem aos fatores liberados em situações de estresse como adrenalina, noradrenalina, cortisol e diversas citocinas (DICKERSON; KEMENY, 2004).

Existe uma hipótese clássica de que o *overtraining* se origina no momento em que novas sessões vigorosas de exercícios são realizadas sem o tempo necessário de recuperação da imunossupressão (NIELSEN; PEDERSEN, 2008; SMITH, 2000). O exercício exaustivo pode levar a leucocitose aguda transitória seguida de supressão parcial da imunidade celular, redução no número ou função de leucócitos e outros componentes do sistema imunológico (SILVA; MACEDO, 2011; TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012). O período em que agentes do sistema imunológico são suprimidos após o esgotamento causado por uma sessão de treinamento ou evento competitivo é conhecido como janela aberta da oportunidade (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2005). O aumento do risco de infecções do trato respiratório superior ou outras condições deletérias da oportunidade de patógenos pode variar dentro de uma a nove horas (PEDERSEN; FISCHER, 2007), 72 horas (STEENSBERG; VAN HALL; OSADA; SACCHETTI *et al.*, 2000) ou até mesmo duas semanas (FISCHER; HISCOCK; PENKOWA; BASU *et al.*, 2004). O desequilíbrio imunológico parece ser a origem da síndrome do excesso de treinamento (NIELSEN; PEDERSEN, 2008; SMITH, 2000).

Pessoas que participam de eventos de *endurance* parecem ser mais suscetíveis a infecções. Por exemplo, existe a observação clássica na literatura de dores de garganta e sintomas semelhantes ao da gripe acometem com maior frequência pessoas engajadas em atividades de longa duração em relação à população em geral, além de que uma vez infectados o tempo necessário para a recuperação é maior (NIEMAN, 1995). A maior susceptibilidade às infecções

parece decorrer de um desequilíbrio no sistema imune e acredita-se que um período de exercício físico intenso é acompanhado de respostas semelhantes às infecções (NIEMAN, 1995). Ainda que os danos extremos do exercício sejam associados à imunossupressão, o aumento da incidência de infecções não é exclusivo desta condição, mas, sobretudo, da alteração do perfil imunológico, da predominância da imunidade humoral associada à supressão da imunidade celular (LAKIER SMITH, 2003).

Enquanto o exercício de intensidade moderada promove proteção contra infecções causadas por microrganismos intracelulares, pois direciona a resposta imune à predominância de um perfil de resposta do tipo Th1, atividades vigorosas geram concentrações crescentes de citocinas anti-inflamatórias. Esta condição induz o predomínio de um perfil de resposta Th2 com a finalidade de reparar o dano tecidual muscular e a inflamação sistêmica, embora isso possa resultar em aumento da susceptibilidade a infecções por microrganismos intracelulares (TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012).

No fim do século passado, Smith (2000) propôs uma teoria para explicar o desenvolvimento dos sinais e sintomas da síndrome do *overtraining* com base nas citocinas. Apesar de multifatorial, os sinais e sintomas podem ser decorrência da ação autrócrina, parácrina e/ou endócrina das citocinas, que orquestram não apenas o sistema imunológico como também determinam a comunicação com diversos órgãos do corpo, especialmente o hipotálamo, crucial na regulação central da homeostase e interação com todos os demais sistemas orgânicos (SMITH, 2000).

Dados obtidos pelo nosso grupo mostraram que células de linfonodos de camundongos submetidos à natação em intensidade moderada por 12 semanas apresentaram elevação das concentrações de IFN-γ e TNF, enquanto IL-4 e IL-10 diminuem significativamente em relação ao grupo sedentário. A razão IL-10/ IFN-γ tendeu para um perfil Th1. Além disso, macrófagos isolados de camundongos exercitados produziram mais IL-12 e TNF, após estímulo com LPS. A infecção desses macrófagos por *Leishmania major* resultou em maior produção de IL-12 do que foi observado com os macrófagos do grupo controle. A produção de NO também foi aumentada em macrófagos, estimulados com LPS, oriundos do grupo exercitado. Esses dados sugerem que exercícios moderados promovem a

predominância de uma resposta imune protetora tipo Th1 em camundongos (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013).

Por outro lado, a revisão clássica de Smith (2000) sugere que o trauma gerado no sistema muscular e esquelético, a partir do estresse extremo provocado pelo exercício, produz grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e TNF (SMITH, 2000). A retroalimentação positiva dos componentes anti-inflamatórios torna-se iminente e o desequilíbrio no perfil Th1 e Th2 pode refletir uma condição perturbadora da homeostase. Os estímulos crônicos sucessivos do treinamento excessivo, sem uma recuperação adequada do estado fisiológico estável, podem desenvolver sintomas deletérios à saúde, como por exemplo, os distúrbios neuroendócrinos e comportamentais (CADEGIANI; KATER, 2017; 2019; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017).

Poucos estudos, no entanto, testaram a hipótese de que os perfis Th1 e Th2 são cronicamente alterados pelo *overtraining*. Existem limitações éticas em pesquisas com seres humanos e, nesse contexto, animais são mais utilizados. Apesar dos diferentes protocolos de esgotamento crônico e populações utilizadas, os resultados indicam uma predominância da resposta Th2 em Th1 (GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017).

No estudo de Ceddia e Woods (1999), foi verificado que camundongos experimentam uma supressão na apresentação de antígenos por macrófagos após quatro dias de treinamento exaustivo, quando comparados aos camundongos do grupo que treinou moderadamente. Especula-se que, uma vez comprometidos, os macrófagos podem perder a capacidade de estimular a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ virgens em Th1, provocando imunossupressão celular (CEDDIA; WOODS, 1999). Estudos com maior tempo de intervenção, como o de Ru e Peije (2009), onde oito ratos foram submetidos a nove semanas de treinamento com distribuição progressiva de cargas, seis dias por semana, também verificaram uma imunossupressão celular por predominância da resposta Th2. A relação Th1/Th2 pelas citocinas IFN-γ/IL-4 foi desequilibrada, predominando o perfil Th2 (RU; PEIJIE, 2009).

Exercícios prolongados e extenuantes diminuem a expressão de *toll-like receptors* (TLRs) em macrófagos e comprometem a apresentação de antígenos para os linfócitos T impedindo, sobretudo, a resposta inflamatória Th1. Esse efeito anti-inflamatório impede o dano tecidual causado pelos mediadores inflamatórios e

reduz o risco de doenças inflamatórias crônicas, mas aumenta a susceptibilidade de infecções por microrganismos intracelulares (ELENKOV, 2004; GLEESON, 2006; TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013). Por outro lado, a prática regular de exercícios em intensidade moderada pode induzir a resposta imune celular (Th1) e, consequentemente, favorecer o controle de infecções causadas por microrganismos intracelulares (GLEESON, 2006; TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012).

Gholamnezhad e colaboradores (2014) investigaram o efeito de oito semanas de treinamento moderado e onze semanas de treinamento severo (*overtraining*) na concentração plasmática de citocinas de ratos. O treinamento moderado promoveu a imunidade celular, enquanto em outros grupos, incluindo o controle, foi observada uma imunossupressão celular. A imunossupressão observada nesses grupos foi associada ao direcionamento da resposta ao perfil Th2, enquanto no grupo moderado houve um direcionamento da resposta imune para o perfil do tipo Th1 (GHOLAMNEZHAD; BOSKABADY; HOSSEINI; SANKIAN *et al.*, 2014). No entanto, neste trabalho não estão publicados os resultados dos testes de capacidade e os animais não foram submetidos a nenhum tipo de infecção.

Em relação ao período de polimento ou *tapering*, Gholamnezhad e colaboradores (2014) verificaram que duas semanas de redução gradual nas cargas de treinamento não foram suficientes para reverter a imunossupressão celular. O *tapering* é caracterizado como um período de recuperação ativa que varia entre duas e quatro semanas antes de algum evento importante. Esse período pode provocar efeitos de supercompensação fisiológica e melhorar o desempenho, a partir do *overreaching* funcional (HALSON; JEUKENDRUP, 2004).

No estudo de Farhangimaleki e colaboradores (2009), o grupo de ciclistas que realizou o polimento durante três semanas, após oito semanas de treinamento, experimentou um melhor desempenho em relação ao grupo controle, que treinou onze semanas com sobrecarga progressiva. As citocinas IL-1 β, IL-6 e TNF no grupo controle apresentaram concentrações mais altas. Embora os autores não tenham avaliado o perfil Th2, os achados reforçam a necessidade do período de polimento para evitar distúrbios na homeostase fisiológica, risco de infecções e fadiga (FARHANGIMALEKI; ZEHSAZ; TIIDUS, 2009)

1.5 **Leishmaniose**

O efeito do exercício físico na modulação do sistema imunológico também vem sendo estudado através do modelo experimental com camundongos Balb/c. Linhagens distintas de camundongos apresentam susceptibilidade e resistência à infecção por parasitos de forma diferenciada. Um excelente modelo de estudo sobre essa dicotomia susceptibilidade/resistência é a infecção de camundongos Balb/c (susceptíveis) e C57BL/6 (resistentes) por *Leishmania major*. A resistência dos camundongos C57BL/6 está relacionada com a resposta Th1 levando à infecção autolimitada e não progressiva. Por outro lado, camundongos Balb/c são susceptíveis ao desenvolvimento progressivo de lesões não cicatrizantes, estando este fato associado à resposta do tipo Th2 (MOSMANN; CHERWINSKI; BOND; GIEDLIN *et al.*, 2005).

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias transmitidas por vetores. Elas são endêmicas em 102 países e territórios distribuídos entre os cinco continentes (OMS, 2019), as quais são promovidas por parasitos do gênero *Leishmania*. Os flebotomíneos são os principais vetores de transmissão das leishmanioses. Essas parasitoses apresentam um largo espectro de manifestações clínicas, que se distribuem desde lesões cutâneas autolimitadas até o envolvimento visceral severo, podendo levar à morte.

Leishmania são parasitos obrigatoriamente intracelulares, sendo preferencialmente o macrófago sua célula hospedeira (CHANG, 1983). Aproximadamente 350 milhões de pessoas correm risco de infecção com incidência anual de cerca de 1,6 milhões e uma prevalência de 12 milhões de indivíduos (OMS, 2019). As leishmanioses causam entre 20.000 e 30.000 mortes anuais e, de acordo com a análise global do ônus das doenças infecciosas, são responsáveis por 2,35 milhões de anos de vida perdidos por invalidez (Organização Pan-Americana de Saúde, 2019).

Dependendo da espécie da *Leishmania* essas doenças apresentam características clínicas específicas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A leishmaniose visceral acomete órgãos internos, havendo acentuado tropismo do parasito pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. Esse tipo de leishmaniose é o mais grave,

podendo levar ao óbito se não tratado a tempo. Quase 90% dos casos de leishmaniose visceral de todo o mundo estão concentrados entre o Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia. Nas Américas, 12 países apresentam áreas endêmicas de leishmaniose visceral. No período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, com incidência anual de 3.516 casos. Cerca de 96% (57.582) desses casos foram reportados pelo Brasil, que apresentou um aumentou de 28% dos seus casos em 2017. Contudo, países Sul Americanos como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela também estão entre aqueles com maiores registros de casos (Organização Pan-Americana de Saúde, 2019).

As principais formas clínicas da LT são: (1) leishmaniose cutânea, onde há ocorrência de lesões exclusivamente cutâneas; (2) leishmaniose mucosa, apresentando lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; (3) leishmaniose muco-cutânea, onde ocorrem concomitantemente lesões na pele e mucosas, e; (4) leishmaniose cutânea difusa, levando à ocorrência de lesões cutâneas disseminadas (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002).

1.5.1 Resposta imune à leishmaniose

Geralmente a resposta imunológica protetora na leishmaniose está associada à resposta imune celular, onde participam ativamente linfócitos T e macrófagos (resposta tipo Th1). Grande parte dos conhecimentos a respeito da resposta imune e da dicotomia Th1/Th2 na leishmaniose é proveniente de experimentos em camundongos utilizando o modelo *Leishmania major* - Balb/C – C57BL/6. Embora a infecção humana seja muito mais complexa do que esta dicotomia há alguma associação com os dados obtidos em estudos desenvolvidos em camundongos (LIEW; MILLOTT; PARKINSON; PALMER *et al.*, 1990; STENGER; THÜRING; RÖLLINGHOFF; BOGDAN, 1994).

A resistência em todas as formas de leishmaniose tem sido relacionada às respostas do tipo Th1 com produção de IFN-γ (BELOSEVIC; FINBLOOM; VAN DER MEIDE; SLAYTER *et al.*, 1989), enquanto a suscetibilidade está associada a uma resposta do tipo Th2 com produção de IL-4 (BOGDAN; GESSNER; SOLBACH; RÖLLINGHOFF, 1996; LAUNOIS; TACCHINI-COTTIER; PARRA-LOPEZ; LOUIS, 1998; MANSUETO; VITALE; DI LORENZO; RINI *et al.*, 2007;

ROMAGNANI; ABBAS, 1996; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Entretanto, no Novo Mundo o prognóstico é positivo quando a resposta imune celular é equilibrada. Indivíduos com leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral apresentam resposta não protetora do tipo Th2 (MANSUETO; VITALE; DI LORENZO; RINI *et al.*, 2007; ROMAGNANI; ABBAS, 1996), enquanto na leishmaniose mucosa clássica, uma exacerbação da resposta do tipo Th1 (hiperergia) leva a crescente destruição do tecido onde há presença de antígenos parasitários. Nestes casos, os níveis de IFN-γ e TNF são muito altos, associados a uma produção relativamente baixa de IL-10 (ANEXO J).

A cura da leishmaniose é clínica. Deste fenômeno poderiam surgir as recidivas tardias, onde a perda da eficiência da resposta imune pode levar à quebra do equilíbrio entre hospedeiro e parasito permitindo a replicação parasitária e o ressurgimento de lesões (BRASIL, 2013).

Recentemente nosso grupo demonstrou que camundongos BALB/c infectados com *L. major* submetidos à atividade natatória tiveram uma diminuição significativa no desenvolvimento da lesão leishmaniótica, além de apresentarem carga parasitária mais baixa que os animais controle. Os animais infectados e treinados apresentaram resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos específicos de *Leishmania* positiva quando comparados aos animais controle. A razão IFN-γ/IL-4 e IFN- γ/IL10 nestes animais mostram uma predominância de resposta Th1 em células de linfonodos drenantes da lesão. Esses dados sugerem que o exercício de intensidade moderada é capaz de modular uma resposta Th1 que promove um efeito protetor contra o desenvolvimento de infecção por *L. major* (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; ALVES; LIMA; GOMES *et al.*, 2019).

1.6 **Justificativa e relevância**

A discussão sobre princípios e conceitos relacionados ao excesso de treinamento (*overtraining*, *overreaching*, *tapering*/polimento, exaustão, síndrome inexplicável do baixo desempenho, síndrome de descondicionamento paradoxal, por exemplo), monitoramento de cargas externas e internas, além da integração da imunologia e parasitologia às ciências do exercício e medicina do esporte, pode permitir uma melhor compreensão sobre condições perturbadoras da homeostase

relacionadas ao estresse físico. Trata-se de assuntos cientificamente atuais e muito promissores.

Pouco se sabe a respeito dos possíveis efeitos colaterais do excesso de exercício. Parece prevalecer o paradigma de que apenas atletas de alto rendimento os experimentam. Ainda não há sequer um consenso sobre marcadores objetivos, precisos e confiáveis, a partir de parâmetros fisiológicos e bioquímicos classicamente estudados, para o diagnóstico da exaustão crônica relacionada ao treinamento. Não é do nosso conhecimento a existência de um único estudo que reúna diferentes protocolos de treinamento em relação ao volume, do leve ao extenuante, e ainda que realize um período de descanso ativo (polimento/*tapering*), exponha resultados de capacidade física e envolva a infecção de animais para avaliar funções específicas do sistema imune. Mais pesquisas são requeridas e relevantes, havendo a necessidade de maior crivo científico no que se refere à indução do supertreinamento, elucidação de seus mecanismos, ferramentas diagnósticas e definições operacionais sobre os conceitos associados.

Dentro das ciências do exercício e esporte diversas dificuldades metodológicas limitam o avanço sobre o entendimento do tema abordado. Por exemplo, experimentos com humanos devem respeitar critérios éticos que protejam o bem-estar físico e emocional dos sujeitos, sendo necessária a utilização de modelo animal.

O estresse provocado pelo exercício físico pode apresentar uma relação dose-resposta paradoxal. Recomendações e prescrições consistentes dependem de uma melhor compreensão sobre seus mecanismos fisiológicos e funcionais.

1.7 **Hipóteses**

- O treinamento aeróbio de muito alto volume compromete a capacidade física.
- O treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência de treinamento são condições que aumentam a suscetibilidade de infecções em macrófagos (*in vitro*) em relação ao treinamento com volume moderado.
- O treinamento de volume moderado direciona o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente celular.

- O treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência do treinamento são condições que direcionam o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente humoral.
- O polimento de duas semanas com redução do desempenho caracteriza a exaustão e é acompanhado de maior suscetibilidade de infecções em macrófagos (*in vitro*).
- O treinamento aeróbio de alto volume aumenta a suscetibilidade dos animais à infecção *in vivo* por *Leishmania major*.

2 **OBJETIVOS**

Objetivo geral

Investigar o efeito do treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos infectados com *Leishmania major in vitro* e no desenvolvimento da infecção no modelo *in vivo* com camundongos Balb/c.

Objetivos específicos

- Comparar o efeito de diferentes volumes do treinamento aeróbio e da condição sedentária na capacidade de macrófagos peritoneais no controle da infecção intracelular por *Leishmania major in vitro*.
- Verificar se o treinamento aeróbio de muito alto volume compromete a capacidade física.
- Verificar se o treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência de treinamento são condições que aumentam a suscetibilidade de infecções em macrófagos em relação ao treinamento com volume moderado.
- Avaliar o efeito do treinamento aeróbio no perfil de citocinas produzidas por macrófagos e verificar se o treinamento de volume moderado direciona o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente celular.
- Verificar se o treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência do treinamento são condições que direcionam o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente humoral.
- Verificar o efeito do treinamento aeróbio em diferentes volumes na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados ou não com *Leishmania major*.
- Avaliar o efeito do treinamento aeróbio em diferentes volumes no desenvolvimento da infecção *in vivo* por *Leishmania major*.
- Verificar se o treinamento aeróbio em diferentes volumes promove visceralização da infecção *in vivo* por *Leishmania major*.
- Verificar se o treinamento aeróbio em diferentes volumes aumenta a suscetibilidade dos animais à infecção por *Leishmania major in vivo*.

3 **MÉTODOS**

3.1 **Amostra**

A amostra total consistiu de 89 camundongos BALB/c machos jovens, com seis semanas de idade em média. Dois experimentos semelhantes com infecção *in vitro* foram realizados com 71 camundongos. Um terceiro experimento com infecção *in vivo* foi realizado com 18 camundongos.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em grupos com no máximo cinco camundongos por gaiola, alojados em um biotério sob condição padrão de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas), a uma temperatura variando entre 22 e 24 °C e umidade de 65%, com alimento e água fornecidos *ad libitum*.

O projeto foi realizado sob aprovação pelo Comitê de Ética em Uso Experimental e Cuidado Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (protocolo número CEA/043/2015), estando de acordo com os padrões éticos do IJSM (HARRISS; ATKINSON, 2011).

3.2 **Adaptação ao treinamento e teste de capacidade física**

A natação foi o modelo de treinamento adotado. As sessões foram realizadas em um tanque de acrílico (50 × 50 × 40 cm), com uma profundidade de 30 cm. A amostra foi submetida a uma semana de adaptação ao meio aquático, seguida de uma semana para a realização do primeiro teste de capacidade física.

O teste de capacidade física consistiu de uma sessão de natação com carga de 2% da massa corporal (MC) até o ponto de fadiga, definido como o momento em que o animal permaneceu submerso por 10 segundos sem retornar à superfície para respirar (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; ALVES; LIMA; GOMES *et al.*, 2019). O tempo em que a fadiga ocorreu foi registrado em minutos.

3.3 **Desenho experimental e protocolos de treinamento *in vitro***

Os 71 camundongos do treinamento para infecção *in vitro* foram divididos em cinco grupos experimentais homogêneos, estabelecidos com base nos resultados do primeiro teste de capacidade: controle sedentário (SED, n=11), baixo volume (BV, n=12), médio volume (MV, n=13), alto volume (AV, n=17) e muito alto volume (MAV, n=18). O período de treinamento de natação foi realizado na sequência e teve a duração total de 10 semanas. O protocolo de treinamento aplicado no grupo MV (CASIMIRO-LOPES; ALVES; SALERNO; PASSOS *et al.*, 2008) foi utilizado em estudos anteriores do nosso laboratório (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; ALVES; LIMA; GOMES *et al.*, 2019) e serviu para nortear o treinamento dos demais grupos experimentais. As Tabelas 1, 2, 3 e 4 informam a distribuição de cargas ao longo das semanas de treinamento.

Tabela 1- Distribuição das cargas de treinamento no grupo experimental BV (n=12) ao longo das 10 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	30	0	0	2
2	30	0	0	2
3	30	0	0	2
4	30	0	0	2
5	30	0	0	2
6	30	0	0	2
7	30	0	0	2
8	30	0	0	2
9	30	0	0	2
10	30	0	0	2

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 2- Distribuição das cargas de treinamento no grupo experimental MV (n=13) ao longo das 10 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	30	15	2% MC	3
2	30	26,54 ± 6,68	3,5% MC	3
3	30	30	3,5% MC	3
4	30	28,39 ± 5,05	3,5% MC	3
5	30	30	3,5% MC	3
6	30	29,44 ± 2,36	3,5% MC	3
7	30	30	3,5% MC	3
8	30	30	3,5% MC	3
9	30	30	3,5% MC	3
10	30	30	3,5% MC	3

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 3- Distribuição das cargas de treinamento no grupo experimental AV (n=17) ao longo das 10 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	60	15	2%	3
2	60	30 ± 15	3,5% MC	3
3	60	45 ± 15	3,5% MC	3
4	88,95 ± 5,10	72,69 ± 25,24	3,5% MC	3
5	90	66,08 ± 25,26	3,5% MC	3
6	90	72,35 ± 25,89	3,5% MC	3
7	90	90	3,5% MC	3
8	90	81,95 ± 19,08	3,5% MC	3
9	90	87,91 ± 8,77	3,5% MC	3
10	90	83,1 ± 15,96	3,5% MC	3

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 4- Distribuição das cargas de treinamento no grupo experimental MAV (n=18) ao longo das 10 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	90	15	2%	5
2	90	30 ± 15	3,5% MC	5
3	90	45 ± 15	3,5% MC	5
4	120	69,41 ± 29,42	3,5% MC	5
5	120	70,86 ± 24,35	3,5% MC	5
6	120	74,88 ± 21,95	3,5% MC	5
7	117,5 ± 7,95	81,86 ± 21,54	3,5% MC	5
8	115,47 ± 10,84	87,11 ± 29,96	3,5% MC	5
9	113,07 ± 14,21	92,83 ± 26,38	3,5% MC	5
10	118,01 ± 6,69	84,24 ± 30,44	3,5% MC	5

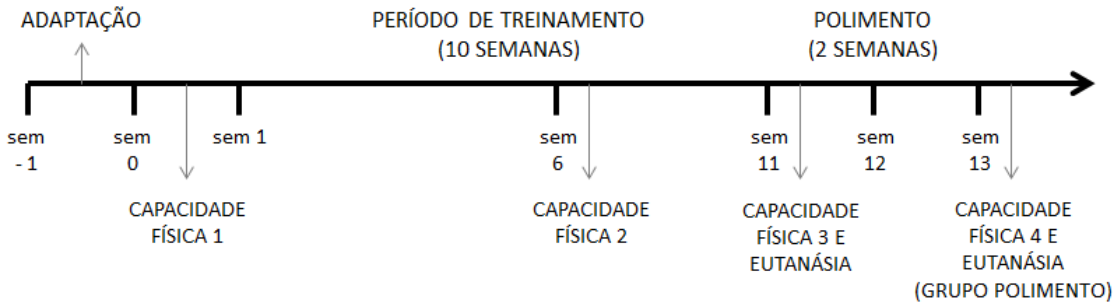
Fonte: O autor, 2019.

Ao final do período de 10 semanas de treinamento foi constituído o sexto grupo experimental, a partir do grupo MAV, denominado polimento (POL, n=5).

Cinco animais que realizaram o protocolo de treinamento de muito alto volume foram submetidos ao polimento (*tapering*), que consistiu de um descanso ativo, com duração total de duas semanas. Houve redução na frequência, duração e intensidade neste período. A frequência foi reduzida para duas sessões semanais, com duração de 60 minutos e sem sobrecarga adicional na cauda.

Além do primeiro teste de capacidade física mencionado, outros três foram realizados em momentos diferentes. O segundo teste de capacidade física ocorreu no início da segunda metade do período de 10 semanas de treinamento (sexta semana). O terceiro teste de capacidade física ocorreu no início da semana seguinte ao período de 10 semanas de treinamento (décima primeira semana). No início da semana seguinte ao final do período de polimento, ou seja, na décima terceira semana, o grupo POL teve sua capacidade física avaliada (quarto teste de capacidade física). A Figura 1 apresenta o desenho experimental do estudo.

Esquema 1- Desenho experimental.



3.4 **Desenho experimental e protocolos de treinamento *in vivo***

Os 18 camundongos do treinamento com infecção *in vivo* foram divididos em três grupos experimentais homogêneos, estabelecidos com base nos resultados do primeiro teste de capacidade: controle sedentário (SED, n=5), alto volume (AVi, n=7) e alto volume não periodizado (AViNP, n=6). O período de treinamento de natação foi realizado na sequência e teve a duração total de 12 semanas. O protocolo de treinamento moderado aplicado nos experimentos *in vitro*, previamente utilizado e publicado (CASIMIRO-LOPES; ALVES; SALERNO; PASSOS *et al.*, 2008), inclusive pelo nosso grupo (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; ALVES; LIMA; GOMES *et al.*, 2019),

serviu para nortear o treinamento dos grupos experimentais adotados. As Tabelas 1 e 2 informam a distribuição de cargas ao longo das semanas de treinamento.

Tabela 5- Distribuição das cargas de treinamento com infecção *in vivo*: grupo experimental AVi (n=7) ao longo das 12 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	90	15	2%	5
2	90	30 ± 15	3,5% MC	4
3	90	45 ± 15	3,5% MC	3
4	120	67,71 ± 28,42	3,5% MC	5
5	120	72,17 ± 25,69	3,5% MC	4
6	120	77,30 ± 19,19	3,5% MC	3
7	120	88,86 ± 31,59	3,5% MC	5
8	120	97,61 ± 35,06	3,5% MC	4
9	120	102,33 ± 16,45	3,5% MC	3
10	120	101,14 ± 20,74	3,5% MC	3

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 6- Distribuição das cargas de treinamento com infecção *in vivo*: grupo experimental AViNP (n=6) ao longo das 12 semanas de intervenção.

Semanas	Duração total da sessão (min)	Duração da sessão com carga (min)	Carga	Treinos por semana
1	60	15	2%	3
2	60	30 ± 15	3,5% MC	2
3	60	45 ± 15	3,5% MC	3
4	60	45 ± 15	3,5% MC	2
5	90	60 ± 30	3,5% MC	1
6	90	60 ± 30	3,5% MC	2
7	90	90	3,5% MC	2
8	90	85,95 ± 10,37	3,5% MC	3
9	90	90	3,5% MC	2
10	90	81,1 ± 25,06	3,5% MC	2

Fonte: O autor, 2019.

3.5 **Consumo alimentar**

O consumo alimentar foi calculado semanalmente, no mesmo dia e horário, sendo representado pela diferença, em gramas, entre o alimento oferecido e o residual. Posteriormente foi calculada a média de consumo por animal.

3.6 **Avaliação da massa corporal**

A massa corporal dos animais foi verificada uma vez por semana, antes das sessões de treinamento, onde foi utilizada uma balança digital com precisão de 0,1 g.

3.7 **Microrganismos**

Utilizamos promastigotas na fase estacionária da cepa LV39 de *Leishmania major*, cultivados sob condições previamente descritas (CUBA CUBA; NETTO; MARSDEN; ROSA *et al.*, 1986), em tubos de tampa de rosca de 15 mL, contendo 5,0 mL de meio Schneider's, suplementado com 20% de soro fetal bovino e mantidos a 26ºC.

3.8 **Manutenção da infecção *in vivo***

A cepa (virulenta) de *L. major* foi mantida através de inoculação em camundongos BALB/c. Os promastigotas (10^6 parasitos) na fase estacionária foram ressuspensos em PBS estéril, e inoculados na pata traseira direita. Após cerca de 2 meses de infecção, os animais infectados foram sacrificados, para retirada dos linfonodos inguinal e poplíteo e punção da lesão da pata. Estes tecidos foram macerados em meio Schneider, acrescido de Estreptomicina/Penicilina 0,1%. O resultado da maceração foi colocado em tubos de tampa de rosca de 15 mL, contendo 5,0 mL de meio Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino e ágar-sangue, e mantidos a 26ºC. Após o isolamento, os parasitos foram mantidos até o quarto repique semanal, quando novamente foram inoculados em camundongos BALB/c.

3.9 **Modelo de infecção com *L. major in vivo***

Camundongos BALB/c foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita com 2 x 10^6 promastigotas de *L. major* em um volume de 20 ⌠l.

O curso da lesão foi acompanhado pela medida da pata infectada com paquímetro (Mitutoyo, Brasil) uma vez por semana. O tamanho da lesão foi calculado pela diferença entre o tamanho da pata infectada em relação ao tamanho da pata contralateral.

3.10 **Eutanásia**

A eutanásia dos experimentos *in vitro* nos camundongos que constituíram os grupos SED, BV, MV, AV e MAV ocorreu cerca de 48 horas após o teste de capacidade física 3. Já a dos camundongos do grupo POL ocorreu 48 horas após o teste de capacidade física 4. No treinamento com infecção *in vivo*, a eutanásia foi realizada 48 horas após o último teste de capacidade física. O procedimento, em todos os casos, foi realizado através da injeção de cloridrato de cetamina (7,5 mg).

3.11 **Obtenção de macrófagos peritoneais e infecção com *L. Major***

Nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, os macrófagos foram retirados por lavagem peritoneal com meio de cultura RPMI, quantificados por contagem em câmara de Neubauer, centrifugados a 1.500 *g*, por 10 minutos a 4ºC, plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços (1 x 10^6 células) e incubados a 37°C, em atmosfera de CO_2 a 5% por 30 minutos. Após este período, os macrófagos foram novamente lavados em meio RPMI para a retirada das células não aderentes. Após esta lavagem, as células foram incubadas em atmosfera de CO_2 a 5% por 2 horas em meio RPMI, e posteriormente utilizadas nos ensaios de interação celular. Os parasitos *L. major* foram deixados em contato com os

macrófagos a uma proporção de 5:1, em atmosfera de CO_2 a 5% a 37°C, por 24 horas na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bactreriano (LPS) 10 ng/mL. Após este período o sobrenadante foi colhido e estocado a -20°C para posterior dosagem da concentração das citocinas e da concentração de óxido nítrico (NO). As lamínulas foram fixadas com metanol e coradas por Giemsa e montadas em laminas de vidro para posterior contagem. Em cada lamínula contou-se, ao menos, 200 macrófagos e os parasitos que os infectavam. Os resultados destes experimentos foram expressos como um fator que visa associar o percentual de macrófagos infectados com o número médio de parasitos por cada uma dessas células hospedeiras. Assim:

Fator de infecção (FI) = percentual de macrófagos infectados x o número médio de amastigotas por macrófago.

3.12 **Dosagem de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos**

No experimento *in vivo*, o sobrenadante dos macrófagos (100 µL) foi plaqueado em microplaca de 96 poços. As duas soluções de reagente de Griess (Naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%) foram misturadas numa proporção de 1:1 no momento do uso. Foi adicionado 100 µL do reagente de Griess em cada amostra e os sistemas foram incubados por 15min, na ausência de luz, a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lidas em leitor de microplacas *TP reader Thermo Plate*, a 550 nm. O NO foi calculado utilizando a curva padrão de nitrito de sódio (10-200 µM) (STUEHR; MARLETTA, 1985).

3.13 **Quantificação da carga parasitária na pata infectada e em linfonodos poplíteos**

No experimento *in vivo*, para a obtenção dos parasitos, após a eutanásia dos animais, as patas infectadas foram cortadas, tiveram garras e pele retiradas e foram maceradas em meio Schneider (8 mL) e decantada por cinco minutos. O

sobrenadante desta maceração foi plaqueado em microplacas de 96 poços em diluições seriadas de 1:5 a 1:78.125 em meio Scheneider suplementado com 20% de SFB e Estreptomicina/Penicilina 0,1%. Os sistemas foram incubados a 26ºC até observar-se o crescimento de parasitos no sistema controle (sedentário), quando os parasitos foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer.

Células de linfonodos poplíteos drenantes da infecção dos animais de todos os grupos experimentais foram obtidas por maceração, plaqueadas em microplacas de 96 poços em diluições seriadas de 1:5 a 1:78.125 em meio Scheneider suplementado com 20% de SFB e Estreptomicina/Penicilina 0,1%. Os sistemas foram incubados a 26ºC até observar-se o crescimento de parasitos na última diluição do sistema controle (sedentário), quando os parasitos foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer. O surgimento dos parasitos ocorreu após 24h da maceração e plaqueamento. O resultado das contagens foi ajustado para a concentração de parasitos no macerado e dividido pelo peso em grama do linfonodo.

3.14 **Obtenção de células do baço**

No experimento *in vivo*, após a eutanásia dos animais, os baços foram macerados com a ajuda de um êmbolo de seringa. O macerado foi centrifugado a 1500 g, por 10 minutos a 4ºC, o sedimento foi ressuspenso em tampão ACK (0,15 M NH4Cl, 1,0 mM KHCO3, 0,1 mM Na2EDTA, pH 7,2) e incubado por 1 min em banho de gelo. Após a incubação o ACK foi inativado pela adição de 5mL de RPMI. As células foram então centrifugadas a 1500 g, por 10 minutos a 4ºC, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI. As células foram quantificadas em câmera de Neubauer utilizando Azul de Trypan 0,02% e plaqueadas a $1x10^6$ células por poço em placa de 24 poços e incubadas a 37ºC, por 48 horas em atmosfera de CO_2 a 5%. Os sobrenadantes foram guardados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

Uma parte deste macerado foi plaqueado (1:5) em placa de 24 poços contendo meio Schneider suplementado com 20% de SFB e as placas foram incubadas a 26ºC para verificar se houve visceralização da infecção. Todos os

dias os poços foram checados para verificar se havia crescimento de promastigotas.

3.15 **Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA)**

No experimento *in vitro*, amostras de sobrenadante de cultura de macrófagos e de baços macerados foram coletados e armazenados a -80°C até o momento de sua utilização. A concentração de citocinas foi determinada usando o Kit BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Inflammation* (TNF, MCP-1, IL-10, IL-6; BD Biosciences, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente com uma mistura de esferas fluorescentes de captura recobertas com anticorpo específico para cada citocina, e anticorpos de detecção também marcados fluorescentemente. Após este período, as amostras foram lavadas com solução fornecida pelo fabricante. Foram adquiridos 2500 eventos em citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) utilizando o programa FACSDiva. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FCAP Array (BD Bioscience) e a concentração de citocinas foi determinada tendo como base a curva-padrão estabelecida, de acordo com as orientações do fabricante.

3.16 **Análise estatística**

Inicialmente, foi realizada a análise de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos dados. Atendido esse pressuposto, os dados foram tratados através de testes paramétricos e expressos em média e desvio-padrão.

No experimento *in vitro* foi utilizada a ANOVA de duas entradas, com *post hoc* de Bonferroni quando necessário (razões F significativas), para analisar possíveis diferenças estatísticas nos resultados relacionados ao consumo alimentar, massa corporal, testes de capacidade física, índices de infecção de macrófagos e concentrações de citocinas entre os diferentes grupos experimentais (SED, BV, MV, AV, MAV e POL), momentos (tempo de intervenção) ou condições (com ou sem LPS). O Teste *t* pareado foi empregado para comparar o tempo até a

exaustão em minutos entre o grupo MAV no teste de capacidade física 3 e o grupo POL (teste de capacidade física 4).

A ANOVA de duas entradas para os resultados relacionados ao consumo alimentar (quantidade de ração em gramas) e massa corporal (em gramas) consistiu de uma comparação 5 x 10 (cinco grupos experimentais x 10 semanas de intervenção). Para os testes de capacidade física (tempo até a exaustão em minutos) a ANOVA de duas entradas consistiu de uma comparação 5 x 3 (cinco grupos experimentais x 3 momentos [pré, durante e pós treinamento]).

Para os fatores de infecção de macrófagos e concentrações de citocinas (pg/mL) a ANOVA de duas entradas consistiu de uma comparação 6 x 2 (seis grupos experimentais x 2 condições [com ou sem LPS]).

Os resultados obtidos na experimentação *in vivo*, exceto o do desenvolvimento das lesões (Figura 10), foram analisados por ANOVA de única entrada seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Também foram analisados por ANOVA de única entrada, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey, o experimento do fator de infecção obtido após 12 semanas de treinamento dos animais e os resultados da dosagem de óxido nítrico resultante dessa interação.

A ANOVA de duas entradas para o ensaio de desenvolvimento da lesão leishmaniótica consistiu de uma comparação 3 x 12 (3 grupos experimentais x 12 semanas de treinamento).

Todos os procedimentos estatísticos foram efetuados no *software* Graphpad Prism 5.01®, assumindo-se o nível de significância $P < 0,05$.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Morte experimental**

No treinamento para infecção *in vitro*, seis mortes ocorreram no total, representando em termos relativos 8,45% dos 71 animais que constituíram a amostra. Dos 18 animais do grupo MAV, três morreram durante a primeira, segunda e nona semana do período de treinamento, respectivamente, representando em termos relativos 16,67% para este grupo. Dos 17 animais do grupo AV, um morreu durante a sexta semana do período de treinamento, representando 5,89% em termos relativos para este grupo. Dos 13 animais do grupo MV, dois (15,38%) morreram durante a quinta e oitava semana do período de treinamento, respectivamente.

Já no treinamento com infecção *in vivo*, um animal do grupo AVi morreu na sexta semana e outro do grupo AViNP morreu na décima primeira semana.

4.2 **Consumo alimentar e massa corporal**

Os resultados estatísticos relacionados ao consumo alimentar semanal e massa corporal (em gramas) entre os diferentes grupos experimentais e semanas de intervenção no treinamento para infecção *in vitro* são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

A ANOVA de duas entradas seguida do *post hoc* de Bonferroni revelou diferenças estatísticas no consumo alimentar dos camundongos (quantidade de ração em gramas) entre as semanas ($P < 0,0001$), grupos experimentais ($P < 0,0001$) e na interação momento x tratamento ($P < 0,0001$). Destacamos, na Tabela 5, o grupo MAV com maior consumo alimentar em relação aos demais grupos experimentais ao longo das semanas de intervenção.

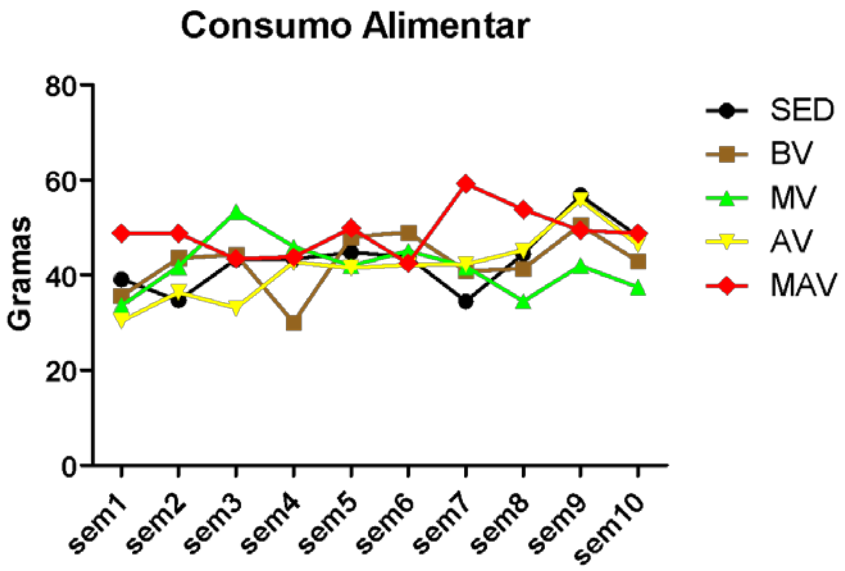
O grupo MAV apresentou diferença estatística significativa em todas as semanas quando comparado ao grupo AV ($P < 0,001$), exceto nas semanas 4 e 6; grupo MV ($P < 0,001$), exceto na semana 4; grupo BV ($P < 0,001$), exceto nas semanas 3, 5 e 9; grupo SED ($P < 0,001$), exceto nas semanas 3, 4, 6 e 10.

Também foram encontradas diferenças estatísticas significativas em todas as semanas entre os grupos BV e SED (P < 0,01), exceto na terceira; BV e MV (P < 0,001), exceto na primeira, segunda e sétima; BV e AV (P < 0,001), exceto na sétima; MV e SED (P < 0,01), exceto na sexta; MV e AV (P < 0,001), exceto na quinta e sétima; AV e SED (P < 0,001), exceto na segunda, quarta, sexta, oitava, nona e décima.

Tabela 7- Consumo alimentar semanal entre os diferentes grupos experimentais ao longo das semanas de treinamento, expresso em gramas (média ± desvio-padrão).

	SED	BV	MV	AV	MAV	POL
Sem 1	39,08 ± 2,51	35,55 ± 3,42	33,62 ± 3,34#	30,38 ± 2,31	48,84 ± 2,40*	
Sem 2	34,64 ± 2,19	43,54 ± 3,11	41,76 ± 3,59#	36,44 ± 2,57	48,84 ± 4,11*	
Sem 3	43,29 ± 1,97	44,23 ± 2,91	53,34 ± 2,18#	33,02 ± 2,11	43,42 ± 1,89*	
Sem 4	43,29 ± 2,41	29,97 ± 3,03	46,04 ± 1,98	42,68 ± 3,90	43,75 ± 2,87	
Sem 5	44,83 ± 2,35	47,94 ± 3,49	41,96 ± 2,17#	41,58 ± 2,15	49,85 ± 2,44*	
Sem 6	43,86 ± 2,66	48,92 ± 2,37	45,08 ± 4,41#	42,13 ± 4,33	42,5 ± 2,32*	
Sem 7	34,44 ± 2,43	40,92 ± 2,56	41,76 ± 2,13#	42,3 ± 2,49	59,24 ± 4,95*	
Sem 8	44,42 ± 2,17	41,36 ± 3,12	34,5 ± 1,94#	45,15 ± 2,12	53,75 ± 4,20*	
Sem 9	56,8 ± 2,23	50,4 ± 2,98	42,06 ± 2,07#	55,76 ± 1,90	49,35 ± 3,91*	
Sem 10	48,23 ± 2,01	42,88 ± 2,98	37,5 ± 2,44#	46,35 ± 2,12	48,84 ± 2,33*	
Sem 11						49,35 ± 4,11
Sem 12						44,74 ± 2,11
Consumo médio	43,29 ± 6,51	42,57 ± 6,20	41,76 ± 5,78	41,58 ± 7,18	48,84 ± 5,05	

Destacamos *P < 0,001 entre MAV e MV, e #P < 0,01 entre MV e SED.
Fonte: O autor, 2019.



Fonte: O autor, 2019.

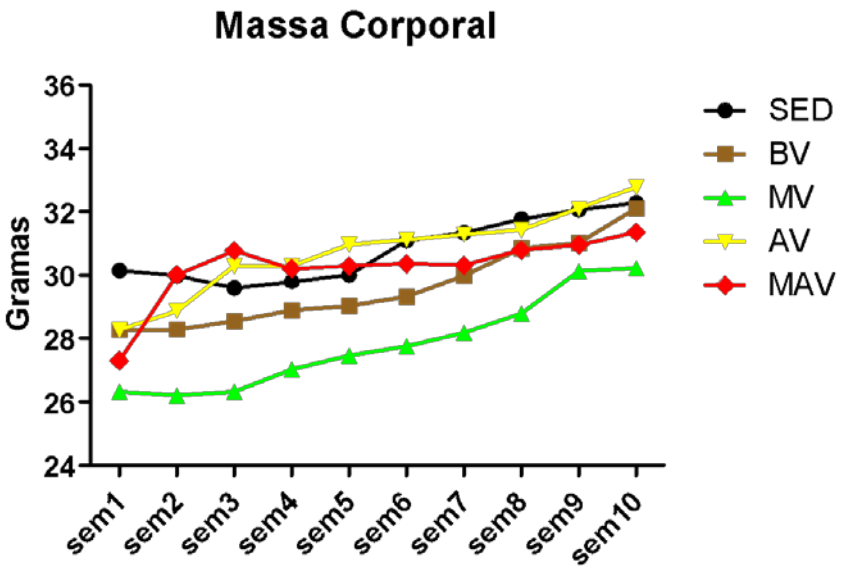
Em relação à massa corporal (mensurada em gramas), a ANOVA de duas entradas seguida do *post hoc* de Bonferroni revelou diferenças estatísticas entre as semanas (P < 0,0001), grupos experimentais (P < 0,0001) e na interação momento x tratamento (P = 0,034). Destacamos, na Tabela 6, o grupo MV com a menor massa corporal em relação aos demais grupos experimentais ao longo das semanas de intervenção.

O grupo MV apresentou diferença estatística significativa em todas as semanas em relação ao AV (P < 0,01) e ao SED (P < 0,01), exceto na nona semana. Em relação ao grupo BV, o MV apresentou menor massa corporal nas semanas 1, 2 e 8 (P < 0,05). Em relação ao grupo MAV, o MV apresentou menor massa corporal nas semanas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (P < 0,01). Também foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos BV e AV na semana 5 (P < 0,05), BV e MAV na semana 3 (P < 0,05), MAV e SED na semana 1 (P < 0,001).

Tabela 8- Massa corporal (MC), expressa em gramas, entre os diferentes grupos experimentais ao longo das semanas de treinamento (média ± desvio-padrão).

	SED	BV	MV	AV	MAV	POL
Sem 1	30,15 ± 1,33	28,27 ± 1,98	26,32 ± 1,48*	28,28 ± 1,47	27,3 ± 1,33	
Sem 2	29,98 ± 1,27	28,3 ± 1,75	26,2 ± 2,11*	28,88 ± 1,88	30 ± 1,27*	
Sem 3	29,59 ± 1,78	28,56 ± 2,12	26,33 ± 1,77*	30,28 ± 2,09	30,77 ± 1,78*	
Sem 4	29,79 ± 2,01	28,9 ± 2,29	27,01 ± 2,13*	30,3 ± 1,94	30,2 ± 2,01*	
Sem 5	30,03 ± 1,11	29,03 ± 1,54	27,47 ± 1,37*	30,97 ± 1,33	30,28 ± 1,11*	
Sem 6	31,09 ± 1,98	29,32 ± 1,12	27,75 ± 1,33*	31,13 ± 1,27	30,35 ± 2,12*	
Sem 7	31,33 ± 1,75	29,98 ± 1,81	28,19 ± 1,27*	31,29 ± 1,78	30,31 ± 2,29*	
Sem 8	31,77 ± 1,54	30,85 ± 1,5	28,8 ± 1,78*	31,43 ± 2,01	30,8 ± 1,54*	
Sem 9	32,07 ± 1,12	31,01 ± 2,29	30,11 ± 2,01	32,09 ± 1,11	30,96 ± 1,12	
Sem 10	32,28 ± 1,81	32,12 ± 2,13	30,23 ± 1,11*	32,78 ± 1,77	31,35 ± 1,81	
Sem 11						32,08 ± 2,12
Sem 12						32,58 ± 1,44
MC média	30,81 ± 1,02	29,63 ± 1,31	27,84 ± 1,49	30,74 ± 1,37	30,23 ± 1,11	

Destacamos *P < 0,01 entre MV em relação ao SED e AV, e entre MAV e MV.
Fonte: O autor, 2019.



Fonte: O autor, 2019.

4.3 **Capacidade física**

Os resultados estatísticos para os testes de capacidade física 1, 2 e 3 dos experimentos *in vitro* estão apresentados na Figura 1. A ANOVA de duas entradas seguida do *post hoc* de Bonferroni revelou diferenças estatísticas no tempo até a exaustão, registrado em minutos, entre os momentos, grupos experimentais e na interação momento x tratamento ($P < 0,0001$). Destacamos, no Gráfico 10, a progressiva melhora dos grupos AV e MV, assim como a piora de desempenho do grupo MAV do segundo para o terceiro teste de capacidade física.

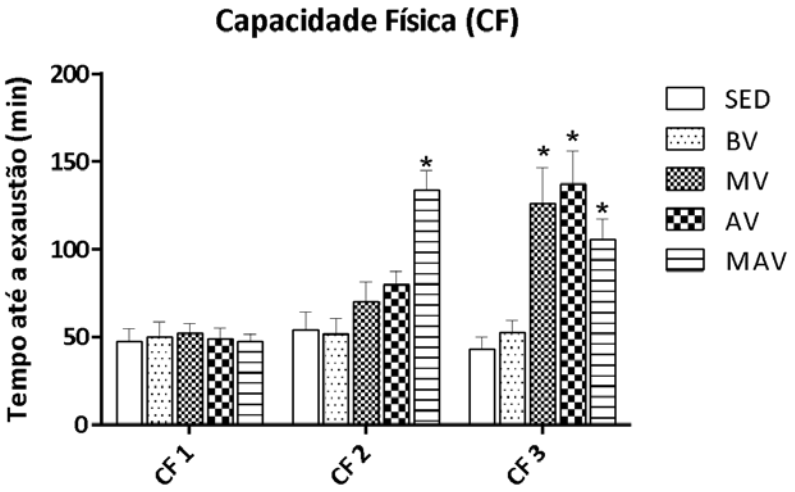
O grupo BV apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao MV ($P < 0,001$), AV ($P < 0,001$) e MAV ($P < 0,01$) no teste de capacidade física 3. O grupo AV também diferiu estatisticamente em relação ao MAV no teste de capacidade física 2 ($P < 0,001$). Não houve diferença estatística significativa entre BV e SED.

O grupo MV diferiu estatisticamente em relação ao MAV ($P < 0,001$) no teste de capacidade física 2, e em relação ao SED ($P < 0,001$) no teste de capacidade física 3. Não houve diferença estatística significativa entre MV e AV.

O grupo AV apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao MAV ($P < 0,001$) no teste de capacidade física 2, e em relação ao

SED no teste de capacidade física 3 (P < 0,001). O grupo MAV diferiu estatisticamente em relação ao SED (P < 0,001) nos testes de capacidade física 2 e 3.

Figura 1- Testes de capacidade física (tempo até a exaustão em minutos) entre diferentes grupos experimentais antes (CF1), durante (CF2) e após (CF3) o período de 10 semanas de treinamento.

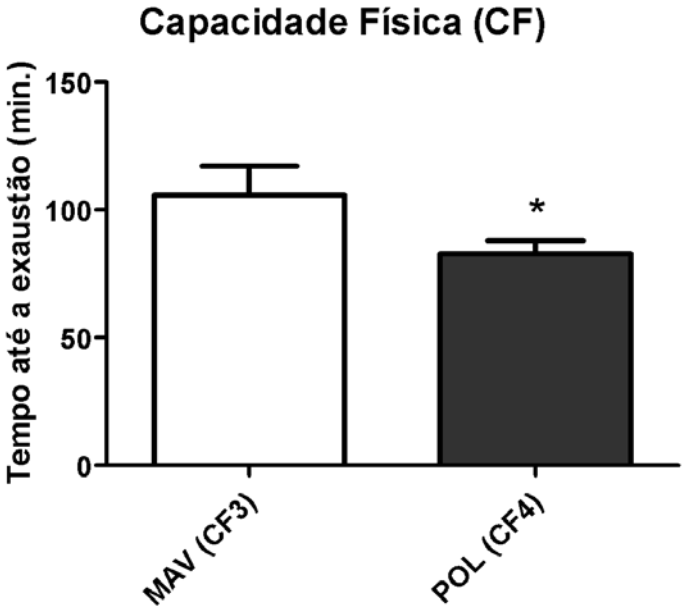


Legenda: Valores expressos em média ± EP e analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA one-way seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,001 no CF2 para MAV em relação ao SED, BV e MV; *P < 0,001 no CF3 para MV, AV e MAV em relação ao SED e BV.

Fonte: O autor, 2019.

Ainda em relação aos experimentos *in vitro*, a Figura 2 apresenta o resultado da comparação estatística (Teste *t* pareado) para o tempo até a exaustão (em minutos) entre o grupo MAV no teste de capacidade física 3 e o grupo POL no teste de capacidade física 4. Houve diferença estatística significativa (P = 0,011), indicando uma piora no rendimento do grupo POL, mesmo apesar da redução das cargas de treinamento durante duas semanas.

Figura 2- Testes de capacidade física (tempo até a exaustão em minutos) entre os grupos MAV após o período de 10 semanas de treinamento (CF3) e POL (CF4).



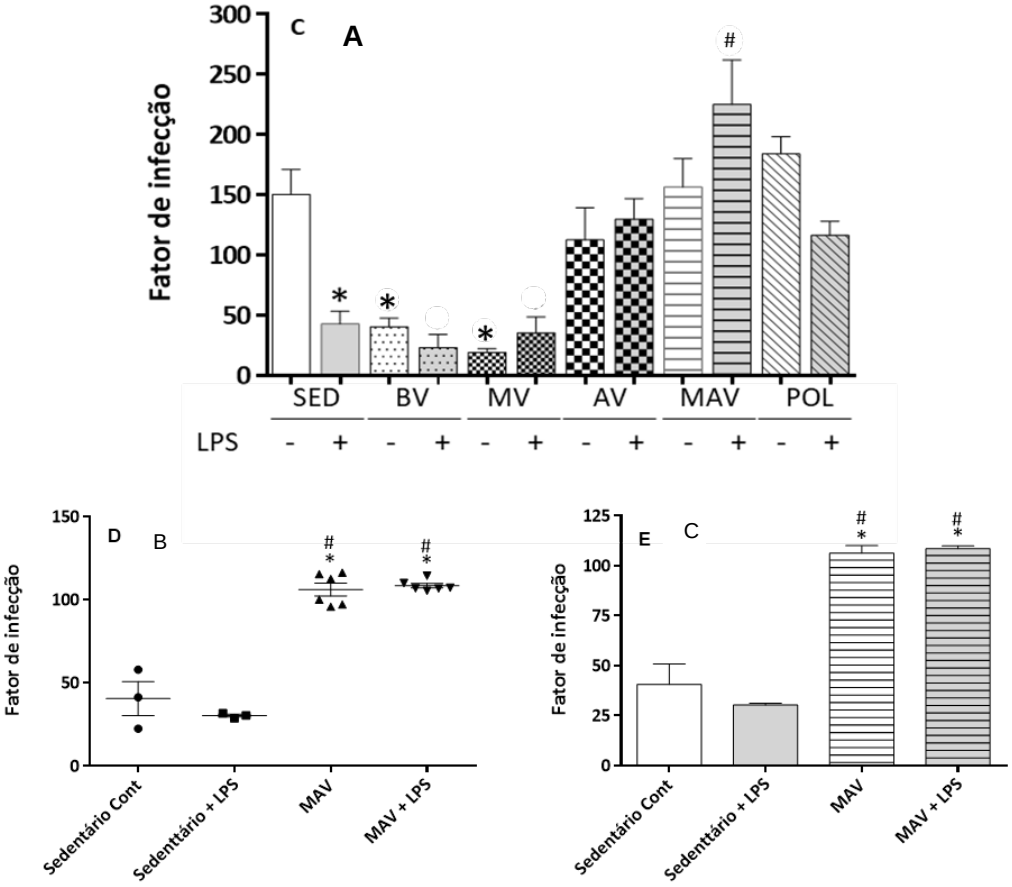
Legenda: Valores expressos em média ± EP e analisados estatisticamente utilizando-se Teste t. *P = 0,011.

Fonte: O autor, 2019.

4.4 **Efeito do exercício físico na infecção de macrófagos por *L. major***

Nos experimentos *in vitro*, o treinamento físico de BV e de MV foi capaz de melhorar a atividade microbicida dos macrófagos, inibindo significativamente seus fatores de infecção. Já o grupo POL parece ter tido sua atividade microbicida inibida, pois apresentou o maior fator de infecção (Figura 3A).

Figura 3- Efeito do exercício físico crônico na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major.*



Legenda: Os valores representam a média e o erro padrão de pelo menos 3 animais por grupo. **A** – 10 semanas de treinamento para infecção *in vitro*. **B** (Distribuição dos valores individuais dos animais) e **C** - 12 semanas de treinamento com infecção *in vivo*. Os gráficos B e C representam os mesmos grupos de animais, o gráfico de distribuição é apenas para uma melhor visualização dos resultados. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni para o gráfico A e por ANOVA de única entrada seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para os gráficos B e C. *P<0,001 em relação ao grupo sedentário sem LPS (A, B e C) e em relação ao grupo sedentário com LPS (A). # p<0,05 em relação ao grupo POL em B e p<0,001 em relação ao grupo sedentário com LPS em C, D e E.

Fonte: O autor, 2019.

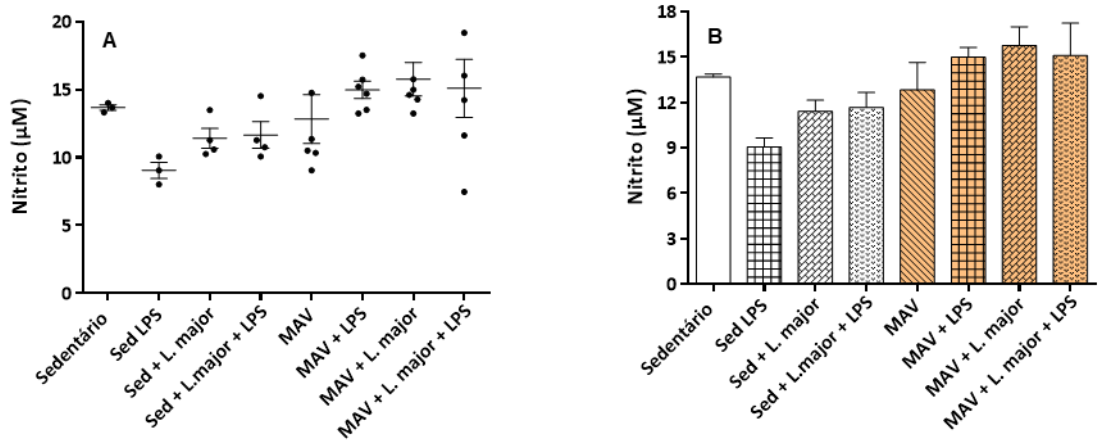
Na presença de LPS o exercício de MAV provavelmente promoveu uma inibição da capacidade microbicida dos macrófagos, apresentando o maior fator de infecção após tratamento com LPS (225 ± 90,7), o qual é significativamente maior que todos os outros grupos (Figura 3). Como anteriormente visto, o exercício BV e de MV inibiu o fator de infecção entre o parasito e sua célula hospedeira. Enquanto o exercício de MAV promoveu um aumento no fator de infecção de macrófagos tratados com LPS.

Após 12 semanas de treinamento com infecção *in vivo*, os macrófagos oriundos dos animais submetidos ao exercício de AVi (MAV na figura) e AViNP (AVI na figura) apresentam uma maior suscetibilidade à infecção por *L. major* em relação ao controle sedentário, como pode ser observado nas Figuras 3B e 3C.

4.5 **Efeito do exercício físico na produção de óxido nítrico por macrófagos**

Embora após 12 semanas de treinamento com infecção *in vivo* os macrófagos oriundos dos animais do grupo AVi (MAV na figura) tenham apresentado um aumento significativo no fator de infecção encontrado (Figuras 3B e 3C), não houve alteração na produção de óxido nítrico (Figura 4).

Figura 4 – Efeito do exercício físico crônico de muito alto volume na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C.



Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com promastigotas de *L. major* na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de nitrito dosada pelo método de Griess (Material e Métodos). **A** – Gráfico de distribuição das concentrações de NO produzido por cada animal; **B** - Gráfico do valor médio das concentrações de NO produzido por cada animal. Os dois gráficos representam os mesmos grupos de animais, o gráfico de distribuição é apenas para uma melhor visualização dos resultados obtidos por cada animal. Os valores representam a média e o erro padrão de, pelo menos, 3 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de única entrada, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Não houve diferença significativa.

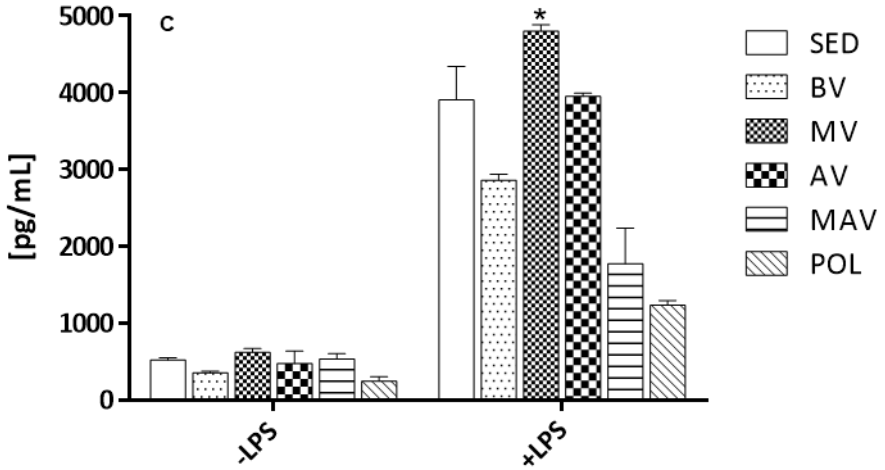
Fonte: O autor, 2019.

4.6 **Efeito do exercício físico na produção de citocinas por macrófagos**

As Figuras de 5 a 9 apresentam a concentração das citocinas TNF, MCP-1, IL-10, IL-6 e razão TNF/IL-10 dosadas no sobrenadante de macrófagos oriundos de camundongos BALB/c treinados para infecção *in vitro*. Esses macrófagos foram infectados por *Leishmania major* na ausência ou na presença de LPS.

O grupo polimento promoveu uma inibição na produção de TNF, tanto em macrófagos controle, quanto naqueles tratados com LPS (Figura 5). O exercício de MAV também promoveu uma inibição na concentração de TNF oriunda dos macrófagos tratados com LPS (Figura 5). O exercício de MV estimulou a produção de TNF por macrófagos tratados com LPS (Figura 5).

Figura 5- Efeito do treinamento físico na produção de TNF por macrófagos infectados por *Leishmania major*.

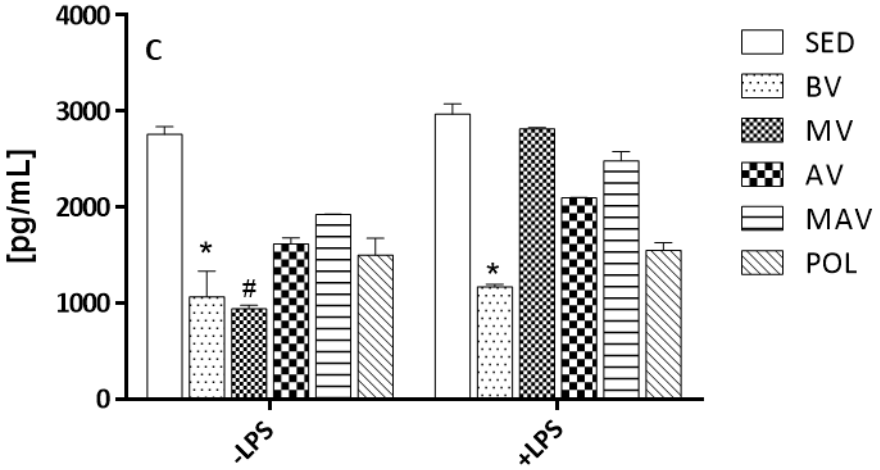


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major*) na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,05 para MV em relação ao SED, BV, AV, MAV e POL na condição com LPS. Todos os grupos tratados com LPS apresentam P<0,001 em relação ao seu respectivo controle não tratado com LPS.

Fonte: O autor, 2019.

A produção da quimiocina MCP-1 por macrófagos não tratados com LPS também foi inibida por todos os volumes de exercícios aos quais os camundongos foram submetidos (Figura 6). Já naqueles fagócitos tratados com LPS, apenas BV, AV e POL foram capazes de inibir a síntese dessa quimiocina (Figura 6).

Figura 6- Efeito do treinamento físico na produção de MCP-1 por macrófagos infectados por *Leishmania major*.

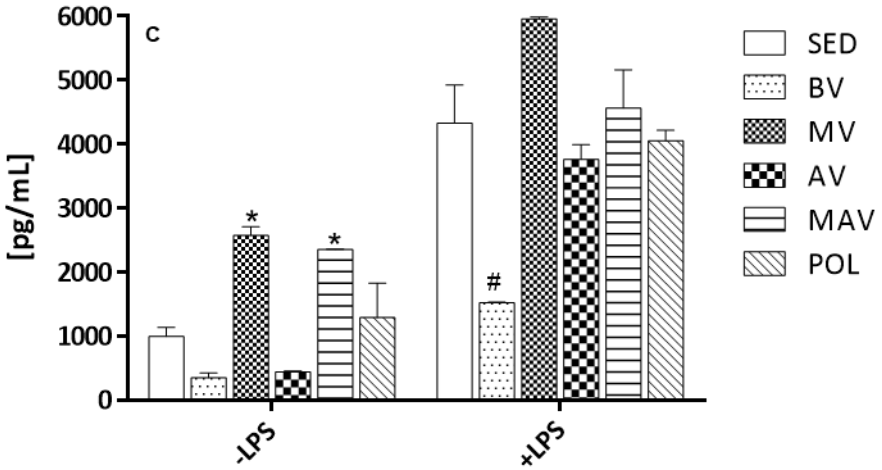


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major*) na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,05 na condição sem LPS para BV em relação ao SED, AV, MAV e POL, além de $^{\#}$P < 0,001 para MV em relação ao SED, AV, MAV e POL; *P < 0,05 na condição com LPS para BV em relação ao SED, AV, MAV e POL.

Fonte: O autor, 2019.

Os macrófagos não ativados por LPS tiveram sua produção de IL-6 estimulada nos grupos MV e MAV (Figura 7). Entretanto, somente MV continuou estimulando a produção desta citocina nos macrófagos tratados com LPS, onde o grupo BV mostrou ter sua produção diminuída (Figura 7).

Figura 7- Efeito do treinamento físico na produção de IL-6 por macrófagos infectados por *Leishmania major*.

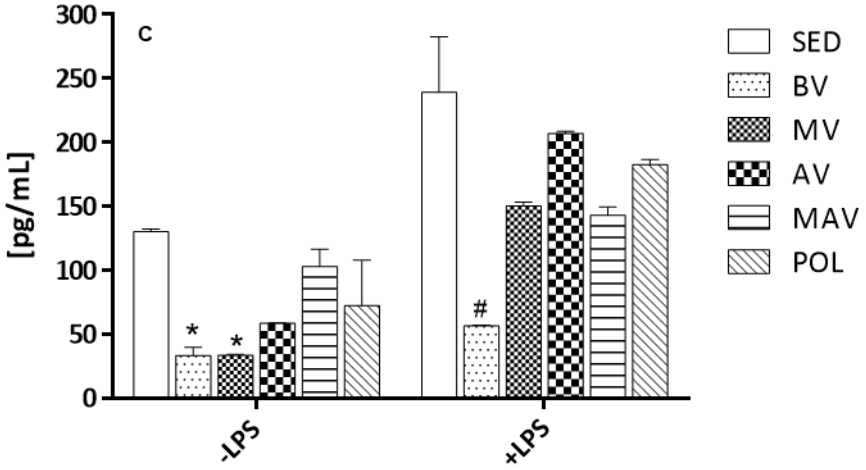


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major*) na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,05 na condição sem LPS para MV e MAV em relação ao SED, BV, AV e POL; $^{\#}$P < 0,001 na condição com LPS para BV em relação ao SED, MV, AV, MAV e POL.

Fonte: O autor, 2019.

A produção de IL-10 foi inibida por BV, MV e AV nos macrófagos não estimulados com LPS (Figura 8) enquanto que BV, MV e MAV inibiram a produção de IL-10 nos macrófagos tratados com LPS (Figura 8).

Figura 8- Efeito do treinamento físico na produção de IL-10 por macrófagos infectados por *Leishmania major*.

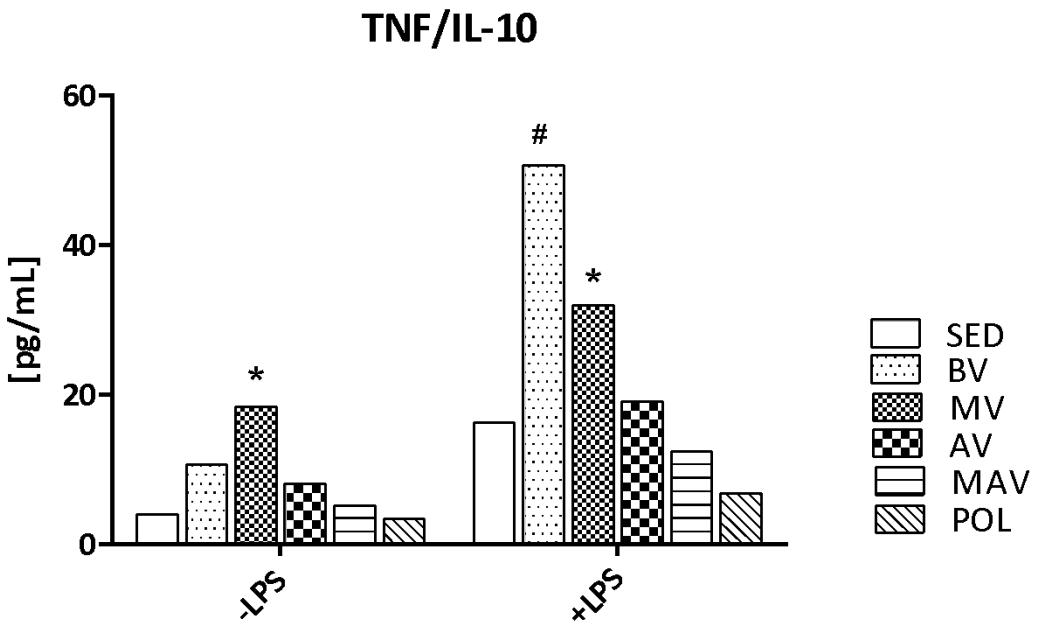


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major*) na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,01 na condição sem LPS para BV e MV em relação ao SED e MAV; #P < 0,001 na condição com LPS para BV em relação ao SED, MV, AV, MAV e POL.

Fonte: O autor, 2019.

A razão TNF/IL-10 mostrou que o grupo MV sem tratamento com LPS e os grupos BV e MV tratados com LPS apresentam valores significativamente maiores que aqueles obtidos pelo grupo sedentário e os demais grupos submetidos a volumes mais altos de exercício (Figura 9).

Figura 9- Razão entre TNF e IL-10 (Th1/Th2).



Legenda: Os valores representam as médias de TNF divididos pelos valores das médias de IL-10. Os dados foram analisados por ANOVA de duas entradas seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,001 nas condições com e sem LPS para MV em relação ao SED, BV, AV, MAV e POL; #P < 0,001 na condição com LPS para BV em relação ao SED, MV, AV, MAV e POL.
Fonte: O autor, 2019.

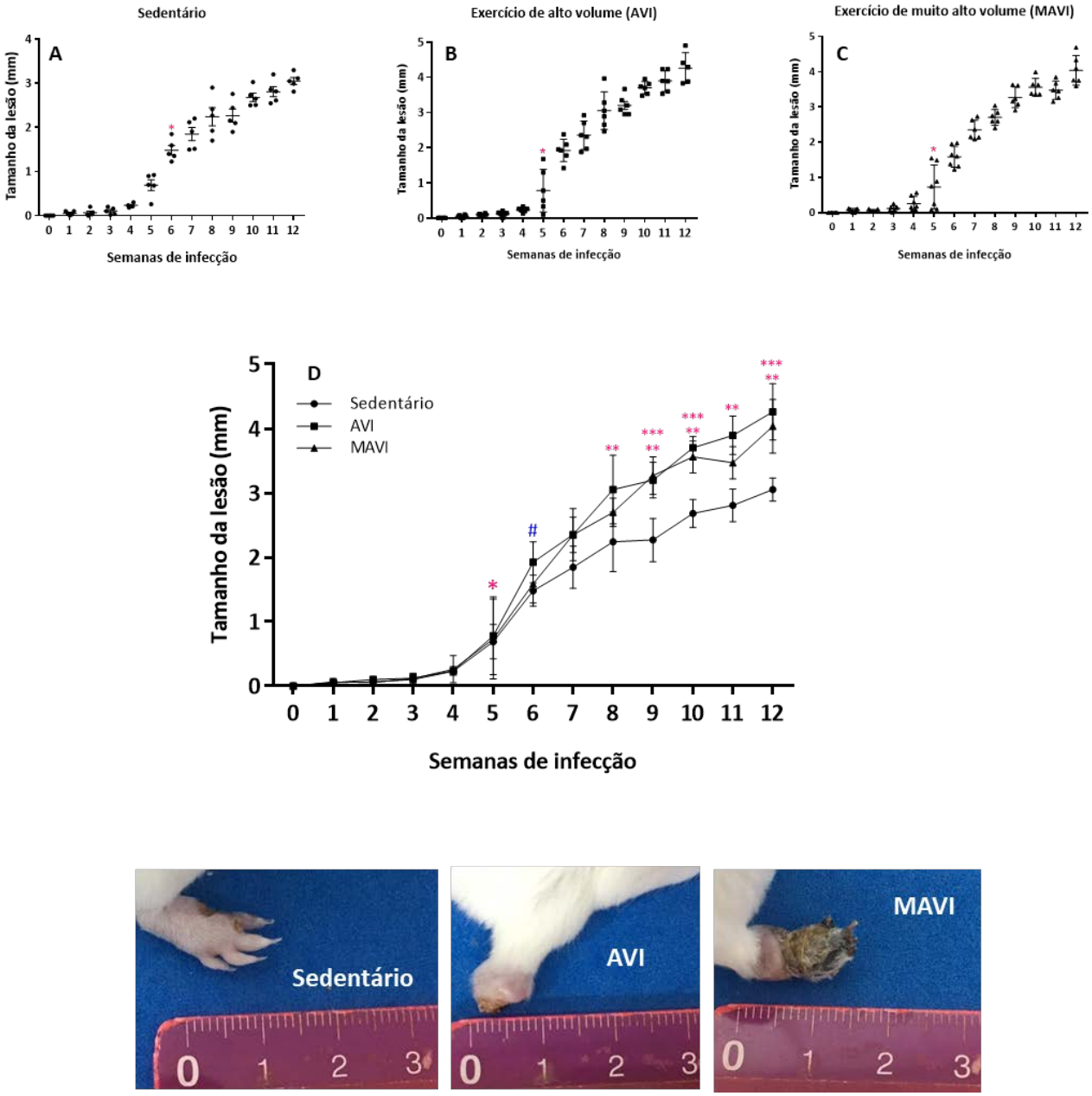
4.7 **Efeito do treinamento com infecção *in vivo* no desenvolvimento da infecção de camundongos Balb/c por *L. major***

Após 12 semanas de infecção *in vivo*, verificamos que o treinamento aumentou o desenvolvimento da lesão leishmaniótica, assim como a fez tornar-se significativa uma semana antes dos animais do grupo controle sedentário, tendo surgido na quinta semana nos animais treinados e na sexta semana nos animais controle (Figuras 10A, 10B e 10C). O exercício de AViNP (AVi nas figuras) aumentou significativamente o tamanho da lesão dos camundongos a partir da 8ª semana, enquanto o exercício de AVi (MAV nas figuras) promoveu esse efeito a partir da 9ª semana (Figura 10).

Observando as fotos representativas dos animais, percebe-se que o exercício promoveu mais necrose nas patas infectadas, chegando mesmo a fazer

com que a parte necrosada da pata caísse, como no exemplo do grupo AViNP (Figura 10).

Figura 10- Efeito do exercício físico no desenvolvimento da lesão em pata de camundongo BALB/c infectados por *L. major* ($2x10^6$ promastigotas)

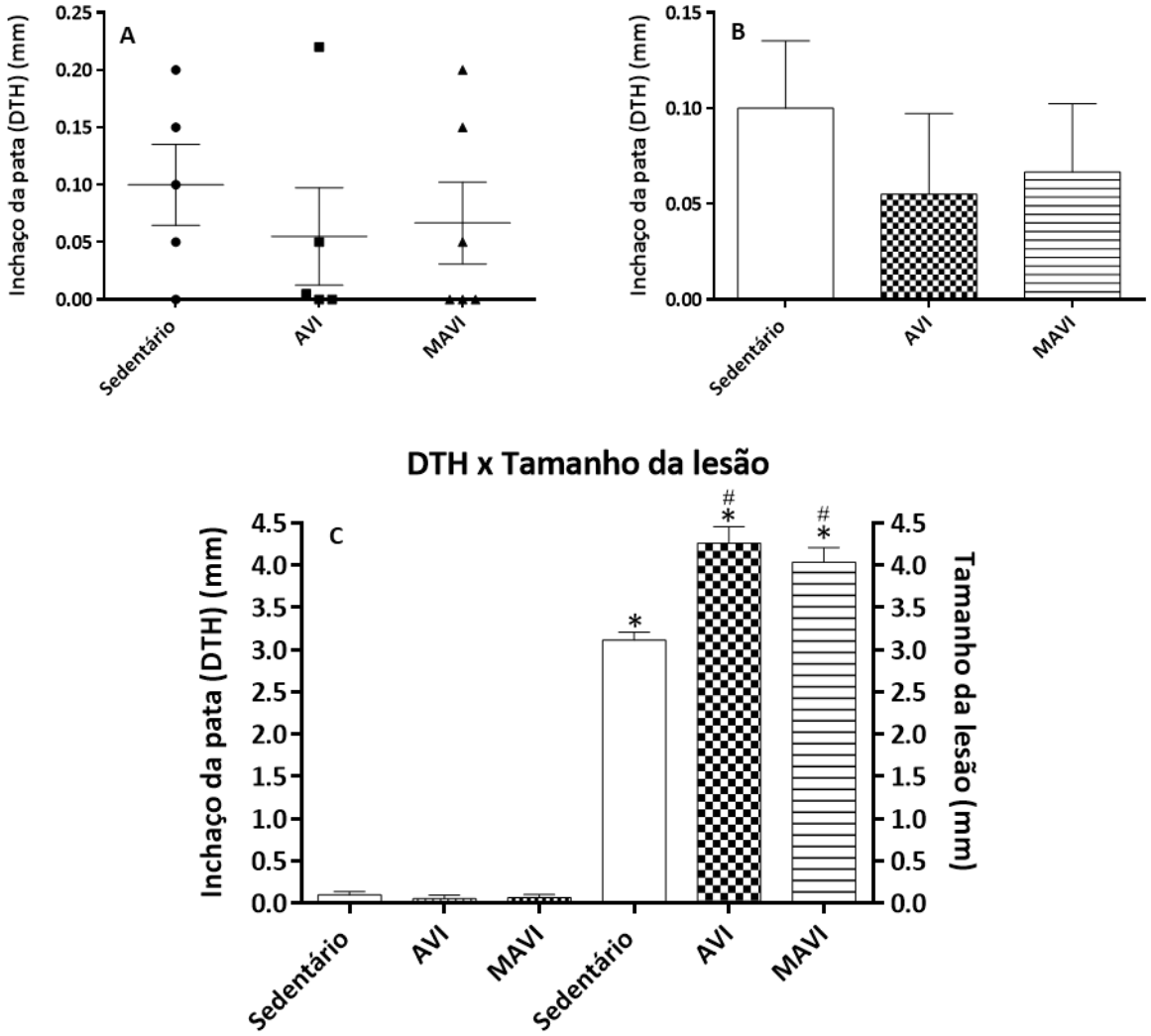


Legenda: As patas foram medidas semanalmente com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo). Os resultados expressos representam a diferença entre a medida da pata (mm) contralateral e a pata infectada, durante 12 semanas de treinamento com infecção *in vivo*. Os valores representam a média dos animais de cada grupo e as barras representam o erro padrão. **Controle** – Animais infectados e não treinados, AVI (AViNP) – Animais infectados e submetidos ao exercício de alto volume não periodizado por 12 semanas, MAVI (AVi) - Animais infectados e submetidos ao exercício de alto volume por 12 semanas. **A, B e C** – gráficos de distribuição dos valores individuais dos camundongos. **D** – Média dos valores individuais de cada animal ± desvio padrão. Os gráfico o gráfico D representa os mesmos grupos de animais mostrados nos gráficos de distribuição dos valores, o qual foi utilizado apenas para uma melhor visualização dos resultados obtidos por cada animal. As fotos são representativas de 1 animal de cada grupo. Fotos obtidas na

13ª semana. Os dados foram analisados por ANOVA de dupla entrada seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. O * indica a partir de que semana a lesão tornou-se significativa para AVI e MAVI (5ª semana) e o # indica a partir de que semana a lesão tornou-se significativa para o Sedentário (6ª semana). ** AVI com P < 0,0001 em relação ao controle sedentário a partir da 8ª semana. ***MAVI com P < 0,0001 em relação ao controle sedentário nas semanas 9, 10 e 12.
Fonte: O autor, 2019.

Após realizarmos o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) aos antígenos de *L. major* em todos os camundongos infectados, verificamos que todos os grupos não apresentaram resposta positiva (Figura 11).

Figura 11- Resposta da hipersensibilidade tardia (DTH) ao antígeno total de *Leishmania major* em camundongos BALB/c treinados ou não.



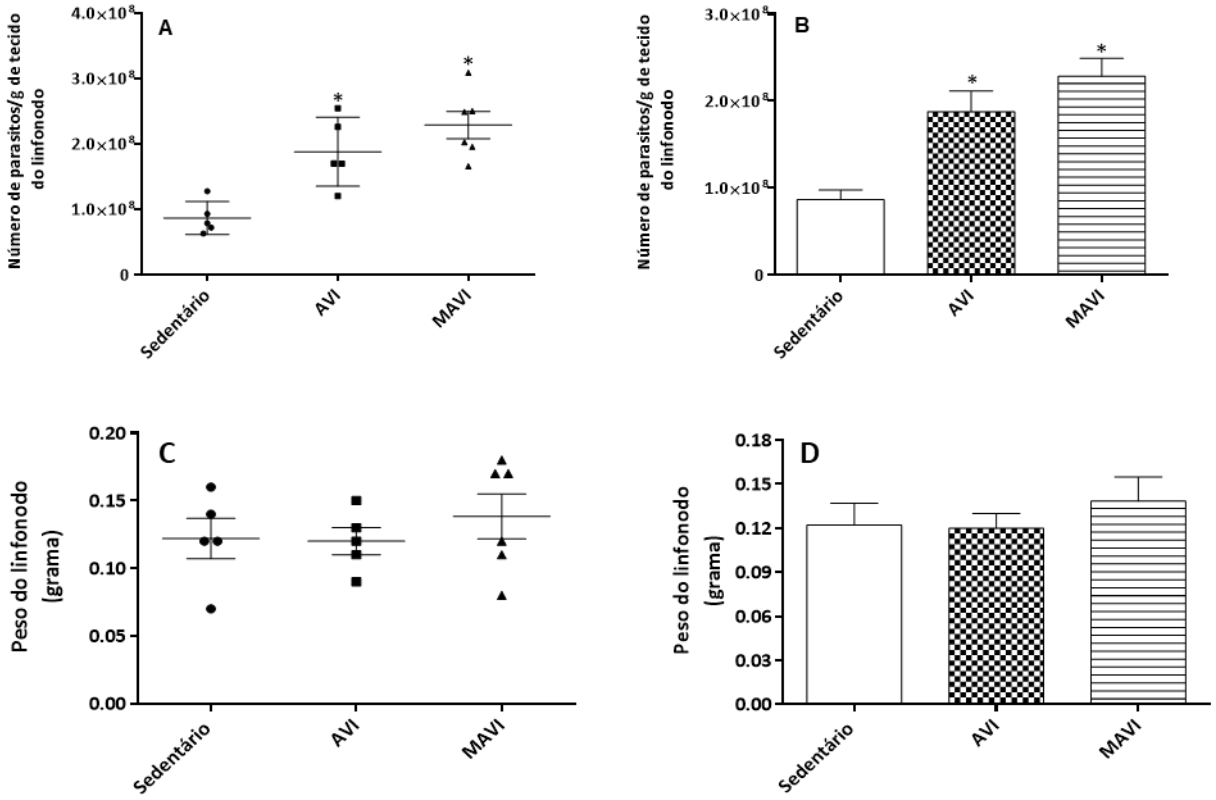
Legenda: A DTH dos camundongos foi avaliada utilizando-se 20 ⌠g de antígeno total de *L. major*, em 20 ⌠l de salina que foram inoculados na pata contralateral à infectada (traseira). Resultado da DTH após 48h do inoculo do antígeno *de L. major*. **A** – Gráfico de distribuição dos valores individuais da DTH. **B** – Média dos valores individuais da DTH de cada animal ± erro padrão **C** – Comparação entre a DTH (48 horas) e o tamanho da lesão nas patas após 12 semanas de infecção por *L. major*. Os gráficos A e B representam os mesmos grupos de animais, o gráfico de distribuição é apenas para uma melhor visualização dos resultados obtidos por cada animal. Os

valores representam a média dos animais de cada grupo e as barras representam o erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * P<0,0001 em relação aos respectivos valores do DTH. # P<0,0001 em relação ao tamanho da lesão do controle sedentário.
Fonte: O autor, 2019.

Comparando-se o tamanho do inchaço da pata em resposta à injeção dos antígenos de *L. major* na pata contralateral, percebe-se que esta foi insignificante quando comparada ao tamanho da lesão desencadeada pela infecção por este parasito (Figura 11C).

O exercício de AViNP (AVI nas figuras) e AVi (MAVI nas figuras) aumentaram significativamente a carga parasitária do linfonodo poplíteo drenante da lesão, passando de cerca de 1 x 10^8 parasitos/g de tecido para mais de 2 x 10^8 parasitos/g de tecido (Figuras 12A e 12B), embora não tenham promovido alterações no tamanho do linfonodo (Figuras 12C e 12D).

Figura 12- Carga parasitária e peso dos linfonodos dos camundongos infectados e submetidos ou não ao treinamento.



Legenda: Os parasitos foram isolados dos linfonodos após 12 semanas de infecção e quantificados através de diluição limitante em meio Schneider acrescido de 20% de SFB. Após o isolamento, foram mantidos a 26°C, até que houvesse crescimento do sistema controle sedentário na última diluição (o que ocorreu em 24h), quando todos os grupos foram quantificados através de contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, o número de parasitos foi dividido pelo peso (em gramas) do linfonodo. **A e C –** Gráfico de distribuição dos valores individuais de cada camundongo. **B e D** – Média dos valores individuais. Os gráficos A e B e os gráficos C e D representam os mesmos grupos de animais; os gráficos de distribuição são apenas para uma melhor visualização dos resultados obtidos por cada animal. Os valores representam a média e as barras representam o erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. *P < 0,0006 em relação ao controle sedentário.

Fonte: O autor, 2019.

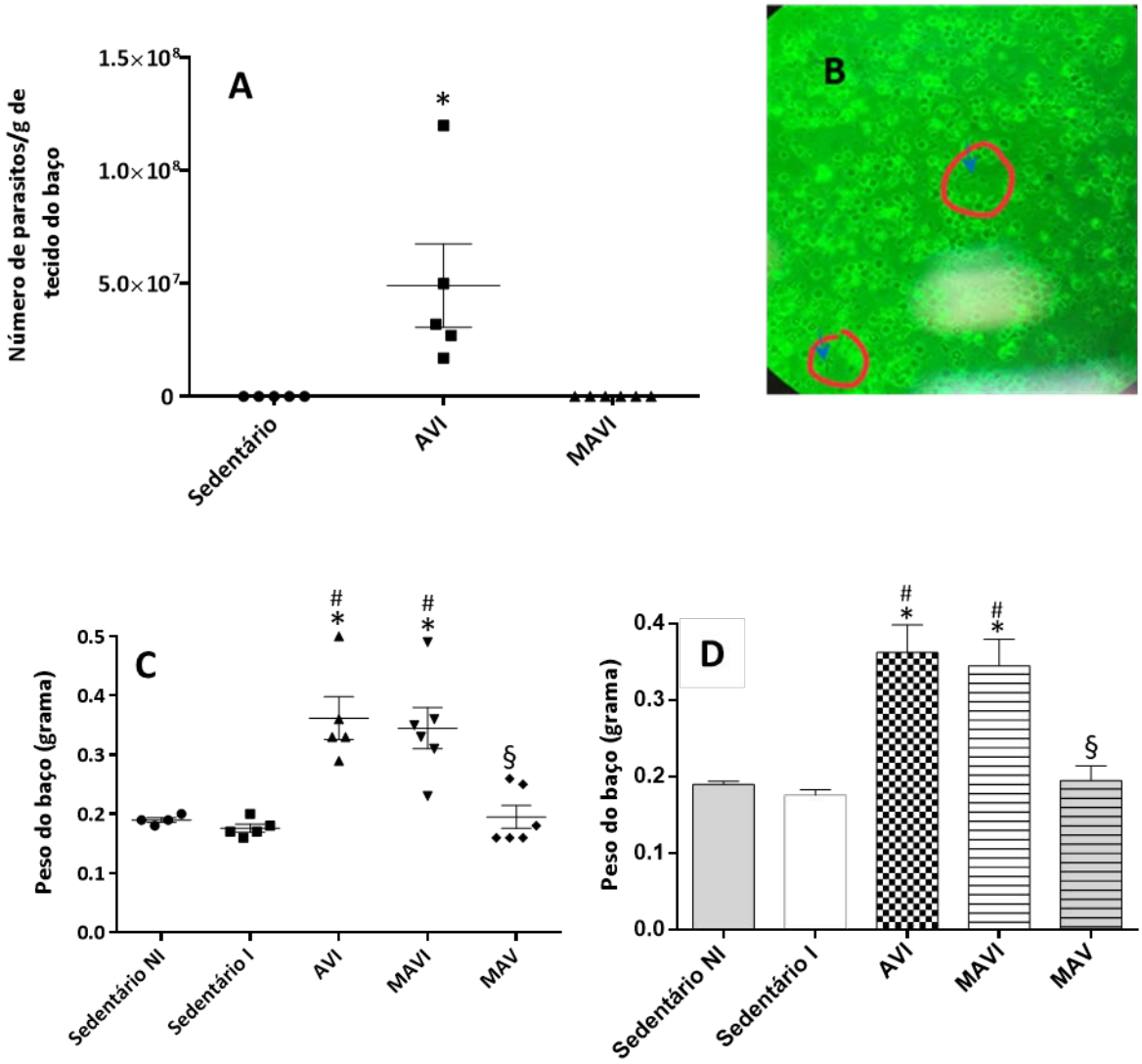
Não foi possível isolar parasitos das patas infectadas. Por esse motivo a carga parasitária foi calculada apenas nos linfonodos. Durante o desenvolvimento do curso da infecção, um camundongo do grupo AViNP morreu na décima primeira semana durante seu período de repouso, sem, contudo, ter um motivo aparente. Como já está descrito na literatura, a infecção de Balb/c por *L. major* é capaz de gerar grandes úlceras na pele que podem expandir e fazer metástase, levando o camundongo a morte (Nasseb e Modabber, 1979), resolvemos verificar se esse fato tinha se estabelecido no animal morto. Para isso, seu baço foi retirado, macerado e cultivado em meio Schneider suplementado com 10% de

SFB. Após oito dias de cultivo a 26°C, conseguimos visualizar parasitos crescendo na cultura de células do baço deste animal (dados não mostrados).

Deste modo, após a realização da eutanásia, todos os animais tiveram seus baços retirados para verificar a possibilidade de visceralização da infecção. Após 4 dias de cultivo em meio Schneider suplementado com 20% de SFB a 26°C, observamos o crescimento de promastigotas em meio ao cultivo de células esplênicas apenas nos baços oriundos dos animais do grupo AViNP (Figuras 13A e 13B). Os poços contendo as células oriundas dos animais do grupo AVi sofreram contaminação por fungos e bactérias. Contudo, essa contaminação não aconteceu em todos os poços das células isoladas dos baços dos animais sedentários, comprometendo apenas 2 animais. Não houve crescimento do parasito nos poços não contaminados.

Os animais infectados e submetidos em ambos os grupos treinados tiveram o tamanho do baço significativamente aumentado (0,362g e 0,345g, respectivamente). Já os animais sedentários, tanto os não infectados, como aqueles submetidos à infecção por *L. major*, apresentaram o mesmo tamanho de baço, em torno de 0,19g, sendo este também o peso dos baços dos animais submetidos ao exercício de AVi, mas que não sofreram infeção pelo parasito (Figuras 13C e 13D).

Figura 13- Efeito do treinamento físico na visceralização da leishmaniose *por L. major* em camundongos Balb/c: presença de parasitos no baço dos camundongos infectados e submetidos ou não ao treinamento após 4 dias de cultivo (A e B). C e D – Peso dos baços.



Legenda: Os parasitos foram isolados dos baços após 12 semanas de infecção. Os baços, após serem macerados, tiveram uma alíquota de 100µL retirada e plaqueada em meio Schneider acrescido de 20% de SFB numa diluição de 1:5. Após o isolamento, foram mantidos a 26°C, até que houvesse crescimento de parasitos em um dos sistemas, quando foram quantificados através de contagem em câmara de Neubauer. O número de parasitos, então, foi dividido pelo peso dos baços em grama. **A e C –** Gráfico de distribuição dos valores individuais de cada camundongo. **B** – Foto representativa de um dos poços da placa de 24 poços após 4 dias de incubação (AVI), mostrando o parasito presente, sendo destacado pelo círculo vermelho e pela seta azul. **D** – Média dos valores individuais. Os gráficos C e D representam os valores dos mesmos grupos de animais; o gráfico de distribuição é apenas para uma melhor visualização dos resultados obtidos por cada animal. Os valores representam a média e as barras o erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. *P < 0,0057 em relação ao controle sedentário e ao grupo MAVI em A. *P < 0,0001 em relação ao sedentário não infectado (NI) em C e D. #P < 0,0001 em relação ao sedentário infectado (I) em C e D. §P < 0,0001 em relação aos grupos AVI e MAVI em C e D.

Fonte: O autor, 2019.

5 **DISCUSSÃO**

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito do treinamento aeróbio em diferentes volumes na modulação da função de macrófagos infectados com *Leishmania major*. Foram testadas as seguintes hipóteses: (1) o treinamento aeróbio de muito alto volume compromete a capacidade física; (2) o treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência de treinamento são condições que aumentam a suscetibilidade de infecções em macrófagos (*in vitro*) em relação ao treinamento com volume moderado; (3) o treinamento de volume moderado direciona o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente celular; (4) o treinamento aeróbio de muito alto volume e a ausência do treinamento são condições que direcionam o perfil de citocinas para uma resposta imune predominantemente humoral; (5) o polimento de duas semanas com redução do desempenho caracteriza a exaustão e é acompanhado de maior suscetibilidade de infecções em macrófagos (*in vitro*), e; (6) o treinamento aeróbio de alto volume aumenta a suscetibilidade dos animais à infecção *in vivo* por *Leishmania major*.

No decorrer das 10 semanas de intervenção o grupo MAV apresentou um maior consumo alimentar em relação ao MV, enquanto a massa corporal do grupo MV foi menor em relação aos grupos SED, AV e MAV desde o início das intervenções. O teste de capacidade física após cinco semanas revelou o melhor desempenho para o grupo MAV. Entretanto, ao final das 10 semanas, não houve diferença estatística entre os grupos MAV, MV e AV, além de que o grupo POL piorou o desempenho em relação ao grupo MAV. O grupo MV apresentou o menor índice de infecção na condição sem LPS, enquanto o grupo MAV, mesmo na presença de um potente estimulador da resposta imune (condição com LPS), exibiu o maior índice de infecção. O padrão nas concentrações de citocinas obtidas *in vitro* sugere um perfil predominante da resposta celular no grupo MV. O treinamento aeróbio de alto volume aumentou a suscetibilidade dos animais à infecção *in vivo* por *Leishmania major*. Com isso, podemos afirmar que as hipóteses testadas foram confirmadas.

O exercício físico tem sido associado a inúmeros benefícios biológicos e funcionais (FIUZA-LUCES; GARATACHEA; BERGER; LUCIA, 2013). Existem

protocolos intensos potencialmente benéficos, como por exemplo, o treinamento intervalado de alta intensidade (BURGOMASTER; HOWARTH; PHILLIPS; RAKOBOWCHUK *et al.*, 2008; BURGOMASTER; HUGHES; HEIGENHAUSER; BRADWELL *et al.*, 2005; GIBALA; MCGEE, 2008). O lactato, cuja produção é aumentada em atividades muito intensas, vem sendo associado à biogênese mitocondrial (GOHIL; BROOKS, 2012), sinaptogênese (SOBRAL-MONTEIRO-JUNIOR; MAILLOT; GATICA-ROJAS; ÁVILA *et al.*, 2019) e, portanto, à promoção da saúde e qualidade de vida. Entretanto, os efeitos desejáveis do exercício parecem depender de uma posologia adequada, ou seja, uma dose capaz de não provocar efeitos colaterais. Períodos de recuperação curtos entre as sessões de exercício, além do aumento do volume e intensidade do treinamento, estresse mental e má alimentação estão relacionados ao comprometimento não apenas do rendimento atlético, como também da saúde (CADEGIANI; KATER, 2017; 2019). Este estudo evidenciou que tanto a inatividade física como o treinamento de muito alto volume pode impactar negativamente em funções biológicas, como o sistema imune.

O exercício físico tem sido considerado o “melhor remédio” (DEWEERDT, 2011) em função de evidências epidemiológicas relacionadas à saúde pública. No entanto, sua efetividade é questionada com frequência na área experimental. O exercício regular apresenta benefícios até o desenvolvimento da exaustão crônica, cuja definição operacional diverge entre autores e cujo processo fisiológico continua pobremente compreendido até hoje (CADEGIANI; KATER, 2019; FARHANGIMALEKI; ZEHSAZ; TIIDUS, 2009; MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Parece prevalecer o paradigma de que apenas atletas de elite experimentam sintomas da síndrome do *overtraining*. Esta condição se assemelha com algumas doenças crônicas não transmissíveis, apresenta etiologia multifatorial, ampla variação entre indivíduos, inespecificidade, além de que seu desenvolvimento não se restringe às variáveis clássicas do treinamento (frequência, duração, intensidade e intervalo das sessões) (CADEGIANI; KATER, 2019; GUIMARÃES; COSTA; ALONSO; RUBINI *et al.*, 2018; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017; MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). “Qualquer coisa” e “quanto mais melhor” podem ser estratégias de adesão ao exercício incompatíveis com o equilíbrio necessário ao pleno funcionamento dos sistemas orgânicos.

Poucos estudos testaram a hipótese de que o sistema imunológico é cronicamente alterado pelo excesso de estresse provocado pelo exercício físico. Existem limitações éticas em pesquisas com seres humanos e por essa razão animais devem ser utilizados em desenhos experimentais. Até onde sabemos, somos o primeiro grupo a aplicar um protocolo de treinamento de muito alto volume, comparar com outros cinco protocolos menos volumosos, realizar um período de descanso ativo (polimento/*tapering*), expor resultados de capacidade física e infectar animais *in vitro* para avaliar funções específicas do sistema imune.

Consumo alimentar e massa corporal: experimentos *in vitro*

O peso de músculos e órgãos linfoides tem sido utilizado como parâmetro complementar no estudo das repercussões metabólicas induzidas pelo exercício (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; FERRARESSO; DE OLIVEIRA; MACEDO; NUNES *et al.*, 2012; WOODS; CEDDIA; ZACK; LOWDER *et al.*, 2003; XIAO; CHEN; DONG, 2012). Protocolos de treinamento que induzem o *overtraining* em cobaias animais inibem o crescimento muscular do gastrocnêmio (DONG; CHEN; WANG; YU *et al.*, 2011; XIAO; CHEN; DONG, 2012). Um maior consumo alimentar nessas condições pode aumentar a reserva de glicogênio pode evitar o catabolismo e representar um importante efeito protetor contra a proteólise muscular (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016). Embora o presente estudo não tenha avaliado o peso de músculos e órgãos linfoides, encontramos diferenças estatísticas significativas em relação ao consumo alimentar e massa corporal entre os diferentes grupos experimentais. O grupo MAV apresentou maior consumo alimentar em relação ao grupo MV, que por sua vez consumiu menos ração ao longo das 10 semanas de treinamento em relação ao grupo SED. Embora a massa corporal tenha sido menor no grupo MV em relação aos grupos SED, AV e MAV, destacamos que tal diferença foi verificada desde o início da intervenção. Não se pode afirmar, portanto, que o treinamento tenha sido determinante para o controle da massa corporal.

Todos os grupos seguiram a mesma tendência de ganho de peso ao longo das 10 semanas de treinamento. Não se pode comparar o impacto da hipertrofia muscular ou mobilização e utilização de gorduras no metabolismo energético entre

diferentes grupos experimentais, pois apenas a massa corporal total foi avaliada. Além da avaliação do peso dos músculos, o peso dos órgãos linfoides também pode ser utilizado para avaliar o impacto do exercício sobre a perturbação da homeostase, incluindo o sistema imune (WOODS; CEDDIA; ZACK; LOWDER *et al.*, 2003). Em condições normais, os órgãos linfoides reagem positivamente ao estímulo da atividade física e se desenvolvem (TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012). Porém, o exercício extenuante de forma crônica leva a uma atrofia do timo (WOODS; CEDDIA; ZACK; LOWDER *et al.*, 2003).

A insulina e as vias da fome (orexigênicas) e saciedade (anorexigênicas) podem comprometer o consumo alimentar e a massa corporal em períodos de supertreinamento. A insulina tem a sua função comprometida pelo estado de *overtraining*, afetando inclusive fatores relacionados à função imunológica (PEREIRA; PAULI; DE SOUZA; ROPELLE *et al.*, 2014). O fígado promove o aumento da gliconeogênese, o que pode levar a uma maior produção de insulina, comprometendo sua afinidade com receptores da membrana plasmática em longo prazo. Um protocolo de oito semanas envolvendo três grupos de ratos sob diferentes combinações de treinamento (sedentário, moderado e extenuante) evidenciou uma alteração na via de sinalização desses receptores de insulina com aumento concomitante de um complexo enzimático ligado à resposta celular de inflamação (PEREIRA; PAULI; DE SOUZA; ROPELLE *et al.*, 2014). Além disso, a insulina também participa, em conjunto com o peptídeo YY, leptina e grelina, da regulação da atividade dos neurônios anorexigênicos e orexigênicos (BELL; WALLEY; FROGUEL, 2005). O hipotálamo é a estrutura do sistema nervoso central que monitora e controla funções vitais, como por exemplo, a homeostase energética, fome e saciedade através desses neurônios (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL; SIEGELBAUM *et al.*, 2014).

O treinamento aeróbio no grupo MV parece ter promovido o equilíbrio entre a fome e saciedade, refletindo um melhor controle da ingestão de alimento em relação aos demais grupos ao longo das semanas de intervenção. As projeções sinápticas excitatórias e inibitórias do hipotálamo para outras regiões do cérebro como o córtex frontal, amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, tálamo, área tegmental ventral, locus coerelus, núcleos da rafe, sistema límbico de recompensas e regiões motoras são alteradas em condições de estresse como o distúrbio do sono e a síndrome metabólica, por exemplo (ADAMANTIDIS; DE

LECEA, 2009). A integração entre áreas centrais e periféricas permite ajustes no metabolismo, alerta, sono, motivação e comportamentos apropriados à preservação da vida (ADAMANTIDIS; DE LECEA, 2009). É de se esperar, portanto, que diferentes condições perturbadoras da homeostase possam impactar diretamente no consumo alimentar e massa corporal do organismo.

Capacidade física: experimentos *in vitro*

As tentativas na prática de aplicação de cargas extremas podem provocar uma reação negativa na adaptação (GOMES, 2009). O processo adaptativo não é uma função linear da carga física, existe um limite individual de adaptação (GOMES, 2009). A deterioração da performance constitui-se como principal desfecho, considerado o fator consensual para constatação do *overtraining* (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY et al., 2013).

O grupo MAV exibiu o melhor desempenho no teste de capacidade física 2, todavia, ao final das 10 semanas seu rendimento piorou e não foram encontradas diferenças estatísticas significativas em relação aos grupos AV e MV (teste de capacidade física 3). Para investigar se os animais estavam em *overtraining* ou *overreaching*, realizamos o período de polimento, que consistiu de duas semanas de treinamento com o volume reduzido. O *overreaching* pode ser entendido como uma exaustão temporária, provocado pelo excesso de treinamento físico e estresse, que resulta na diminuição parcial do desempenho, cuja recuperação ocorre de duas a quatro semanas (HALSON; JEUKENDRUP, 2004). O treinamento intensificado é frequentemente utilizado para melhorar o desempenho. Quando há uma recuperação apropriada, um efeito de supercompensação de adaptações fisiológicas pode ocorrer, seguido da melhora na performance em comparação com os níveis da linha de base (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Verificamos que o grupo POL piorou ainda mais o desempenho em relação ao grupo MAV no seu terceiro teste de capacidade física, sugerindo a ocorrência do *overtraining* e a confirmação de que o tipo de treinamento adotado neste grupo foi severo e extenuante.

A “síndrome inexplicável do baixo desempenho” (*unexplained underperformance syndrome*), termo proposto para a substituição de síndrome do *overtraining*, foi definida como um decréscimo persistente na capacidade de

performance apesar de duas semanas de repouso relativo (MEEUSEN; DUCLOS; FOSTER; FRY *et al.*, 2013). Esta condição pode ser causada pela liberação excessiva de citocinas durante e após o exercício ("doença por citocinas"), provocando um estado inflamatório crônico (ROBSON, 2003). Gholamnezhad et al. (2014) verificaram que duas semanas de redução gradual nas cargas de treinamento não foram suficientes para reverter a imunossupressão celular provocada pelo direcionamento do perfil de citocinas para uma resposta humoral em ratos. Tanto os achados de Gholamnezhad et al. (2014), ainda que os autores não tenham publicado os dados de performance física, como os resultados expostos no presente estudo são compatíveis com a teoria proposta por Robson (2003) em relação ao desenvolvimento da exaustão e desequilíbrio imune, apesar de duas semanas de repouso ativo relativo. A capacidade física deteriorada no grupo POL somada ao maior índice médio de infecção e perfil de citocinas predominantemente relacionado à resposta extracelular reforçam os indícios de que o protocolo de treinamento do grupo MAV adotado neste estudo foi severo.

Fator de infecção e citocinas: experimentos *in vitro*

Nossos achados indicaram uma melhora progressiva de performance no grupo MV associado a um menor índice de infecção na condição sem LPS, enquanto o grupo MAV reduziu o desempenho na segunda metade do treinamento exibindo o maior índice de infecção, mesmo estimulado com LPS. O treinamento nos grupos BV e MV foi capaz de melhorar a atividade microbicida dos macrófagos, inibindo significativamente seus índices de infecção, ao contrário do grupo MAV, que apresentou uma capacidade microbicida inibida (maior fator de infecção). O grupo SED também apresentou maior suscetibilidade de infecções nos macrófagos, indicando sua reduzida capacidade microbicida, assim como o grupo POL, apesar da redução das cargas de estresse físico por duas semanas. O padrão nas concentrações de citocinas obtidas *in vitro* sugere um perfil de resposta imune predominantemente celular (pró-inflamatória) no grupo MV, enquanto nos grupos SED, MAV e POL percebe-se uma resposta predominantemente humoral (anti-inflamatória).

No estudo de Ceddia e Woods (1999), foi verificado que camundongos experimentaram uma supressão na apresentação de antígenos por macrófagos

após quatro dias de treinamento exaustivo. Estudos com maior tempo de intervenção, como o de Ru e Peije (2009), onde ratos foram submetidos a nove semanas de treinamento progressivo, também verificaram uma imunossupressão celular com predominância de perfil humoral. O efeito anti-inflamatório impede o dano tecidual causado pelos mediadores inflamatórios e reduz o risco de doenças inflamatórias crônicas, mas aumenta a susceptibilidade de infecções por microrganismos intracelulares (ELENKOV, 2004; GLEESON, 2006; TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013). Por outro lado, o treinamento moderado pode equilibrar as respostas pró e anti-inflamatória, com discreta prevalência do perfil celular sobre o humoral, favorecendo o controle de infecções causadas por microrganismos intracelulares (GLEESON, 2006; TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012). Os achados do presente estudo são compatíveis com a literatura, pois a combinação moderada da frequência, duração e intensidade do exercício promoveu não somente o desempenho como também a função de macrófagos.

Também convergirmos com os achados de Gholamnezhad et al. (2014), que investigaram o efeito de oito semanas de treinamento moderado e onze semanas de treinamento severo (*overtraining*) na concentração plasmática de citocinas de ratos não infectados. O treinamento moderado promoveu a imunidade celular enquanto no grupo de treinamento severo e no controle sedentário foi observada uma imunossupressão celular, associada ao direcionamento da resposta para o perfil Th2 (GHOLAMNEZHAD; BOSKABADY; HOSSEINI; SANKIAN *et al.*, 2014).

A Sociedade Internacional de Imunologia do Exercício, em seu posicionamento oficial, aponta que o desequilíbrio imune pode ser observado após o exercício contínuo, prolongado, em intensidade variando de moderada a alta (PEDERSEN; STEENSBERG; FISCHER; KELLER et al., 2003; WALSH; GLEESON; PYNE; NIEMAN et al., 2011). Dados do nosso grupo com infecção *in vivo*, utilizando o modelo de Leishmania major em camundongos Balb/c, mostraram que um período de 12 semanas de treinamento de natação, em intensidade moderada, promoveu a resposta imune celular através do predomínio de um perfil do tipo Th1 (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO et al., 2013). Houve um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias (por

exemplo, TNF-α e IFN-γ) e redução de citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10 e IL-4) através do treinamento moderado em comparação ao grupo sedentário (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO et al., 2013). O protocolo de treinamento físico moderado tem se mostrado capaz não só de evitar o desenvolvimento da doença, como também de reverter o quadro da infecção já estabelecida (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013; TERRA; ALVES; LIMA; GOMES *et al.*, 2019). Nossos achados convergem com o posicionamento da Sociedade Internacional de Imunologia do Exercício e dados prévios do próprio grupo, pois o treinamento moderado protegeu contra a infecção, ao contrário do treinamento de maior volume.

De acordo com o conceito de Hormese, respostas biológicas favoráveis geralmente ocorrem devido à exposição adequadamente controlada a estímulos estressores (RADAK; CHUNG; GOTO, 2008). Essa teoria remete à curva em U invertido, contextualizada pelo nosso grupo na relação entre a dose de estresse físico e o direcionamento para uma resposta imune protetora (equilíbrio entre o perfil pró e anti-inflamatório com discreta predominância do perfil pró-inflamatório) ou vulnerável (predominância do perfil anti-inflamatório) (APÊNDICE C – página 96) (GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017). Os achados do presente estudo são compatíveis com o conceito hormese e a curva em U invertido. A razão entre a citocina pró-inflamatória TNF e a citocina anti-inflamatória IL-10 na condição sem LPS (Figura 9) expressa perfeitamente a ocorrência do U invertido e a ideia de que não apenas a inatividade física deve ser a principal preocupação da comunidade científica e profissional. O estresse crônico excessivo provocado pelo treinamento físico gera imunossupressão celular e aumenta a suscetibilidade a infecções, podendo comprometer a saúde tal qual o sedentarismo.

A razão TNF/IL-10 na condição com LPS (Figura 9) destacou o grupo BV em relação aos demais. Cabe ressaltar, como introduzido inicialmente, que uma exacerbação da resposta do tipo Th1 (hiperergia) leva a crescente destruição do tecido onde há presença de antígenos parasitários. Nestes casos, os níveis de IFN-γ e TNF são muito altos, associados a uma produção relativamente baixa de IL-10.

Linhagens distintas de camundongos apresentam susceptibilidade e resistência à infecção por parasitos de forma diferenciada (TERRA; ALVES; GONÇALVES DA SILVA; SALERNO *et al.*, 2013). A resistência dos camundongos

C57BL/6 está relacionada com a resposta celular protetora, ao contrário dos camundongos Balb/c, susceptíveis ao desenvolvimento progressivo de lesões não cicatrizantes estando (MOSMANN; CHERWINSKI; BOND; GIEDLIN *et al.*, 2005). Barthelmann et al. (2011) observaram o desenvolvimento da lesão leishmaniótica em camundongos Balb/c (susceptíveis) e C57BL/6 (resistentes) infectados por *Leishmania major*. Os autores analisaram o curso da lesão, carga parasitária e o perfil de citocinas em células de lifonodo drenante e no sítio da infecção (pele), dentre outras variáveis (BARTHELMANN; NIETSCH; BLESSENOHL; LASKAY *et al.*, 2012). O curso da lesão em camundongos susceptíveis foi semelhante ao encontrado no estudo de Terra et al. (2013). Os animais resistentes utilizados por Barthelmann e colaboradores (2011) apresentaram baixa carga parasitária em relação aos susceptíveis e um padrão de citocinas do tipo Th1 em células do linfonodo e no sítio da lesão. Esse perfil foi semelhante ao encontrado no estudo de Terra et al. (2013) com animais susceptíveis submetidos ao exercício moderado, corroborando com a ideia de que este estímulo pode promover efeito protetor contra patógenos intracelulares. Mais uma vez, nossos achados corroboram com a literatura, à medida que o treinamento moderado promoveu um perfil de resistência, ao contrário da suscetibilidade encontrada nas condições sedentária e de treinamento de muito alto volume.

A citocina IL-6 é produzida, principalmente, por monócitos, macrófagos e células musculares. Pode ser considerada pró e anti-inflamatória. Alguns de seus efeitos são a explosão respiratória em neutrófilos, produção de proteínas de fase aguda, inibição de IL-1 e TNF, captação de glicose no músculo esquelético, lipólise no tecido muscular e adiposo, além da gliconeogênese hepática (TERRA; SILVA; SALERNO; DUTRA, 2012). Nossos achados indicaram que os dois grupos com maior produção de IL-6 em relação aos demais foram o MV e MAV, corroborando o importante papel regulador desta citocina para a preservação do equilíbrio (grupo MV) ou a sua restauração diante de uma severa perturbação da homeostase (grupo MAV).

Efeito do exercício na infecção *in vivo* de camundongos Balb/c por *L. major*

Nossos dados mostram que os exercícios de alto volume e de muito alto volume promoveram um aumento na suscetibilidade de camundongos Balb/c à

infecção por *L. major* (Figura 10). Estes dados estão de acordo com a literatura que mostram que exercícios de alta intensidade podem elicitar uma resposta do tipo Th2, anti-inflamatória, e favorecer infecções por microrganismos intracelulares (ELENKOV, 2004; GLEESON, 2006). A razão TNF/IL-10 realizada nos resultados das citocinas dos macrófagos, reforçam a hipótese da predominância de uma resposta Th2 nos camundongos submetidos ao exercíco de alto volume e de muito alto volume. Camundongos Balb/c apresentam naturalmente um padrão de citocinas do tipo Th2 (DUTRA e DA SILVA, 2017) e o exercício pareceu estimular ainda mais esse padrão (Figuras 9 e 10). Em resultados anteriores do nosso grupo, o exercício de intensidade moderada inibiu o desenvovlimento da infecção de camundongos Balb/c por parasitos da espécie *L. major* (TERRA *et al*., 2019).

Ao realizarmos o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) nenhum dos animais infectados apresentou resposta positiva (Figura 11). Embora não seja prova definitiva, a não responsividade aos antígenos de *Leishmania* sugere fortemente que não houve uma resposta imune celular. Ao contrário, camundongos Balb/c infectados com *L. major* e submetidos a 12 semanas de exercício de intensidade moderada apresentaram resposta DTH positiva aos antígenos deste parasito (TERRA *et al*., 2019).

As patas dos animais ficaram fortemente alteradas e não possibilitou o isolamento de parasitos. Por esse motivo, quantificamos a carga parasitária nos linfonodos drenantes da lesão. Os exercícios de AV e de MAV promoveram um aumento significativo na quantidade de parasitos/g de tecido linfóide (Figura 12). Em contrapartida, o exercício de intensidade moderada foi capaz de reduzir fortemente o número de parasitos isolados da pata dos animais infectados (TERRA *et al*., 2019), corroborando mais uma vez para a hipótese de que exercícios moderados promovem a predominância de resposta Th1 e exercícios de maior intesidade ou volume promovem a predominância de resposta do tipo Th2.

A possibilidade de metástase e visceralização da infecção de camundongos Balb/c por *L. major* já está descrita na literatura desde o final da década de 1970 (revisto por DUTRA e DA SILVA, 2017). Com a morte de um dos camundongos infectados e submetidos ao exercício de AV durante seu período de repouso, suspeitamos da possibilidade de visceralização. Ao cultivarmos o células oriundas do baço desse animal, observamos o crescimento de promastigotas após 8 dias

de incubação a 26ºC (dados não mostrados) confirmando nossa hipótese de visceralização. Ao analisarmos o peso dos baços dos animais dos grupos sedentário (infectado ou não infectado), AVI, MAVI e MAV, observamos que o exercício aumentou o tamanho dos baços somente dos animais infectados (Figura 13C e 13D), sendo, mais uma vez, compatível com a possibilidade de visceralização da infecção. Entretanto, os parasitos cresceram apenas nas culturas de células esplênicas isoladas dos baços dos animais do grupo AVI, comprovando nossa hipótese de visceralização apenas nesse grupo. No grupo MAVI houve crescimento de bactérias e fungos nas culturas de células esplênicas, o que pode ter impedido o crescimento de promastigotas de *L. major*. Na cultura das células oriundas do baço dos animais do grupo sedentário não houve contaminação e ainda assim não houve crescimento de parasitos. Deste modo, a visceralização ocorreu apenas nos animais submetidos ao treinamento (Figura 13).

Citocinas e eixo neuroimunoendocrino

Nossos achados indicam um aumento e desequilíbrio entre citocinas que participam da imunidade humoral e celular no grupo MAV, o que poderia repercutir no funcionamento do eixo neuroimunoendocrino, corroborando com as clássicas e pioneiras hipóteses de que o sistema imune participa da organização do caos provocado pelo treinamento extenuante. Esse contexto reforça a necessidade de discussões mais integradas sobre os distintos sistemas fisiológicos em futuras intervenções. Microtraumas mal reparados ocasionados pelo exercício severo associado a curtos períodos de recuperação, mesmo com a ação inflamatória aguda e local desencadeada, podem requerer uma atuação sincronizada e integrada dos sistemas nervoso, imunológico e endócrino (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; HEDELIN; KENTTÄ; WIKLUND; BJERLE *et al.*, 2000; SLIVKA; HAILES; CUDDY; RUBY, 2010).

Os microtraumas gerados pelo exercício induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, causando mais dano muscular (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; TIIDUS, 1998). Com a presença das espécies reativas de oxigênio, neutrófilos, monócitos e macrófagos infiltram-se no tecido muscular para recuperá-lo, gerando mais espécies reativas de oxigênio (via

respiratory burst), bem como mais citocinas e inflamação para a regeneração tecidual (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; TIIDUS, 1998). Essas citocinas também atuam no sistema nervoso central, no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e sistema nervoso simpático, provocando a exacerbação nos níveis sanguíneos de catecolaminas, glicocorticoides e hormônios gonadais, e induzindo um somatório de comportamentos (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016).

Pelo processo descrito, a comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imune é crucial (ROGERO; MENDES; TIRAPEGUI, 2005). O hipotálamo é o órgão responsável por coordenar as respostas decorrentes dessas interações no sistema nervoso autônomo, na hipófise, nas glândulas adrenais e gonadais, tendo sua ação alterada quando há desequilíbrio neuroendócrino (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; MACKINNON, 2000; MEEUSEN; PIACENTINI; BUSSCHAERT; BUYSE *et al.*, 2004; SMITH, 2004; STEINACKER; LORMES; REISSNECKER; LIU, 2004). As citocinas são capazes de modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e outras áreas do cérebro responsáveis pelo controle do humor e ansiedade, além da fome e saciedade (ADAMANTIDIS; DE LECEA, 2009). A ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, juntamente com a supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, pode ser governada por citocinas como IL-1β, IL-6 e TNF-α, e representam consequências relacionadas à síndrome do excesso de treinamento (CADEGIANI; KATER, 2017; SMITH, 2000).

Limitações e perspectivas futuras

Embora não tenha sido utilizado um protocolo de exaustão previamente publicado, os animais dos grupos MAV e POL apresentaram uma diminuição do rendimento, aumento do fator de infecção (capacidade microbicida reduzida), comprometimento da ativação clássica dos macrófagos, ainda que estimulados com LPS (potente estimulador da resposta imune inata) e desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias com predominância anti-inflamatória. Os animais dos grupos AVI e MAVI tiveram maior suscetibilidade à infecção *in vivo* por *L. major*, ausência de DTH positiva, aumento da carga parasitária e visceralização da

infecção (no caso do grupo AVI). Além disso, com base na literatura, o protocolo de exaustão foi suficiente para provocar um decréscimo persistente na capacidade de performance apesar de duas semanas de repouso relativo (ROBSON, 2003).

O hipotálamo é o órgão responsável, dentre várias funções, pela modulação do sistema nervoso autônomo e das glândulas adrenais e gonadais (GUYTON; HALL, 2006). Essa função moduladora resulta em alterações nas concentrações plasmáticas das catecolaminas, glicocorticoides e nos níveis de testosterona (SMITH, 2004). Como as citocinas também têm a função de manter o hipotálamo constantemente informado sobre qualquer condição perturbadora da homeostase (ROBSON, 2003), o estudo da interação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino pode ajudar na elucidação de mecanismos relacionados ao desenvolvimento da síndrome do *overtraining*.

Macrófagos são células cuja função está relacionada à imunidade inata. Porém, também desempenham um papel central na imunidade adquirida, pois apresentam antígenos para linfócitos T se diferenciarem e amplificarem a resposta imune (MURPHY, 2014). O presente estudo não investigou a expressão de citocinas por células específicas da imunidade adaptativa, a partir de sobrenadantes de tecidos como baço e linfonodo. Esses dados podem contribuir para um melhor entendimento do direcionamento do perfil imune para Th1 ou Th2 a partir de diferentes sobrecargas de treinamento físico. A dosagem de citocinas de Treg e marcação de macrófagos M1 e M2 também constituem sugestões para futuras intervenções.

O papel da nutrição no desempenho e saúde está mais do que estabelecido na literatura. A manipulação da ingestão de nutrientes tem o potencial de promover o desempenho esportivo e a recuperação entre as sessões de exercícios. Uma perspectiva futura é avaliar como diferentes nutrientes podem influenciar as adaptações ao treinamento físico, prevenindo o *overtraining* e tratando sintomas desta síndrome, especialmente o retardamento da imunossupressão celular.

Dentre as principais estratégias nutricionais, destacam-se as substâncias moduladoras do sistema imune como a glutamina, aminoácidos e proteínas para redução do dano muscular e aceleração da recuperação, além de antioxidantes e carboidratos (COUTINHO DE OLIVEIRA; BARBOSA; MASSA; PEREIRA *et al.*, 2016; GLEESON, 2006). Em situações de estresse a rota metabólica da glutamina

e outros aminoácidos, por exemplo, pode ser alterada, sendo seu fluxo desviado para o fígado e rins, participando da gliconeogênese e regulação da acidose, respectivamente, com o intuito de restabelecer as condições homeostáticas (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). A glutaminemia se eleva agudamente, seguida por diminuição no período de recuperação, sendo necessárias algumas horas para que os níveis pré-exercício sejam reestabelecidos. Dessa maneira, em decorrência de suas diversas funções fisiológicas, parte da função imune, como por exemplo, a proliferação linfocitária e função dos macrófagos pode ser comprometida contribuindo para o desenvolvimento da síndrome do *overtraining* (MACKINNON, 2000). Macrófagos utilizam altos índices de glutamina para biossíntese de energia (DOS SANTOS; CAPERUTO; DE MELLO; COSTA ROSA, 2009). Especula-se que o comprometimento na oferta deste aminoácido possa contribuir para o desenvolvimento da imunossupressão celular (DOS SANTOS; CAPERUTO; DE MELLO; COSTA ROSA, 2009; GUIMARÃES; TERRA; DUTRA, 2017).

Outras questões que merecem destaque são as possibilidades do *overreaching* e as mortes experimentais. O *overreaching* pode ser classificado em funcional (de curto prazo) ou extremo (não funcional), sendo assim, futuros estudos são necessários para elucidar o impacto de diferentes períodos de redução do treinamento no desempenho, distúrbios na homeostase fisiológica e risco de infecções. Em relação à morte experimental, dificilmente encontra-se o seu relato em pesquisas experimentais sobre *overtraining*. Não se sabe se apenas os animais mais resistentes sobrevivem aos regimes mais intensos de treinamento para se discutir um viés amostral nesses grupos quando comparados a grupos sedentários ou de exercício leve. Sugerimos que tais informações não sejam negligenciadas. Estudos que utilizem animais resistentes (C57BL/6) e suscetíveis (Balb/c) na mesma amostra podem contribuir para o aprofundamento dessas e outras discussões.

CONCLUSÃO

O treinamento aeróbio de muito alto volume comprometeu a capacidade física em longo prazo. Tanto esse tipo de treinamento como a inatividade física são condições que aumentaram a suscetibilidade de infecções em macrófagos e nos animais durante infecção *in vivo*. A distribuição coerente de cargas através do treinamento aeróbio moderado foi a melhor estratégia para a promoção da resposta imune celular, melhora da capacidade física e controle da ingestão de alimentos. Pouco exercício aeróbio não melhorou a capacidade física, mas promoveu a resposta imune celular.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9 ed. Elsevier, 2019.

ADAMANTIDIS, A.; DE LECEA, L. The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 1, p. 33-40, Jan 2009.

ALBANIDIS, E. Exercise in Moderation. Health Perspective of Hellenic Antiquity. **Nikephoros**, v. 26, p. 33-62, 2013.

AREM, H.; MOORE, S. C.; PATEL, A.; HARTGE, P. *et al.* Leisure time physical activity and mortality: a detailed pooled analysis of the dose-response relationship. **JAMA Intern Med**, 175, n. 6, p. 959-967, jun. 2015.

ARMSTRONG, L. E.; VANHEEST, J. L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression and psychoneuroimmunology. **Sports Med**, v. 32, n. 3, p. 185-209, 2002.

BARTHELMANN, J.; NIETSCH, J.; BLESSENOHL, M.; LASKAY, T. *et al.* The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell zone only three weeks after infection with Leishmania major and not during early T-cell activation. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 1, p. 25-35, Feb. 2012.

BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 3, p. 221-234, Mar. 2005.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V. *et al.* Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major. **J Immunol**, v. 143, n. 1, p. 266-274, Jul. 1989.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. **Curr Opin Immunol**, v. 8, n. 4, p. 517-525, Aug. 1996.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013.

BURGOMASTER, K. A.; HOWARTH, K. R.; PHILLIPS, S. M.; RAKOBOWCHUK, M. *et al.* Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. **J Physiol**, v. 586, n. 1, p. 151-160, Jan. 2008.

BURGOMASTER, K. A.; HUGHES, S. C.; HEIGENHAUSER, G. J.; BRADWELL, S. N. *et al.* Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 6, p. 1985-1990, Jun. 2005.

CADEGIANI, F. A.; KATER, C. E. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Functioning in Overtraining Syndrome: Findings from Endocrine and Metabolic Responses on Overtraining Syndrome (EROS)-EROS-HPA Axis. **Sports Med Open**, v. 3, n. 1, p. 45, Dec. 2017.

CADEGIANI, F. A.; KATER, C. E. Novel insights of overtraining syndrome discovered from the EROS study. **BMJ Open Sport Exerc Med**, v. 5, n. 1, p. e000542, 2019.

CAMPBELL, J. P.; TURNER, J. E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **Front Immunol**, v. 9, p. 648, 2018.

CASIMIRO-LOPES, G.; ALVES, S. B.; SALERNO, V. P.; PASSOS, M. C. *et al.* Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. **Horm Metab Res**, v. 40, n. 4, p. 276-280, Apr. 2008.

CEDDIA, M. A.; WOODS, J. A. Exercise suppresses macrophage antigen presentation. **J Appl Physiol (1985)**, 87, n. 6, p. 2253-2258, Dec 1999.

CHANG, K. P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. **Int Rev Cytol Suppl**, v. 14, p. 267-305, 1983.

COUTINHO DE OLIVEIRA, C. V.; BARBOSA, C. V.; MASSA, N. M.; PEREIRA, R. E. A. *et al.* Carbohydrate supplementation attenuates decrement in performance in overtrained rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 1, p. 76-82, Jan. 2016.

CUBA CUBA, C. A.; NETTO, E. M.; MARSDEN, P. D.; ROSA, A. E. C. *et al.* Cultivation of Leishmania braziliensis braziliensis from skin ulcers in man under field conditions. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, p. 456-457, 1986.

DEL PRETE, G. The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. **Parassitologia**, v. 50, n. 1-2, p. 9-16, Jun. 2008.

DEWEERDT, S. Prevention: activity is the best medicine. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. S16-17, Jul. 2011.

DICKERSON, S. S.; KEMENY, M. E. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. **Psychol Bull**, v. 130, n. 3, p. 355-391, May 2004.

DONG, J.; CHEN, P.; WANG, R.; YU, D. *et al.* NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 6, p. 881-891, 2011.

DOS SANTOS, R. V.; CAPERUTO, E. C.; DE MELLO, M. T.; COSTA ROSA, L. F. Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 107, n. 3, p. 309-315, Oct. 2009.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1024, p. 138-146, Jun. 2004.

FARHANGIMALEKI, N.; ZEHSAZ, F.; TIIDUS, P. M. The effect of tapering period on plasma pro-inflammatory cytokine levels and performance in elite male cyclists. **J Sports Sci Med**, v. 8, n. 4, p. 600-606, 2009.

FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 33, n. 3, p. 114-119, Jul. 2005.

FERRARESSO, R. L.; DE OLIVEIRA, R.; MACEDO, D. V.; NUNES, L. A. *et al.* Interaction between overtraining and the interindividual variability may (not) trigger muscle oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in rats. **Oxid Med Cell Longev**, 2012, p. 935483, 2012.

FISCHER, C. P.; HISCOCK, N. J.; PENKOWA, M.; BASU, S. *et al.* Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 558, n. Pt 2, p. 633-645, Jul. 2004.

FIUZA-LUCES, C.; GARATACHEA, N.; BERGER, N. A.; LUCIA, A. Exercise is the real polypill. **Physiology (Bethesda)**, v. 28, n. 5, p. 330-358, Sep. 2013.

FREITAS, D.; MIRANDA, R.; BARA FILHO, M. Marcadores psicológico, fisiológico e bioquímico para determinação dos efeitos da carga de treino e do overtraining. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 4, p. 457-465, 2009.

GHOLAMNEZHAD, Z.; BOSKABADY, M. H.; HOSSEINI, M.; SANKIAN, M. *et al.* Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. **Iran J Basic Med Sci**, v. 17, n. 1, p. 1-8, Jan. 2014.

GIBALA, M. J.; MCGEE, S. L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 36, n. 2, p. 58-63, Apr. 2008.

GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 9, n. 6, p. 659-665, Nov 2006.

GOHIL, K.; BROOKS, G. A. Exercise tames the wild side of the Myc network: a hypothesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 1, p. E18-30, Jul. 2012.

GUIMARÃES, T.; COSTA, D.; ALONSO, M.; RUBINI, E. *et al.* Comparação entre diferentes quantidades de exercício no rendimento acadêmico e desenvolvimento de sinais de overtraining. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 12, n. 76, 2018.

GUIMARÃES, T. T. Paradoxo do exercício físico em excesso: linha tênue entre riscos e benefícios. **Revista Eletrônica Nacional de Educação Física**, v. 6, n. 8, 2016.

GUIMARÃES, T. T.; TERRA, R.; DUTRA, P. Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: Th1 and Th2 profile. **Journal Motricidade**, v. 13, n. 3, p. 69-78, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HALLAL, P. C.; ANDERSEN, L. B.; BULL, F. C.; GUTHOLD, R. *et al.* Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 247-257, Jul. 2012.

HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med**, v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-469, Jul. 2008.

HARRISS, D. J.; ATKINSON, G. Update--Ethical standards in sport and exercise science research. **Int J Sports Med**, 32, n. 11, p. 819-821, Nov 2011.

HEDELIN, R.; KENTTÄ, G.; WIKLUND, U.; BJERLE, P. *et al.* Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 8, p. 1480-1484, Aug. 2000.

HEINONEN, I.; KALLIOKOSKI, K. K.; HANNUKAINEN, J. C.; DUNCKER, D. J. *et al.* Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 6, p. 421-436, Nov. 2014.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Front Immunol**, 5, p. 514, 2014.

JAVED, A.; TEBBEN, P. J.; FISCHER, P. R.; LTEIF, A. N. Female athlete triad and its components: toward improved screening and management. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 9, p. 996-1009, Sep. 2013.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, S.; JESSEL, T.; SIEGELBAUM, S. *et al.* **Princípios de Neurociências.** 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KELLMANN, M. Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. **Scand J Med Sci Sports**, v. 20 Suppl 2, p. 95-102, Oct. 2010.

KLEISIARIS, C. F.; SFAKIANAKIS, C.; PAPATHANASIOU, I. V. Health care practices in ancient Greece: The Hippocratic ideal. **J Med Ethics Hist Med**, v. 7, p. 6, 2014.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. Overtraining syndrome: a practical guide. **Sports Health**, v. 4, 2012.

LAKIER SMITH, L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? **Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 347-364, 2003.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; PARRA-LOPEZ, C.; LOUIS, J. A. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. **Int Rev Immunol**, v. 17, n. 1-4, p. 157-180, 1998.

LEE, I. M.; SHIROMA, E. J.; LOBELO, F.; PUSKA, P. *et al.* Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, Jul. 2012.

LEWIS, N. A.; COLLINS, D.; PEDLAR, C. R.; ROGERS, J. P. Can clinicians and scientists explain and prevent unexplained underperformance syndrome in elite athletes: an interdisciplinary perspective and 2016 update. **BMJ Open Sport Exerc Med**, v. 1, n. 1, p. e000063, 2015.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. *et al.* Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, Jun. 15 1990.

MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 7 Suppl, p. S369-376, Jul. 2000.

MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; RINI, G. B. *et al.* Immunopathology of leishmaniasis: an update. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 20, n. 3, p. 435-445, 2007 Jul./Sep. 2007.

MARTINEZ-SANCHEZ, M. E.; HUERTA, L.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; VILLARREAL LUJÁN, C. Role of Cytokine Combinations on CD4+ T Cell Differentiation, Partial Polarization, and Plasticity: Continuous Network Modeling Approach. **Front Physiol**, v. 9, p. 877, 2018.

MATOS, N. F.; WINSLEY, R. J.; WILLIAMS, C. A. Prevalence of nonfunctional overreaching/overtraining in young English athletes. **Med Sci Sports Exerc**, 43, n. 7, p. 1287-1294, Jul 2011.

MATTA MELLO PORTUGAL, E.; CEVADA, T.; SOBRAL MONTEIRO-JUNIOR, R.; TEIXEIRA GUIMARÃES, T. *et al.* Neuroscience of exercise: from neurobiology mechanisms to mental health. **Neuropsychobiology**, v. 68, n. 1, p. 1-14, 2013.

MATTHEW, J.; HADEED, K. S.; KUEHL, D. L. **Exertional Rhabdomyolysis After Crossfit Exercise Program**. *In:* ACSM's Annual Meeting, 58.; World Congress on Exercise is Medicine, 3., 2011. [S.l.: s.n.], 2011.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A. *et al.* Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 1, p. 186-205, Jan. 2013.

MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; GLEESON, M.; RIETJENS, G. *et al.* Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome - ECSS Position Statement "Task Force'. **Eur J Spor Sci**, v. 6, n. 1, 2006.

MEEUSEN, R.; PIACENTINI, M. F.; BUSSCHAERT, B.; BUYSE, L. *et al.* Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, n. 2-3, p. 140-146, Mar. 2004.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 5-14, Jul. 2005.

MURPHY, K. **Imunbiologia de Janeway**. 8 ed. [S.l.]: Artmed, 2014.

NIELSEN, S.; PEDERSEN, B. K. Skeletal muscle as an immunogenic organ. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 3, p. 346-351, Jun. 2008.

NIEMAN, D. C. Upper respiratory tract infections and exercise. **Thorax**, v. 50, n. 12, p. 1229-1231, Dec. 1995.

O'KEEFE, J. H.; PATIL, H. R.; LAVIE, C. J.; MAGALSKI, A. *et al.* Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. **Mayo Clin Proc**, v. 87, n. 6, p. 587-595, Jun. 2012.

ORGANIZATION, W. H. WORLD Health Organization: Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles. 2014.

ORSINI, M.; HASUE, R.; LEITE, M.; MENEZES, S. *et al.* Doenças neuromusculares: rediscutindo o "overtraining". **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 21, n. 2, 2014.

PATIL, H. R.; O'KEEFE, J. H.; LAVIE, C. J.; MAGALSKI, A. *et al.* Cardiovascular damage resulting from chronic excessive endurance exercise. **Mo Med**, v. 109, n. 4, p. 312-321, Jul./Aug. 2012.

PEDERSEN, B. K.; FISCHER, C. P. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 3, p. 265-271, May 2007.

PEREIRA, B. C.; PAULI, J. R.; DE SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. *et al.* Eccentric exercise leads to performance decrease and insulin signaling impairment. **Med Sci Sports Exerc**, v. 46, n. 4, p. 686-694, Apr. 2014.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 153-159, Jan. 2008.

RAGLIN, J. S.; MORGAN, W. P.; LUCHSINGER, A. E. Mood and self-motivation in successful and unsuccessful female rowers. **Med Sci Sports Exerc**, v. 22, n. 6, p. 849-853, Dec. 1990.

REARDON, C. L.; FACTOR, R. M. Sport psychiatry: a systematic review of diagnosis and medical treatment of mental illness in athletes. **Sports Med**, v. 40, n. 11, p. 961-980, Nov. 2010.

REVU, S.; WU, J.; HENKEL, M.; RITTENHOUSE, N. *et al.* IL-23 and IL-1β Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation. **Cell Rep**, v. 22, n. 10, p. 2642-2653, Mar. 2018.

ROBSON, P. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes : the interleukin-6 hypothesis. **Sports Med**, v. 33, n. 10, p. 771-781, 2003.

ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas com Overtraining. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 3, 2005.

ROMAGNANI, S.; ABBAS, A. K. IV International Conference on Cytokines. Ares-Serono Foundation (under the auspices of the European Cytokine Society). Florence, Italy. March 20-22, 1996. Report and abstracts. **Eur Cytokine Netw**, v. 7, n. 4, p. 801-827, Dec. 1996.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Med**, 21, n. 2, p. 80-97, Feb 1996.

RU, W.; PEIJIE, C. Modulation of NKT cells and Th1/Th2 imbalance after alpha-GalCer treatment in progressive load-trained rats. **Int J Biol Sci**, v. 5, n. 4, p. 338-343, 2009.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SATTELMAIR, J.; PERTMAN, J.; DING, E. L.; KOHL, H. W. *et al.* Dose response between physical activity and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. **Circulation**, v. 124, n. 7, p. 789-795, Aug. 2011.

SAÚDE, M. D. **Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

SAÚDE, M. D.; SAÚDE, S. D. V. E. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. [S.l.: s.n.], 2007.

SCHAAL, K.; TAFFLET, M.; NASSIF, H.; THIBAULT, V. *et al.* Psychological balance in high level athletes: gender-based differences and sport-specific patterns. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19007, 2011.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, 2011.

SINGER, R. N.; MURPHEY, M.; TENNANT, L. K. **Handbook of research on sport psychology.** New York: MacMillan, 1993.

SLIVKA, D. R.; HAILES, W. S.; CUDDY, J. S.; RUBY, B. C. Effects of 21 days of intensified training on markers of overtraining. **J Strength Cond Res**, v. 24, n. 10, p. 2604-2612, Oct. 2010.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 2, p. 317-331, Feb. 2000.

SMITH, L. L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **J Strength Cond Res**, v. 18, n. 1, p. 185-193, Feb. 2004.

SOBRAL-MONTEIRO-JUNIOR, R.; MAILLOT, P.; GATICA-ROJAS, V.; ÁVILA, W. R. M. *et al.* Is the "lactormone" a key-factor for exercise-related neuroplasticity? A hypothesis based on an alternative lactate neurobiological pathway. **Med Hypotheses**, v. 123, p. 63-66, Feb. 2019.

SOLOMON, M. L.; WEISS KELLY, A. K. Approach to the Underperforming Athlete. **Pediatr Ann**, v. 45, n. 3, p. e91-96, Mar. 2016.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

STEENSBERG, A.; VAN HALL, G.; OSADA, T.; SACCHETTI, M. *et al.* Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, p. 237-242, Nov. 2000.

STEINACKER, J. M.; LORMES, W.; REISSNECKER, S.; LIU, Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, n. 4, p. 382-391, Apr. 2004.

STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. **J Exp Med**, v. 180, n. 3, p. 783-793, Sep. 1994.

STUEHR, D. J.; CHO, H. J.; KWON, N. S.; WEISE, M. F. *et al.* Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7773-7777, Sep. 1991.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, Nov. 1985.

TERRA, R.; ALVES, P. J.; GONÇALVES DA SILVA, S. A.; SALERNO, V. P. *et al.* Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice. **Int J Sports Med**, v. 34, n. 7, p. 661-666, Jul. 2013.

TERRA, R.; ALVES, P. J. F.; LIMA, A. K. C.; GOMES, S. M. R. *et al.* Immunomodulation From Moderate Exercise Promotes Control of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 115, 2019.

TERRA, R.; SILVA, S. A. G.; SALERNO, V.; DUTRA, P. M. L. Effect of exercise on immune system: response, adaptation and cell signaling. **Rev Bras Med Esporte**, v. 18, n. 3, 2012.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, n. 5, p. 533-538, May 1998.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VIOLA, A.; MUNARI, F.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, R.; SCOLARO, T. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front Immunol**, v. 10, p. 1462, 2019.

WOODS, J. A.; CEDDIA, M. A.; ZACK, M. D.; LOWDER, T. W. *et al.* Exercise training increases the näive to memory T cell ratio in old mice. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 5, p. 384-392, Oct. 2003.

WU, X.; FAN, Z.; CHEN, M.; CHEN, Y. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a mediates IFN-γ induced MHC II transcription in macrophages. **Immunology**, Sep. 2019.

XIAO, W.; CHEN, P.; DONG, J. Effects of overtraining on skeletal muscle growth and gene expression. **Int J Sports Med**, v. 33, n. 10, p. 846-853, Oct. 2012.

APÊNDICE A

Trabalho premiado com a primeira colocação no XI Congresso Sul-Americano de Medicina do Esporte (e 31º Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte) – 2019.

EXCESSO DE EXERCÍCIO FÍSICO AUMENTA A SUSCETIBILIDADE DE INFECÇÕES EM MACRÓFAGOS

Autores: Guimarães T, Terra R, Dutra P.

Instituições: UERJ - Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - Brasil, UNESA - Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - Brasil.

Introdução e Objetivo: A inatividade física é uma das principais causas atribuídas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, cargas extenuantes de exercício podem prejudicar o desempenho e promover danos à saúde, como alterações no sistema imunológico e síndrome do overtraining. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito crônico do exercício físico em diferentes combinações de frequência, duração e intensidade, especialmente o treinamento exaustivo, na modulação da função de macrófagos através de modelo experimental com camundongos Balb/c.

Casuística e Método: Uma amostra com 65 camundongos jovens foi aleatoriamente dividida em cinco grupos: controle sedentário (SED), leve (LEV), moderado (MOD), intenso (INT) e extenuante (EXT). Com exceção do SED, os demais grupos foram submetidos a 10 semanas de treinamento de natação, variando em intensidade de zero a 3,5% da massa corporal, duração de 20 a 150 minutos por sessão e frequência de duas a cinco vezes por semana. O grupo polimento (POL) foi constituído no final da décima semana de treinamento (n=5) a partir do grupo EXT. O descanso ativo neste grupo teve a duração de duas semanas, onde a frequência, duração e intensidade das sessões foram reduzidas. O teste de capacidade física foi realizado antes, no meio e ao final do período de 10 semanas de treinamento, assim como ao final do período de polimento para o grupo POL. Após a eutanásia, macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal e mantidos em meio RPMI na presença de promastigotas de Leishmania major. Os níveis das citocinas TNF, IFN-γ, MCP-1, IL-10 e IL-6 nos sobrenadantes dos macrófagos foram mensurados pelo método de CBA (BD Biosciences®).

Resultados: O teste de capacidade física após cinco semanas de treinamento revelou uma diferença estatística significativa no tempo até a exaustão, indicando o melhor desempenho para o grupo EXT ($p<0,01$). No entanto, ao final de 10 semanas os grupos MOD e INT apresentaram o melhor desempenho, com diferença estatística para o grupo EXT ($p<0,05$). O grupo POL, apesar de duas semanas de redução das cargas de treinamento, piorou o desempenho em relação ao grupo EXT ($p <0,01$). O grupo POL apresentou o maior índice de infecção (184±28,96), com diferença estatística em relação ao MOD (19±8,53) ($p < 0,001$) e LEV (40,4 ± 16,01) ($p<0,01$). O segundo maior índice de infecção foi encontrado no grupo EXT (145,9±59,56), com diferença estatística em relação ao MOD ($p<0,001$) e LEV ($p<0,01$). O grupo SED apresentou o terceiro maior índice de infecção (132,2±54,16). O padrão nas concentrações de citocinas obtidas in vitro sugere uma resposta Th1 mais aparente no grupo MOD. Os grupos SED e EXT aparentaram uma resposta com predominância de Th2, além do grupo INT.

Discussão: Compreender como parâmetros relacionados ao exercício podem modular o funcionamento do importante sistema de reconhecimento e reparo, o sistema imunológico, em muito pode contribuir para o entendimento da homeostase e condições perturbadoras deste estado, primordiais para uma vida saudável e com qualidade. O exercício físico tem sido associado a inúmeros benefícios biológicos e funcionais. Existem protocolos de exercícios intensos potencialmente benéficos, como por exemplo, o treinamento intervalado de alta intensidade. Entretanto, seus efeitos desejáveis parecem depender de uma posologia adequada. Este estudo evidenciou que o treinamento severo apresenta efeitos similares na função de macrófagos em relação à inatividade física.

Conclusão: Embora o grupo EXT tenha apresentado os melhores parâmetros de capacidade física no meio do período de treinamento, seu desempenho foi prejudicado após 10 semanas e a imunidade celular in vitro foi comprometida. Foi confirmada a hipótese de que o excesso de estresse provocado pelo exercício, ou sua ausência, aumenta a suscetibilidade de infecções em macrófagos, além de que a distribuição coerente das cargas de treinamento promove o desempenho e o equilíbrio imunológico.

APÊNDICE B

Revisão narrativa publicada em: GUIMARÃES, T.; TERRA, R.; DUTRA, P. Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: Th1 and Th2 profile. *Revista Motricidade*, v. 13, n.3, 2017.

Motricidade
2017, vol. 13, n. 3, pp. 69-78

© Edições Desafio Singular
http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.10049

Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: T_h1 and T_h2 profile

Thiago Teixeira Guimarães[1,2,3*], Rodrigo Terra[1], Patrícia Maria Lourenço Dutra[1,2]

REVIEW ARTICLE

ABSTRACT

Although physical inactivity figures as one of the main causes attributed to mortality, the damage caused by excessive exercise is also a reality. Professional athletes, amateur or uncompetitive modalities beneficiaries are often affected by deleterious conditions resulting from excessive exercise, such as neurological, endocrine and immune origin. The thin line between losses and benefits of successive fatiguing sessions effort depends on the understanding of concepts and methodological training principles. Exercise may have a paradoxical relationship and its consistent prescription in terms of public health depends on a better understanding of their cellular mechanisms. In this sense, the purpose of this review was to explore a promising topic in sports science, able to contribute to elucidate such mechanisms: T_h1 and T_h2 profile of the immune response related with chronic exhausting exercise and overtraining.

Keywords: overtraining, exhaustion, immune system, physical activity, cytokines.

INTRODUCTION

Although the expectation of global life has increased, the number of people affected by chronic diseases, such as cardiovascular, diabetes, several types of cancer, mental disorders, bone and joint diseases has also increased (Handschin & Spiegelman, 2008; Lee et al., 2012). Physical inactivity figures as one of the main causes attributed to mortality (Hallal et al., 2012). According to the World Health Organization (2012), in addition to causing suffering, functional dependence, intangible costs on health systems and reduced quality of life, these diseases account for 58.5% of all deaths worldwide.

On the other hand, the damage caused by excessive exercise is also a reality. The intense physical exercise can optimize performance and health (Gohil & Brooks, 2012), however, strenuous loads of mental and physical stress can cause numerous deleterious conditions such as overtraining syndrome, pathological remodeling and heart arrhythmia, and muscular and skeletal injuries. The immune imbalance seems to be the origin of the problem (Smith, 2000). In this sense, the purpose of this review is to explore a promising topic in sports science, able to contribute to the elucidation of such mechanisms: T_h1 and T_h2 profile of the immune response related with chronic exhausting exercise and overtraining. Few chronic studies involving protocols of exhaustion and overtraining were carried out to investigate the change in the relationship between T_h1 and T_h2 cells. For such, the following topics will be addressed: 1) Thin line between risks and benefits of heavy physical exercise; 2) General characteristics of the immune response; 3) Basic considerations on the immune response to exercise; 4) Chronic effects of exhaustive exercise and overtraining: T_h1 and T_h2 profile; 5) Physical inactivity, excessive exercise and public health.

Manuscript received at September 26th 2016; Accepted at April 11th 2017

[1] *Laboratory of Protozoan Biochemistry and Immunophysiology of Exercise, LIFE, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, University of the State of Rio de Janeiro, UERJ, Brazil*

[2] *Post-Graduation Program in Exercise and Sport Sciences – UERJ – Brazil*

[3] *Laboratory of Exercise Physiology, LAFIEX, Estácio de Sá University, UNESA, Rio de Janeiro, Brazil*

* *Autor correspondente*: Rua Sargento João Lopes, 608, Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 21931-420. Faculdades. *E-mail*: thiagotguimaraes@yahoo.com.br

Thin line between risks and benefits of heavy physical exercise

Exercise has been considered a "polypill" (Fiuza-Luces, Garatachea, Berger, & Lucia, 2013), able to promote numerous biological and functional benefits. There are intense exercise protocols potentially beneficial, such as high intensity interval training, for example (Burgomaster et al., 2008; Burgomaster, Hughes, Heigenhauser, Bradwell, & Gibala, 2005; Gibala & McGee, 2008). It can be found in the literature results pointing out that maximum exercise active areas of the brain limbic system, regions could be related to the promotion of pleasure, emotions and rewards (Guimarães et al., 2014; Guimarães & Deslandes, 2014). Other positive examples of high intensity exercise include the greater impact on energy expenditure (and possibly on body composition), in addition to the overreaching, temporary exhaustion induced by excessive training, followed by physiological overcompensation and improvement of physical fitness.

Meeusen et al. (2006) defined functional overreaching as a short-term performance decrement without severe psychological or other lasting negative symptoms that eventually leads to improvement in performance after days of recovery (Meeusen et al., 2006). This condition is relatively easy to be recovered in the short term, between two and four weeks (Fry & Kraemer, 1997; Fry, Morton, & Keast, 1991). Meeusen et al. (2006) characterized nonfunctional overreaching as a performance decrement that can be reversed after weeks or months of recovery, while a performance decrement in overtraining syndrome can last months to years. It has been proposed that overreaching is a stage prior to overtraining (Rogero, Mendes, & Tirapegui, 2005). Short periods of rest between exercise sessions, in addition to increases in volume and intensity of training, can make the practitioner routine increasingly exhausting (Rogero et al., 2005). Individual differences in recovery time, ability to perform and tolerate physical effort, the impact of adverse weather conditions, lack of nutritional planning (control of carbohydrates, amino acids and hydration, for example) and other stressors not related to training (sleep, diet, family, studies, work, leisure, finances) may explain why each practitioner has a different answer for the same routine or training planning (Freitas, Miranda, & Bara Filho, 2009; Wanner, Wilke, & Duffield, 2016).

Amateur or professional athletes are often affected by deleterious conditions resulting from excessive exercise, such as neurological, endocrine and immune. These changes are the overtraining syndrome characteristics, involving mood and anxiety disorders, depression, general apathy, emotional instability, loss of appetite, sleep disorders, hormonal changes, increased heart rate at rest and increased vulnerability to infection and injury in addition to muscle and joint pain (Kellmann, 2010; Matta Mello Portugal et al., 2013; Reardon & Factor, 2010; Schaal et al., 2011). Overtraining can be defined as a condition of poor adaptation to a chronic period of excessive stress caused by physical exertion, resulting in the development of the syndrome, compromising the health and sports performance (Kreher & Schwartz, 2012).

The prevalence of the overtraining is rarely studied, but it is estimated that 60% of marathoners, 50% of football players and 33% of basketball players have experienced its symptoms (Armstrong & VanHeest, 2002). However, frequently, fitness programs for people who do not aim the competition involving endurance exercise, strength and speed also cause undesirable acute or chronic damage and side effects (Rogero et al., 2005). One of the most common symptom or consequence of the muscle damage suffered by beginners is the delayed onset muscle soreness, characterized as a feeling of discomfort in the skeletal muscle, which occurs a few hours after exercise, triggered by inflammation from excessive overloads (Foschini, Prestes, & Charro, 2007; Tricoli, 2001). In addition to beginners, severe stress caused by physical exertion in non-competitive environment can also lead to extreme complications, as in the study of case presented in 2011, during the annual meeting of the American College of Sports Medicine (Hadeed, Kuehl, Elliot, & Sleigh, 2011). Three

days after a session of intense exercise, based on the Crossfit method, a 33 year old male, previously asymptomatic and physically active, experienced a condition of rhabdomyolysis (Hadeed, Kuehl, Elliot, & Sleigh, 2011). This syndrome is characterized by damage to the skeletal muscles, the result of extravasation of intracellular content (Criddle, 2003; Lopes & Costa, 2013). Microtraumas from exercise may include disruption of extracellular matrix, basement membrane, and the sarcolemma, resulting in the release of intracellular proteins such as myoglobin, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and creatine kinase (CK), for example, into the bloodstream (Catanho da Silva & Macedo, 2011; Lazarim et al., 2009). When the stress caused by physical effort is controlled, the degenerative microtrauma are followed by a regenerative tissue repair phase resulting in remodeling of damaged tissue (Catanho da Silva & Macedo, 2011; Smith, 2004). However, excessive stress can result in muscle weakness, myalgia, nausea, renal failure or even lead to death (Lopes & Costa, 2013).

Excessive endurance exercise in people with different levels of physical fitness, as well as muscular and skeletal injuries, can induce pathological remodeling of the heart structures and adjacent arteries (O'Keefe et al., 2012). Marathons, ultramarathons, triathlons, too long bike races, can cause acute volume overload in the atria and ventricles, with transient decreases in ventricular ejection fraction and cardiac biomarker elevations, which return to normal within a week. Over months and years of repetitive stress, this process may result in fibrosis of the myocardium, particularly in atria, ventricles and interventricular septum, which may develop fibrillations and arrhythmias (O'Keefe et al., 2012; Patil et al., 2012).

The desirable effects of exercise seem to depend on an adequate dose, or a dose that cannot cause side effects. Excessive exercise can damage health of practitioners from many different levels of physical fitness and sports purposes, inducing a reduction in physical performance and ends the competitive athlete's career early. Table 1 summarizes possible risks and benefits of exercise in prolonged durations, extreme loads and/or high frequency.

Table 1

Summary of risks and benefits of exercise in prolonged durations, extreme loads and/or high frequency.

Potential Benefits	Potential Risks
Overreaching;	Overtraining syndrome, cellular and functional lesions;
Increased caloric expenditure, reduced body fat;	Pathological remodeling of the heart and arrhythmias;
Activation of the limbic system of brain rewards, pleasure.	Loss of performance and health;
	Reduction of adherence to exercise, physical inactivity and development of chronic diseases.

General characteristics of the immune response

The immunological response may be understood in two steps: innate and adaptive response. The innate response includes physical barriers (i.e., skin), chemical (i.e., tear complement system) and the participation of cells such as macrophages, neutrophils, dendritic cells, natural killer cells (NK) and microbicides molecules such as nitric oxide (NO) and superoxide anion (O2-). The adaptive immune response involves mainly T (TCD4$^+$ and TCD8$^+$) and B lymphocytes and their products, cytokines and antibodies, respectively. It can be divided into humoral (mediated for antibodies) and cellular immune response (cell-mediated, such as T lymphocytes and macrophages). The TCD4$^+$ lymphocytes (helper/helper-Th0) can differentiate into various cell subpopulations as T_h1 (T helper type 1) and T_h2 (T helper type 2), that produce different standards of cytokines (Del Prete, 2008; Romagnani, 1991; Terra, Silva, Salerno, & Dutra, 2012). The differentiation of TCD4$^+$ in T_h1 lymphocytes can be stimulated by interleukin 12 (IL-12) produced by antigen-presenting cells (macrophages and dendritic cells), whereas differentiation into T_h2 is induced by autocrine action of IL-4 produced by

TCD4⁺. The T_h1 cells predominantly produce interferon-gamma (IFN-γ) and are related to cellular immune response control caused by intracellular microorganism's infections. The T_h2 cells produce mainly IL-4 and are related to the humoral immune response and control of extracellular infections. Various factors such as predominant cytokines in the activation microenvironment, costimulatory molecules, the type of antigen and early events occurring during the innate immune response involving dendritic cells and NK cells can drive predominant response, determining control or not of an infection (Ostrowski, Rohde, Asp, Schjerling, & Pedersen, 1999; Pedersen & Febbraio, 2008; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Terra et al., 2012).

Basic considerations on the immune response to exercise

According to the American College of Sports Medicine, aerobic activities ranging from 40 to 59% of VO_{2max}, 55 and 69% of maximum heart rate and 12-13 on the Borg scale are considered moderate, while aerobic activities ranging from 60 to 84% of VO_{2max}, 70 and 89% of maximum heart rate and 14-16 on the Borg scale are considered high intensity (ACSM, 1998; Febbraio & Pedersen, 2002; Pedersen & Febbraio, 2008). The International Society of Exercise and Immunology (ISEI), in its official position, points out that immune dysfunction observed after exercise is more pronounced when the effort is continuous, prolonged (> 1.5 hours) and held in intensity ranging from moderate to high (55 and 75% of VO_{2max}) (Pedersen et al., 2003; Walsh et al., 2011).

During and immediately after the exertion the leukocytes appear to suffer an increase (transient leukocytosis), followed by a fall (leucopenia) (Catanho da Silva & Macedo, 2011). The period in which agents of the immune system are suppressed after the exhaustion caused by a training session or competitive event is known as the "window of opportunity" (Febbraio & Pedersen, 2005). The increased risk of respiratory tract infections or other deleterious condition from the opportunity for pathogens may vary within one to nine hours (Pedersen & Fischer, 2007), 72 hours (Steensberg et al., 2000) or even two weeks (Fischer et al., 2004). In addition, it has been hypothesized that overtraining begins at the time when new strenuous exercise sessions are performed without the necessary time to recover from immunosuppression (Nielsen & Pedersen, 2008).

Mechanical, hormonal and metabolic factors can modulate the immune response to exercise (Costa Rosa & Vaisber, 2002). As examples of mechanical factors, hypoxia, hyperthermia and muscle injury are capable of generating a localized inflammatory process (Costa Rosa & Vaisber, 2002). Overtraining induced by downhill running training sessions is associated with DNA damage in peripheral blood and skeletal muscle cells, with oxidative stress in skeletal muscle cells and total blood (Pereira et al., 2013). DNA damage observed in lymphocytes, provoked by strenuous exercise, may compromise immune function (Dong et al., 2011; Wierzba, Olek, Fedeli, & Falcioni, 2006).

The hypothalamus is the structure responsible for coordinating responses resulting from the interaction between the nervous system and secretory glands of hormones (cortisol and growth hormone, for example). Its action changes when there is a neuroendocrine imbalance (Mackinnon, 2000; Meeusen et al., 2004; Smith, 2004). Cytokines are able to modulate the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and other areas of the brain responsible for mood control and anxiety. Activation of the autonomic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis together with suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis can be governed by cytokines such as IL-1β, IL-6 and TNF-α representing consequences related to the overtraining syndrome (Smith, 2000). Athletes with chronic pain have enhanced production of IL-1, IL-2, TNF-α and IFN-γ and reduced performance in the ergospirometric test (Vaisberg, de Mello, Seelaender, dos Santos, & Costa Rosa, 2007).

In relation to metabolism, during catabolic states like infections, surgeries, traumas, acidosis and strenuous physical exercises, plasma glutamine undergoes a reduction

(Mackinnon, 2000), correlating with an increase in symptoms of upper respiratory tract infections (dos Santos, Caperuto, de Mello, & Costa Rosa, 2009). Several studies have shown a decrease in plasma glutamine concentration after exhaustive exercise in humans and animals (Bassit, Sawada, Bacurau, Navarro, & Costa Rosa, 2000; Castell, 2002; dos Santos et al., 2009; Koyama, Kaya, Tsujita, & Hori, 1998; Walsh, Blannin, Robson, & Gleeson, 1998), as well as in the presence of overtraining syndrome (dos Santos et al., 2009; Parry-Billings et al., 1992; Rowbottom, Keast, Goodman, & Morton, 1995). Macrophages use high rates of glutamine to generate energy and biosynthesis (dos Santos et al., 2009). Mice submitted to moderate and strenuous eight weeks training protocols, relative to sedentary control, suffered an increase in macrophage post-exercise function, which was supported by enhanced glutamine consumption and metabolism (dos Santos et al., 2009).

Insulin metabolism also appears to be compromised by overtraining status, affecting factors related to immune function (Pereira et al., 2014). Besides the liver suffer an up regulation of gluconeogenesis, promoting a high-caloric state and redirecting even more amino acids (like glutamine) to this function, insulin presents its metabolism altered. An eight-week protocol involving three groups of rats under different training combinations (sedentary, moderate, and strenuous), evidenced an impaired insulin signaling pathway with concomitant increases in enzymatic complex linked to the cellular response to inflammation, the stress-activated protein kinases/Jun aminoterminal kinases and the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Pereira et al., 2014).

Chronic effects of exhaustive exercise and overtraining: Th1 and Th2 profile

Even if several studies associate extreme exercise damages with immunosuppression, the increase in incidence of disease is not exclusive of immunosuppression, but, above all, a change in the immunological profile, from an increase in humoral immunity coupled with the suppression of cellular immunity (Lakier Smith, 2003). While the moderate intensity exercise promotes a protection against infections caused by intracellular microorganisms, because it directs the immune response to the predominance of a response profile of T_h1 type, vigorous activities generate increasing concentrations of anti-inflammatory cytokines. This condition promoting the predominance of a T_h2 response profile, in order to decrease the muscle tissue damage resulting from inflammation, although this may result in increased susceptibility to infections (Terra et al., 2012).

Data collected by Terra et al. (2013) showed that lymph nodes cells from mice submitted to swimming activity of moderate intensity for 12 weeks presented an elevation in IFN-γ and TNF-α concentrations and IL-4 and IL-10 significantly decreased compared to sedentary group. These data suggest that moderate exercise promote the predominance of a protective immune response type T_h1 in mice (Terra et al., 2013). On the other hand, a review written by Smith (2000) suggests that trauma generated in muscle and skeletal system, from the extreme stress provoked by exercise, produce large amounts of proinflammatory cytokines such as IL-1β, IL-6 and TNF-α (Smith, 2000). The positive feedback of the anti-inflammatory components becomes imminent and the imbalance in T_h1 and T_h2 profile can reflect a disturbing condition of homeostasis. Successive chronic stimuli, without proper recovery of stable physiological state, may develop symptoms related to overtraining.

Few studies, however, have tested the hypothesis that T_h1 and T_h2 profile are chronically altered by overtraining. There are ethical limitations in studies with humans and animals, therefore, are more frequently used. Despite the different protocols of chronic exhaustion and populations used, the results indicate a predominance of the T_h2 response on T_h1.

Protocols of four to six days of exhaustion.

Mice experienced a suppression in antigen presentation by macrophages three and 24 hours after four days of exhaustive training when

compared to moderate group (Ceddia & Woods, 1999). Macrophages are antigen presenting cells capable of causing differentiation of TCD4+ lymphocytes into T_h1. The authors suggested that cellular immunosuppression is a consequence in reducing differentiation of T_h1 new cells, causing an imbalance in T_h1 and T_h2 profile. In another study, seven cyclists under six days of intensified training also experienced an imbalance in the ratio T_h1/T_h2 immediately after an exhaustive effort session and the end of two weeks of rest (Lancaster et al., 2004). It was observed a reduction in IFN-γ while IL-4 remained unchanged. Therefore, the ratio IFN-γ/IL-4 reduced with severe stress and was associated with the window of opportunity (Lancaster et al., 2004).

Studies with longer intervention time (overtraining).

The study of Ru and Peije (2009) found that eight rats submitted to nine weeks of progressive training, six days a week, provoked a cellular immunosuppression by predominance of T_h2 response, reduced systemic hemoglobin concentration and decreased in testosterone and corticosterone 36 hours after the last training session. Seven days after the last session, the authors found in the spleen a reduction of natural killer T cells and IFN-γ in addition to IL-4 increased, unbalancing the ratio T_h1/T_h2 through IFN-γ/IL-4 compared to the control group (Ru & Peijie, 2009).

Farhangimaleki et al. (2009) found in cyclists that combined a maintenance of intensity with a decrease in the duration (tapering) within one to three weeks, immediately after eight weeks of training with increasing volume, an improvement in performance compared to a control group. The control group, who trained for eleven weeks progressively from the first to the eleventh, did not improve performance as well as IL-1 β , IL-6 and TNF-α increased in relation to tapering group. Although the authors did not evaluate the T_h2 profile, the findings suggested the importance of tapering period to prevent disturbances in physiological homeostasis, risk of infections and fatigue (Farhangimaleki, Zehsaz, & Tiidus, 2009).

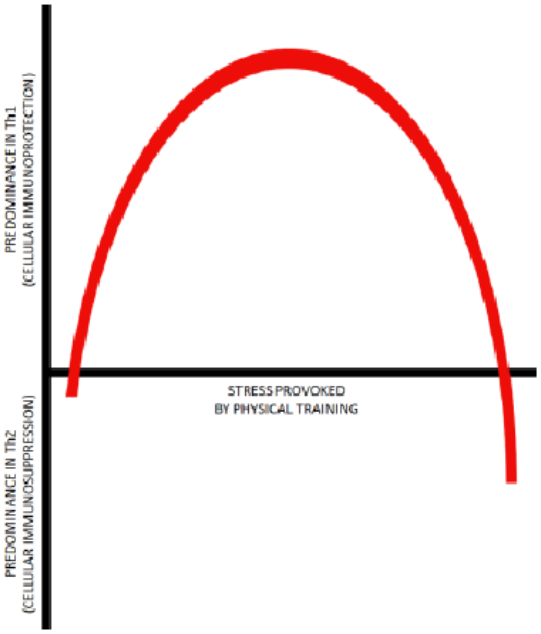


Figure 1. Excessive chronic stress caused by physical training generates an imbalance in T_h1 and T_h2 profile with predominance in T_h2, cellular immunosuppression, increased susceptibility to infections, signs and symptoms of overtraining. The sedentary condition, studied through control groups without exercise, also represents risks to cellular immunity and health. Moderate training seems to promote the balance between T_h1 and T_h2 with predominance in T_h1, generating a cellular immunoprotected response.

Gholamnezhad et al. (2014) investigated the effect of eight weeks of moderate training and eleven weeks of severe training (overtraining), immediately, 24 hours and two weeks after in the plasma concentration of cytokines. Although TNF-α has increased in overtraining and overtraining post two weeks recovery, IL-10 and IL-4 increased in both conditions, and IFN-γ increased just at moderate group. Even though the authors have not shared the results of physical capacity, moderate training promoted cellular immunity while in other groups, including the control, was observed cellular immunosuppression (Gholamnezhad, Boskabady, Hosseini, Sankian, & Khajavi Rad, 2014). These groups had a response directed to the T_h2 profile while the response of moderated group was directed to the T_h1 profile. In this study, two weeks of recovery (tapering) were not enough to reverse the cellular immunosuppression, as the findings of

Farhangimaleki et al. (2009). Figure 1 summarizes the changes of different types of chronic stress caused by physical training in T_h1 and T_h2 profile.

Overtraining can be seen as the third stage of the General Adaptation Syndrome, originally described by Hans Selye in 1936. The depletion stage (third stage) refers to recover for survival, unlike the latter, in which the body resists the alarm (first stage) and adapts. The third stage is to protect the body against excessive physiological stress. The signs and symptoms of overtraining syndrome are the positive precaution point of view against even more severe damage (Smith, 2000). Numerous models to explain the mechanisms of acute and chronic fatigue have been developed, but few discuss the relationship of cytokines between the need to repair and regulate afferent feedbacks that process signals that might lead to sensations and feelings of exhaustion (Vargas & Marino, 2014). The organism requires absolute repose and negative changes in T_h1 and T_h2 profile appear to help the immune system to repair even greater injuries.

Physical inactivity, excessive exercise and public health

According to the concept of Hormesis favorable biological responses generally occur due to the properly controlled exposure to stressful stimuli (Radak, Chung, & Goto, 2008). In the context of public health, not only physical inactivity should figure as the main concern. The exercise has been considered a miracle drug because there is epidemiological evidence to corroborate this statement. However, experimental studies question the effectiveness of any configuration of a physical training program in relation to the intensity and duration. Regular exercise has benefits before the development of overtraining, however, according to Farhangimaleki et al. (2009), overtraining is a poorly understood process.

The state of physical and mental exhaustion not only impairs performance. Its signs and symptoms are consistent with the development of damage to health similar to chronic noncommunicable diseases. The difference between medicine and poison is the dose. With physical exercise does not seem to be different. In this context, we suggest more attention of researchers and policy makers not only to physical inactivity, but at the excessive exercise. The immune imbalance and cellular immunosuppression represent a promising topic in sports science that can help broaden the understanding and discussion of the paradox of exercise.

CONCLUSION

Chronic exhaustive training may cause the imbalance in T_h1 and T_h2 profile with predominance in T_h2, resulting in cellular immunosuppression, increased susceptibility to infections, inflammation, signs and symptoms of overtraining. On the other hand, the moderate training seems to promote the balance between T_h1 and T_h2 with predominance in T_h1, generating a cellular immunoprotection.

Acknowledgments:
Nothing to declare

Conflict of interest:
Nothing to declare

Funding:
Nothing to declare

REFERENCES

ACSM (1998). American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 30*(6), 992-1008.

Armstrong, L. E., & VanHeest, J. L. (2002). The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression and psychoneuroimmunology. *Sports Medicine, 32*(3), 185-209.

Bassit, R. A., Sawada, L. A., Bacurau, R. F., Navarro, F., & Costa Rosa, L. F. (2000). The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 32*(7), 1214-1219.

Burgomaster, K. A., Howarth, K. R., Phillips, S. M., Rakobowchuk, M., Macdonald, M. J., McGee, S. L., & Gibala, M. J. (2008). Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training

in humans. *The Journal Physiology, 586*(1), 151-160. doi:10.1113/jphysiol.2007.142109

Burgomaster, K. A., Hughes, S. C., Heigenhauser, G. J., Bradwell, S. N., & Gibala, M. J. (2005). Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *Journal of Applied Physiology, 98*(6), 1985-1990. doi: 10.1152/japplphysiol.01095.2004

Castell, L. M. (2002). Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? *Nutrition, 18*(5), 371-375.

Catanho da Silva, F., & Macedo, D. (2011). Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano, 13*(4), 320-328. doi: 10.5007/1980-0037.2011v13n4p320

Ceddia, M. A., & Woods, J. A. (1999). Exercise suppresses macrophage antigen presentation. *Journal of Applied Physiology, 87*(6), 2253-2258.

Costa Rosa, L. F. P. B., & Vaisber, M. W. (2002). Influência do Exercício na Reposta Imune. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 8*(4), 167-172. Criddle, L. M. (2003). Rhabdomyolysis. Pathophysiology, recognition, and management. *Critical Care Nurse, 23*(6), 14–22, 24–26, 28 passim; quiz 31-32.

Del Prete, G. (2008). The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. *Parassitologia, 50*(1-2), 9-16.

Dong, J., Chen, P., Wang, R., Yu, D., Zhang, Y., & Xiao, W. (2011). NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils. *International Journal of Biological Sciences, 7*(6), 881-891.

dos Santos, R. V., Caperuto, E. C., de Mello, M. T., & Costa Rosa, L. F. (2009). Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. *European Journal of Applied Physiology, 107*(3), 309-315. doi:10.1007/s00421-009-1130-6

Farhangimaleki, N., Zehsaz, F., & Tiidus, P. M. (2009). The effect of tapering period on plasma pro-inflammatory cytokine levels and performance in elite male cyclists. *Journal of Sports Science and Medicine, 8*(4), 600-606.

Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *The FASEB Journal, 16*(11), 1335-1347. doi:10.1096/fj.01-0876rev

Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2005). Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exercercise and Sport Science Reviews, 33*(3), 114-119.

Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., . . . Pedersen, B. K. (2004). Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *Journal of Physiology, 558*(2), 633-645. doi:10.1113/jphysiol.2004.066779

Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A., & Lucia, A. (2013). Exercise is the real polypill. *Physiology, 28*(5), 330-358. doi:10.1152/physiol.00019.2013

Foschini, D., Prestes, J., & Charro, M. A. (2007). Relationship between physical exercise, muscle damage and delayed-onset muscle soreness. *Revista Brasileira de Cineantropomemtria e Desempenho Humano, 9*(1), 101-106. doi:10.5007/%25x

Freitas, D., Miranda, R., & Bara Filho, M. (2009). Marcadores psicológico, fisiológico e bioquímico para determinação dos efeitos da carga de treino e do overtraining. *Revista Brasileira de Cineantropomemtria e Desempenho Humano, 11*(4), 457-465

Fry, A. C., & Kraemer, W. J. (1997). Resistance exercise overtraining and overreaching. Neuroendocrine responses. *Sports Medicine, 23*(2), 106-129.

Fry, R. W., Morton, A. R., & Keast, D. (1991). Overtraining in athletes. An update. *Sports Medicine, 12*(1), 32-65.

Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., Hosseini, M., Sankian, M., & Khajavi Rad, A. (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 17*(1), 1-8.

Gibala, M. J., & McGee, S. L. (2008). Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exercise and Sport Science Review, 36*(2), 58-63. doi: 10.1097/JES.0b013e318168ec1f

Gohil, K., & Brooks, G. A. (2012). Exercise tames the wild side of the Myc network: a hypothesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 303*(1), E18-30. doi:10.1152/ajpendo.00027.2012

Guimaraes, T. T., Costa, B. M. da, Cerqueira, L. S., Serdeiro, A. de C. A., Pompeu, F. A. M. S., Moraes, H. S. de, ... Deslandes, A. C. (2015). Acute Effect of Different Patterns of Exercise on Mood, Anxiety and Cortical Activity. *Archives of Neuroscience, 2*(1), e18781. https://doi.org/10.5812/archneurosci.18781

Guimarães, T., & Deslandes, A. (2014). *Exercício físico em diferentes intensidades: efeito sobre o humor, ansiedade, cognição e atividade cortical*. Novas Edições Acadêmicas.

Hadeed, M. J., Kuehl, K. S., Elliot, D. L., & Sleigh, A. (2011). Exertional Rhabdomyolysis After Crossfit Exercise Program: 1210. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 43*(5), 224–225. https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000400606.24620.bc

Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R., Haskell, W., Ekelund, U., & Group, L. P. A. S. W. (2012). Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects.

Lancet, 380(9838), 247-257. doi:10.1016/S0140-6736(12)60646-1

Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature, 454*(7203), 463-469. doi:10.1038/nature07206

Kellmann, M. (2010). Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, 20*(Suppl 2), 95–102. https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01192.x

Koyama, K., Kaya, M., Tsujita, J., & Hori, S. (1998). Effects of decreased plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 77*(1-2), 25-31.

Kreher, J. B., & Schwartz, J. B. (2012). Overtraining syndrome: a practical guide. *Sports Health, 4*(2), 128–138. https://doi.org/10.1177/1941738111434406

Lakier Smith, L. (2003). Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports Medicine, 33*(5), 347-364.

Lancaster, G. I., Halson, S. L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., . . . Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exercise Immunology Review, 10*, 91-106.

Lazarim, F. L., Antunes-Neto, J. M., da Silva, F. O., Nunes, L. A., Bassini-Cameron, A., Cameron, L. C., . . . de Macedo, D. V. (2009). The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *Journal of Science and Medicine in Sport, 12*(1), 85-90. doi:10.1016/j.jsams.2007.10.004

Lee, I. M., Shiroma, E. J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S. N., Katzmarzyk, P. T., & Group, L. P. A. S. W. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet, 380*(9838), 219-229. doi:10.1016/S0140-6736(12)61031-9

Lopes, C., & Costa, L. (2013). Rabdomiólise induzida pelo exercício: biomarcadores, mecanismos fisiopatológicos e possibilidades terapêuticas. *Revista HUPE, 12*(4), 59-65.

Mackinnon, L. T. (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 32*(7 Suppl), S369-376.

Matta Mello Portugal, E., Cevada, T., Sobral Monteiro-Junior, R., Teixeira Guimarães, T., da Cruz Rubini, E., Lattari, E., . . . Camaz Deslandes, A. (2013). Neuroscience of exercise: from neurobiology mechanisms to mental health. *Neuropsychobiology, 68*(1), 1-14. doi:10.1159/000350946

Meeusen, R., Duclos, M., Gleeson, M., Rietjens, G., Steinacker, J., & Urhausen, A. (2006). Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome. *European Journal of Sport Science, 6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1080/17461390600617717

Meeusen, R., Piacentini, M. F., Busschaert, B., Buyse, L., De Schutter, G., & Stray-Gundersen, J. (2004). Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. *European Journal of Applied Physiology, 91*(2-3), 140-146. doi:10.1007/s00421-003-0940-1

Nielsen, S., & Pedersen, B. K. (2008). Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Current Opinion in Pharmacology, 8*(3), 346-351. doi:10.1016/j.coph.2008.02.005

O'Keefe, J. H., Patil, H. R., Lavie, C. J., Magalski, A., Vogel, R. A., & McCullough, P. A. (2012). Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. *Mayo Clinic Proceedings, 87*(6), 587-595. doi:10.1016/j.mayocp.2012.04.005

Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *Journal of Physiology, 515*(1), 287-291.

Parry-Billings, M., Budgett, R., Koutedakis, Y., Blomstrand, E., Brooks, S., Williams, C., . . . Newsholme, E. A. (1992). Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 24*(12), 1353-1358.

Patil, H. R., O'Keefe, J. H., Lavie, C. J., Magalski, A., Vogel, R. A., & McCullough, P. A. (2012). Cardiovascular damage resulting from chronic excessive endurance exercise. *Missouri Medicine, 109*(4), 312-321.

Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews, 88*(4), 1379-1406. doi:10.1152/physrev.90100.2007

Pedersen, B. K., & Fischer, C. P. (2007). Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 10*(3), 265-271. doi:10.1097/MCO.0b013e3280ebb5b3

Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews, 80*(3), 1055-1081.

Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., . . . Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research and Cell Motility, 24*(2-3), 113-119.

Pereira, B. C., Pauli, J. R., Antunes, L. M., de Freitas, E. C., de Almeida, M. R., de Paula Venâncio, V., . . . da Silva, A. S. (2013). Overtraining is associated with DNA damage in blood and

skeletal muscle cells of Swiss mice. *BMC Physiology, 13*, 11. doi:10.1186/1472-6793-13-11

Pereira, B. C., Pauli, J. R., De Souza, C. T., Ropelle, E. R., Cintra, D. E., Freitas, E. C., & da Silva, A. S. (2014). Eccentric exercise leads to performance decrease and insulin signaling impairment. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 46*(4), 686-694. doi:10.1249/MSS.0000000000000149

Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology & Medicine, 44*(2), 153-159. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029 Reardon, C. L., & Factor, R. M. (2010). Sport psychiatry: a systematic review of diagnosis and medical treatment of mental illness in athletes. *Sports Medicine, 40*(11), 961-980. doi:10.2165/11536580-000000000-00000

Rogero, M. M., Mendes, R. R., & Tirapegui, J. (2005). Neuroendocrine and nutritional aspects of overtraining. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 49*(3), 359–368. https://doi.org/10.1590/S0004-27302005000300006

Romagnani, S. (1991). Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *International Journal of Clinical & Laboratory Research, 21*(2), 152-158.

Rowbottom, D. G., Keast, D., Goodman, C., & Morton, A. R. (1995). The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 70*(6), 502-509.

Ru, W., & Peijie, C. (2009). Modulation of NKT cells and T_h1/T_h2 imbalance after alpha-GalCer treatment in progressive load-trained rats. *International Journal of Biological Sciences, 5*(4), 338-343.

Saúde., Ministério da Saúde. (2011). *Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022*. Brasília: Ministério da Saúde.

Schaal, K., Tafflet, M., Nassif, H., Thibault, V., Pichard, C., Alcotte, M., . . . Toussaint, J. F. (2011). Psychological balance in high level athletes: gender-based differences and sport-specific patterns. *PLoS One, 6*(5), e19007. doi:10.1371/journal.pone.0019007

Smith, L. L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine & Science in Sports & Exercise, 32*(2), 317-331.

Smith, L. L. (2004). Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *Journal of Strength and Conditioning Research, 18*(1), 185-193.

Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., & Klarlund Pedersen, B. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *Journal of Physiology, 529*(1), 237-242.

Terra, R., Alves, P. J., Gonçalves da Silva, S. A., Salerno, V. P., & Dutra, P. M. (2013). Exercise improves the T_h1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice. *International Journal of Sports Medicine, 34*(7), 661-666. doi:10.1055/s-0032-1329992

Terra, R., Silva, S. A. G. da, Pinto, V. S., & Dutra, P. M. L. (2012). Effect of exercise on immune system: response, adaptation and cell signaling. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte, 18*(3), 208–214. https://doi.org/10.1590/S1517-86922012000300015

Tricoli, V. (2001). Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento, 9*(2), 39-44.

Vaisberg, M., de Mello, M. T., Seelaender, M. C., dos Santos, R. V., & Costa Rosa, L. F. (2007). Reduced maximal oxygen consumption and overproduction of proinflammatory cytokines in athletes. *Neuroimmunomodulation, 14*(6), 304-309. doi:10.1159/000123155

Vargas, N. T., & Marino, F. (2014). A neuroinflammatory model for acute fatigue during exercise. *Sports Medicine, 44*(11), 1479-1487. doi:10.1007/s40279-014-0232-4

Walsh, N. P., Blannin, A. K., Robson, P. J., & Gleeson, M. (1998). Glutamine, exercise and immune function. Links and possible mechanisms. *Sports Medicine, 26*(3), 177-191.

Walsh, N. P., Gleeson, M., Pyne, D. B., Nieman, D. C., Dhabhar, F. S., Shephard, R. J., . . . Kajeniene, A. (2011). Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Exercise Immunology Review, 17*, 64-103.

Wanner, S. P., Wilke, C. F., & Duffield, R. (2016). Nutritional strategies for maximizing recovery from strenuous exercise in the heat: An important role for carbohydrate (sago) supplementation. *Temperature, 3*(3), 366–368. https://doi.org/10.1080/23328940.2016.1214335

Wierzba, T. H., Olek, R. A., Fedeli, D., & Falcioni, G. (2006). Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society, 57 Suppl 10*, 115–131.

Todo o conteúdo da revista Motricidade está licenciado sob a Creative Commons, exceto quando especificado em contrário e nos conteúdos retirados de outras fontes bibliográficas.

APÊNDICE C

Resumo do trabalho publicado no XVII Simpósio Internacional de Atividades Físicas do Rio de Janeiro – 2016

Excesso de exercício físico aumenta a suscetibilidade de infecções

Thiago Guimarães[1], Rodrigo Terra[1], Ana Lima[1], Patrícia Dutra[1]
Laboratório de Imunofisiologia do Exercício – LIFE/UERJ

INTRODUÇÃO: a inatividade física figura como uma das principais causas atribuídas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Porém, cargas extenuantes de exercícios podem prejudicar o desempenho e gerar prejuízos à saúde, como a imunossupressão celular, janela de oportunidades e o *overtraining*. **OBJETIVO:** investigar o efeito crônico do exercício físico em diferentes combinações de intensidade e duração na modulação da imunidade celular (macrófagos), através de modelo experimental com animais. **MATERIAIS E MÉTODOS:** uma amostra com 40 camundongos jovens (6 semanas de vida) foi dividida randomicamente em cinco grupos, sendo eles “controle” (6), “leve” (6), “moderado” (8), “pesado” (10) e “extenuante” (10). Com exceção do controle, os demais grupos foram submetidos a 10 semanas de treinamento de natação, variando na intensidade de zero a 2% da massa corporal, duração de 20 a 150 minutos por sessão e frequência de duas a cinco vezes semanais. O teste de capacidade física foi realizado antes, na metade e ao final do período de treinamento. Após a eutanásia, os macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal e mantidos em meio de cultura RPMI na presença de promastigotas de *Leishmania major*. **RESULTADOS:** o teste de capacidade física após a quinta semana de treinamento revelou uma diferença estatística significativa do tempo até a exaustão entre os grupos pesado (75,81±37,51) e controle (30,34±15,74), pesado e leve (30,26±20,22), extenuante (93,73±28,57) e controle, extenuante e leve, extenuante e moderado (41,11±12,88). Porém, ao final da décima semana, o teste de capacidade física revelou que os grupos moderado e pesado apresentaram o melhor desempenho, com diferenças estatísticas entre o moderado (93,58±55,26) e controle (31,08±14,17), pesado (87,59±33,43) e controle. O grupo extenuante reduziu o tempo até a exaustão na semana 10 (68,21±25,19) em relação à semana 5. Macrófagos infectados com *Leishmania major* do grupo extenuante apresentaram o maior índice de infecção (152,86±22,15), com diferença estatística em relação aos grupos pesado (14,46±4,04), moderado (6,01±4,65), leve (25,5±17,52) e controle (56,89±18,19). O grupo controle apresentou o segundo maior índice de infeção, com diferença estatística em relação aos grupos pesado, moderado e leve. **CONCLUSÃO:** embora ao final da quinta semana de experimento o grupo extenuante, com maior volume de treinamento, tenha se destacado dos demais quanto à capacidade física, o desempenho foi prejudicado a partir da segunda metade da intervenção e a imunidade celular foi comprometida. Esses dados corroboram com a hipótese de que o excesso de estresse provocado pelo exercício provoca um aumento da suscetibilidade a lesões e infecções, além do que a distribuição de cargas de forma coerente em um treinamento promove a performance e o equilibro imunológico.

Apoio: FAPERJ

APÊNDICE D

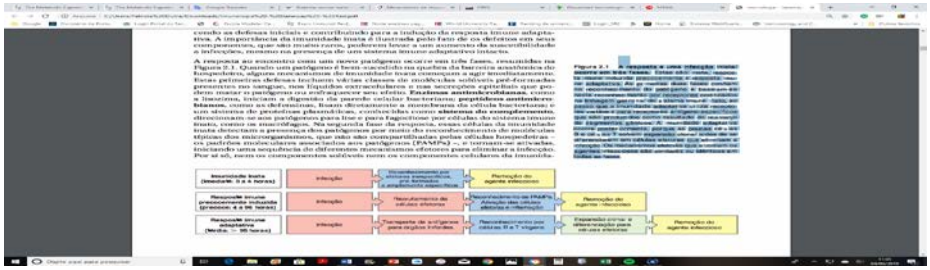
Resumo do trabalho desenvolvido junto à Liga Acadêmica de Medicina do Esporte e do Exercício da UERJ (atividade de orientação) – SUBMETIDO AO XVIII 2019.

Comparação entre rendimento acadêmico e sintomas de *overtraining*

Introdução. A prática regular de exercícios é reconhecida como promotora e mantenedora de saúde e qualidade de vida. Entretanto, o exercício físico regular parece apresentar benefícios até o desenvolvimento do *overtraining* (OT), que compromete o desempenho e a saúde. **Objetivo.** O objetivo do estudo foi verificar se o rendimento acadêmico de graduandos em medicina está correlacionado com o estado de *overtraining*, além de comparar seus sinais entre estudantes fisicamente superativos, moderadamente ativos e sedentários. **Métodos.** A amostra consistiu de 107 estudantes (massa corporal total: 68,8 ± 15,51 kg; estatura: 1,68 ± 0,10 m) do curso de Medicina da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), campus Hospital Universitário Pedro Ernesto. Foi utilizada uma anamnese para verificar o status de atividade física e dividir a amostra em três grupos: sedentários ou insuficientemente ativos (n=35), moderadamente ativos (n=57) e superativos (n=15). Foi aplicado o Questionário de Sintomas Clínicos do *Overtraining*, onde quanto maior a pontuação (podendo variar de zero a 87), mais evidentes os seus sintomas. O rendimento acadêmico foi obtido através do resultado da avaliação curricular nas disciplinas com maior carga horária em seus respectivos períodos (Anatomia II, Micro Imuno I e Clínica Médica e Propedêutica II), com pontuação variando entre zero a 10. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto em março de 2017 (parecer número 1.984.066). **Resultados.** Não houve diferença estatística significativa, através da correlação não paramétrica de Spearman, entre os escores de *overtraining* e o rendimento acadêmico (rs=-0,058; p=0,554). A ANOVA indicou diferença estatística significativa nos escores de *overtraining* entre sedentários (36,31 ± 17,3) e moderadamente ativos (28,15 ± 14,17) ($p<0,01$), entre sedentários e superativos (14,66 ± 8,86) ($p<0,001$) e entre moderadamente ativos e superativos ($p<0,01$). A ANOVA não indicou diferença significativa na quantidade de horas de sono entre os três grupos ($p>0,05$). **Conclusão.** O rendimento acadêmico não é afetado pelo estado de *overtraining*, porém, pessoas sedentárias ou insuficientemente ativas podem ser acometidas por seus sintomas característicos. Existem questões relacionadas ao desenvolvimento da exaustão física e emocional que não são justificadas exclusivamente por parâmetros tradicionais do treinamento, como por exemplo, a frequência, intensidade, duração e o intervalo das sessões de exercício físico.

ANEXO A

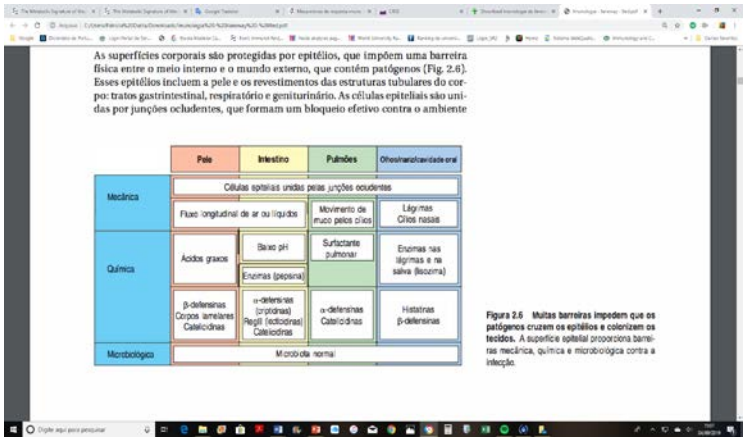
Fases da resposta imune a uma infecção inicial.



Extraído de Imunobiologia de Janeway (MURPHY, 2014).

ANEXO B

Componentes do sistema imune inato.



As superfícies corporais são protegidas por epitélios, que impõem uma barreira física entre o meio interno e o mundo externo, que contém patógenos (Fig. 2.6). Esses epitélios incluem a pele e os revestimentos das estruturas tubulares do corpo: tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário. As células epiteliais são unidas por junções ocludentes, que formam um bloqueio efetivo contra o ambiente

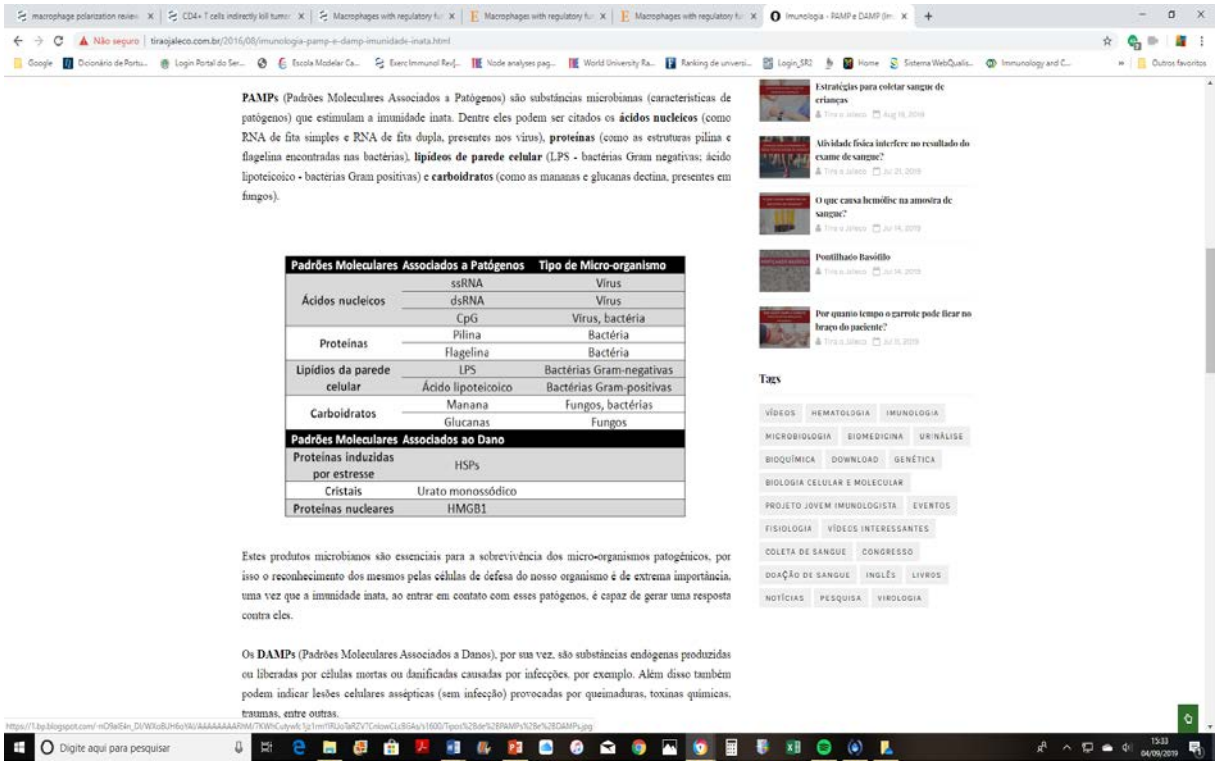
	Pele	Intestino	Pulmões	Olhos/nariz/cavidade oral
Mecânica	Células epiteliais unidas pelas junções ocludentes			
	Fluxo longitudinal de ar ou líquidos		Movimento de muco pelos cílios	Lágrimas Cílios nasais
Química	Ácidos graxos	Baixo pH Enzimas (pepsina)	Surfactante pulmonar	Enzimas nas lágrimas e na saliva (lisozima)
	β-defensinas Corpos lamelares Catelicidinas	α-defensinas (criptidinas) Regiff (ectidinas) Catelicidinas	α-defensinas Catelicidinas	Histatinas β-defensinas
Microbiológico	Microbiota normal			

Figura 2.6 Muitas barreiras impedem que os patógenos cruzem os epitélios e colonizem os tecidos. A superfície epitelial proporciona barreiras mecânica, química e microbiológica contra a infecção.

Barreiras mecânicas, químicas e microbiológicas. Extraído de Imunobiologia de Janeway (MURPHY, 2014).

ANEXO C

Receptores de reconhecimento em células do sistema imune inato.



PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) são substâncias microbianas (características de patógenos) que estimulam a imunidade inata. Dentre eles podem ser citados os **ácidos nucleicos** (como RNA de fita simples e RNA de fita dupla, presentes nos vírus), **proteínas** (como as estruturas pilina e flagelina encontradas nas bactérias), **lipídeos de parede celular** (LPS - bactérias Gram negativas; ácido lipoteicoico - bacterias Gram positivas) e **carboidratos** (como as mananas e glucanas dectina, presentes em fungos).

Padrões Moleculares Associados a Patógenos		Tipo de Micro-organismo
Ácidos nucleicos	ssRNA	Vírus
	dsRNA	Vírus
	CpG	Vírus, bactéria
Proteínas	Pilina	Bactéria
	Flagelina	Bactéria
Lipídios da parede celular	LPS	Bactérias Gram-negativas
	Ácido lipoteicoico	Bactérias Gram-positivas
Carboidratos	Manana	Fungos, bactérias
	Glucanas	Fungos
Padrões Moleculares Associados ao Dano		
Proteínas induzidas por estresse	HSPs	
Cristais	Urato monossódico	
Proteínas nucleares	HMGB1	

Estes produtos microbianos são essenciais para a sobrevivência dos micro-organismos patogênicos, por isso o reconhecimento dos mesmos pelas células de defesa do nosso organismo é de extrema importância, uma vez que a imunidade inata, ao entrar em contato com esses patógenos, é capaz de gerar uma resposta contra eles.

Os **DAMPs** (Padrões Moleculares Associados a Danos), por sua vez, são substâncias endógenas produzidas ou liberadas por células mortas ou danificadas causadas por infecções, por exemplo. Além disso também podem indicar lesões celulares assépticas (sem infecção) provocadas por queimaduras, toxinas químicas, traumas, entre outras.

Moléculas reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células do sistema imune inato (PAMPs e DAMPs). Extraído de Imunologia (ABBAS, 2014).

ANEXO D

Receptores de reconhecimento em macrófagos.

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em macrófagos. Extraído de Imunobiologia de Janeway (MURPHY, 2014).

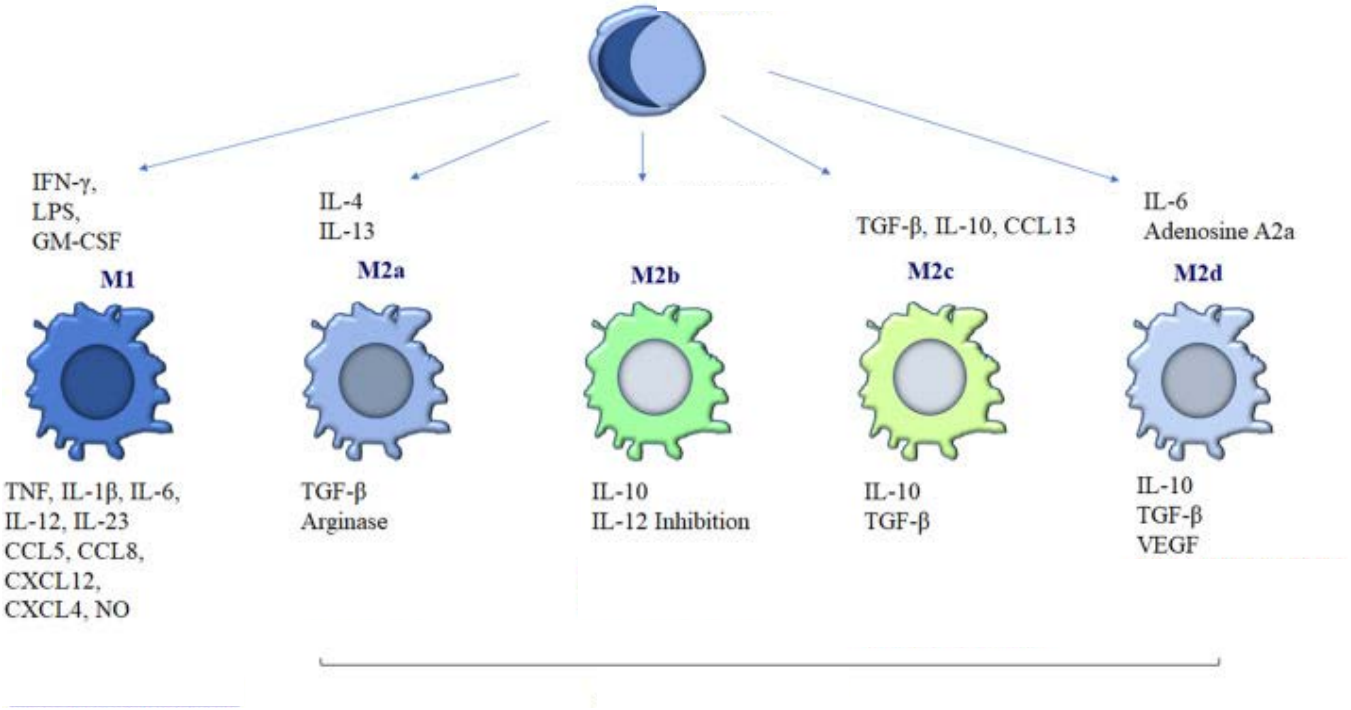
ANEXO E

Sumário da polarização de macrófagos.

M1	LPS + IFN-γ	TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23	CD80, CD86, CIITA, MHC-II	iNOS, PFKFB3, PKM2, ACOD1	NF-κB (p65), STAT1, STAT3, IRF-4, HIF1α, AP1
M2a	IL-4/IL-13	IL-10, TGF-β	CD206, CD36, IL1Ra, CD163	ARG1, CARKL	STAT6, GATA3, SOCS1, PPARγ
M2b		IL-10, IL-1β, IL-6, TNF- α	CD86, MHC II	ARG1, CARKL	STAT3, IRF4, NF-κB (p50)
M2c		IL-10, TGF- β	CD163, TLR1, TLR8	ARG1, GS	STAT3, STAT6, IRF4, NF-κB (p50)
M2d (TAM)	TLR ligands + A2R/IL-6	IL-10, VEGF	CD206, CD204, CD163	ARG1, IDO	STAT1, IRF3, NF-κB (p50)

ANEXO F

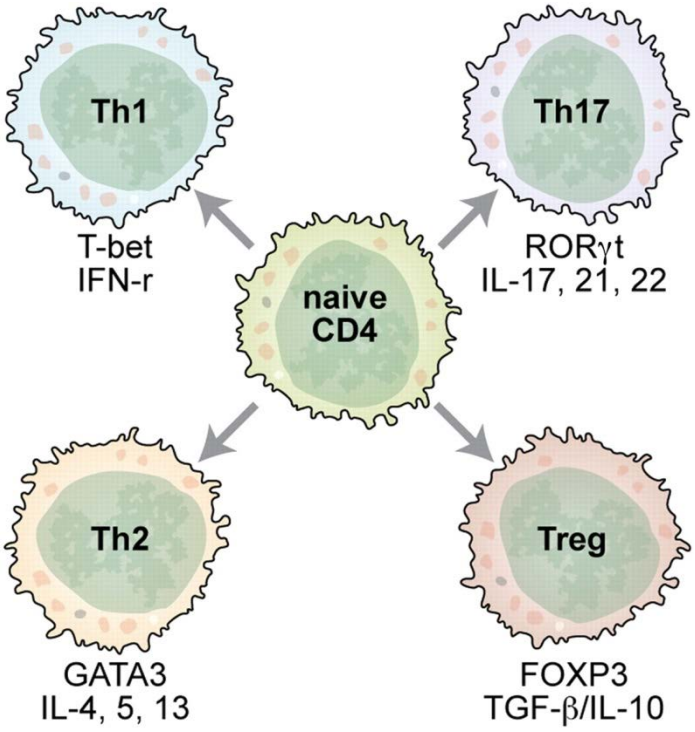
Polarização de macrófagos.



Polarização de macrófagos. Extraído de Viola *et al*., 2019.

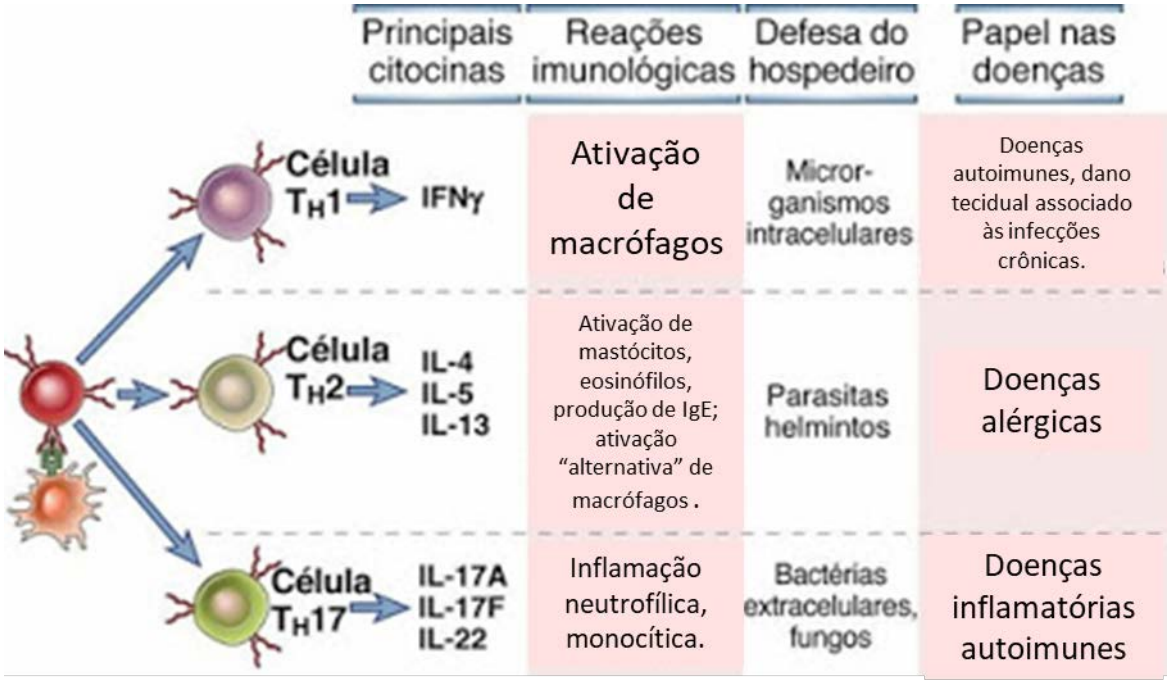
ANEXO G

Diferenciação de células TCD4^{+}.



ANEXO H

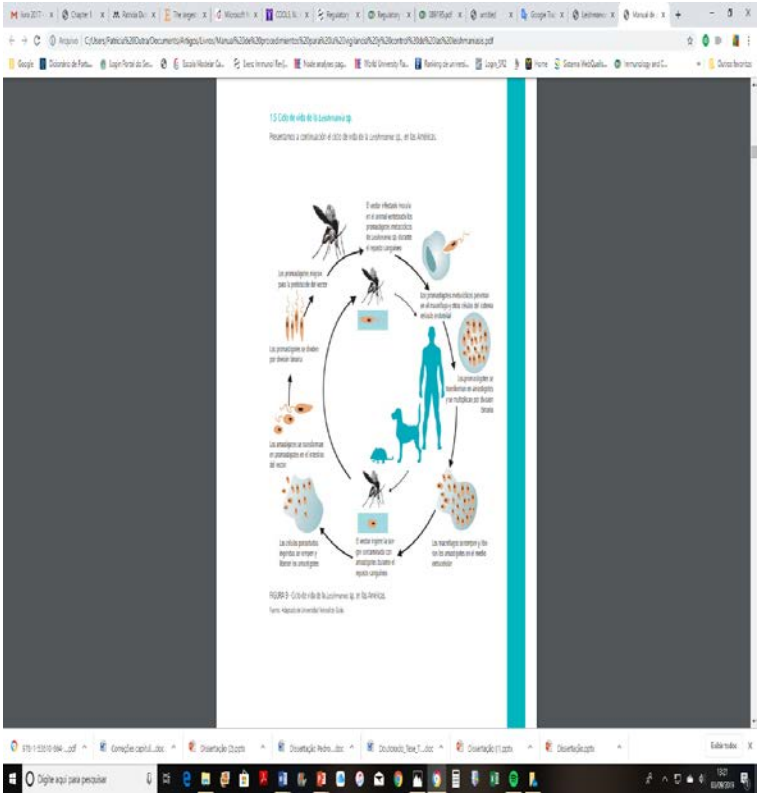
Células TCD4^{+} sob diferentes estímulos.



Representação esquemática de células TCD4^{+} virgens (Th0) sob diferentes estímulos e suas possíveis vias de diferenciação (fenótipos finais). Os linfócitos T *helper* virgens (Th0) podem diferenciar-se nos fenótipos efetores Th1, Th2 eTh17 em resposta a antígenos, co-estimuladores e citocinas. As colunas mostram as diferenças entre os subgrupos mais bem definidos. Extraído de Imunologia (ABBAS, 2014).

ANEXO I

Ciclo de vida da *Leishmania sp*.

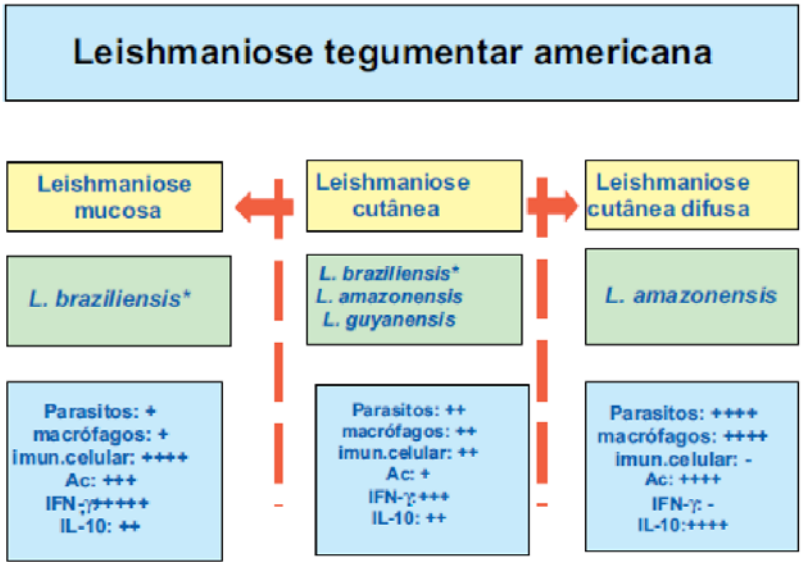


Extraído de Manual de Procedimientos para Vigilancia y Control de las Leishmaniasis em las Americas (OPAS, 2019)

Após a picada do flebotomíneo, neutrófilos dirigem-se ao local da lesão e são invadidos pelos promastigotas metacíclicos em um processo inicial de infecção. Os parasitos liberados dos neutrófilos, ou ainda aqueles que não tiveram contato com este tipo celular, são convencionalmente fagocitados pelos macrófagos, alojados em um fagolisossoma clássico, onde diferenciam-se em amastigotas e multiplica-se por divisão binária. Os macrófagos rompem-se, liberando os amastigotas, que podem infectar novas células. Durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos, os amastigotas presentes nos macrófagos da pele, no líquido intersticial (devido ao rompimento dos macrófagos) ou no sangue (no plasma ou no interior de monócitos, no caso de calazar) são sugados e transformam-se em promastigotas procíclicos, os quais se multiplicam por divisão binária no trato digestivo do inseto vetor. Posteriormente, esses protozoários passam pela metaciclogênese, o processo de aquisição do poder infectante, transformando-se em promastigotas metacíclicos, os quais não possuem capacidade replicativa. Após a metaciclogênese o parasito migra para o pró-ventrículo, onde secreta uma molécula chamada proteoglicana (PPG) formando uma rede. Esta rede e a grande quantidade de promastigotas presentes neste órgão provocam um entupimento, que, durante o próximo repasto sanguíneo, ocasiona um regurgitamento introduzindo as formas infectantes misturadas ao sangue não ingerido e à saliva do inseto vetor no hospedeiro vertebrado.

ANEXO J

Resposta imune à LTA.



Legenda: * Principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil.
Ac: Anticorpos
IFN-γ: Interferon gama
IL-10: Interleucina 10
- ausência
+ Presença : + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa

Reposta imune à Leishmaniose tegumentar americana.