



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Educação e Humanidades

Instituto de Educação Física e Desportos

Pedro José Falci Alves

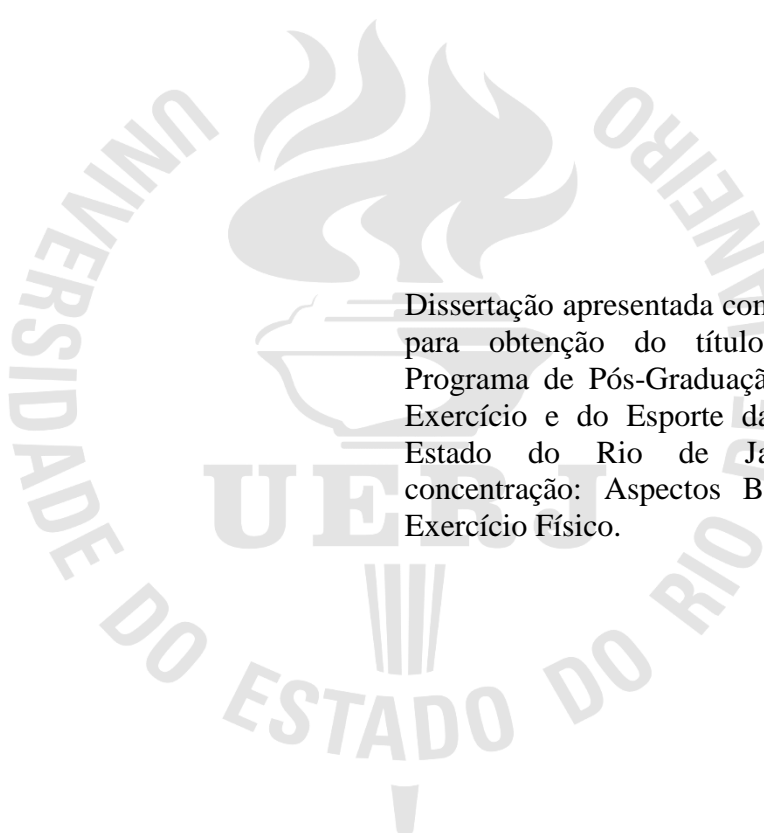
**Comparação de diferentes protocolos de exercício físico agudo na atividade microbicida de macrófagos: *Leishmania major* como modelo experimental**

Rio de Janeiro

2019

Pedro José Falci Alves

**Comparação de diferentes protocolos de exercício físico agudo na atividade microbicida de macrófagos: *Leishmania major* como modelo experimental**



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra,

Rio de Janeiro

2019

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

A474 Alves, Pedro José Falci.

Comparação de diferentes protocolos de exercício físico agudo na atividade microbicida de macrófagos: Leishmania major como modelo experimental / Pedro José Falci Alves. – 2019.

62 f. : il.

Orientadora: Patrícia Maria Lourenço Dutra.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Educação Física e Desportos.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos – Teses. 2. Exercícios físicos – Aspectos de saúde – Teses. 3. Sistema imunológico – Teses. 4. Macrófagos – Teses. I. Dutra, Patrícia Maria Lourenço. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Educação Física e Desportos. III. Título.

CDU 612.766.1

Bibliotecária: Eliane de Almeida Prata. CRB7 4578/94

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

---

Assinatura

---

Data

Pedro José Falci Alves

**Comparação de diferentes protocolos de exercício físico agudo na atividade microbicida de macrófagos: *Leishmania major* como modelo experimental**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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 03 de setembro de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra (Orientadora)  
Instituto de Educação Física e Desportos – UERJ

---

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

---

Prof. Dr. Rodrigo Terra Mattos Sanctos  
Força Aérea Brasileira

Rio de Janeiro

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação à minha família por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Aos meus amigos por sempre me trazerem momentos especiais durante esse processo. À minha orientadora Patrícia Dutra, pois sem ela, não teria conseguido alcançar tal patamar.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e meu anjo da guarda por sempre me protegerem e me guiarem. Agradeço aos meus pais por todo o suporte dado até esse momento. Agradeço aos meus amigos, mas, em especial a Rodrigo Terra, Gustavo Massom e Leandro Corrêa por sempre me incentivarem neste meio e por se tornarem pessoas as quais me espelho para seguir o tal caminho. Agradecer à amiga Carolina Moreira, por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor. À todos que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho profa. Silvia, Rosiane, Larissa, Rafaella, Andreia, Thayssa, Jenifer e, principalmente, à Shay que fez de tudo para que esse trabalho desse certo. Não poderia deixar de agradecer à minha orientadora e amiga, Patrícia Dutra por me aturar todo esse tempo e ter gasto três coisas muito preciosas comigo: tempo, paciência e conhecimento (sem você, nada teria acontecido)

## RESUMO

ALVES, Pedro José Falci. *Comparação de diferentes protocolos de exercício físico agudo na atividade microbicida de macrófagos: Leishmania major* como modelo experimental. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Exercício e do Esporte) – Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O exercício físico pode trazer benefícios para saúde através de respostas e adaptações promovidas nos diversos sistemas biológicos, incluindo o sistema imunológico. Exercício físico de intensidade moderada pode reduzir o risco de infecção por microrganismos intracelulares, através do direcionamento da resposta imune para um padrão do tipo Th1. Exercício físico extenuante pode gerar um direcionamento das células imunes, causando uma “janela imunológica”, podendo deixar o organismo suscetível a infecções, através da prevalência de uma resposta do tipo Th2. Este estudo investiga o efeito de uma única sessão de exercício, agudo, moderado ou extenuante, na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C. Os camundongos foram divididos em 3 grupos para o exercício agudo (controle sedentário, exercício moderado e exercício extenuante). O exercício agudo consistiu de uma única sessão moderada e uma única sessão extenuante. Uma única sessão de exercício moderado (agudo) promoveu aumento significativo na produção NO em macrófagos estimulados por LPS e infectados por *Leishmania major* ou por *Leishmania braziliensis*. Uma única sessão de exercício moderado e extenuante promoveu a diminuição do índice de associação *Leishmania*/Macrófago na infecção *in vitro* por *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*. Estes dados sugerem que exercício físico agudo promove uma melhora na capacidade microbicida de macrófagos, o que facilita a resolução de infecções por microrganismos intracelulares, porém, há a necessidade de mais estudos para melhor entender tais mecanismos.

Palavras-chave: Exercício físico. Sistema imune. Macrófagos.

## ABSTRACT

ALVES, Pedro José Falci. *Comparison of different exercise protocols on macrophage microbicidal activity: Leishmania major as an experimental model*. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Exercício e do Esporte) – Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Exercise can bring health benefits through responses and adaptations promoted in various biological systems, including the immune system. Moderate intensity exercise can reduce the risk of infection by intracellular microorganisms by directing the immune response to a Th1 type pattern. Strenuous physical exercise can lead to immune cell targeting, causing an “immune window” that can make the body susceptible to infection through the prevalence of a Th2-type response. This study investigates the effect of a single exercise session, acute, moderate or strenuous, on nitric oxide production by peritoneal macrophages of Balb / C mice. The mice were divided into 3 groups for acute exercise (sedentary control, moderate exercise and strenuous exercise). The acute exercise consisted of a single moderate session and a single strenuous session. A single session of moderate (acute) exercise promoted a significant increase in NO production in LPS-stimulated macrophages infected with *Leishmania major* or *Leishmania braziliensis*. A single session of moderate and strenuous exercise promoted a decrease in the *Leishmania* / Macrophage association index in in vitro *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* infection. These data suggest that acute exercise promotes an improvement in macrophage microbicidal capacity, which facilitates the resolution of infections by intracellular microorganisms, but further studies are needed to better understand such mechanisms.

Keywords: Exercise. Immune system. Macrophage.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 - Fases da resposta imune a uma infecção inicial.....	16
Quadro 1 - Componentes do sistema imune inato: Barreiras mecânicas, químicas e microbiológicas.....	17
Quadro 2 - Moléculas reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células do sistema imune inato (PAMPs e DAMPs) .....	18
Esquema 2 - Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em macrófagos.	19
Tabela 1 - Sumário esquematizado da polarização de macrófagos.....	21
Esquema 3 - Polarização de macrófagos. ....	22
Esquema 4 - Diferenciação de células TCD4+ virgens nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg. ....	24
Esquema 5 - Representação esquemática de células TCD4+ virgens (Th0) sob diferentes estímulos e suas possíveis vias de diferenciação (fenótipos finais).....	26
Esquema 6 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.	30
Quadro 3 - Resposta imune à LTA.....	32
Figura 1 - Controle da intensidade do exercício.....	40
Figura 2 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> ou <i>L. braziliensis</i> .....	41
Figura 3 - Efeito do exercício físico agudo extenuante na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> .....	42
Figura 4 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C.....	43
Figura 5 - Efeito do exercício físico agudo extenuante na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C.....	45
Figura 6 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de TNF em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> ou <i>L. braziliensis</i> .....	46
Figura 7 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de MCP-1 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> ou <i>L. braziliensis</i> .....	47

Figura 8 -	Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-10 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> ou <i>L. braziliensis</i> .....	48
Figura 9 -	Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-6 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de <i>L. major</i> ou <i>L. braziliensis</i> .....	48
Figura 10 -	Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-6, TNF, MCP-1 e IL-10 em células esplênicas de camundongos BALB/c .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSM	Colégio Americano de Medicina do Esporte
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EROS	Espécies reativas de oxigênio
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISEI	Sociedade Internacional de Exercício e Imunologia
ITRS	Infecção do trato respiratório superior
Lb	<i>Leishmania brasiliensis</i>
LC	Leishmania Cutânea
LCD	Leishmania Cutânea difusa
Lm	<i>Leishmania major</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LPS	Lipolossacarídeo bacteriano
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M.C	Massa Corporal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
O <sup>2-</sup>	ânion superóxido
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
TBARs	Substância reativa de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricolocético
Th1	T helper tipo 1

Th2	T helper tipo 2
TLRS	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VO <sub>2</sub>	Consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
1 CONSIDERAÇÕES BÁSICAS NA RESPOSTA IMUNE .....	15
1.1 Resposta imune inata .....	16
1.2 Resposta imune adaptativa .....	23
1.3 Efeito do exercício físico no sistema imunológico .....	26
1.4 Leishmaniose .....	28
1.5. Resposta imune à leishmaniose .....	31
2 OBJETIVOS: .....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 Microrganismo .....	35
3.2 Animais .....	35
3.3 Estabelecimento dos grupos .....	35
3.4 Estabelecimento do protocolo de treinamento físico .....	36
3.4.1. Exercício agudo .....	36
3.5 Teste de capacidade física do exercício .....	36
3.6 Controle de parâmetros associados ao exercício .....	37
3.6.1. Dosagem de lactato sanguíneo .....	37
3.6.2. Avaliação dos índices de peroxidação lipídica: .....	37
3.7 Obtenção de macrófagos peritoneais .....	37
3.8 Obtenção de Células do Baço .....	38
3.9 Experimentos de interação celular .....	38
3.10 Efeito do exercício na produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos .....	38
3.11 Análise estatística .....	39
4 RESULTADOS .....	40
4.1 Efeito do exercício físico agudo nas concentrações de lactato sanguíneo .....	40
4.2 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) no fator de infecção entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e protozoários do gênero Leishmania .....	41
4.3 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por protozoários do gênero Leishmania .....	43

4.4	<b>Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na quantificação de citocinas em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C</b> .....	46
4.5	<b>Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na produção de citocinas em células do baço de camundongos Balb/c</b> .....	49
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

## INTRODUÇÃO

As modificações no estilo de vida observadas na população mundial durante o último século têm proporcionado uma diminuição na prática de atividade física, seja pela mudança no tipo de trabalho, seja por adoção de novos hábitos cada vez mais sedentários. Esta mudança tem levado a um pronunciado aumento na incidência de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, assim como tem promovido um aumento na obesidade, em desordens musculoesqueléticas, em doenças pulmonares, em certos tipos de câncer e em desordens neurológicas (Eriksen *et al.*, 1998; Handschin e Spiegelman, 2008; Booth, 2017). Tais modificações também podem interferir no funcionamento do sistema imunológico (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Romeo *et al.*, 2010; Rubinow K.B. e Rubinow D.R., 2017). O exercício físico regular promove uma série de respostas e adaptações fisiológicas dependentes de princípios básicos que devem ser observados em sua prescrição. Variáveis como o volume e a intensidade, devem estar muito bem definidas para que se obtenha um resultado satisfatório. O Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) recomenda que adultos aparentemente saudáveis realizem exercícios moderados, cinco dias ou mais por semana com volume aproximado 150min/sem ou exercício extenuante três ou mais dias por semana com volume aproximado de 75min/sem, ou ainda uma combinação dos dois. Exercícios de intensidade leve/moderada podem ser benéficos para pessoas destreinadas (ACSM, 1998).

No final do século XIX (1893) foi publicado o primeiro artigo relatando alterações encontradas em células sanguíneas após a prática de exercício físico. Estudos deste tipo, relacionando exercício físico e sistema imune, foram muito escassos até a metade da década de 1970, quando o grande aumento de conhecimentos na área de imunologia associado ao alto desenvolvimento tecnológico permitiu uma ampla investigação em áreas fundamentais do exercício, incluindo o estudo das causas de infecções de vias aéreas superiores que ocorrem em atletas submetidos a esforços extenuantes, o estudo do exercício como modelo de estresse e o estudo da influência do exercício crônico como resposta adaptativa a situações de estresse (revisto por Rosa e Vaisberg, 2002).

As respostas e adaptações promovidas pelo exercício (agudo ou crônico) podem afetar diversos componentes do sistema imune (revisto por Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Nieman e Wentz, 2019). O exercício de intensidade moderada pode estimular parâmetros

relacionados à uma maior imunidade celular e assim diminuir o risco de infecção, enquanto o exercício de alta intensidade pode promover um decréscimo destes mesmos parâmetros, aumentando assim o risco de infecções (Malm, 2004; Gleeson, 2006b; (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Nieman e Wentz, 2019).



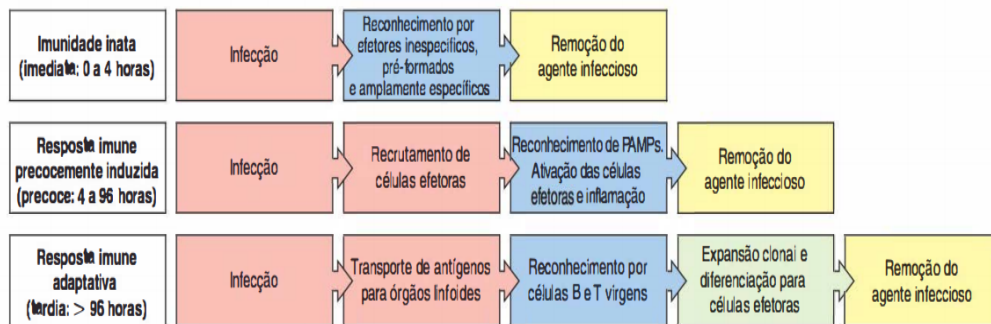
## 1. CONSIDERAÇÕES BÁSICAS NA RESPOSTA IMUNE

O Sistema Imunológico é um sistema de reconhecimento e reparo. Ele reconhece o que é próprio ou não é próprio ao organismo e repara as alterações do mesmo visando a homeostasia (Mesquita Junior *et al.*, 2010). A resposta imunológica pode ser de dois tipos: resposta inata e resposta adaptativa. A resposta inata é aquela inerente ao organismo, já está pronta, enquanto a resposta imune adaptativa precisa ser montada, sendo a forma como o sistema prepara sua defesa a partir do contato com o organismo invasor (Cruvinel *et al.*, 2010).

Na maior parte das vezes, os microrganismos são detectados e destruídos rapidamente por mecanismos que não incluem a expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos. Esses são os mecanismos apresentados pela resposta imune inata. No reconhecimento dos diversos patógenos, tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo são capazes de distinguir entre o próprio e o não próprio, mas 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. Já na imunidade adaptativa os receptores para o reconhecimento do organismo invasor são formados por um processo de rearranjo gênico nas células somáticas e produz um enorme repertório de receptores de antígenos, os quais são capazes de distinguir perfeitamente entre moléculas muito relacionadas. Contudo, 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 (Imunobiologia de Janeway, 2014).

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 (Esquema 1). As primeiras duas fases fazem o reconhecimento do patógeno por meio de receptores codificados na linhagem germinal do sistema imune inato. Na terceira fase, o reconhecimento é feito por meio de receptores variáveis para antígenos específicos. 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 (Imunobiologia de Janeway, 2014).

## Esquema 1 - Fases da resposta imune a uma infecção inicial



Fonte: Extraído de Imunobiologia de Janeway (2014).

Somente os mecanismos que envolvem os componentes solúveis e celulares da imunidade inata não podem fornecer memória imunológica protetora de longo tempo. Por esse motivo, esses mecanismos são responsáveis pela indução da resposta imune adaptativa, a terceira fase da resposta a infecção inicial por um patógeno. Essa indução ocorre no caso do patógeno ser capaz de romper as duas primeiras fases da resposta. Ela 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 (Imunobiologia de Janeway, 2014).

### 1.1. Resposta imune inata:

A resposta inata é a resposta imunológica com a qual já nascemos. Ela não precisa do contato com o organismo invasor para ser montada. Essa resposta inclui a participação de barreiras químicas e mecânicas (Quadro 1), como moléculas contidas na saliva e na lágrima e a pele, respectivamente, como exemplos dessas barreiras (Imunobiologia de Janeway, 2014). A resposta imune inata inclui a participação de células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, além dos linfócitos conhecidos como células *natural killer* (NK), sistemas enzimáticos como os que incluem a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a NADPH oxidase (phox), que resultam em moléculas microbicidas como o óxido nítrico (NO) e ânion superóxido ( $O_2^-$ ) respectivamente (Cruvinel *et al.*, 2010).

Quadro 1 - Componentes do sistema imune inato: Barreiras mecânicas, químicas e microbiológicas

	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)
	$\beta$ -defensinas Corpos lamelares Catelicidinas	$\alpha$ -defensinas (criptidinas) RegIII (lectidinas) Catelicidinas	$\alpha$ -defensinas Catelicidinas	Histatinas $\beta$ -defensinas
Microbiológica	Microbiota normal			

Legenda: A superfície epitelial proporciona barreiras mecânica, química e microbiológica contra a infecção.  
Fonte: Extraído de Imunobiologia de Janeway (2014).

Quando um organismo invasor consegue romper as barreiras anatômicas da imunidade inata, outros mecanismos deste sistema começam a agir imediatamente. As primeiras defesas incluem várias classes de moléculas solúveis pré-formadas presentes no sangue, nos líquidos extracelulares e nas secreções epiteliais. Como exemplo, 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 importante, 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 (Imunobiologia de Janeway, 2014). Na segunda fase da resposta, as células da imunidade inata reconhecem os patógenos por meio de moléculas típicas dos microrganismos, as quais não são compartilhadas pelas células do hospedeiro. Deste modo, tornam-se ativadas iniciando uma sequência de diferentes mecanismos efetores com o objetivo de eliminar a infecção. 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 receptores capazes de reconhecer os PAMPs são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*). 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 quebra de homeostasia, denominadas padrões

moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular pattern*). Como exemplo podemos citar as proteínas induzidas por estresse (proteínas de choque térmico HSPs, do inglês *heat shock protein*), cristais e proteínas nucleares (Imunobiologia de Janeway, 2014) (Quadro 2).

Quadro 2 - Moléculas reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células do sistema imune inato (PAMPs e DAMPs)

<b>Padrões Moleculares Associados a Patógenos</b>		<b>Tipo de Micro-organismo</b>
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
<b>Padrões Moleculares Associados ao Dano</b>		
Proteínas induzidas por estresse	HSPs	
Cristais	Urato monossódico	
Proteínas nucleares	HMGB1	

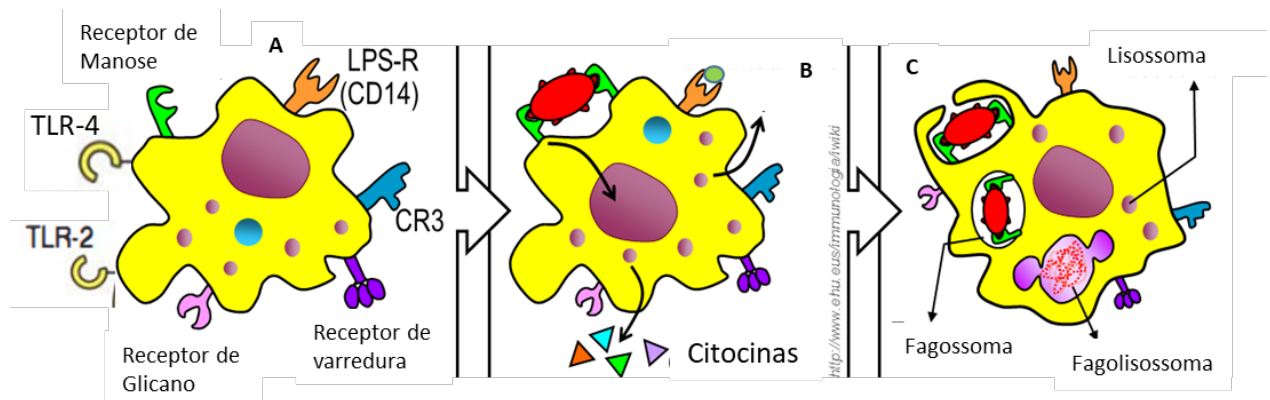
Fonte: Extraído de Imunologia (Abbas, 2014).

Os macrófagos são células fagocíticas que desempenham um papel central no sistema imunológico inato, seja no controle da fagocitose, seja promovendo a morte bacteriana, produzindo citocinas ou apresentando 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, as quais ele chamou de "macrófagos" ("makros" = grande, "phagein" = comer) (Metchnikoff, 1989).

Os macrófagos expressam vários PRRs que os permitem reconhecer componentes específicos dos microrganismos. Alguns destes, como os receptores de manose e de glicano e os receptores de varredura, ligam-se a carboidratos da parede celular das bactérias, das leveduras e dos fungos. 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 (Imunobiologia de Janeway, 2014). O LPS é muito utilizado experimentalmente para a ativação clássica de macrófagos (Esquema 2).

Esquema 2 - Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em macrófagos.



Legenda: A – Os macrófagos têm receptores que reconhecem muitos compostos comuns aos microrganismos (PAMPs). B – Quando os receptores reconhecem seus ligantes, o macrófago torna-se ativado e libera vários produtos. C – O macrófago engloba, internaliza e destrói o microrganismo (Extraído de Imunobiologia de Janeway, 2014).

Os macrófagos consistem em duas importantes classes principais: macrófagos residentes nos tecidos e macrófagos infiltrantes. Células de Kupffer hepáticas, micróglia, macrófagos peritoneais, macrófagos alveolares, macrófagos da polpa esplênica e da medula óssea são exemplos de macrófagos residentes em tecidos. Estes macrófagos residem e desempenham funções homeostáticas em seus respectivos tecidos removendo patógenos invasores, células apoptóticas e detritos de células (*debris* celular), mantendo assim a integridade do tecido e a homeostase dos sistemas (Murray e Wynn, 2011). 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 Ly6Chi). Esses macrófagos geralmente são encontrados em contextos patológicos, como o câncer (Qian *et al.*, 2011), aterosclerose (Ingersoll *et al.*, 2011) e doença metabólica (Chawla *et al.*, 2011).

Primeiramente sugeriu-se que os macrófagos teciduais seriam oriundos da diferenciação de monócitos que deixam a corrente sanguínea periférica durante o processo inflamatório. Contudo, atualmente já está estabelecido que os progenitores dos macrófagos teciduais derivam do saco vitelino e do fígado fetal durante a hematopoese primitiva (Hoeffel *et al.*, 2012), enquanto os macrófagos infiltrantes são derivados de monócitos e tem origem na

medula óssea por hematopoese definitiva. Os macrófagos derivados dos embriões mantêm o potencial de auto-renovação, enquanto as células derivadas de monócitos são terminalmente diferenciadas (Hashimoto *et al.*, 2013).

Embora haja diferenças, tanto os macrófagos infiltrados quanto os macrófagos residentes desempenham um papel central na manutenção da homeostasia e na regeneração tecidual pós lesão. A taxa de renovação tecidual em humanos tem sido estimada em, aproximadamente, 1 milhão de células/s a cada dia (Han e Ravichandran, 2011), sendo realizada pela constante remoção de corpos apoptóticos, a qual é mantida, principalmente, por macrófagos residentes, através de um processo imunologicamente silencioso chamado de eferocitose. Uma das principais características deste processo é a liberação de citocinas anti-inflamatórias que impedem o desenvolvimento de inflamação. Dentre as citocinas anti-inflamatórias secretadas podem ser citadas a IL-10 e TGF- $\beta$  (Fadok *et al.*, 1998; Voll *et al.*, 1997). De fato, defeitos no *clearance* de células apoptóticas são diretamente ligadas ao desenvolvimento de inflamação e de doenças auto-imunes (Han e Ravichandran, 2011). Por outro lado, 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 estromais e endoteliais. 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 (Ley *et al.*, 2007).

Os macrófagos são células extremamente plásticas, que respondem a estímulos provenientes do microambiente local e, assim, adquirem um fenótipo funcional específico. Este processo de diferenciação de macrófagos em um determinado fenótipo é chamado de polarização. De acordo com essa polarização, os macrófagos podem ser classificados em macrófagos classicamente ativados (pró-inflamatórios ou M1) (8, 9) e macrófagos alternativamente ativados (anti-inflamatórios ou M2) (10, 11). Estes 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 *et al.*, 2019). Os macrófagos pró-inflamatórios (M1) são ativados por produtos microbianas como o lipopolissacarídeo (LPS) e outros ligantes de TLRs, ou por ação de citocinas secretadas por linfócitos Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF. Do ponto de vista funcional os macrófagos M1 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, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-23 e induz respostas do tipo Th1 (revisto por 12, 13) (Tabela 1 e Esquema 3).

Tabela 1 - Sumário esquematizado da polarização de macrófagos

Polarização	Estímulo	Citocinas liberadas	Marcadores de superfície	Enzimas metabólicas	Fatores de transcrição	Funções
M1	LPS + IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23	CD80, CD86, CIITA, MHC-II	iNOS, PFKFB3, PKM2, ACOD1	NF- $\kappa$ B (p65), STAT1, STAT3, IRF-4, HIF1 $\alpha$ , AP1	Morte de bactérias, resistência a tumores, resposta Th1
M2a	IL-4/IL-13	IL-10, TGF- $\beta$	CD206, CD36, IL1Ra, CD163	ARG1, CARKL	STAT6, GATA3, SOCS1, PPAR $\gamma$	Resposta anti-inflamatória, remodelação tecidual, cicatrização de feridas
M2b	IC, Ligantes de TLR/IL-1Ra	IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$	CD86, MHC II	ARG1, CARKL	STAT3, IRF4, NF- $\kappa$ B (p50)	Progressão de tumor, <u>imunorregulação</u> , resposta Th2
M2c	<u>Glicocorticóides</u> /IL-10	IL-10, TGF- $\beta$	CD163, TLR1, TLR8	ARG1, GS	STAT3, STAT6, IRF4, NF- $\kappa$ B (p50)	<u>Fagocitose</u> de corpos apoptóticos, remodelação tecidual, imunossupressão
M2d (TAM)	TLR ligands + A2R/IL-6	IL-10, VEGF	CD206, CD204, CD163	ARG1, IDO	STAT1, IRF3, NF- $\kappa$ B (p50)	Angiogênese, progressão de tumores

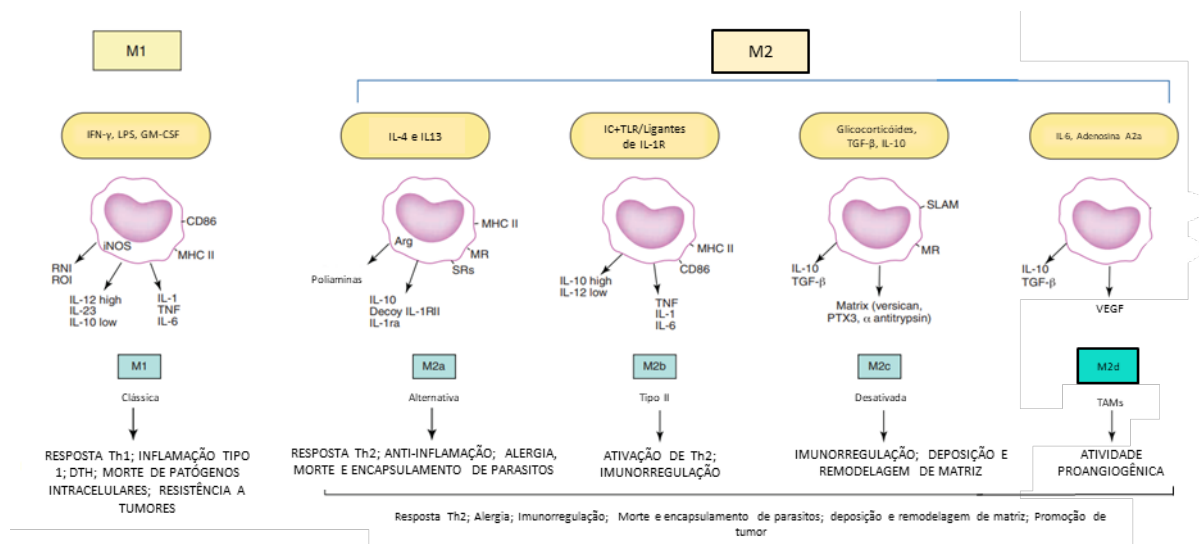
Legenda: A2R - receptor de adenosina 2; ACOD1 - aconitato descarboxilase 1; AP-1 - Proteína ativadora 1; ARG1 - Arginase 1; CARKL - Carboidrato cinase-like; IC - imunocomplexos; IDO - Indoleamina dioxigenase; iNOS - Óxido nítrico sintase induzida; GATA3 - Proteína de ligação GATA 3; GS - Glutamina sintetase; HIF1 $\alpha$  - Fator induzível por hipóxia 1 alfa; IFN- $\gamma$  - interferon gama; IL - interleucina; IRF - Fator regulador do interferon; MHC-II - Complexo de histocompatibilidade principal classe 2; NF- $\kappa$ B - Fator nuclear de transcrição de ativação de células B; PPAR $\gamma$  - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; SOCS1 - Supressor de sinalização de citocinas; STAT - Sinal transdutor e ativador de transcrição; TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa; TGF- $\beta$  - Fator de transformação e crescimento beta; TLR - Receptor do tipo Toll; VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Extraído de Viola *et al.*, 2019.

Macrófagos M2 são alternativamente ativados por ação das citocinas IL-4 ou IL-13 secretadas tanto por células imunes inatas quanto adaptativas, como mastócitos, basófilos e linfócitos Th2 (10, 11). 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- $\beta$ ) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), suprimindo ativamente a inflamação e promovendo o reparo tecidual (21). Além disso, esse fenótipo expressa a enzima arginase 1 (ARG1) (22). O aumento da atividade desta enzima resulta na produção de poliaminas e colágeno e favorece a remodelação tecidual e a cicatrização de feridas (21), contudo, pode também estimular o crescimento de microrganismos. Finalmente, 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

(23) (Tabela 1). Além deste fenótipo induzido por IL-4/IL-13 (também conhecido como M2a), perfis específicos de macrófagos M2 podem ser induzidos por diferentes 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) (24). Assim, M2b ou macrófagos regulatórios induzidos por estimulação com complexos imunes e ligantes TLR ou por agonistas de IL-1R, produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, como TNF e IL-10, respectivamente, e são capazes de regular reações imunológicas e inflamatórias. Por outro lado, o subconjunto M2c é ativado por glicocorticóides ou IL-10 e exibe um forte perfil anti-inflamatório liberando IL-10 e TGF- $\beta$ . Finalmente, os macrófagos M2d, também conhecidos como macrófagos associados a tumores (TAMs), são induzidos por ligantes de TLR e agonistas do receptor A2 de adenosina (A2R) ou por IL-6. Este fenótipo secreta altos níveis de IL-10, TGF- $\beta$  e VEGF e baixos níveis de IL-12, TNF e IL-1 $\beta$ , e contribuem para a angiogênese tumoral, crescimento e metástase (25) (Tabela 1 e Esquema 3). 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 *et al.*, 2019).

Esquema 3 - Polarização de macrófagos.



Legenda: Dependendo do microambiente de ativação, das citocinas e ligantes aos quais os macrófagos são expostos, 5 fenótipos podem ser ativados: M1 (inflamatório), M2a (anti-inflamatório), M2b (imunorregulador), M2c (reparador tecidual) e M2d (promotor de tumores)

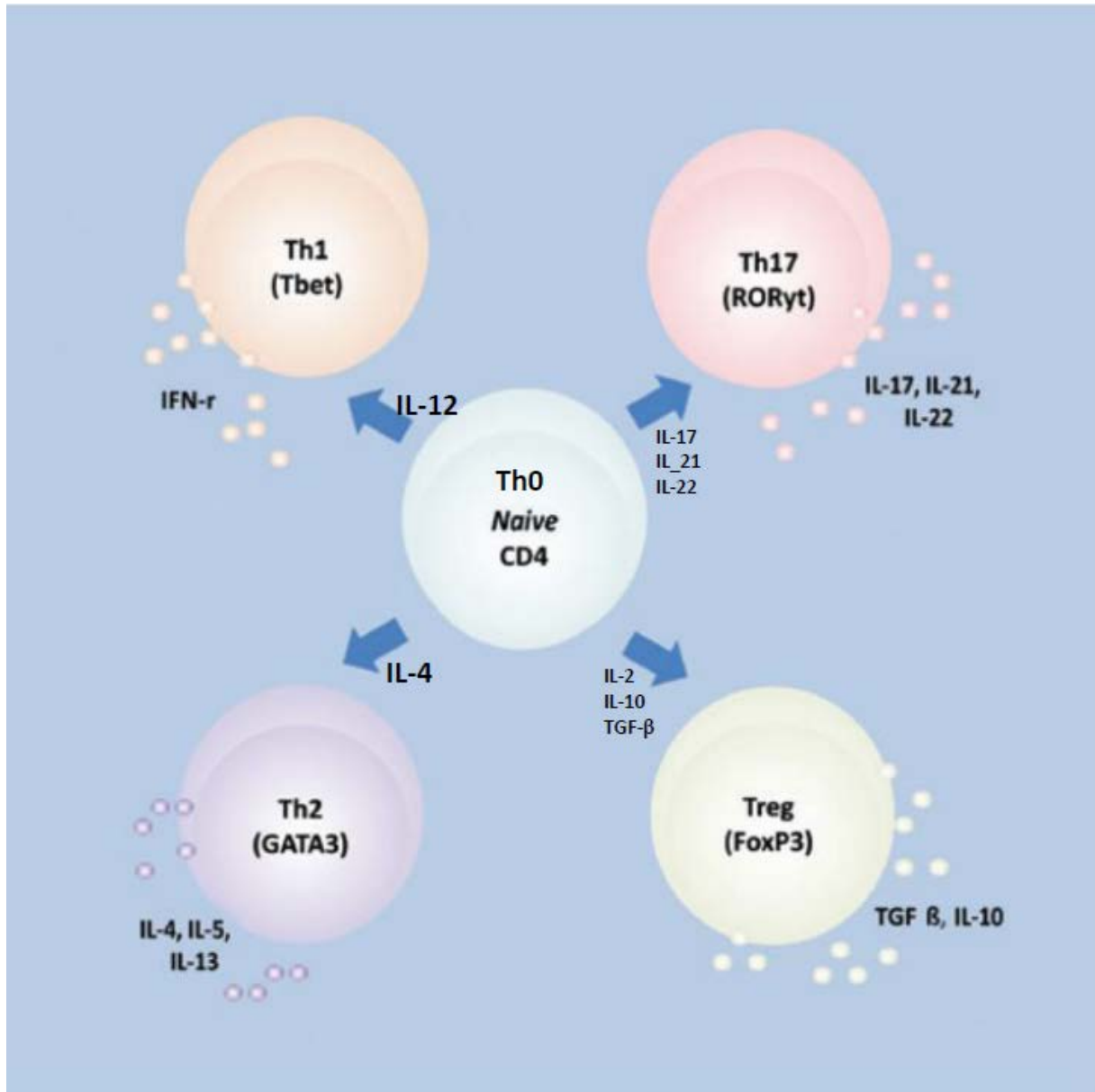
Fonte: Extraído e adaptado de Martinez e Gordon, 2014 e de Viola *et al.*, 2019.



## 1.2. Resposta imune adaptativa:

A resposta imune adaptativa é uma resposta montada a partir do contato com o organismo invasor. Ela pode ser de dois tipos: resposta imune humoral (mediada por anticorpos, produzidos por linfócitos B) e resposta imune celular (mediada por células, tais como linfócitos T e macrófagos) (Cruvinel *et al.*, 2010). Os linfócitos T podem ter dois diferentes marcadores principais: CD4 e CD8. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> são chamados de auxiliares (*helper* - Th) enquanto os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são os conhecidos linfócitos T citotóxicos (Junior *et al.*, 2010). Os linfócitos Th virgens (Th0) podem se diferenciar em diversas subpopulações, dentre elas destacam-se as células Th1 (T *helper* tipo 1), Th2 (T *helper* tipo 2) Th17 (T *helper* tipo 17) e Treg (T *helper* tipo regulatório) (revisto por Kemp *et al.*, 1996; Del Prete, 2008).

Cada um desses tipos celulares produz diferentes padrões de citocinas e sua diferenciação nos diversos fenótipos depende da presença das citocinas predominantes no microambiente de ativação, moléculas co-estimulatórias e o tipo de antígeno a ser apresentado (revisto por Del Prete, 2008) (Esquema 4).

Esquema 4 - Diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> virgens nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg.

Legenda: As células TCD4<sup>+</sup> virgens diferenciam-se nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg por ação das citocinas presentes no microambiente onde ocorre sua proliferação. A sinalização promovida por estas citocinas leva à expressão dos fatores de transcrição específicos para cada fenótipo (Tbet para Th1, GATA3 para Th2, ROR $\gamma$ t para Th17 e FoxP3 para Treg) e à síntese das citocinas específicas de cada padrão fenotípico. Extraído e adaptado de Normaton e Marti (2013).

A diferenciação de Th0 em Th1 parece depender da produção de IL-12, além da responsividade a esta citocina. Sua fonte inicial provém, principalmente, das células dendríticas e de macrófagos durante a resposta imune inata na fase aguda de uma infecção por microrganismos intracelulares. Para responder à IL-12 e se diferenciarem em Th1, as células Th0 precisam expressar em sua membrana o receptor para IL-12 (IL-12R $\beta$ 2). Este receptor induz uma sinalização intracelular envolvendo as moléculas transdutoras e ativadoras de transcrição STAT 1 e STAT 4, além de Tbet (Esquema 4). A sinalização via STAT 4 parece

ser determinante para ativar a transcrição do gene do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Normaton e Marti, 2013), a citocina predominantemente produzida pelo fenótipo Th1. O IFN- $\gamma$  atua sobre macrófagos estimulando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), promovendo a produção de óxido nítrico (NO) que representa o principal mecanismo microbicida capaz de destruir microrganismos que tenham o macrófago como sua célula hospedeira (Liew *et al.*, 1990 e 1991; Stenger *et al.*, 1994) (Esquema 5). O IFN- $\gamma$  e a própria IL-12 ativam a expressão de IL-12R $\beta$ 2 pelas células. Além das células Th1, a IL-12 também estimula as células *Natural Killer* (NK) a produzirem IFN- $\gamma$  (revisto por Stafford, Neumann & Belosevic, 2002).

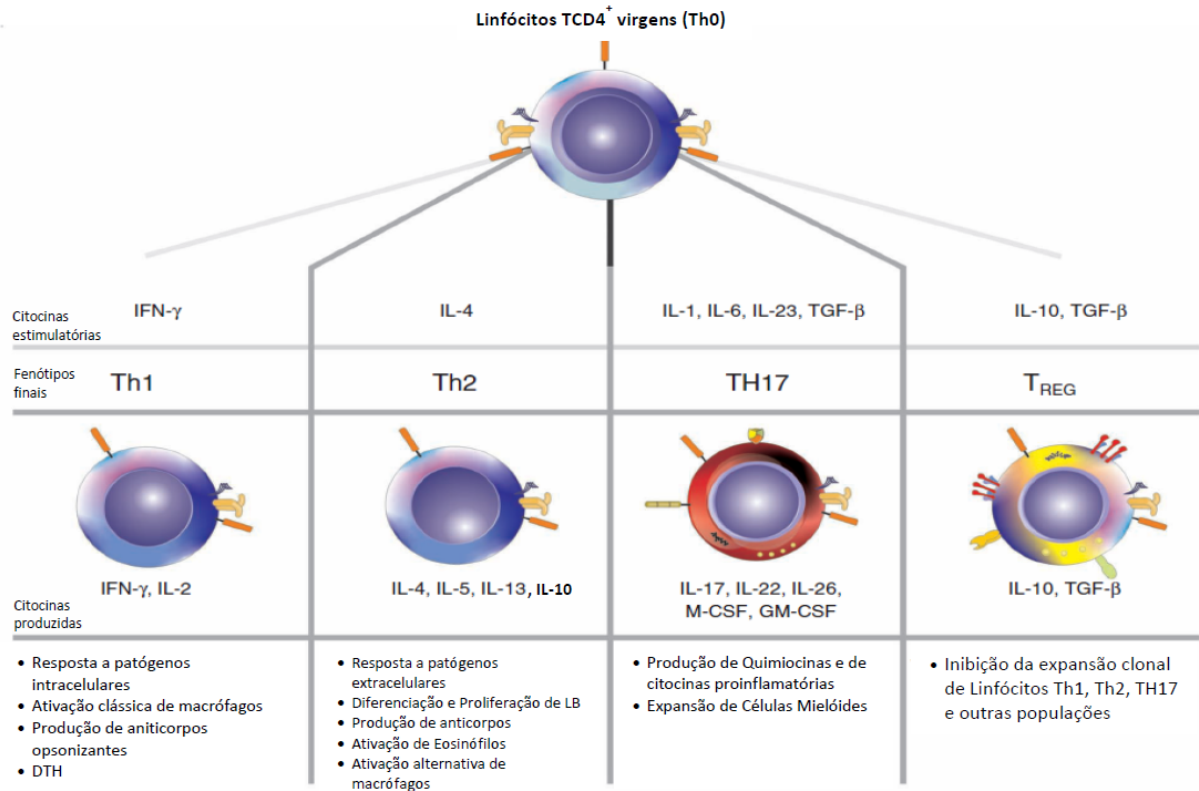
As células Th2 produzem as citocinas interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) e são correlacionadas com a resposta às infecções extracelulares. A diferenciação deste fenótipo ocorre por estímulo pela IL-4 em decorrência da interação com helmintos e bactéria extracelulares (Machado *et al.*, 2004). A princípio a IL-4 pode ser produzida por mastócitos, eosinófilos e, possivelmente, outras populações de células (como células linfoides inatas) ou as próprias células TCD4<sup>+</sup> estimuladas pelo antígeno que secretam pequenas quantidades de IL-4 a partir de sua ativação inicial (Machado *et al.*, 2004). Essa citocina ativa os fatores de transcrição GATA3 e STAT6, que estimulam a diferenciação das células Th0 no fenótipo Th2 (Esquema 4) (revisto por Normaton e Marti, 2013). O fenótipo Th2 está associado às respostas anti-inflamatórias e promovem ativação alternativa de macrófagos, além da ativação de mastócitos e de eosinófilos, que auxiliam na defesa contra helmintos (Esquema 5).

O fenótipo Th17 é composto por células que secretam as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e expressam o fator de transcrição órfão gama relacionado a RAR (ROR $\gamma$ t) (Infante-Duarte *et al.*, 2000; Ghilardi e Ouyang, 2007). O desenvolvimento deste fenótipo é estimulado pelas citocinas IL-1, IL-6 e IL-23 produzidas em resposta às infecções por bactérias e fungos (Revu, 2018). 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 (revisto por Normaton e Marti, 2013) (Esquema 5).

Os linfócitos T regulatórios (Treg) inicialmente foram descritos como linfócitos T supressores (Gerson *et al.*, 1972). Na década de 1990, Sakaguchi e colaboradores (1995) mostraram que havia um pequeno grupo de linfócitos T *helper* que co-expressavam o marcador CD25 e exibiam atividade supressora em cobaias adultos (Cools *et al.*, 2007), redescobrimo essas células. A partir de então, vários grupos descreveram linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com ação regulatória em humanos (revisto por Shevak, 2001). A diferenciação

de Th0 em Treg se faz por ativação do fator de transcrição FoxP3 realizada pelas citocinas IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$  (Martinez-Sanchez, 2018).

Esquema 5 - Representação esquemática de células TCD4<sup>+</sup> virgens (Th0) sob diferentes estímulos e suas possíveis vias de diferenciação (fenótipos finais).



Legenda: Os linfócitos T *helper* virgens (Th0) podem diferenciar-se nos fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg em resposta a antígenos, co-estimuladores e citocinas. As colunas mostram as diferenças entre os subgrupos mais bem definidos.

### 1.3. Efeito do exercício físico no sistema imunológico

Em geral, durante e imediatamente após o exercício o número total de leucócitos na circulação aumenta, e, embora haja uma queda no número de linfócitos e monócitos circulantes, o número de neutrófilos continua subindo várias horas após o exercício extenuante (Pedersen *et al.*, 1997; Sellami *et al.*, 2018). Segundo Nieman *et al.* (2005), a realização de exercício agudo de intensidade moderada e curta duração (até 30 minutos) com sujeitos treinados, não apresentou alterações em diversos padrões da imunidade. Os exercícios agudos de intensidade moderada, realizados entre 30 minutos e 3 horas de duração podem aumentar taxas de leucócitos em até 5 vezes o valor pré-exercício, além de grande mobilização dos neutrófilos. A seguir, ocorre linfocitopenia sanguínea, pois os linfócitos

deixam o sangue e adentram os tecidos danificados pelo exercício, no intuito de compor o processo regenerativo dos mesmos, em até 3 minutos após a realização do exercício (Simpson *et al.*, 2015).

A imunidade inata pode ser levemente estimulada em atletas, enquanto a função neutrofílica pode ser levemente suprimida. O sistema imune adaptativo em estado de repouso parece não ser muito afetado cronicamente pelo exercício extenuante e prolongado (revisto por Pedersen e Toft, 2000; Simpson *et al.*, 2015).

Alguns estudos associam a intensidade do exercício com a incidência de infecção do trato respiratório superior (ITRS) em atletas de *Endurance*, porém esta também é associada à fase do treinamento e a possíveis eventos decorrentes de, principalmente, sobretreinamento. Contudo, alguns fatores ambientais podem influenciar tal ocorrência (Mackinnon, 2000; Nieman, 2000c; Campbell, J. P.; Turner, J. E., 2018). Este tipo de incidência pode estar relacionado à teoria da “janela aberta” (*open window*). Tal teoria é direcionada para a ocorrência de perturbações transitórias causadas pelo exercício de intensidade alta e longa duração, geradora de apoptose linfocitária e linfocitopenia transitória a níveis abaixo do que é considerado clinicamente saudável, gerando assim, uma oportunidade para microrganismos infectarem, principalmente, o trato respiratório superior (URTI's) das pessoas submetidas ao exercício, no período de risco entre 3 e 72 horas após o a realização do mesmo (Nieman e Pedersen, 1999; Simpson *et al.* 2015).

A prática de exercício moderado favorece a resolução de infecções virais e infecções causadas por microrganismos intracelulares, enquanto o exercício extenuante favorece a resolução de infecções extracelulares, já que o exercício moderado induz o sistema imune a uma resposta tipo Th1 enquanto o exercício extenuante a uma resposta do tipo Th2 (Malm, 2004). Exercícios prolongados e extenuantes diminuem a expressão de *toll-like receptor* (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, 2006a; Gleeson, Mcfarlin e Flynn, 2006). Por outro lado, a prática regular de exercícios de intensidade moderada, pode induzir a resposta imune celular (Th1) e, conseqüentemente, favorecer o controle de infecções causadas por microrganismos intracelulares (Gleeson, 2006a; 2007). Em um estudo realizado com indivíduos voluntários, foi mostrado que a prática regular de exercícios aumenta a capacidade de responder a tuberculina (antígeno para tuberculose - PPD), sendo esta uma resposta do tipo Th1 (Okutsu *et al.*, 2008). Em outro estudo publicado recentemente, o autor realizou o

treinamento moderado de camundongos, durante 7 semanas, os quais, obtiveram resposta imune Th1 significativamente aumentada, comparados a camundongos não treinados, quando submetidos ao contato com parasito *Trichinella spiralis* (Baek *et al.*, 2019), corroborando com os achados do nosso grupo.

Atualmente, a Sociedade Internacional de Exercício e Imunologia (ISEI), em sua recomendação oficial, estabelece um consenso geral de que é necessário um programa de baixo a médio volume e intensidade para a manutenção saudável do sistema imune. A ISEI ainda sugere o uso do modelo *Leishmania* para estudos do efeito do exercício no sistema imunológico (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011).

#### 1.4. Leishmaniose

Parasitas do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos responsáveis pelas leishmanioses, um grupo de doenças transmitidas por vetores chamados de flebotomíneos. As leishmanioses são parasitoses que estão presentes nos cinco continentes e são endêmicas em 102 países ou territórios (revisto por Alvar *et al.*, 2012; Organização Pan-americana de Saúde [OPAS], 2019). Aproximadamente 350 milhões de pessoas correm risco de infecção com incidência anual de cerca de 1,6 milhões de novos casos e uma prevalência de 12 milhões de indivíduos infectados (World Health Organization, 2015). Cerca de 20.000 a 30.000 mortes são registradas a cada ano. De acordo com a análise global do ônus das doenças infecciosas, a leishmaniose, em suas diferentes formas clínicas, são responsáveis por 2,35 milhões de anos de vida perdidos por invalidez (OPAS, 2019).

Os flebotomíneos são o principal vetor de transmissão das leishmanioses e o macrófago é a principal célula hospedeira destes parasitos (revisto por Lainson *et al.*, 1997). De acordo com as manifestações clínicas e as espécies do parasito envolvido, a leishmaniose pode apresentar três formas principais: leishmaniose visceral (conhecido como kala-azar ou calazar, a forma mais séria que pode ser letal), leishmaniose cutânea (a mais comum) e leishmaniose mucosa (Stark *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2010; Badirzadeh *et al.*, 2013; McCall *et al.*, 2013; Organização Pan Americana De Saúde, 2019). A leishmaniose cutânea (CL) é causada por várias espécies dermatrópicas de *Leishmania*, como *L. tropica* e *L. major* no Velho Mundo e *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo (Carvalho *et al.*, 2005; Samy *et al.*, 2014; Kahime *et al.*, 2016). A leishmaniose mucosa, também conhecida como mucocutânea, é mais comumente observada em infecções por espécies restritas da América do Sul, principalmente do subgênero *Viannia*, como *L. braziliensis* e *L. panamensis* (Miranda Lessa *et al.*, 2007). A

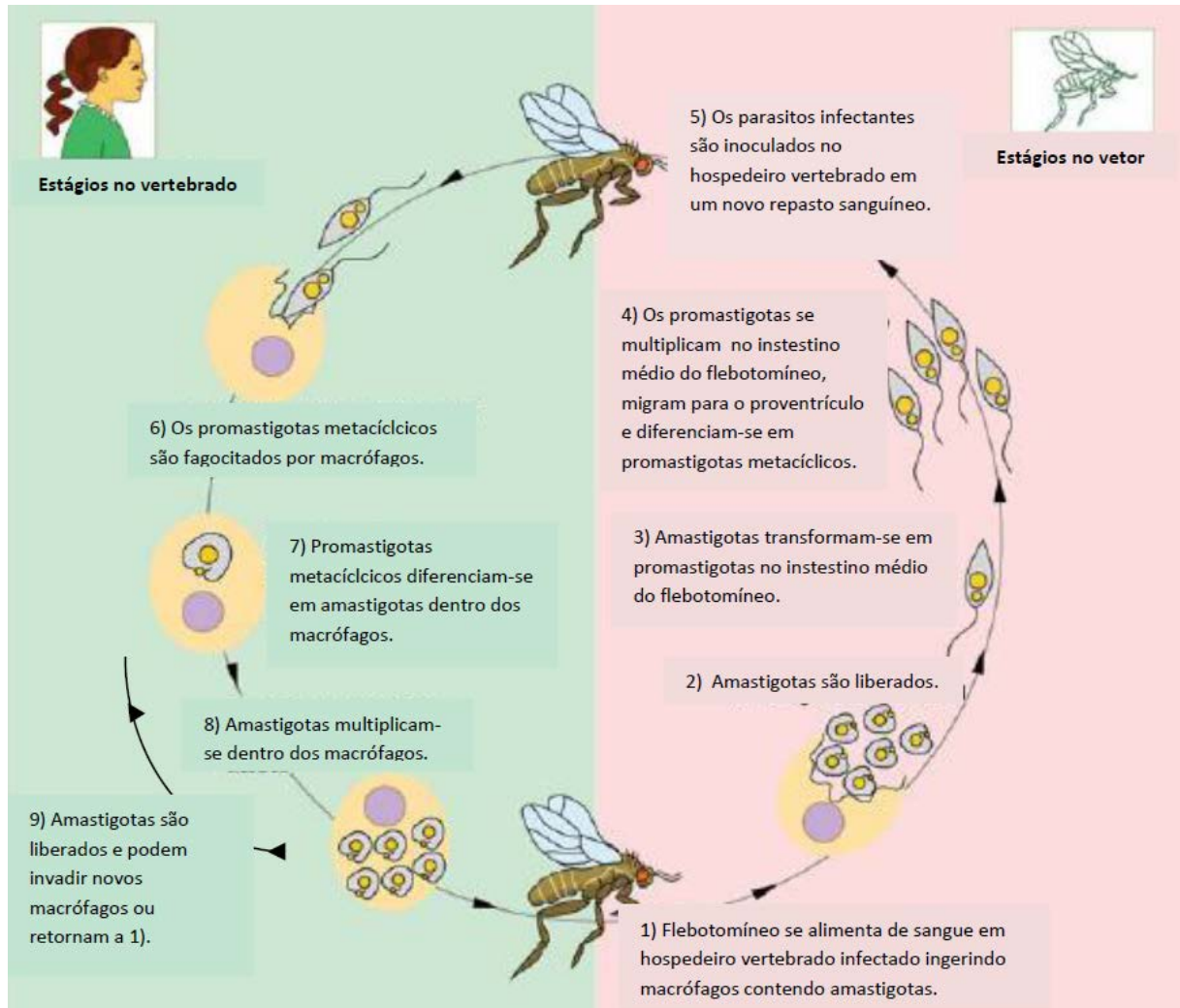
leishmaniose visceral é causada por espécies viscerotrópicas como *L. donovani* (Velho Mundo) e *L. infantum* (Novo Mundo) (revisto por Momen *et al.*, 1993).

Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países e a forma clínica mais comum é a leishmaniose cutânea (LC). Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, atingindo também o Mediterrâneo, a Ásia Central e o Médio Oriente. Três quartos da incidência anual de leishmaniose cutânea no mundo ocorrem em apenas cinco países: Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria. Em se tratando da forma visceral, quase 90% dos casos de todo o mundo estão concentrados entre o Brasil, a Índia, o Sudão, o Sudão do Sul, a Etiópia e o Quênia. A leishmaniose mucosa ocorre principalmente na região das Américas, com a Bolívia, o Brasil e o Peru sendo os países com os mais altos recordes dessa forma clínica. Nas Américas foram reportados casos humanos de leishmaniose desde o sul dos Estados Unidos até o norte de Argentina, com exceção do Chile. O Uruguai registrou seu primeiro caso humano de LV em dezembro de 2018. Durante o período de 2001 a 2017, foram reportados ao Sistema Regional de Informação da Leishmaniose da OPAS/OMS (SisLeish) 940.396 casos de leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) com média de incidência anual de cerca de 55.317 casos (OPAS, 2019).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são obrigatoriamente intracelulares, sendo preferencialmente o macrófago, sua célula hospedeira (Chang, 1983). Após a picada do flebotomíneo, neutrófilos, que são os primeiros leucócitos a serem recrutados durante o processo inflamatório, dirigem-se ao local da lesão e são invadidos pelos promastigotas metacíclicos em um processo inicial de infecção (John e Hunter, 2008; Peters *et al.*, 2008). Seguindo o processo, os parasitos liberados dos neutrófilos, ou ainda aqueles que não tiveram contato com este tipo celular, são convencionalmente fagocitados pelos macrófagos sendo alojados em um fagolisossoma clássico (Mauel, 1996). Neste compartimento, a forma amastigota 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 a grande quantidade de promastigotas aí presentes, provoca um entupimento. Este entupimento, 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 (Chang e Dwyer, 1976; Alexander, Satoskar e Russell, 1999) (Esquema 6).

Esquema 6 - Ciclo biológico de *Leishmania* sp no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.



Legenda: No tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (vetor): 1) ingestão de amastigotas presentes no tecido do hospedeiro vertebrado infectado; 2) liberação dos amastigotas; 3) transformação em promastigotas; 4) multiplicação dos promastigotas, metaciclogênese e migração para o pró-ventrículo e 5) inoculação de promastigotas metacíclicas em novo hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado: 6) entrada de promastigotas metacíclicas em macrófagos; 7) transformação de promastigotas em amastigotas; 8) multiplicação de amastigotas por divisão binária simples; 9) liberação de amastigotas no tecido e entrada em novos macrófagos ou retorno a 1).

Fonte: Adaptado de (Lopes e Zimmermann, 2010).

A manutenção do seu ciclo, assim como sua relação com seus hospedeiros, são processos primordiais na vida destes tripanossomatídeos. Estes processos são extremamente complexos envolvendo várias cascatas de sinalização que influenciam diretamente o desenvolvimento da infecção, promovendo o deslocamento da homeostase desta relação de acordo com aspectos intrínsecos tanto ao parasito quanto ao hospedeiro como, por exemplo, o desenvolvimento da resposta imune.

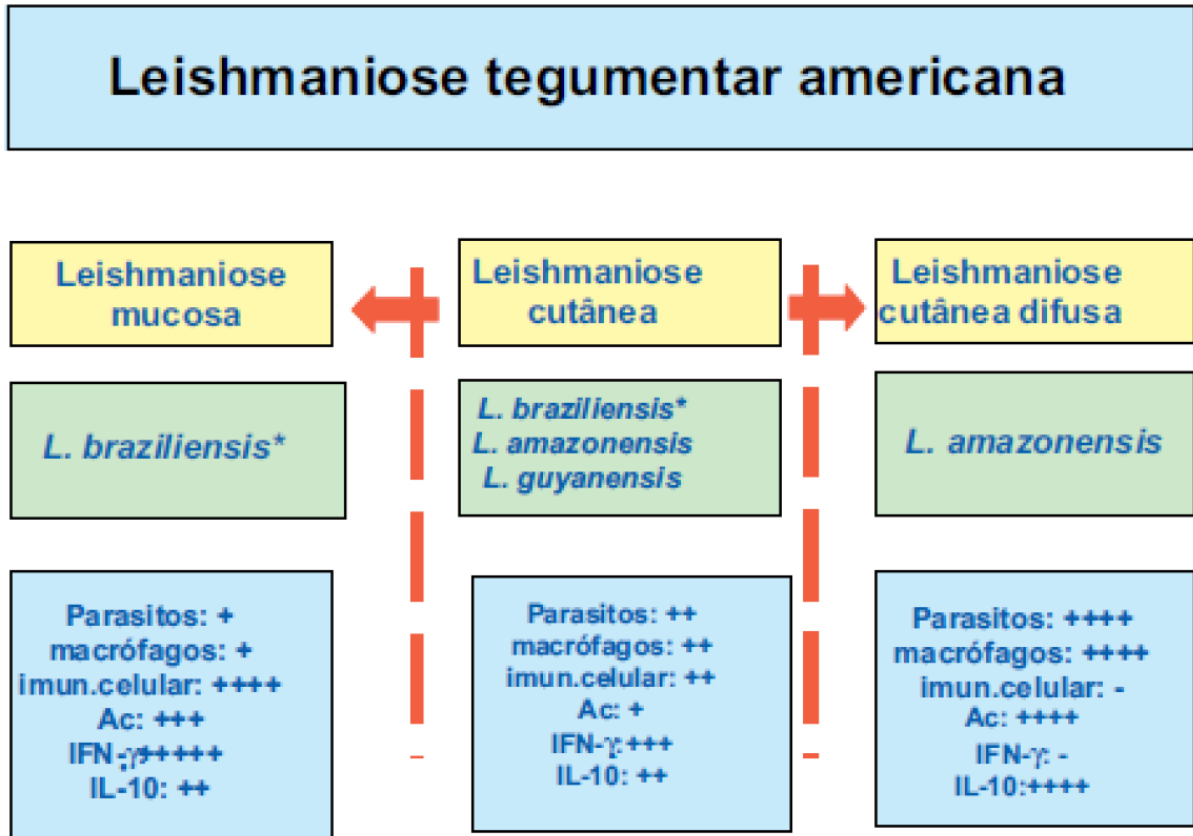


## 1.5. Resposta imune à leishmaniose

Os mecanismos de proteção a patógenos são dependentes das respostas imunes inata e adaptativa. A resposta imune protetora na leishmaniose geralmente está associada à resposta imune celular, onde participam ativamente linfócitos T e macrófagos (resposta tipo Th1 – ver item 1.1 *CONSIDERAÇÕES BÁSICAS NA RESPOSTA IMUNE*). Embora grande parte dos conhecimentos a respeito da resposta imune e da dicotomia Th1/Th2 na leishmaniose seja proveniente de experimentos em camundongos utilizando o modelo *Leishmania major* - Balb/C – C57BL/6, a infecção humana, embora muito mais complexa, demonstra alguma correlação com esses dados (Liew *et al.*, 1990; Stenger *et al.*, 1994).

Os fenômenos de resistência em todas as formas de leishmaniose têm sido relacionados às respostas imunes mediadas por células (Th1) (Belosevic *et al.*, 1989). Por outro lado, a suscetibilidade está associada a uma resposta de ativação de linfócitos do tipo Th2 (*T helper 2*), com produção de IL-4 (Bogdan *et al.*, 1996; Romagnani e Abbas, 1996; Launois *et al.*, 1998; Sacks e Noben-Trauth, 2002; Mansueto *et al.*, 2007). Contudo, o equilíbrio entre essas respostas é o desejado, pois indivíduos com leishmaniose cutânea no Novo Mundo apresentam prognóstico positivo quando a resposta imune celular é equilibrada (Ministério da Saúde, 2007). Indivíduos com leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral apresentam resposta não protetora do tipo Th2 (Romagnani e Abbas, 1996; Mansueto *et al.*, 2007), 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- $\gamma$  e TNF são muito altos, associados a uma produção relativamente baixa de IL-10 (Ministério da Saúde, 2007) (Quadro 3).

Quadro 3 - Resposta imune à LTA.



Legenda: Principal espécie causadora de leishmaniose cutânea no Brasil.

Ac: Anticorpos

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

- Ausência

+ Presença: + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa

A cura da leishmaniose geralmente ocorre após tratamento e não se define pela destruição completa dos protozoários, tendo sido possível isolar parasitos viáveis de cicatrizes de indivíduos curados há anos. Este fenômeno ajudaria a explicar recidivas tardias. 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 (Ministério da Saúde, 2007).

Com o avanço da literatura acerca da modulação da resposta imunológica promovida pelo exercício, a leishmaniose torna-se um interessante modelo para novos estudos, uma vez que camundongos Balb/c infectados por *Leishmania major* são suscetíveis a desenvolver esta parasitose por apresentar uma resposta não protetora (Th2). O exercício, dependendo de sua intensidade e volume, pode direcionar o sistema imunológico a uma resposta do tipo Th1, protetora contra patógenos intracelulares, como é o caso dos parasitos do gênero *Leishmania*.

Recentemente nosso grupo demonstrou que camundongos BALB/c infectados com *L. major* e submetidos ao exercício físico (atividade natatória) tiveram a lesão leishmaniótica

significativamente diminuída, assim como apresentaram carga parasitária mais baixa que os animais controle da infecção. Os animais infectados e treinados também apresentaram resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos específicos de *Leishmania* positiva quando comparados aos animais controle. A razão IFN- $\gamma$ /IL-4 e IFN-  $\gamma$ /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 provê um efeito protetivo contra o desenvolvimento de infecção por *L. major* (Terra *et al.*, 2019).

## 2. OBJETIVOS

*Objetivo geral:* Avaliar o efeito do exercício físico agudo moderado e extenuante na atividade microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c contra *L. major* ou *L. braziliensis*.

*Objetivos específicos:*

- a) Verificar o efeito do exercício físico agudo moderado e extenuante no fator de infecção de macrófagos por parasitos do gênero *Leishmania*.
- b) Verificar o efeito do exercício físico agudo moderado e extenuante na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados ou não por parasitos do gênero *Leishmania*.
- c) Verificar o efeito do exercício físico agudo moderado e extenuante na produção de citocinas por macrófagos infectados ou não por parasitos do gênero *Leishmania*.
- d) Verificar o efeito do exercício físico agudo moderado e extenuante na produção de citocinas por células do baço de camundongos submetidos a uma sessão de exercício.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1 Microrganismo

Na presente dissertação, utilizamos promastigotas da cepa virulenta LV39 de *Leishmania major* e da cepa Thor de *L. braziliensis*, cultivados sob condições previamente descritas (Cuba Cuba *et al.*, 1986). Os promastigotas foram cultivados 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 26°C.

#### 3.2 Animais

Na presente dissertação, utilizamos camundongos (*Mus musculus*) BALB/c. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno tampadas com grade. As caixas foram mantidas em biotério climatizado (temperatura entre 22 e 24°C) com ciclo circadiano invertido (12/12h claro/escuro), forradas com maravalha e limpas três vezes na semana, com água filtrada e ração (Nuvilab Cr-1® da Nuvital®) disponíveis *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimental Use e Cuidados Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (protocolo número CEA/043/2015).

#### 3.3 Estabelecimento dos grupos

Ao longo deste trabalho foram estabelecidos 3 grupos no total. No exercício agudo foram estabelecidos outros 3 grupos (N = 6), sendo (1) controle, (2) exercício moderado agudo e (3) exercício extenuante agudo. A composição dos grupos foi realizada de forma pareada.

### 3.4 Estabelecimento do protocolo de treinamento físico

Os animais tiveram sua massa corporal mensurada e foram submetidos à adaptação ao meio aquático. O volume do exercício e as adaptações ao mesmo foram determinados por testes de capacidade física e biomarcadores fisiológicos de intensidade (curva de lactato, peroxidação lipídica) de estudos anteriores do nosso grupo.

#### 3.4.1 Exercício agudo

- a) *Moderado*: Os animais foram treinados em um tanque (50 x 50 x 40 cm) com uma profundidade de 30 cm água, cuja temperatura foi mantida em torno de  $32\pm 2$  °C, utilizando a sobrecarga de 2% da massa corporal durante 25 a 30 min. Imediatamente após a sessão de treinamento os animais foram sacrificados por administração do anestésico cloridato de cetamina (7,5 mg).
  
- b) *Extenuante*: Os animais foram treinados em um tanque (50 x 50 x 40 cm) com uma profundidade de 30 cm água, cuja temperatura foi mantida em torno de  $32\pm 2$  °C, utilizando a sobrecarga de 6% da massa corporal até a fadiga. Foi entendida como fadiga a incapacidade de manter-se emerso. Imediatamente ou 24 ou 48 ou 72h após a sessão de treinamento, os animais foram eutanasiados por administração do anestésico cloridato de cetamina (7,5 mg).

### 3.5 Teste de capacidade física do exercício

Os animais foram submetidos a um teste máximo, onde se mantiveram em atividade natatória, com sobrecarga de 2 até a fadiga. Foi entendida como fadiga a incapacidade de manter-se emerso. O volume do exercício foi de 50% para atividade moderada.

### 3.6 Controle de parâmetros associados ao exercício

#### 3.6.1 Dosagem de lactato sanguíneo

O lactato sanguíneo foi dosado no estado de repouso e logo após a realização da sessão de exercício moderado e extenuante. A concentração de lactato sanguíneo foi realizada com lactímetro (Accusport<sup>®</sup>), colhendo uma amostra de sangue total (~10µl) através de pequena incisão feita na cauda dos animais.

#### 3.6.2 Avaliação dos índices de peroxidação lipídica:

A dosagem dos índices de peroxidação lipídica (thiobarbituric acid reactive substances - TBARs) foi realizada como previamente descrito (Keles et al., 2001). Imediatamente após a sessão de exercício, o sangue foi coletado em tubos com EDTA. O sangue foi centrifugado por 10min a 1.000g e o plasma foi isolado para realizar um ensaio de peroxidação lipídica. O plasma (50 µL) foi misturado com 200 µL de TCA 10% e 150 µL de tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7,4) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos antes da centrifugação (2.000xg por 15min). O sobrenadante foi coletado e, em seguida, 500 µL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) foram adicionados, seguido de uma incubação adicional a 95°C por 60min. As amostras foram, então, resfriadas por 5min e submetidas a vórtex. Finalmente, a absorvância foi medida a 532 nm num leitor de microplacas, o leitor de TP Thermo Plate. As concentrações de MDA (malondialdeído) foram avaliadas usando uma curva padrão de TMP (1,1,3,3-Tetrametoxipropano).

### 3.7 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram retirados por lavagem peritoneal em meio de cultura desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial (RPMI), quantificados por contagem em câmara de Neubauer, centrifugados a 1.500 g, por 10 minutos a 4°C, plaqueados sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços (1 x 10<sup>6</sup> células) e incubados a 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> a 5% por 2 horas (exercício crônico) ou 24 horas (exercício agudo) em meio RPMI, e posteriormente utilizadas nos ensaios de interação celular. Os macrófagos oriundos dos camundongos submetidos ao exercício agudo foram incubados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL a 37°C, por 24 horas em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

### 3.8 Obtenção de Células do Baço

Os baços foram macerados com a ajuda de um êmbolo de seringa. O macerado foi centrifugado a 1500 g, por 10 minutos a 4°C, o sedimento foi ressuspenso em tampão ACK (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1,0 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 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 4°C, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan 0,02% e plaqueadas a  $1 \times 10^6$  células por poço em placa de 24 poços e incubadas a 37°C, por 48 horas em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

### 3.9 Experimentos de interação celular

Os promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* foram deixados em contato com os macrófagos oriundos dos camundongos submetidos ao exercício agudo a uma proporção de 5:1, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C, por 24 horas. 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.

### 3.10 Efeito do exercício na produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos

O sobrenadante dos macrófagos (100 µL) foi plaqueado em microplaca de 24 poços. As duas soluções de reagente de Griess (Naftiletlenodiamino 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  $\mu$ L 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  $\mu$ M) (Stuehr e Marletta, 1985).

### 3.11 Análise estatística

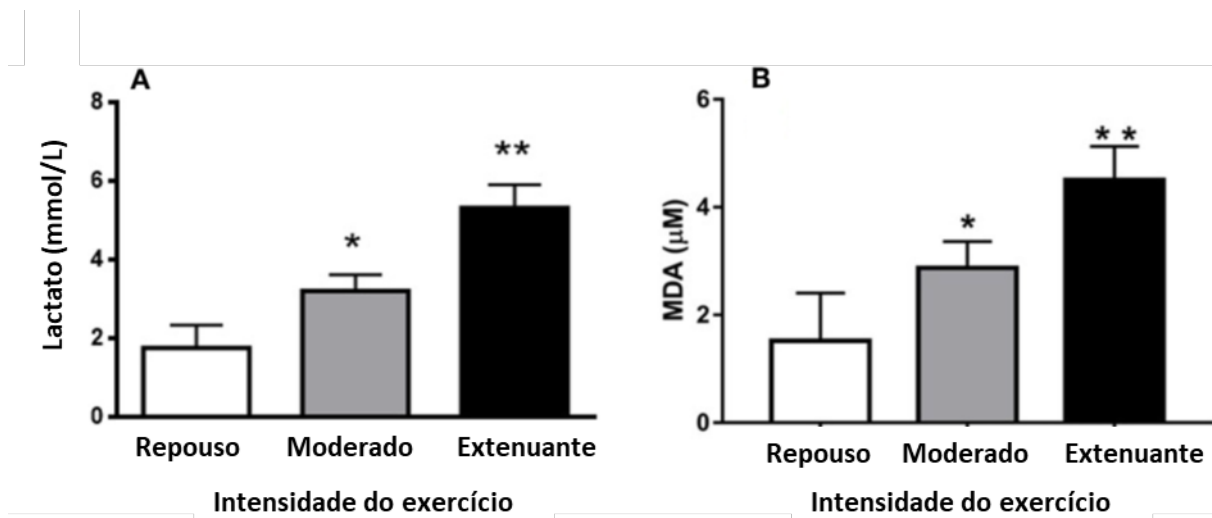
Os resultados foram representados por média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados através de *one way* ANOVA, seguido do Teste de post-hoc de Tukey. Os dados foram analisados utilizando o Programa Graph Pad Prism 5.

## 4. RESULTADOS:

### 4.1 Efeito do exercício físico agudo nas concentrações de lactato sanguíneo

Os níveis de lactato sanguíneo foram medidos sob três condições diferentes: (1) animais em repouso e (2) animais posteriormente submetidos a uma sessão de exercício moderado ou (3) extenuante. Em repouso, a concentração de lactato sanguíneo foi de 1,78mmol/L. Em animais submetidos a uma sessão de exercício moderado a concentração medida foi de 3,23 mmol/L e em animais submetidos a uma sessão de exercício extenuante foi de 5,63 mmol/L (Figura 1A). Esses dados sugerem que os protocolos de exercício empregados neste estudo foram associados à intensidade moderada (3,23 mmol/L) e à intensidade extenuante (5,63 mmol/L). Além disso, houve uma mudança de 88% na peroxidação lipídica do grupo de repouso (1,52  $\mu$ M de MDA) para o grupo de exercício moderado (2,87  $\mu$ M de MDA) e camundongos submetidos ao exercício extenuante (4,50 $\mu$ M de MDA) apresentaram aumento de 196% na peroxidação lipídica quando comparados ao grupo repouso (Figura 1B).

Figura 1 - Controle da intensidade do exercício.

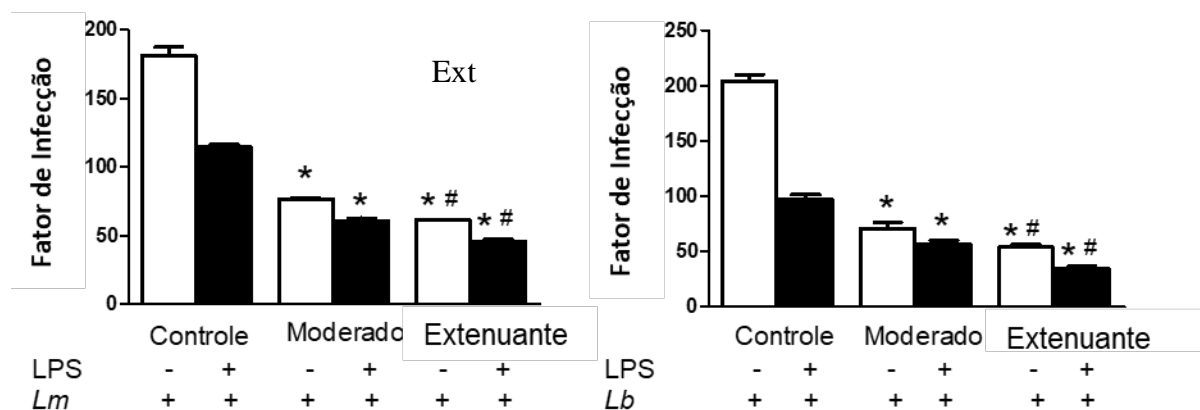


Legenda: [Concentrações de lactato no sangue (A) e TBAR (B)]: (A) As concentrações de lactato no sangue foram medidas no repouso e imediatamente após uma sessão de exercício moderado e de exercício extenuante. (B) As concentrações de MDA (peroxidação lipídica) no sangue foram medidas no repouso e imediatamente após uma sessão de exercício moderado e de exercício extenuante. Os animais utilizados nesses ensaios, lactato (n = 15) e peroxidação lipídica (n = 15), não participaram dos grupos experimentais. (\* P <0,01 comparado ao repouso, \*\* P <0,001 comparado ao repouso e protocolo do estudo). Os valores são expressos como média e  $\pm$  SD. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

#### 4.2 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) no fator de infecção entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e protozoários do gênero *Leishmania*

A fim de investigarmos o efeito do exercício físico na estimulação de macrófagos na ativação de sua atividade microbicida, realizamos experimentos de interação celular entre células tratadas ou não com LPS e promastigotas de *L. major* e de *L. braziliensis* (Fig. 2). O exercício promoveu uma diminuição significativa no fator de infecção (FI) em todos os sistemas observados (Fig. 2). Este fator é calculado pelo produto entre o percentual de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófago. O exercício moderado inibiu pelo menos em 57% o FI (Fig. 2A), enquanto o exercício extenuante foi capaz de inibir em pelo menos 66% este índice (Fig. 2A). Esta significativa inibição foi observada tanto em *L. major* (Fig. 2A) quanto em *L. braziliensis* (Fig. 2B).

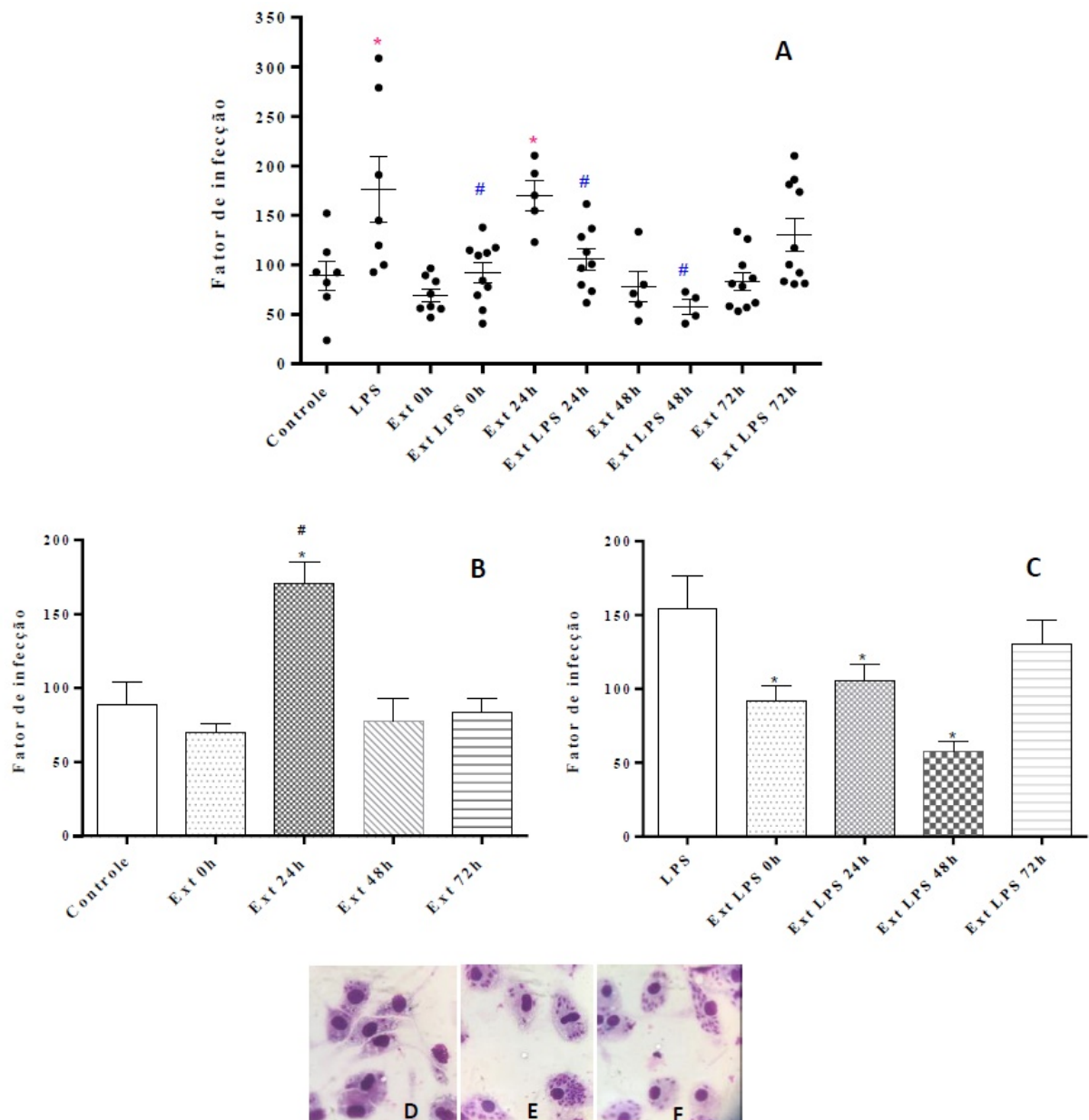
Figura 2 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major* ou *L. braziliensis*.



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* e *L. braziliensis*) 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. \* P<0,0001 em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. # P<0,0001 em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Realizamos um curso temporal do efeito de uma única sessão de exercício extenuante no fator de infecção entre promastigotas de *Leishmania major* e macrófagos. Para tal fizemos interação entre os parasitos e macrófagos oriundos de animais eutanasiados imediatamente, 24, 48 e 72h após o término da sessão de exercício (Fig. 3).

Figura 3 - Efeito do exercício físico agudo extenuante na interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. 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 pelo menos, 5 animais por grupo. \* P<0,0001 em relação ao sistema Controle (A e B) e ao sistema LPS (C). # P<0,0001 em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários (LPS em A) e aos sistemas 0, 48 e 72h

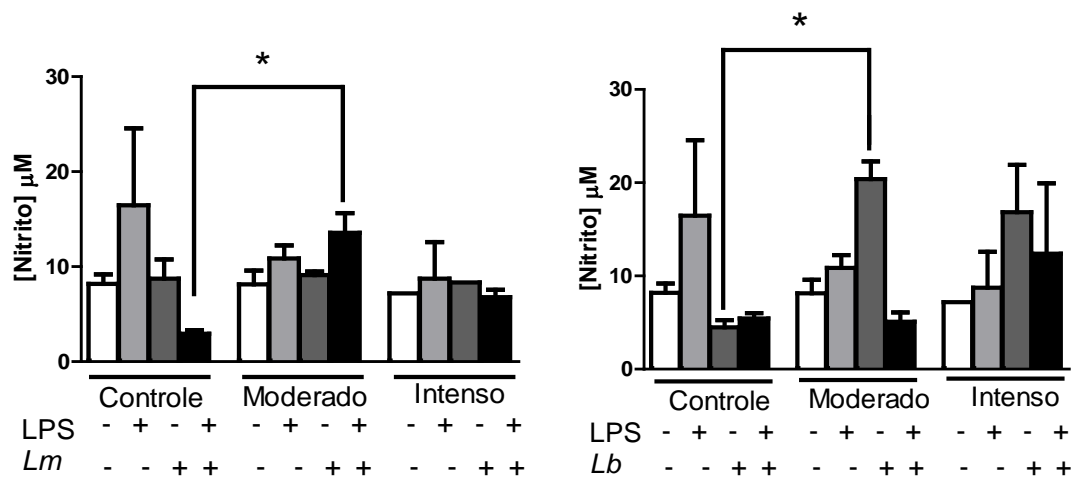
(B). Os valores são expressos como média e  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. D, E e F são figuras representativas dos campos observados ao microscópio ótico sendo que D representa o Controle 0h, E representa o sistema LPS 0h e F representa o sistema Extenuante 24h. Aumento de cerca de 1.000 vezes.

É interessante notar que o LPS, diferente do que se esperava, aumentou o FI entre *L. major* e macrófagos (Fig 3A e 3C), sendo significativamente diferente do controle. Como anteriormente observado, imediatamente após a realização da atividade física, o exercício extenuante inibiu o FI. Apenas 24h após a realização da atividade física, o exercício extenuante estimulou o FI (Fig 3A e 3B). O exercício físico parece ter estimulado o efeito esperado do LPS, tendo inibido o FI entre o parasito e os macrófagos nos tempos de 0, 24 e 48h (Fig. 3A e 3C).

#### 4.3 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por protozoários do gênero *Leishmania*

Ainda a fim de investigarmos o efeito do exercício físico agudo moderado ou extenuante na estimulação de macrófagos dosamos as concentrações de NO no sobrenadante destas células tratadas com LPS e/ou infectadas com *L. major* (Fig. 4A) ou *L. braziliensis* (Fig. 4B). O exercício moderado foi o único que promoveu um aumento significativo na concentração de nitrito no sistema infectado por *L. major* e tratado com LPS (Fig. 4A) e no sistema infectado por *L. braziliensis* sem a adição de LPS (Fig. 4B).

Figura 4 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C

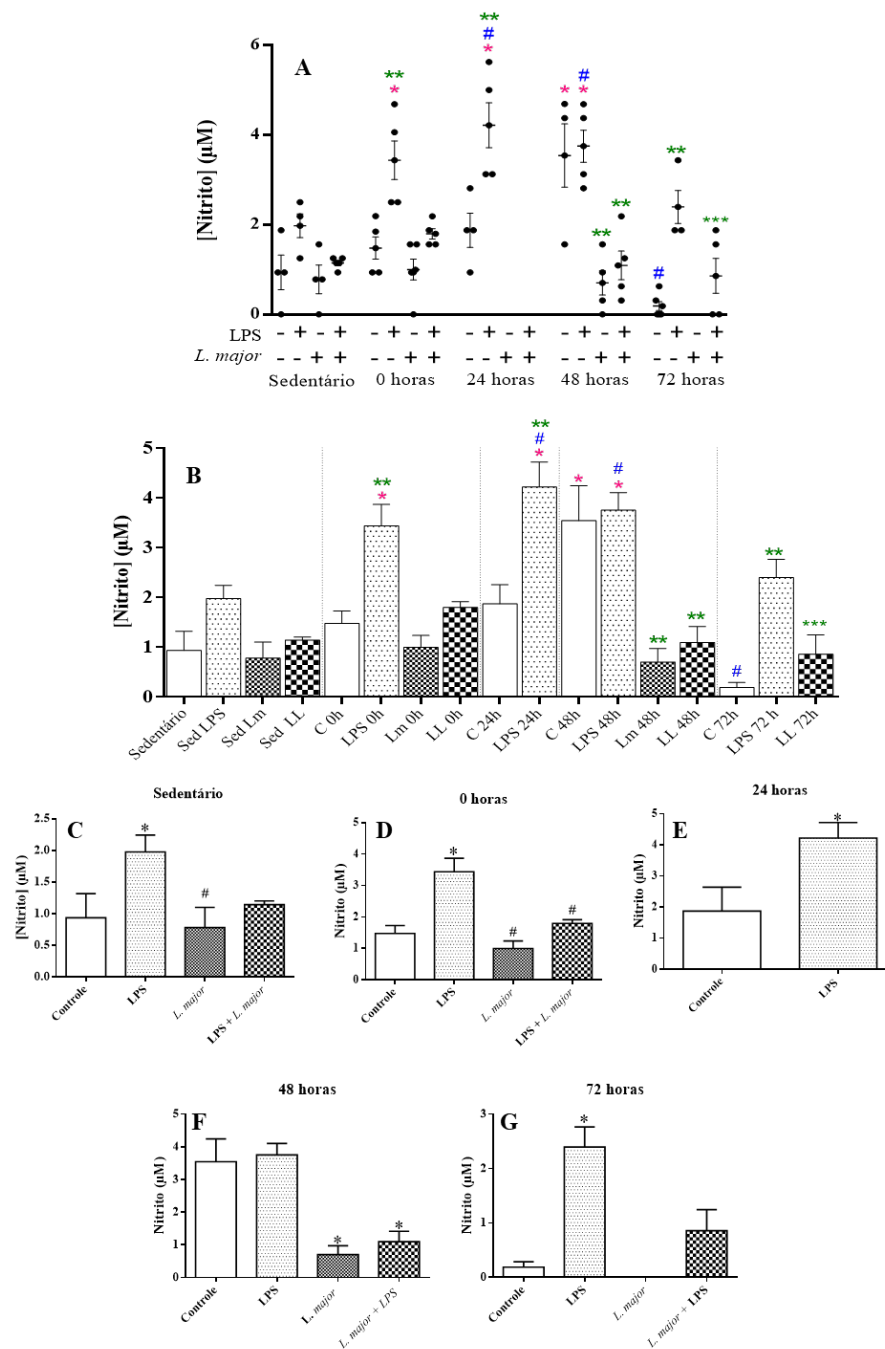


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major* e *L. braziliensis*) na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de nitrito dosada pelo método de Griess (Material e Métodos). Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. \*  $P < 0,01$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Realizamos um curso temporal do efeito de uma única sessão de exercício extenuante na produção de NO. Para tal dosamos NO em macrófagos oriundos de animais eutanasiados imediatamente, 24, 48 e 72h após o término da sessão de exercício. O exercício extenuante estimulou a produção de NO logo após o seu término, quando os macrófagos foram tratados com LPS 24h depois do término da sessão de atividade natatória e também após 48h do término desta sessão. O LPS não aumentou significativamente a produção de NO nos macrófagos oriundos dos animais eutanasiados 48h após o término do exercício e nem naqueles obtidos dos animais sedentários, embora nestes últimos haja uma nítida tendência de aumento. A infecção por *L. major* diminuiu significativamente a concentração de NO produzida por nos macrófagos oriundos dos animais eutanasiados 48 e 72h após o término do exercício. Esta também foi uma tendência nos animais sedentários e naqueles eutanasiados imediatamente após o término da sessão da atividade natatória (Fig 5A e B).

Infelizmente foram perdidos os sobrenadantes dos sistemas 24h tratados infectados por *L. major* e tratados com LPS e infectados com *L. major*, assim como o do sistema 72h infectado por *L. major*.

Figura 5 - Efeito do exercício físico agudo extenuante na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C

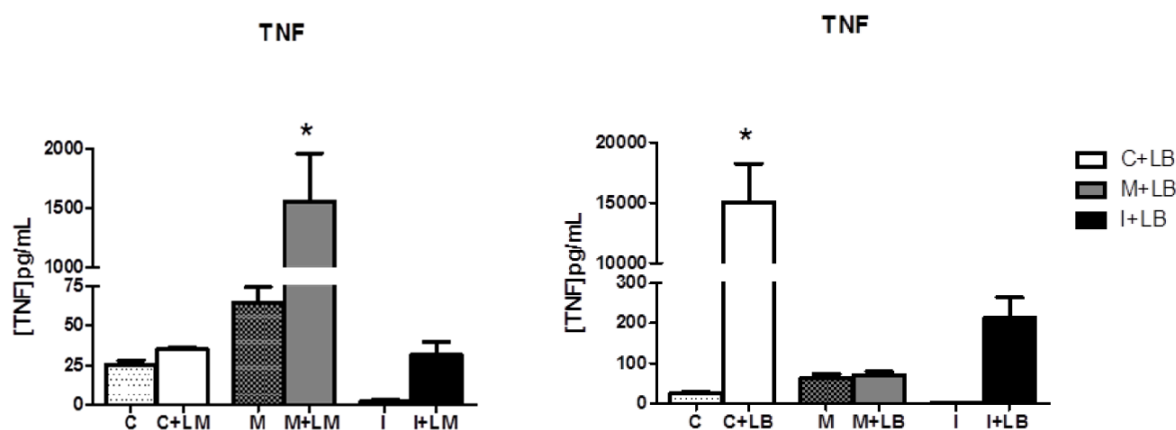


Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com promastigotas de *L. major* na proporção de 5 parasitos por macrófago, por igual período de 24h. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração 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 valores representam a média e o erro padrão de, pelo menos, 4 animais por grupo. C – Sedentário, D – 0 horas, E – 24 horas, F – 48 horas, G – 72 horas. \* P < 0,0001 em relação ao Sedentário; # P < 0,0001 em relação ao Sedentário LPS; \*\* P < 0,0001 em relação ao respectivo controle e \*\*\* P < 0,0001 em relação ao grupo LPS de cada período de tempo; § P < 0,0001 em relação ao respectivo controle; ¶ P < 0,0001 em relação ao respectivo LPS. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. No caso de 24 horas, os dados foram analisados pelo teste T não pareado.

#### 4.4 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na quantificação de citocinas em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C

Ainda a fim de investigarmos o efeito do exercício físico agudo moderado ou extenuante na estimulação de macrófagos dosamos as concentrações de citocinas no sobrenadante destas células tratadas com LPS e/ou infectadas com *L. major* (Fig. 6A) ou *L. braziliensis* (Fig. 6B). O exercício moderado promoveu um aumento significativo na concentração de TNF no sistema infectado por *L. major* e tratado com LPS (Fig. 6A). No sistema infectado por *L. braziliensis*, o grupo controle apresentou diferença significativa dos demais sistemas (Fig. 6B).

Figura 6 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de TNF em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major* ou *L. braziliensis*.



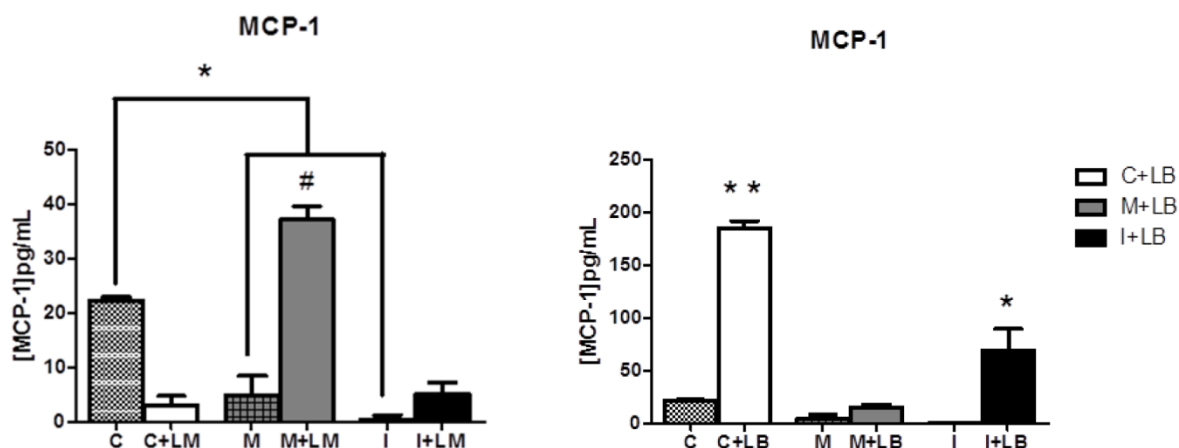
Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1 µg/mL por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major* e *L. braziliensis*) na proporção de 5 parasitos 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. \* P<0,05 em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. # P<0,05 em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

O exercício moderado promoveu um aumento significativo na concentração de MCP-1 no sistema infectado por *L. major* e tratado com LPS (Fig. 7A), quando comparado com os demais sistemas, e o grupo controle sem infecção apresentou diferença significativa dos grupos exercitados, moderado e extenuante, sem infecção. No sistema infectado por *L. braziliensis* e tratado com LPS, o grupo controle infectado apresentou diferença significativa



dos demais sistemas e o grupo exercitado extenuante e infectado apresentou diferença significativa para o grupo exercitado moderado e infectado (Fig. 7B).

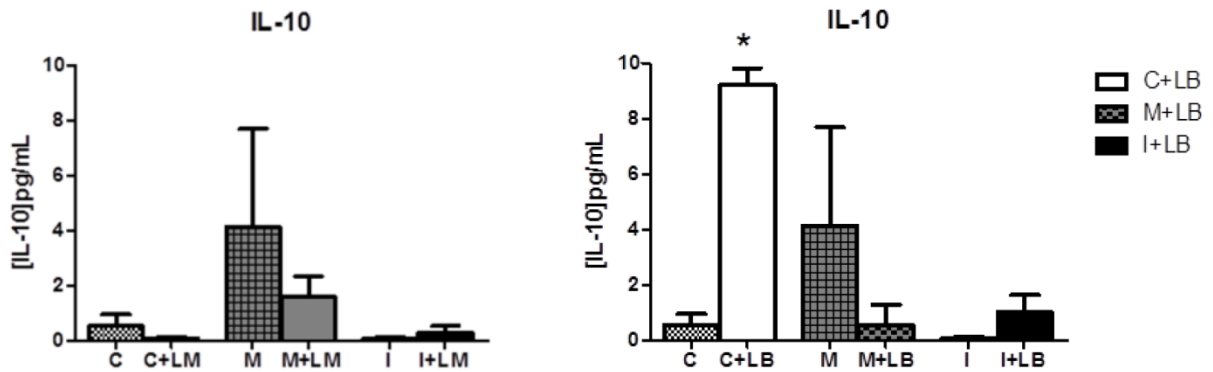
Figura 7 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de MCP-1 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major* ou *L. braziliensis*



Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major* e *L. braziliensis*) 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. \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Não houve diferença significativa na concentração de IL-10 nos sistemas não infectados ou infectados por *L. major* e tratado com LPS (Fig. 8A). No sistema infectado por *L. braziliensis*, o grupo controle infectado e tratado com LPS apresentou diferença significativa dos demais sistemas (Fig. 8B).

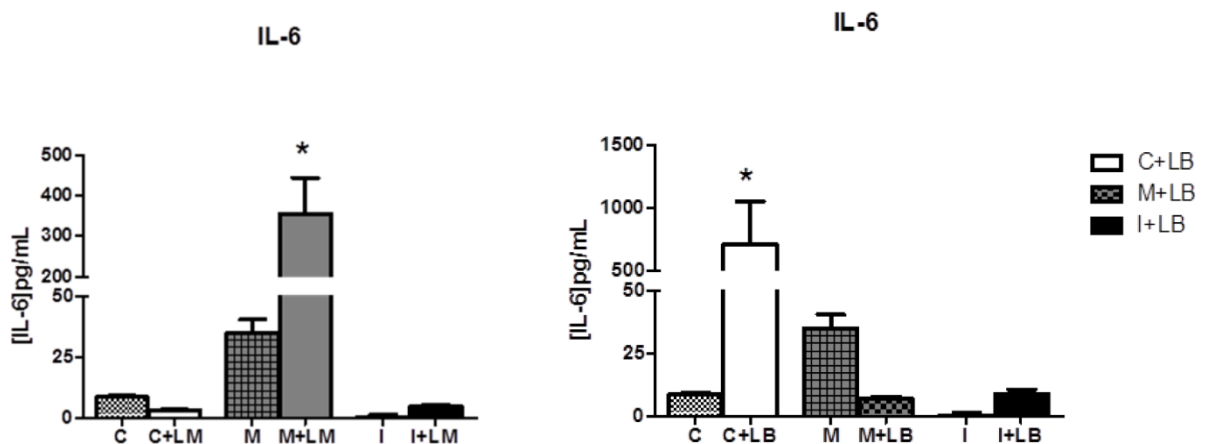
Figura 8 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-10 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major* ou *L. braziliensis*.



Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major* e *L. braziliensis*) 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. \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

O exercício moderado promoveu um aumento significativo na concentração de IL-6 no sistema infectado por *L. major* e tratado com LPS (Fig. 9A), quando comparado com os demais sistemas. No sistema infectado por *L. braziliensis* e tratado com LPS, o grupo controle infectado apresentou diferença significativa dos demais sistemas (Fig. 9B)

Figura 9 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-6 em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. major* ou *L. braziliensis*



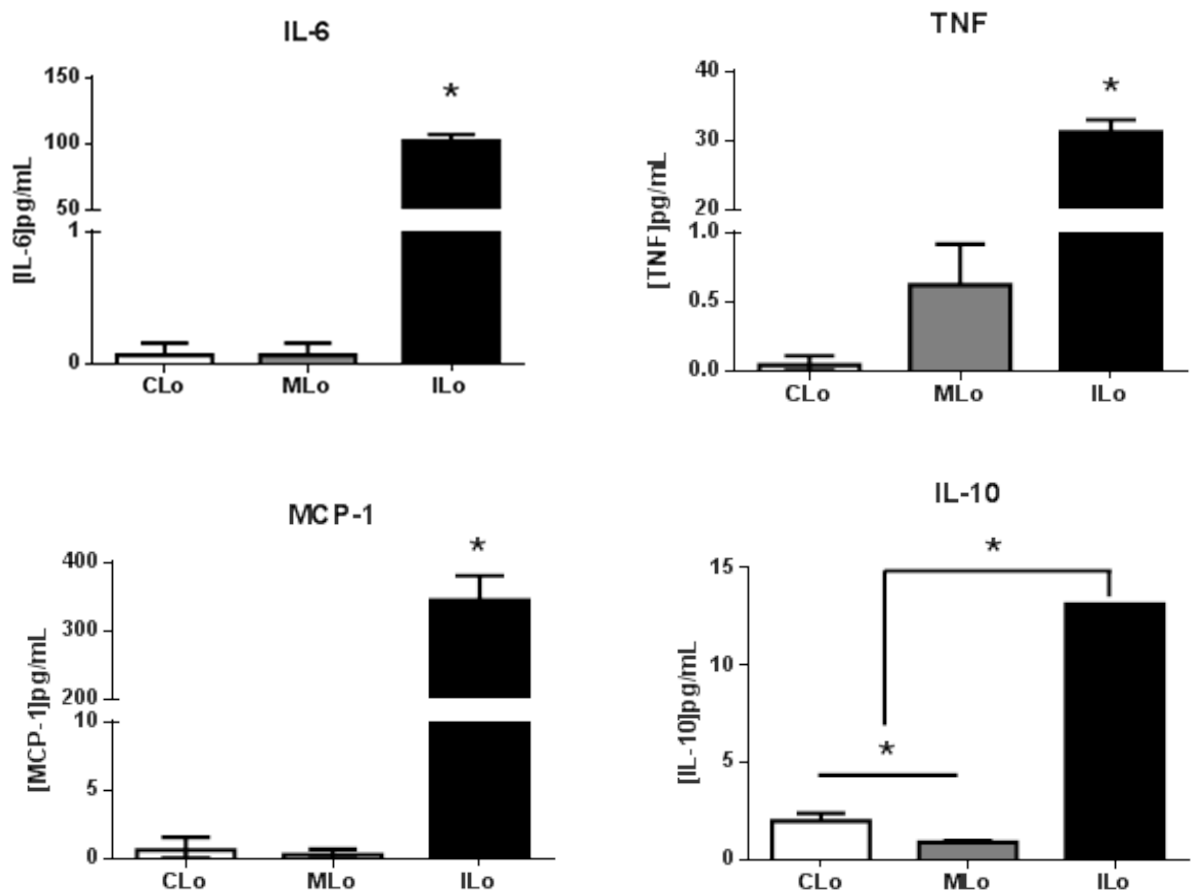
Legenda: Os macrófagos foram extraídos do peritônio dos camundongos, posteriormente plaqueados na ausência ou na presença de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 1  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 24h e, então, deixados em contato com os protozoários (*L. major* e *L. braziliensis*) na proporção de 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. \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais sedentários. #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo sistema no grupo de animais submetidos ao exercício moderado. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

#### 4.5 Efeito do exercício físico agudo (moderado ou extenuante) na produção de citocinas em células do baço de camundongos Balb/c

O exercício extenuante promoveu um aumento significativo na concentração de IL-6, quando comparado aos grupos controle e exercitado moderado (Fig. 10A).

Figura 10 - Efeito do exercício físico agudo (extenuante ou moderado) na produção de IL-6, TNF, MCP-1 e IL-10 em células esplênicas de camundongos BALB/c



Legenda: As células do baço foram extraídas a partir da maceração do mesmo e, posteriormente plaqueadas. Os valores representam a média e o erro padrão de dois experimentos com, pelo menos, 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

O mesmo efeito também foi observado na produção de TNF (Fig. 10B), de MCP-1, (Fig. 10C) e de IL-10 (Fig. 10D). No caso da IL-10 também houve diferença significativa do grupo controle para o grupo exercitado moderado (Fig. 10D).

## 5. DISCUSSÃO

Os benefícios promovidos pelo exercício físico dependem do controle de parâmetros observados em sua prescrição (intensidade, volume e frequência). Isso é claramente demonstrado na prática, onde a falta de controle do treinamento tanto pode levar ao *overtraining*, em caso de treinamentos extenuantes, como pode não promover as adaptações e os benefícios esperados, no caso de intensidade abaixo da indicada (Kellmann, 2010; Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). Vários são os parâmetros utilizados atualmente para controlar o volume e a intensidade do exercício. O padrão ouro é representado pelo consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ), sendo também utilizados a frequência cardíaca, a percepção subjetiva de esforço, a concentração sanguínea de lactato, os testes específicos de capacidade física, dentre outros (American College of Sports Medicine Position Stand and American Heart Association. Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities) (ACSM 2011).

Outra consequência da falta de controle da intensidade do exercício físico é a possibilidade de ocorrer um aumento em infecções virais ou por microrganismos intracelulares, já que a literatura descreve que exercícios de alta intensidade direcionam o sistema imune para uma predominância de resposta humoral (Th2), a qual não é capaz de debelar estes tipos de infecção. Em contrapartida, a prática de exercício controlada, de intensidade moderada resulta em uma predominância do padrão de resposta celular (Th1), controlando essas infecções (Walsh, Gleeson, Pyne, *et al.*, 2011). Deste modo, fica clara a importância de um treinamento adequado, apresentando um controle da intensidade do exercício físico realizado.

Nossos dados demonstraram que a concentração de lactato sanguíneo apresentada pelos camundongos no período pós-exercício (3,23 mmol/L) sugere exercício de intensidade moderada, visto que a concentração para um protocolo de exercício extenuante até a fadiga (5,63 mmol/L) foi significativamente maior (Fig. 1). Outros protocolos de intensidade moderada preconizam valores de lactato muito semelhantes aos encontrados neste trabalho. Camundongos Balb/c submetidos à corrida de intensidade moderada (25 m/min) apresentam concentração de lactato sanguíneo de 2,61 mmol/L, enquanto em repouso, o valor encontrado é 1,81 mmol/L (Haramizu *et al.*, 2009). Este valor é muito semelhante ao que nós encontramos ao medir o lactato de camundongos em repouso (1,78 mmol/L) (Fig. 1A).

Além disso, camundongos submetidos a exercício extenuante apresentaram nível de peroxidação lipídica 196% maior que o grupo em repouso, enquanto o protocolo de exercício

moderado promoveu um aumento de cerca de 88% (Fig. 1B). Isso sugere que as intensidades dos exercícios utilizados neste trabalho eram moderada e extenuante, pois a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo músculo é diretamente proporcional à intensidade do exercício (Bloomer and Fisher-Wellman, 2008). Os níveis de peroxidação lipídica são aumentados em resposta ao exercício físico aeróbio exaustivo e ao exercício de resistência (Alessio et al., 2000; Pinho et al., 2010).

Malm (2004), sugeriu que o exercício moderado auxilia na resolução de infecções virais, enquanto o exercício extenuante facilita o surgimento de infecções intracelulares, pois a intensidade do exercício seria capaz de direcionar o tipo de resposta imunológica apresentada. Deste modo, como já comentado, o exercício moderado estaria associado à resposta imune celular (Th1) e o exercício extenuante à resposta imune humoral (Th2).

Durante a resposta Th1 o aumento da produção de IFN- $\gamma$  estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos ativados resultando na produção de óxido nítrico (NO). A expressão desta enzima é induzida por vários estímulos, incluindo IL-1, TNF, IFN- $\gamma$  e LPS (Stafford, Neumann e Belosevic, 2002; Mansueto *et al.*, 2007). Kizaki e colaboradores (2008) sugeriram que este fenômeno está associado à expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, pois, macrófagos isolados de camundongos treinados durante 3 semanas em esteira rolante apresentam a expressão destes receptores significativamente diminuída. Este estudo também mostra que células que super expressam receptores  $\beta$ -adrenérgicos, quando estimuladas por LPS, apresentam concentrações menores tanto de RNAm quanto da própria enzima iNOS, culminando em uma menor produção de NO por estas células. Os macrófagos oriundos dos animais submetidos apenas a uma sessão de exercício (agudo) moderado apresentaram aumento na produção de NO somente nos sistemas infectados por parasitos do gênero *Leishmania*. Já os macrófagos obtidos a partir dos animais submetidos a uma única sessão de exercício extenuante, mesmo tendo sido tratados com uma alta concentração de LPS, não foram capazes de apresentar aumento na produção de NO. Este fenômeno possivelmente poderia ser explicado pelo fato de que o exercício extenuante promove a predominância da resposta do tipo Th2 (revisito por Terra *et al.*, 2012) e que esta resposta leva à ativação do macrófago por uma via alternativa, onde ocorre a produção de IL-10 em detrimento da IL-12 e a ativação da enzima arginase em detrimento da iNOS (Bogdan, 2008). A ativação da arginase culmina na produção de poliaminas, que estimulam o crescimento de microrganismos, ao contrário do NO, produzido pela ativação da iNOS, o qual consiste na principal molécula microbicida de macrófagos (revisito por Mosser e Edwards, 2008; Naderer e Mcconville, 2008).

Macrófagos de camundongos submetidos ao treinamento moderado e infectados com *L. major* mostram uma maior produção de IL-12 quando comparados ao grupo sedentário (Terra *et al.*, 2013). Em contraste a outros parasitos, o gênero *Leishmania* inibe a secreção de IL-12 por macrófagos inibindo sua via de sinalização, prevenindo, deste modo, que uma resposta efetora seja montada (Reiner *et al.*, 1994; Olivier, Gregory e Forget, 2005). O exercício moderado parece promover um estado pró-inflamatório no macrófago que seria capaz de ignorar os mecanismos de escape de *Leishmania*, contribuindo para a resistência do hospedeiro à infecção pelo parasito (Terra *et al.*, 2013). A produção de IL-12 também é aumentada em células dendríticas isoladas de ratos exercitados (Chiang *et al.*, 2007) e a produção desta citocina por estes dois tipos celulares é crítica para a diferenciação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> no subgrupo Th1 (revisado por Liew, 2002).

O exercício moderado agudo foi capaz de inibir o fator de infecção entre o parasito e os macrófagos (Fig. 2A e 2B). Este poderia ser considerado o padrão já esperado em virtude deste tipo de exercício estimular a predominância do perfil Th1 de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Terra *et al.*, 2012). Em um estudo desta década, Barthelmann e colaboradores (2011) observaram o desenvolvimento da lesão leishmaniótica em camundongos Balb/c (susceptíveis) e C57BL/6 (resistentes) infectados por *L. major* (2x10<sup>6</sup> promastigotas). Os autores analisaram o curso da lesão, DTH, carga parasitária e o perfil de citocinas em células de linfonodo drenante e no sítio da infecção (pele). Os animais resistentes utilizados por Barthelmann e colaboradores (2011) apresentaram DTH positiva e baixa carga parasitária em relação aos susceptíveis. Ainda apresentaram padrão de citocinas Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) em células de linfonodo drenante e no sítio da lesão, confirmando ser este o padrão de citocinas mais associado ao controle da infecção por *Leishmania major*.

Surpreendentemente, os macrófagos isolados dos camundongos submetidos ao exercício agudo extenuante apresentaram um FI significativamente inferior ao apresentado pelos grupos controle e mesmo pelo grupo do exercício agudo moderado (Fig 2). Como estes macrófagos não foram estimulados a produzir NO, provavelmente outros mecanismos efetores devem estar envolvidos na inibição da interação entre o parasito e sua célula hospedeira. Um destes mecanismos poderia ser o aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pelo macrófago. Já está bem estabelecido que exercícios exaustivos promovem a produção destas moléculas instáveis (Bloomer e Fisher-Wellman, 2008), desta forma, talvez alguma alteração na concentração de ROS também poderia ser observada no vacúolo parasitóforo do macrófago. Entretanto, outra explicação seria a diminuição da capacidade de fagocitose observada em macrófagos alternativamente ativados (Mosser e Edwards, 2008). Esta hipótese é bastante plausível visto que, como já discutido anteriormente,

o exercício extenuante promove a predominância da resposta do tipo Th2 (revisto por Terra *et al.*, 2012, Terra *et al.*, 2013, Terra *et al.*, 2019) e que esta resposta leva à ativação do macrófago por uma via alternativa (Mosser e Edwards, 2008).

Outra hipótese capaz de explicar esse fato seria a possibilidade de o exercício extenuante iniciar uma forte resposta inflamatória imediatamente após o término do exercício e, posteriormente, contrabalanceasse essa resposta inflamatória com a produção de uma resposta do tipo Th2. Para verificar essa hipótese, fizemos um curso temporal da resposta dos macrófagos ao exercício extenuante. Imediatamente após o término do exercício, este foi capaz de continuar inibindo o FI entre o parasito e os macrófagos (Fig. 3) como anteriormente mostrado (Fig. 2). Já após 24h da realização da atividade física, o FI aumentou significativamente (Fig. 3), sugerindo uma resposta Th2. Esse aumento não permaneceu durante as horas seguintes (48 e 72h).

Embora o LPS pareça não ter ativado dos macrófagos por ter aumentado o FI no sistema sedentário, a prática da atividade física parece ter estimulado essa ativação, já que os macrófagos tratados com LPS após 24 e 48h do término da sessão natatória, tiveram o FI significativamente reduzido em relação aos animais em repouso (Fig. 3A e 3C). Esse resultado foi compatível com a produção de NO pelos macrófagos, onde houve estímulo nos animais exercitados (Fig. 5), ainda que a infecção por *L. major* reduza esse efeito estimulatório do LPS. Contudo, embora haja uma tendência de maior produção, não houve diferença significativa nas concentrações de NO encontradas para os macrófagos dos animais exercitados, ou mesmo sedentários, tratados com LPS e infectados por *L. major* (Fig. 5). Esse fato poderia explicar, pelo menos em parte, o motivo do sistema sedentário estimulado por LPS ter demonstrado um aumento no FI entre o parasito e o macrófago (Fig. 3). Infelizmente perdemos o sobrenadante dos macrófagos submetidos a uma única sessão de exercício extenuante, sacrificados após 24h do término desta sessão, tratados com LPS e infectados por *L. major*. Este sobrenadante seria de muito interesse, pois esperávamos que a produção de NO nele estivesse reduzida, pois foi o único sistema onde o FI entre macrófagos e o parasito foi aumentada em decorrência do exercício (Fig. 3).

O exercício moderado parece ter estimulado o padrão Th1 nos macrófagos oriundos de camundongos exercitados e posteriormente infectados por *L. major*. Como pode ser observado, o exercício de intensidade moderada promoveu um aumento significativo na concentração de TNF no sistema infectado por *L. major* e tratado com LPS, assim como nas concentrações de IL-6 e MCP-1 (Figs. 6, 7 e 9). Contudo, nenhum efeito significativo foi observado na produção de IL-10 desses macrófagos (Fig. 8), o que reforça ainda mais a ideia da predominância de uma resposta inflamatória nos animais eutanasiados imediatamente após



a realização de uma sessão de exercício físico de intensidade moderada. O fato do FI encontrado entre o parasito e os macrófagos oriundos de animais eutanasiados após 24h do término do exercício extenuante ter aumentado significativamente, sugere um padrão Th2. Contudo seria primordial dosar sua produção de citocinas para que essa afirmação seja feita. O que realizaremos em breve.

Esse padrão não se repetiu quando os macrófagos foram infectados por *L. braziliensis* no lugar da *L. major*. Nesses casos, os macrófagos dos animais que foram mantidos em repouso apresentaram uma maior produção de todas essas citocinas (Figs. de 6 a 9).

Embora não fosse o resultado esperado, o exercício extenuante aumentou todas as citocinas dosadas no sobrenadante de células oriundas do baço dos animais exercitados, inclusive de IL-10. Esse fato pode demonstrar que o organismo esteja buscando, a nível sistêmico, um equilíbrio para o controle do processo inflamatório inicialmente desencadeado pelo exercício extenuante. Contudo, seria importante dosarmos outras citocinas como IL-4, IL-5 ou IL-13, citocinas do padrão Th2.

Embora estes dados sejam muito promissores, ainda existe um longo caminho a ser percorrido para o completo entendimento do efeito do exercício físico na atividade microbicida de macrófagos.

## CONCLUSÕES:

1. Uma única sessão de exercício agudo moderado promoveu aumento na produção NO em macrófagos estimulados por LPS e infectados por *Leishmania major* e em macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.
2. Uma única sessão de exercício agudo moderado e extenuante promoveu a diminuição do Fator de infecção *Leishmania*/Macrófago na infecção *in vitro* por *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*.
3. Uma única sessão de exercício extenuante inibiu o fator de infecção (FI) entre promastigotas de *Leishmania major* e macrófagos quando os mesmos foram retirados imediatamente após a realização da atividade física. Apenas 24h após a realização da atividade física, o exercício extenuante estimulou o FI. O exercício físico parece ter estimulado o efeito esperado do LPS, tendo inibido o FI entre o parasito e os macrófagos nos tempos de 24 e 48h.
4. Uma única sessão de exercício agudo promoveu o aumento na produção das citocinas TNF, IL-6 e MCP-1 por macrófagos peritoneais estimulados por LPS e infectados por *Leishmania major*.
5. Uma única sessão de exercício agudo extenuante promoveu o aumento na produção de citocinas MCP- por macrófagos peritoneais estimulados por LPS e infectados por *Leishmania braziliensis*, quando comparado ao grupo que realizou exercício moderado.
6. Uma única sessão de exercício agudo extenuante promoveu o aumento na produção das citocinas TNF, IL-6, MCP-1 e IL-10 por células esplênicas.
7. Uma única sessão de exercício agudo moderado promoveu uma diminuição na produção de citocina IL-10 por células esplênicas, quando comparado aos grupos controle e exercitado extenuante.

## REFERÊNCIAS

- ALESSIO, H. M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, n. 9, p. 1576-81, Sep 2000. ISSN 0195-9131.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999. ISSN 0021-9533
- American College of Sports Medicine Position Stand and American Heart Association. Recommendations for cardiovascular screening, staffing, and emergency policies at health/fitness facilities. *Med Sci Sports Exerc*, v. 30, n. 6, p. 1009-18, Jun 1998. ISSN 0195-9131.
- ANGELA H. LOPES, T. S.-P., FELIPE A. DIAS, MARTA T. GOMES, GISELI C. RODRIGUES,; LUCIANA T. ZIMMERMANN, T. L. A. E. S. A. A. B. V. *Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. The Open Parasitology Journal*, n. 4, p. 30-59, 2010.
- BAEK, K.-W. et al. Exercise training reduces the risk of opportunistic infections after acute exercise and improves cytokine antigen recognition. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, p. 4–13, 2019.
- BELOSEVIC, M. 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. 266-74, Jul 1989. ISSN 0022-1767. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499629>.
- BLOOMER, R. J.; FISHER-WELLMAN, K. H. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gen Med*, v. 5, n. 3, p. 218-28, Sep 2008. ISSN 1550-8579. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18727988>.
- BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 6, p. 1221-34, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363880>.
- BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*, v. 8, n. 4, p. 517-25, Aug 1996. ISSN 0952-7915. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8794010>.
- BOOTH, F. W. et al. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary Insight and Pathophysiological Mechanisms. *Physiological Reviews*, v. 97, n. 4, p. 1351–1402, 2017.
- 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. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. Apr, p. 1–21, 2018.
- CASIMIRO-LOPES, G. et al. Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. *Horm Metab Res*, v. 40, n. 4, p. 276-80, Apr 2008. ISSN 0018-5043.
- CHANG, K. P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int Rev Cytol Suppl*, v. 14, p. 267-305, 1983. ISSN 0074-770X.

- CHANG, K. P.; DWYER, D. M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 678-80, Aug 20 1976. ISSN 0036-8075.
- CHIANG, L. M. et al. Modulation of dendritic cells by endurance training. *Int J Sports Med*, v. 28, n. 9, p. 798-803, Sep 2007. ISSN 0172-4622
- CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória; Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Rev. bras. reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- CUBA CUBA, C. A. 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. 456-7, 1986. ISSN 0035-9203.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1529-8019.
- 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. ISSN 0048-2951
- DUTRA, P. M. L., SILVA, S.A.G., DA CRUZ, A.M., DUTRA, F.L. Leishmaniose Americana. In: (Ed.). *Bases Moleculares em Clínica Médica*. 1ª: Editora Atheneu., 2010.
- ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1024, p. 138-46, Jun 2004. ISSN 0077-8923.
- ERIKSEN, W. et al. Smoking as a predictor of long-term work disability in physically active and inactive people. *Occup Med (Lond)*, v. 48, n. 5, p. 315-20, Jul 1998. ISSN 0962-7480.
- FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, v.101, n. 4, p. 890-8, 1998. doi: 10.1172/JCI1112.
- GHILARDI, N.; OUYANG, W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Seminars in Immunology*, v. 19, n. 6, p. 383-393, 2007.
- GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. In: (Ed.). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. England, v.9, 2006a. p.659-65. ISBN 1363-1950 (Print) 1363-1950 (Linking).
- GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 9, n. 6, p. 659-65, Nov 2006b. ISSN 1363-1950.
- GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol*, v. 103, n. 2, p. 693-9, Aug 2007. ISSN 8750-7587.
- GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev*, v. 12, p. 34-53, 2006. ISSN 1077-5552.
- Han CZ, Ravichandran KS. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell*. (2011) 147:1442-5. doi:10.1016/j.cell.2011.12.006

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 $\alpha$  in inflammation and chronic disease. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 463-9, Jul 2008. ISSN 1476-4687.

HARAMIZU, S. et al. Different contribution of muscle and liver lipid metabolism to endurance capacity and obesity susceptibility of mice. *J Appl Physiol*, v. 106, n. 3, p. 871-9, Mar 2009. ISSN 8750-7587.

INFANTE-DUARTE, C. et al. Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 11, p. 6107–6115, 2000.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? *Science*, United States, v. 321, n. 5891, p. 917-8, 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking).

JÚNIOR1, D. M. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 5, p. 552–80, 2010.

KARPER, W. B.; BOSCHEN, M. B. Effects of exercise on acute respiratory tract infections and related symptoms. Moderate exercise may boast an elder's natural defenses against common illnesses. *Geriatr Nurs*, v. 14, n. 1, p. 15-8, Jan-Feb 1993. ISSN 0197-4572

KELES, M. S. et al. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, v. 28, n. 2, p. 141-3, May 2001. ISSN 0317-1671.

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. ISSN 1600-0838.

KEMP, S. J. et al. Genetic control of resistance to trypanosomiasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 54, n. 1-4, p. 239-43, Nov 1996. ISSN 0165-2427.

LAUNOIS, P. et al. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. *Int Rev Immunol*, v. 17, n. 1-4, p. 157-80, 1998. ISSN 0883-0185

LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M.I., NOURSHARGH, S., Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. (2007) 7:678–89. doi: 10.1038/nri2156.

LIEW, F. Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, v. 2, n. 1, p. 55-60, Jan 2002. ISSN 1474-1733

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990. ISSN 0022-1767

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, n. 7 Suppl, p. S369-76, Jul 2000. ISSN 0195-9131

- MALM, C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. In: (Ed.). *Sports Med.* New Zealand, v.34, 2004. p.555-66. ISBN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking).
- MANSUETO, P. et al. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 20, n. 3, p. 435-45, 2007 Jul-Sep 2007. ISSN 0394-6320.
- MARTINEZ-SANCHEZ, M. E. et al. Role of cytokine combinations on CD4+ T cell differentiation, partial polarization, and plasticity: Continuous network modeling approach. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. Aug, p. 1–14, 2018.
- MAUEL, J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol*, v. 38, p. 1-51, 1996. ISSN 0065-308X
- MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 6, p. 665–679, 2010.
- MORETTA, A. et al. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*, England, v. 15, n. 2, p. 226-33, 2008. ISSN 1350-9047
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 2, p. 301-8, Feb 2008. ISSN 1462-5822.
- NIEMAN, D. C. et al. Immune response to a 30-minute walk. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 37, n. 1, p. 57–62, 2005.
- NIEMAN, D. C. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol*, v. 78, n. 5, p. 496-501, Oct 2000. ISSN 0818-9641
- NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and Immune Function. *Sports Medicine*, v. 27, n. 2, p. 73–80, 1999.
- NIEMAN, D. C. et al. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc*, v. 25, n. 7, p. 823-31, Jul 1993. ISSN 0195-9131
- OKUTSU, M. et al. Exercise training enhances in vivo tuberculosis purified protein derivative response in the elderly. In: (Ed.). *J Appl Physiol*. United States, v.104, 2008. p.1690-6. ISBN 8750-7587
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clin Microbiol Rev*, v. 18, n. 2, p. 293-305, Apr 2005. ISSN 0893-8512
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas, 2019, ISBN: 978-92-75-32063-1
- PEDERSEN, B. K. et al. Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med*, v. 18 Suppl 1, p. S2-7, Mar 1997. ISSN 0172-4622.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, v. 80, n. 3, p. 1055-81, Jul 2000. ISSN 0031-9333.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*, v. 34, n. 4, p. 246-51, Aug 2000. ISSN 0306-3674

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, United States, v. 321, n. 5891, p. 970-4, 2008. ISSN 1095-9203

PINHO, R. A. et al. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. *Clin J Sport Med*, v. 20, n. 4, p. 306-11, Jul 2010. ISSN 1536-3724.

REINER, S. L. et al. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med*, v. 179, n. 2, p. 447-56, Feb 1 1994. ISSN 0022-1007

REY, S. et al. IL-23 and IL-1 $\beta$  Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation. *Cell Reports*, v. 22, n. 10, p. 2642–2653, 2018.

REY, L. *Flagelados parasitos do sangue e dos tecidos: Trypanosomatidae. In: Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do Homem nas Américas e na África.* Guanabara Koogan, 1991.

ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res*, v. 21, n. 2, p. 152-8, 1991. ISSN 0940-5437

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. 801-27, Dec 1996. ISSN 1148-5493.

ROMEO, J. et al. Physical activity, immunity and infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 69, n. 3, p. 390–399, 2010.

ROSA, L. F. P. B. C.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 8, n. 4, p. 167–172, 2002.

ROWBOTTOM, D. G.; GREEN, K. J. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, n. 7 Suppl, p. S396-405, Jul 2000. ISSN 0195-9131

RUBINOW, K. B.; RUBINOW, D. R. In immune defense: Redefining the role of the immune system in chronic disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 19–26, 2017.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, England, v. 2, n. 11, p. 845-58, 2002. ISSN 1474-1733

SAÚDE, M. D.; SAÚDE, S. D. V. E. *MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA* 2007.

- SELLAMI, M. et al. Effects of acute and chronic exercise on immunological parameters in the elderly aged: Can physical activity counteract the effects of aging? *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. Oct, p. 1–17, 2018.
- SIMPSON, R. J. et al. *Exercise and the Regulation of Immune Functions*. 1. ed. [S.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 135
- 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. ISSN 1040-841X
- STENGER, S. et al. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med*, v. 180, n. 3, p. 783-93, Sep 1994. ISSN 0022-1007.
- 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. 7738-42, Nov 1985. ISSN 0027-8424.
- TERRA, R. et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 18, n. 3, p. 208–214, 2012.
- TERRA, R. 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. 661-6, Jul 2013. ISSN 0172-4622.
- TERRA, R. et al. Immunomodulation from moderate exercise promotes control of experimental cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. May, p. 1–13, 2019.
- 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. ISSN 1381-6128.
- VOLL R.E.; HERRMANN, M.; ROTH, E.A.; STACH, C.; KALDEN, J.R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, v. 390, n.6658, p. 350–1, 1997. doi: 10.1038/37022.
- WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*, v. 17, p. 6-63, 2011. ISSN 1077-5552
- WALSH, N. P. et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Exerc Immunol Rev*, v. 17, p. 64-103, 2011. ISSN 1077-5552
- World Health Organization, <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- YOUNG, D. G. A. D., M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in <country-region>Mexico</country-region>, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst*, n. 54, p. 1-881, 1994.