

FABIO TAKEO SATO

**Efeitos do exercício físico resistido em neutrófilos e linfócitos de camundongo
nocaute para receptor 1 de TNF- α**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tania Cristina Pithon-Curi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações.

São Paulo
2012

RESUMO

SATO, F. T. **Efeitos do exercício físico resistido em neutrófilos e linfócitos de camundongo nocaute para o receptor 1 de TNF- α** . 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Checar, na capa conta 2012

O objetivo do estudo foi investigar o efeito do exercício resistido agudo ou crônico do na apoptose de neutrófilos e linfócitos. Camundongos C57BL6/J e nocautes para receptor 1 do TNF- α (TNFR1) machos realizaram o protocolo de treinamento agudo ou crônico por 5 semanas, numa escada, com 25% do peso corpóreo de sobrecarga preso à base da cauda. Os neutrófilos dos animais foram obtidos da medula óssea e os linfócitos dos linfonodos do mesentério. Os seguintes parâmetros foram determinados: 1) viabilidade, 2) externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, 3) fragmentação de DNA e 4) potencial de membrana mitocondrial. Além disso, o conteúdo de lipídios neutros foi determinado em neutrófilos e o ensaio de proliferação em linfócitos. O exercício agudo e crônico não alterou os parâmetros de morte avaliados nos neutrófilos. O exercício agudo não alterou a função de linfócitos. Entretanto, o exercício resistido crônico aumentou a porcentagem dos linfócitos com externalização de fosfatidilserina e diminuiu a capacidade de proliferação dos linfócitos dos camundongos controle. A ausência do receptor 1 para TNF- α reverteu o aumento da apoptose e a diminuição da proliferação de linfócitos dos camundongos C57BL6/J quando os camundongos foram exercitados cronicamente. Concluímos que o efeito do exercício crônico na morte de linfócitos envolve a via do TNFR1.

Palavras-chave: Leucócito. Exercício físico. Morte celular programada. Proliferação de linfócitos.

ABSTRACT

SATO, F. T. **Effects of resistance physical exercise in neutrophils and lymphocytes from knockout mice for TNF- α receptor 1.** 2012. 69 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to investigate the acute (single session) or chronic effects of resistance exercise training on apoptosis of neutrophils and lymphocytes. C57BL6/J (control) and knockout male mice for TNFR1 performed the acute or chronic 5 weeks training protocol in a ladder with a 25% body weight overload attached to the base of the tail. Neutrophils were obtained from bone marrow and lymphocytes from mesenteric lymph nodes. The following parameters were determined in neutrophils and lymphocytes: 1) viability, 2) externalization of phosphatidylserine on the plasma membrane, 3) DNA fragmentation and 4) mitochondrial membrane potential. The measurement of the content of neutral lipids was performed in neutrophils only and the proliferation assay was carried out only in lymphocytes. The acute and chronic exercise did not alter the parameters evaluated in neutrophils. Acute exercised also did not affect lymphocyte function. However, chronic resistance exercise increased the percentage of lymphocytes with phosphatidylserine externalization and decreased lymphocyte proliferation capacity of wild type mice. The absence of receptor 1 of TNF- α reversed the increased apoptosis and decreased proliferation of lymphocytes, observed in wild type mice, in TNFR1 knockout mice, when the mice were chronically exercised. We concluded that the effect of chronic exercise on lymphocyte death involves the TNFR1 pathway.

Keywords: Leukocyte. Physical exercise. Programmed cell death. Lymphocyte proliferation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definições e características do exercício físico resistido

Não se sabe exatamente quando o exercício físico resistido começou a ser tratado como ciência, mas sabe-se que já na Pré-História havia um interesse pelo desenvolvimento da força para a formação de bons guerreiros. Na Antiguidade os gregos buscavam a estética, a harmonia e o equilíbrio do corpo por meio da força física. Dentre aqueles citados por reconhecerem a importância do exercício físico estão Hipócrates (460-370 a.C.) e Galeno (129-210 d.C.) (BERRYMAN; PARK, 1992). As atividades que antes eram predominantemente manuais (agricultura, caça e coleta) vem sendo substituídas por tecnologias de mecanização. Atualmente o exercício físico de força tem significado cultural, estético, lúdico e de tratamento/prevenção de doenças crônico-degenerativas (HASKELL et al., 2007).

Exercício físico resistido é o termo usado para descrever um exercício que requer da musculatura esquelética do corpo, mover ou tentar mover-se contra uma força oposta (FLECK; KRAEMER, 2004). O treinamento resistido engloba o treinamento de força, de hipertrofia e de resistência muscular localizada. O treinamento de força, tem como objetivo adaptações funcionais com aumento de força muscular. No treinamento de hipertrofia, o principal objetivo é o estético, os praticantes desse tipo de treinamento não almejam aumentar a força muscular, no entanto, há aumento de massa muscular, assim como da área de seção transversa do músculo exercitado. Apesar da distinção entre essas duas modalidades quanto aos objetivos, uma série de exercício pode privilegiar uma determinada categoria sem ser excludente para o outro tipo de modalidade (FLECK; KRAEMER, 2004).

Praticantes de treinamento de resistência muscular localizada (RML), tem como objetivo aumentar a resistência muscular à fadiga por mais tempo, executando a contração muscular pelo maior tempo com pouco peso (SANTOS et al., 2008). A prática do treinamento de resistência muscular localizada tem mostrado sua importância em praticantes idosos, por ser uma atividade de baixo impacto para moderada sem comprometer as articulações (SHEPARD, 1994), Nesse tipo de treinamento observa-se a diminuição da porcentagem de gordura com aumento de

massa magra e aumento de metabolismo de repouso nos praticantes (RYAN et al., 1995).

O *American College of Sports Medicine* (ACSM) e o *American Heart Association* (AHA) em seu posicionamento de 2007 recomendaram a prática crônica do exercício resistido para a manutenção e promoção da saúde no mínimo duas vezes por semana. Caracteriza-se como exercício crônico aquele realizado por um período prolongado e o exercício físico agudo refere-se a uma única sessão de exercício físico. Dentre os exercícios recomendados pelo ACSM se encontra o exercício de escalada (HASKELL et al., 2007) .

O treinamento resistido pode envolver contrações musculares isocinéticas, isométricas e isotônicas.

A contração muscular isocinética é realizada a uma velocidade angular dos membros com sobrecarga. Já a isométrico, há a contração muscular sem alteração no ângulo articular. Portanto, nesse caso o músculo contrai, entretanto não é observado o movimento. Ocorre, por exemplo, quando um peso é mantido estático ou quando um objeto é tão pesado que o indivíduo não consegue levantá-lo nem locomove-lo. A contração isotônica é definida como uma ação muscular em que os músculos exercem uma tensão constante, para esse tipo de treinamento foram desenvolvidos equipamentos específicos que permitem a manutenção da carga constante durante a realização do movimento.

A sobrecarga a ser utilizada nos protocolos de força e hipertrofia muscular baseia-se no teste de carga máxima, determinada no teste de repetição máxima (RM). Esse teste é utilizado frequentemente para prescrever exercício físico resistido em humanos. Assim, utiliza-se o maior peso que o indivíduo consegue levantar em um determinado número de movimento (THOMPSON, 2005). Uma repetição máxima (1 RM), é portanto, o maior peso que o indivíduo consegue levantar durante a realização do movimento e 5 RM é o maior peso que o indivíduo pode levantar em uma série de 5 repetições consecutivas de levantamento.

A utilização do conceito de RM é importante pela limitação encontrada para determinar a intensidade do exercício físico resistido. Ao contrário dos exercícios aeróbios, a intensidade do treinamento resistido não pode ser estimado pelos batimentos cardíacos pois esses podem não variar consistentemente dependendo do exercício realizado e grupamento muscular requisitado em cada movimento.

Fleck e Dean (1987), mostraram que durante uma série de exercício de extensão de joelho, os indivíduos que realizaram 100% de 1 RM, apresentaram menor frequência de batimentos cardíacos quando comparados aos indivíduos que exercitaram-se exercício com carga de 50-80% de 1RM.

Outro parâmetro para determinar a intensidade de exercício físico realizado, porém, principalmente os exercícios aeróbios é o consumo de oxigênio ou VO_2 máx. O VO_2 max é a máxima quantidade de oxigênio que o corpo utiliza em um minuto e pode ser analisado por quilograma de peso corporal (mL/kg/min). A intensidade do exercício físico aeróbio é prescrita como % VO_2 max que determinado durante o teste de exercício aeróbio do indivíduo (THOMPSON, 2005). Atualmente, o ACSM recomenda o uso do consumo de oxigênio de reserva (VO_2R) que é a diferença entre o consumo máximo de oxigênio e o consumo de oxigênio basal (ACMS, 2006). Do mesmo modo que a medida de batimentos cardíacos não são adequados para classificar a intensidade de um exercício resistido como no caso de exercício aeróbios, o consumo de VO_2R dificilmente será utilizado para classificar a intensidade de um exercício resistido. Portanto, nesse estudo, para avaliar a intensidade do exercício físico realizado pelos camundongos utilizou-se o teste de repetição máxima (RM).

Cinco repetições máximas (5 RM) correspondeu a aproximadamente 30% de 1 RM. 1 RM obtido foi correspondente a 75% de peso corpóreo de sobrecarga e 5 RM foi correspondente a 25% do peso corpóreo do camundongo de sobrecarga. Hill e colaboradores (HILL; BERMINGHAM; KNIGHT, 2005), consideraram 5 RM em exercício de resistência como exercício de baixa intensidade, mas por ser em animais e por ter características diferentes, ainda não foi demonstrada a equivalência dessa carga em relação à intensidade do exercício resistido.

Existem três práticas comuns para aumentar o estresse muscular em exercício resistido: 1) aumentar gradualmente a carga de trabalho, com aumento de peso nos aparelhos de musculação conforme o músculo aumenta a sua capacidade de gerar força; 2) aumentar o volume de treino, com um aumento de repetições ou séries realizados num determinado período, aumento da velocidade das repetições ou diminuição de tempo de descanso entre cada série de movimentos realizados. O método mais comum, e por isso utilizado nesse estudo foi o aumento do volume de

treino com elevação do número de repetições, e conseqüentemente aumento da resistência muscular (FLECK; KRAEMER, 2004).

Os benefícios do exercício resistido vão além do aumento de força muscular. São documentados efeitos cardiovasculares favoráveis e de bem estar (POLLOCK et al., 2000). Em estudos de ensaio clínico, mulheres que sofreram doença arterial nas coronárias e que participaram do programa de treinamento de exercício resistido, aumentaram a sua capacidade para realizar tarefas cotidianas (ADES et al., 2003). Outros efeitos descritos envolvem um aumento da densidade óssea em jovens adultos e a diminuição da perda de massa óssea no adulto de meia idade (GUADALUPE-GRAU et al., 2009) sendo portanto um fator que pode retardar o aparecimento da osteoporose. Além do exercício resistido ser recomendado para o aumento de massa magra, observa-se o aumento do metabolismo basal (POLLOCK et al., 2000). No entanto, os efeitos do treinamento resistido na função de leucócitos permanece a ser esclarecido.

1.2 Leucócitos

Do grego *leukos* significa branco e *-kytos* significa célula, tem como significado células brancas por apresentarem-se em uma fina camada branca após centrifugação do sangue, visível ao olho nú (SCHALLER et al., 2008).

Os leucócitos são células que se originam na medula óssea a partir das células tronco hematopoéticas, que podem se transformar em diferentes tipos de leucócitos. Dentre os leucócitos, podemos mencionar os três que se encontram em maior número, são os neutrófilos, linfócitos e monócitos (LAGASSE; WESSMAN, 1996).

1.2.1 Características e funções dos leucócitos: neutrófilos e linfócitos

Os neutrófilos são chamados também de neutrófilo polimorfonucleares (PMN) devido à sua característica morfológica de seus núcleos segmentado entre 2-5 lobos ou em forma de bastonete visíveis em microscópio ótico corados por exemplo, em coloração de hematoxilina e eosina. Seu citoplasma contém granulos, característica

que o classifica como granulócito, e seu tamanho em esfregaço varia entre 12-15 µm (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004).

Estas células são consideradas a primeira linha de defesa do organismo, pois são as primeiras a chegarem ao local de infecção ou dano, pela migração ao local da infecção onde fagocitam e matam os agentes invasores. Além disso, possuem função importante no início e sustentação do processo inflamatório (WALSH et al., 2011).

Os neutrófilos são células que participam da imunidade inata. Elas reconhecem e respondem aos microorganismos. A resposta imune inata é um mecanismo de defesa capaz de controlar ou mesmo erradicar infecções antes da ativação da resposta imune adaptativa. Há portanto, um constante *cross-talk* entre o sistema imune inato e adaptativo.

Monócitos e neutrófilos possuem um mesmo progenitor, progenitor de granulócito e monócito, que pertence à linhagem mielóide. Por ter mesma origem, elas dividem muitos antígenos de superfície. Entretanto, apesar dos mesmos antígenos a proporção é diferente, os neutrófilos produzem maior quantidade de Gr1 e Mac-1 (LAGASSE; WEISSMAN, 1996).

Os neutrófilos permanecem na medula óssea em média por 2 a 3 dias. Quando liberados da medula óssea, os neutrófilos permanecem por curto período de tempo na circulação em camundongos, em média 18 h em condições homeostáticas e sem ativação (PILLAY et al., 2010). Esse tempo de vida pode aumentar em caso de ativação de neutrófilos devido a invasão de patógenos ou à uma lesão (KOBAYASHI; DELEO, 2009).

A resposta neutrofílica à invasão de microorganismos ou lesão envolve aderência às células endoteliais (marginação), migração das células aderentes para o exterior do vaso (diapedese), deslocamento para o sítio extravascular (quimiotaxia) e acúmulo no tecido inflamado, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e desgranulação (SELVATICI et al., 2006).

O aumento da aderência dos neutrófilos ocorre por diminuição do fluxo sanguíneo e por moléculas de adesão celular (CAMs) pertencentes à família das selectinas, integrinas e da superfamília das imunoglobulinas. Dentre as CAMs mais conhecidas se encontram: L-selectina, P-selectina, E-selectina, LFA-1, VLA-4 e VCAM-1 (FURZE; RANKIN, 2008).

O número de neutrófilos na circulação pode variar dependendo da condição do animal. O aumento da ocorrência de morte celular pode levar à diminuição do número de neutrófilos na circulação (neutropenia) e maior risco de infecção por fungos ou bactérias. Por outro lado, a redução da morte aumenta o número de neutrófilos circulantes (neutrofilia), o que ocorre na infecção bacteriana, leucemia mielóide e infarto agudo do miocárdio (AKGUL; MOUDING; EDWARDS, 2001).

O recrutamento de neutrófilos pode ser mediado por hormônios de estresse, catecolaminas e corticosteróides, isso ocorre, por exemplo, em caso de exercício agudo intenso, causando um quadro temporário de neutrofilia (NIEMAN; PEDERSEN, 2000).

Durante o exercício físico intenso praticado por triatletas, há aumento de lesão muscular por excesso de contração muscular (KORKIA et al., 1994). Lesões podem aumentar as concentrações de citocinas como TNF- α e outras citocinas que levam ao aumento de expressão de CAMs como ICAM-1 e VCAM-1 (TANG et al., 2010) elevando a migração transendotelial de neutrófilos na região lesada. Citocinas circulantes interagem com receptores específicos de vários tipos celulares que pode levar à resposta inflamatória envolvendo adesão celular, migração e apoptose (SPRAGHE; KHALIL, 2009).

Já os linfócitos são células morfológicamente similares mas heterogênea em função e fenótipo. Dentre eles podemos destacar os linfócitos B, linfócitos T, participantes da imunidade adaptativa e células NK, participante da imunidade inata. Os linfócitos são originados de um mesmo progenitor linfóide antes de se diferenciarem. O processo de formação de linfócitos é chamado de linfopoese e ocorre nos órgãos linfóides primários.

Os linfócitos são responsáveis por especificidade antigênica e memória imunológica. Eles são classificados de acordo com a sua função em linfócitos T, linfócitos B e células NK. Entre as características comuns, está semelhança morfológica ao microscópio óptico do sangue periférico por esfregaço com tamanho aproximado de 10-12 μm de diâmetro e em coloração de May-Grünwald Giemsa, apresenta um núcleo redondo com cromatina condensada e alta relação núcleo-citoplasma pouco basofílico.

Os linfócitos B se desenvolvem na medula óssea e as células T sofrem maturação tímica onde também se diferenciam em outros subtipos. Após a

maturação e diferenciação, os linfócitos possuem dois destinos: a corrente sanguínea e os órgãos linfóides secundários, que são locais onde se gera resposta imunológica linfocítica, como o baço, linfonodos e tecidos linfóides. Após a exposição a antígenos os linfócitos B se tornam plasmócitos ou células B de memória (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004).

As células T podem ser classificadas de acordo com a função que é determinada pelos marcadores de superfície que expressam. As células que expressam CD8 são chamadas de linfócitos citotóxicos, pois destroem outras células infectadas através da liberação de substâncias tóxicas. As células que expressam CD4 são conhecidas como auxiliares, pois estão principalmente envolvidas com a ativação de outras células. Em função da natureza do antígeno e do processo de ativação os linfócitos CD4⁺ efetores ainda são subdivididos em: linfócitos Th1 e Th2. As células Th1 estão envolvidas na ativação de macrófagos e de linfócitos efetores produzindo principalmente IL-2 e INF- γ (JANEWAY et al., 2002). As células do tipo Th2 recrutam e promovem o desenvolvimento de células B e secretam principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Tanto células Th1 como Th2 podem secretar TNF- α (JANEWAY et al., 2002). As respostas características de células Th1 estão alteradas geralmente nas doenças auto-imunes. Já as respostas Th2 em alergias e infecções helmínticas (PONTE; RIZZO; CRUZ, 2007).

Desta forma, como linfócitos efetores, temos os linfócitos B produtores de anticorpos, células T citotóxicas e células T auxiliares que sinalizam para outras células do sistema imune. Células de memória permanecem aptas para responder a um antígeno já reconhecido.

A seguir destacamos algumas das características dos neutrófilos e linfócitos T e B presente no sangue de humanos e de camundongos (Quadro 1).

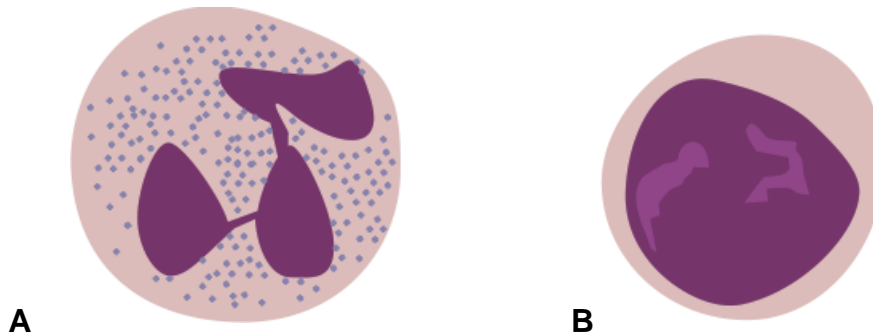
Quadro 1 - Características das populações de neutrófilos, linfócitos T e linfócitos B.

	Neutrófilos	Células T	Células B
Origem	Medula óssea	Medula óssea	Medula óssea
Maturação	Medula óssea	Timo	Medula óssea
Sangue humano	60-70% dos leucócitos	80% dos linfócitos sendo a maioria CD4	20% dos linfócitos
Sangue de camundongo (C57BL6)*	34% dos leucócitos	62% dos leucócitos	
Função	Defesa contra infecção, são os primeiros a fagocitar o agente invasor	CD4: célula T auxiliar para produção de anticorpos e geração de imunidade mediada por células CD8: Imunidade mediada por célula contra microorganismos intracelulares como vírus e células tumorais	Geração de anticorpos
Marcadores de superfície	CD11b Gr1	CD4 ou CD8	CD20

*Camundongo macho com 16 semanas de idade.
Fonte: The Jackson Laboratory, 2012.

Em suma, neutrófilo polimorfonuclear (Figura 1A), tem como característica morfológica a presença de núcleo segmentado entre 2-5 lobos ou em forma de bastonete visíveis em microscópio ótico corados em coloração de hematoxilina e eosina. Seu citoplasma contém granulos, característica que o classifica como granulócito, e seu tamanho varia entre 12-15 µm de diâmetro. O linfócito (Figura 1B) tem tamanho aproximado de 10-12 µm de diâmetro e em coloração de May-Grünwald Giemsa, apresenta um núcleo redondo com cromatina condensada e alta relação núcleo-citoplasma que é pouco basofílico.

Figura 1 - Características morfológicas de neutrófilos (A) e linfócitos (B).



1.3 Apoptose

Em 2002, Sydney Brenner, junto a Howard Robert Horvitz e John Sulston, foi agraciado pelo Nobel em fisiologia ou medicina pelas descobertas na regulação genética de órgãos em desenvolvimento e morte celular programada (THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE, 2002).

Sydney Brenner observou que o número de células de *C. elegans* variava com o desenvolvimento do organismo. Das 954 células observáveis no organismo imaturo, 131 não eram encontrados no organismo adulto (PUTCHA; JOHNSON, 2004). Mais tarde, esse fenômeno de morte celular programada que ocorreu durante o desenvolvimento de *C. elegans*, foi chamado de apoptose.

Esse trabalho foi importante por ser o primeiro a observar a existência do processo de morte celular programada que pôde ser observada em quase todos, senão todos, os organismos existentes. O controle da multiplicação e morte das células é muito importante para o desenvolvimento sadio dos organismos.

Nos mamíferos, uma falha no processo de apoptose, pode levar ao desenvolvimento do câncer, mesmo sem aumento da proliferação celular. Do mesmo modo que acontece com o desenvolvimento do *C. elegans* adulto, a apoptose é importante na formação do ser humano. Durante o desenvolvimento embrionário, ela é responsável, por exemplo, pelo desenvolvimento de nossos dedos e mãos pela apoptose das membranas interdigitais característicos de outros animais, como os morcegos.

A maior parte das mortes celulares ocorre por apoptose, diferente do que acontece com a necrose, descrito como morte celular acidental. A morte por apoptose é importante, pois não causa extravasamento de conteúdo intracelular e evita o início de inflamação, comum na necrose. No organismo, a apoptose é responsável pela manutenção do número de células constante apesar da renovação de aproximadamente um milhão de células por segundo (HANSON; HUME, 2006).

As células apoptóticas ativam a quimiotaxia dos macrófagos pela lisofosfatidilcolina, esfingosina 1 fosfato, CX3CL1 (liberado de células B) e ATP/UTP. Os macrófagos que chegam à célula em apoptose identificam a externalização de fosfatidilserina levando os a fagocitar antes que ocorra algum dano na membrana (NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010). Dependendo da situação, pode ocorrer a formação de corpos apoptóticos, chamados de *blebs*. Na ausência de um fagócito como o macrófago, a célula sofre uma necrose secundária à apoptose, em que há o extravasamento de conteúdo celular pela demora da remoção das células. Esse processo pode acontecer, por exemplo, em células em cultura (NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010).

1.3.1 Bioquímica da célula em apoptose

A apoptose é o processo de morte celular bem caracterizado que pode ocorrer por uma diversidade de estímulos fisiológicos e não fisiológicos, mediante a ativação de um processo bioquímico controlado, que requer energia e não envolve inflamação (DUKE et al., 1996). O conteúdo de lipídeo neutro, como por exemplo, o triacilglicerol (TAG), está relacionado com a apoptose. A diminuição do acúmulo de TAG no citoplasma do neutrófilo atua como fator protetor da apoptose induzido por ácidos graxos livres (HEALY; WATSON; NEWSHOLME, 2003).

As células que morrem por apoptose apresentam condensação de cromatina, clivagem do DNA internucleossomal, causado pelas endonucleases endógenas em fragmentos de 180-200 pares de base ou maiores (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), ativação de caspases e nucleases, permeabilização das membranas mitocondriais, vazamento de diversas moléculas desta organela (citocromo c, Smac/Diablo) para o citoplasma, desestabilização do citoesqueleto e externalização celular de

fosfatidilserina (PITHON-CURI et al., 2003; VERMES et al., 1995). A desestabilização do citoesqueleto causa mudança no formato da célula, e pode ocorrer a formação de *blebs*.

As proteínas pró- e anti-apoptóticas da família Bcl-2 controlam a morte celular (REED, 1997). Um dos mecanismos envolvidos neste controle implica na manutenção da integridade mitocondrial pelas proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 e Bcl-xL (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998) e na regulação da permeabilidade da membrana às moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c (KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997). No entanto, outras proteínas desta família, Bcl-xS (BOISE et al., 1993) e bax (OLTVAI et al., 1993) agem contrariamente e, permitem que ocorra apoptose na presença do Bcl-2.

O nosso grupo demonstrou que no exercício físico aeróbio intenso, há a apoptose com a despolarização de membrana mitocondrial (LAGRANHA et al., 2004; LEVADA-PIRES et al., 2008), entretanto, não se sabe por qual via ocorre a apoptose, pois tanto a via extrínseca como a intrínseca podem levar a despolarização de membrana mitocondrial que leva à sinalização da ativação de caspases.

Os mecanismos envolvidos no processo de indução da apoptose dos leucócitos pelo exercício físico intenso na via intrínseca, são: o aumento na produção de ERO, da despolarização da membrana mitocondrial, da expressão da proteína pró-apoptóticas (Bax) e redução das anti- apoptóticas (Bcl-xL) e ativação de caspases (QUADRILATERO; HOFFMAN-GOETZ, 2005).

A produção de ERO estimulada durante o exercício físico intenso induz apoptose pela redução do conteúdo intracelular de glutathione, alteração de proteínas mitocondriais (Bcl-xL, Bax, citocromo c) e fragmentação do DNA. Além disso, nas fases que precedem a apoptose, existe associação entre a produção de ERO e sinalização ao cálcio e conteúdo de Ca^{2+} no citoplasma (GENNARI et al., 2000).

O superóxido regula a expressão de genes anti- e pró-apoptóticos (KROEMER, 1998). O nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que a competição de *triathlon* (*Half Ironman*), além de estimular a produção de ERO, induz a expressão das proteínas da família Bcl-2, diminuindo a Bcl-xL e aumentando a Bax (LEVADA-

PIRES et al., 2008). A diminuição da quantidade de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL) e/ou aumento das pró-apoptóticas (Bax) resulta em apoptose, pois facilita a formação de homodímeros Bax:Bax, o que propicia a abertura do poro de transição na mitocôndria e conseqüentemente o extravasamento do citocromo c para o citoplasma e ativação de caspases culminando na apoptose da célula. Além disso, as ERO podem agir na proteína Bax provocando alterações conformacionais que a liberam do heterodímero com a Bcl-xL permitindo sua migração para a membrana mitocondrial. O extravasamento do citocromo c está relacionado à despolarização da membrana mitocondrial e redução na síntese de ATP (PITHON-CURI et al., 2003). O citocromo c liberado associa-se à proteína Apaf-1 e com a pró-caspase 9, formando o apoptossomo que ativa a caspase 9, que, por sua vez, ativa a caspase 3. Desta forma, o aumento da permeabilidade mitocondrial é um evento determinante deste processo (PITHON-CURI et al., 2003).

A via extrínseca é desencadeada pela ativação dos receptores de superfície como o TNF-R (*Tumor Necrosis Factor Receptors*), o Fas (CD95/Apo1) e o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), os quais transmitem sinais apoptóticos após estímulos de ligantes específicos: ligante Fas (FasL), TNF- α e TRAIL respectivamente (CABRINI et al., 2010). O estímulo destes receptores com seus ligantes levam a formação do chamado complexo DISC (*Death-inducing signaling complex*) que consiste do receptor de morte, uma proteína adaptadora (FADD e TRADD) e uma caspase iniciadora (pró-caspase 8). O recrutamento da pró-caspase 8 ao DISC desencadeia sua ativação e leva a uma série de eventos, incluindo a ativação da caspase 3 e a clivagem de múltiplos substratos levando a morte da célula (KENNEDY; DELEO, 2009).

Na presença de TNF- α o neutrófilo sofre apoptose pela ativação de caspases devido ao aumento da velocidade de *turnover* da proteína antiapoptótica Mcl-1. Com o passar do tempo, a presença de TNF- α diminui a ocorrência de apoptose em comparação aos neutrófilos cultivados na ausência da citocina. Além disso, o TNF- α leva à produção de fatores antiapoptóticos como Bfl-1 pela ativação de NFkB, tal fato é dose-dependente (CROSS; MOOTS; EDWARDS, 2008).

Há diversidade de respostas ocasionadas pela presença de TNF- α devido aos vários tipos de receptores. O TNF- α atua, por exemplo, na regulação da

concentração de ácidos graxos, produção de leptina, diminuindo o número de transportadores de glicose e a atividade do receptor de insulina (HOTAMISLIGIL, 1999).

Os efeitos do TNF- α ocorrem principalmente pelos receptores TNFR1, também denominado de p55, e o TNFR2, denominado p75 na maioria das células e tecidos (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). O receptor TNFR1 é o mais abundante em neutrófilos e o principal responsável pelas respostas desencadeadas a partir do TNF- α .

A superfamília de receptores de TNF (TNFR), também chamados de receptores de morte, possuem domínio extracelular rico em cisteínas, aminoácido que facilita a fosforilação devido à cadeia lateral que contem o grupo -SH, além de permitir pontes de dissulfeto. O domínio intracelular homólogo é denominado domínio de morte (DD), ausente em TNFR2. Assim, a apoptose por via extrínseca é induzida por estímulos como os ligantes de superfície celular, no caso de TNFR1 o ligante é TNF- α . O complexo de proteína de TNFR1 associado ao domínio de morte (TRADD), uma proteína adaptadora, que na presença de TNF- α pode interagir com o TNFR1 resultando na indução da apoptose (KENNEDY; DELEO, 2009).

Além do complexo TRADD, o receptor associado a fator 2 (TRAF2) associados à CIAP-1 e RIAP-1 (complexo 1) leva ao recrutamento de IKK que ativado fosforila I κ B, esse I κ B fosforilado sofre ubiquitinação e libera o fator de transcrição NF κ B, que transportado ao núcleo, induz a produção de diversas proteínas que podem levar à sobrevivência celular, como FLIP um inibidor de caspase 8, e Bfl-1, que interage com Bid, evitando-o de ficar em um estado truncado que favoreceria à apoptose. Por outro lado, quando TRADD se dissocia de TNFR1, e se liga à FADD e pró-caspase 8, o novo complexo (complexo 2) leva à apoptose. Se o primeiro complexo estiver ativado, um inibidor de caspase 8 é expresso (FLIP), atuando assim no segundo complexo. Esse controle permite que o segundo complexo seja ativo apenas quando o primeiro estiver inativo (SUTHEESOPHON et al., 2005). Portanto, nessa via da sinalização, a apoptose só ocorrerá se a via de sobrevivência estiver inativa.

Em neutrófilos, a sobrevivência ou apoptose pode ser dependente da concentração plasmática de TNF- α presente. Mcl-1 é uma proteína anti-apoptótica com uma meia vida de aproximadamente 3 horas, portanto bastante renovada. TNF-

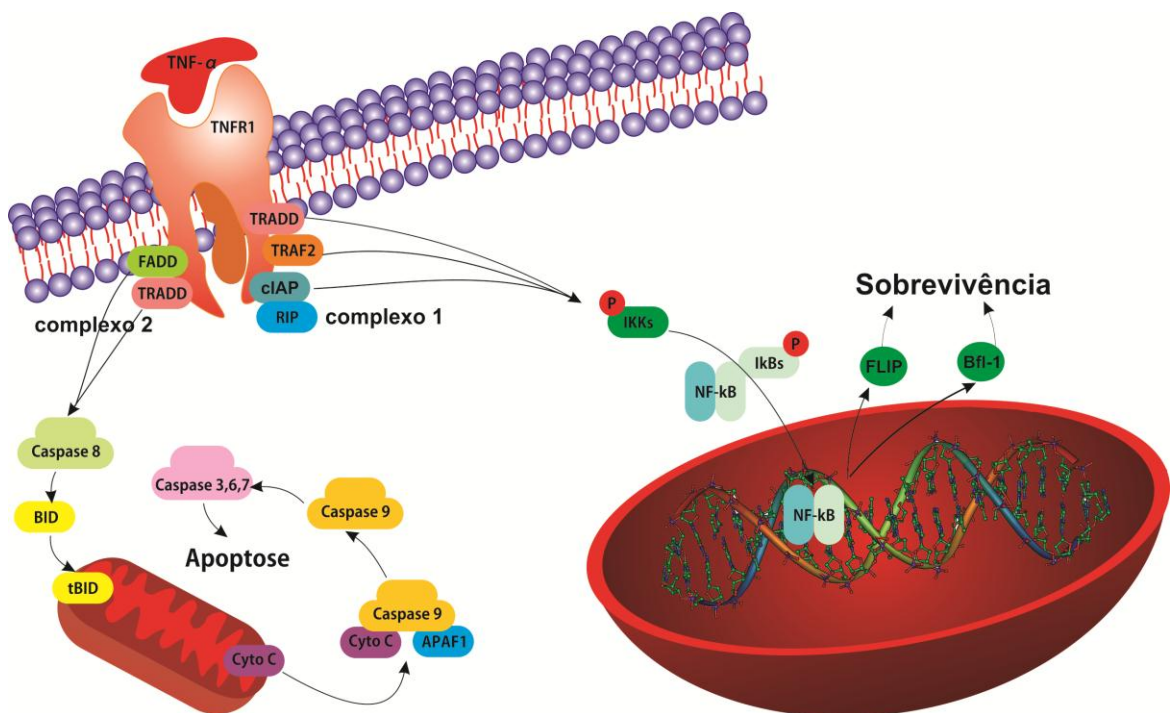
α em concentrações relativamente elevada, estimula a degradação de Mcl-1 levando o neutrófilo a apoptose. Em concentrações menores, TNF- α aumenta a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-1, aumentando a sobrevivência (CROSS; MOOTS; EDWARDS, 2008).

Dentre os mecanismos de apoptose nos linfócitos, é sabido que concentrações elevadas de TNF- α estão associadas ao início da cascata de sinalização para a morte celular assim como a estimulação para expressão de CD95 na superfície de membrana (OWEN-SCHAUB et al., 1992).

Em determinadas circunstâncias, os estímulos pró-apoptóticos podem ser induzidos pelo TNF- α . A presença de ambos receptores TNFR1 e TNFR2 é necessária para a ativação da via pró-apoptótica completa, enquanto apenas a ausência do TNFR1, mas não do TNFR2 inibe completamente a apoptose induzida por TNF- α .

Para facilitar o entendimento das vias bioquímicas da apoptose que envolve o receptor de morte TNFR1, foi adicionado um mapa conceitual ao fim do manuscrito (Anexo A) e uma figura simplificada demonstrada a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Vias bioquímicas da apoptose.



1.3.2 Alterações morfológicas das células em apoptose

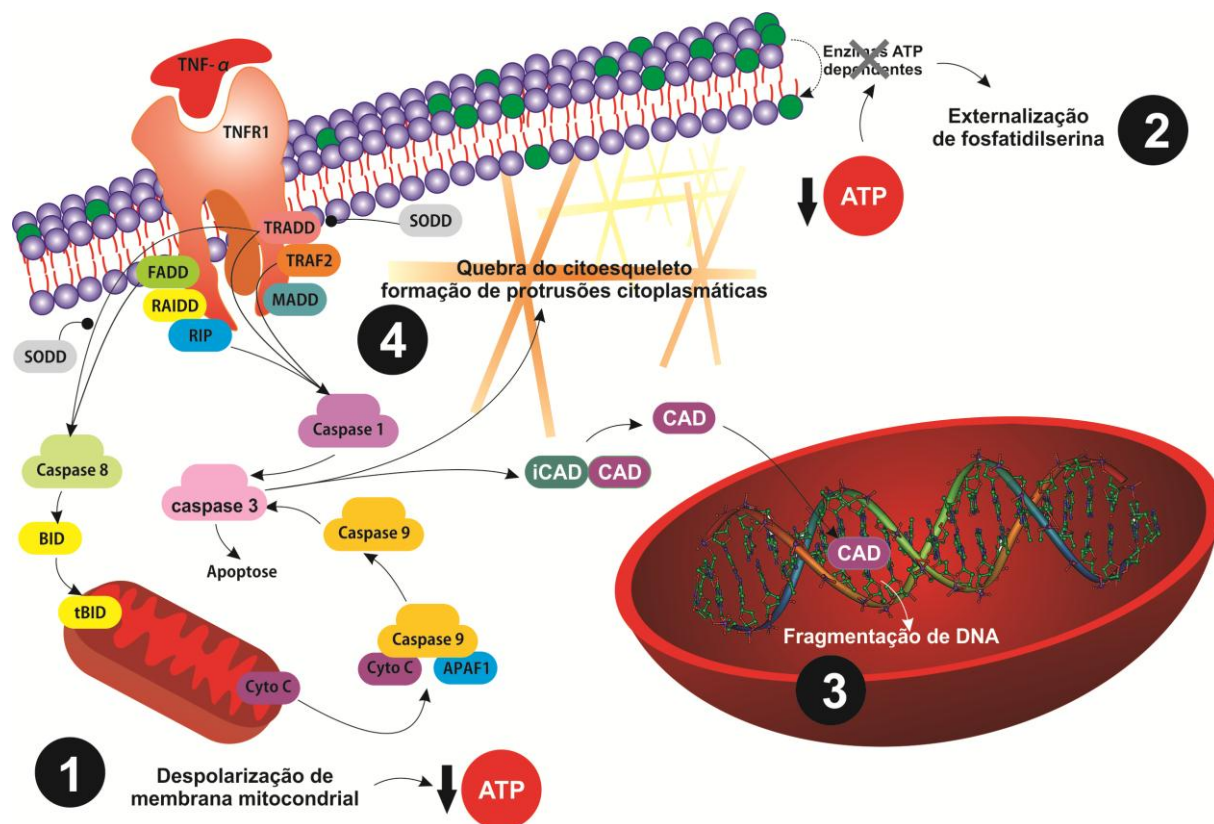
Existem duas vias conhecidas de morte por apoptose, a via intrínseca e a via extrínseca. Por via intrínseca, uma proteína como o Bim, é ativada na célula e causa uma liberação de citocromo c da mitocôndria que ativa a cascata de caspase apoptótica. Caspases é uma família de proteínas cisteína proteases e geralmente são os principais responsáveis pela execução da apoptose (NDOZANGUE-TOURIGUINE; HAMELIN; BREARD, 2008). Drogas anti-cancerígenas, radiação gama podem ativar essa via. Por outro lado, a via extrínseca pode ter a participação linfócitos T citotóxicos e de células NK que usam frequentemente a via extrínseca em seus alvos que são ativados por fatores de morte (Fas ligante, TNF, TRAIL). Nessas duas vias, há a participação e ativação de caspases que clivam mais de 400 substratos específicos (NDOZANGUE-TOURIGUINE; HAMELIN; BREARD, 2008), levando às mudanças morfológicas e bioquímicas característicos de células em apoptose (NAGATA, 2010):

- 1) Despolarização de membrana mitocondrial. A despolarização de membrana mitocondrial é um dos primeiros sinais da apoptose;
- 2) exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática. Enzimas ATP dependentes, flipase e translocase, mantêm a assimetria entre os fosfolipídios na bicamada lipídica da membrana plasmática, com mais fosfolipídios na camada interna e menos na camada externa. Na apoptose, a concentração de ATP é mantida, entretanto, quanto mais se demora para a fagocitose da célula em apoptose ser fagocitada, maior é a redução de ATP devido a disfunção da membrana mitocondrial. Tal fato diminui a assimetria dos fosfolipídios de membrana e conseqüentemente mais fosfatidilserina serão externalizados;
- 3) fragmentação do cromossomo pela ativação de CAD, uma DNAase ativada por caspase. Quando as células em apoptose apresentam DNA fragmentado, a apoptose é praticamente irreversível (EASTMAN, 1995), com algumas exceções. Esse processo ocorre devido à ativação de caspase 3 que dissocia o iCAD (inibidor de CAD) do CAD. O CAD sem a presença da chaperona iCAD, quebra o DNA cromossômico (NAGATA, 2000) em tamanho cerca de 180 kb;

- 4) formação de corpos apoptóticos pelo desarranjo do citoesqueleto e consequente perda da morfologia da célula. Uma das causas da protrusão do citoplasma ocorre devida a uma mudança no gradiente de pressão entre o interior e o exterior da célula principalmente em regiões onde a interação entre a actina do citoesqueleto e a membrana plasmática enfraquece como ocorre pela quebra de fodrina, uma proteína do citoesqueleto, pela caspase (MARTIN et al., 1995; NDOZANGUE-TOURIGUINE; HAMELIN; BREARD, 2008). Outra causa é o aumento da contratilidade do sistema actino-miosina, constituintes do citoesqueleto, originado pelo aumento da fosforilação da miosina de cadeia leve. A caspase 3, cliva o efector Rho GTPase e em consequência há a fosforilação da miosina de cadeia leve, esse último evento leva à contração do anel de actina cortical e a protrusão dinâmica da membrana (NDOZANGUE-TOURIGUINE; HAMELIN; BREARD, 2008). Ao final da formação de protrusões, caso a célula não seja fagocitada, há a condensação da cromatina, fragmentação nuclear (CROFT et al., 2005) e por fim a formação de corpos apoptóticos pela despolimerização de actina;
- 5) se a fagocitose demorar a ocorrer, pode ocorrer o extravasamento da membrana plasmática, ocorrendo uma necrose celular secundária a uma apoptose.

Na figura 3 estão representadas as quatro características da apoptose descritas anteriormente. A quinta característica, por depender de outros fatores, está representada na figura 4.

Figura 3 – Mudanças morfológicas e bioquímicas de uma célula em apoptose.



A figura ilustra simplificada as mudanças bioquímicas e morfológicas que ocorrem em uma célula em apoptose. Os números 1 a 4 descrevem as mudanças morfológicas descritas na seção 1.3.2. Observe que a caspase 3 tem uma função fundamental na mudança morfológica da célula., 1) despolarização de membrana mitocondrial, 2) externalização de fosfatidilserina, 3) fragmentação de DNA e 4) clivagem de proteínas do citoesqueleto e formação de protrusões celulares. Os eventos bioquímicos estão mais detalhados no ANEXO

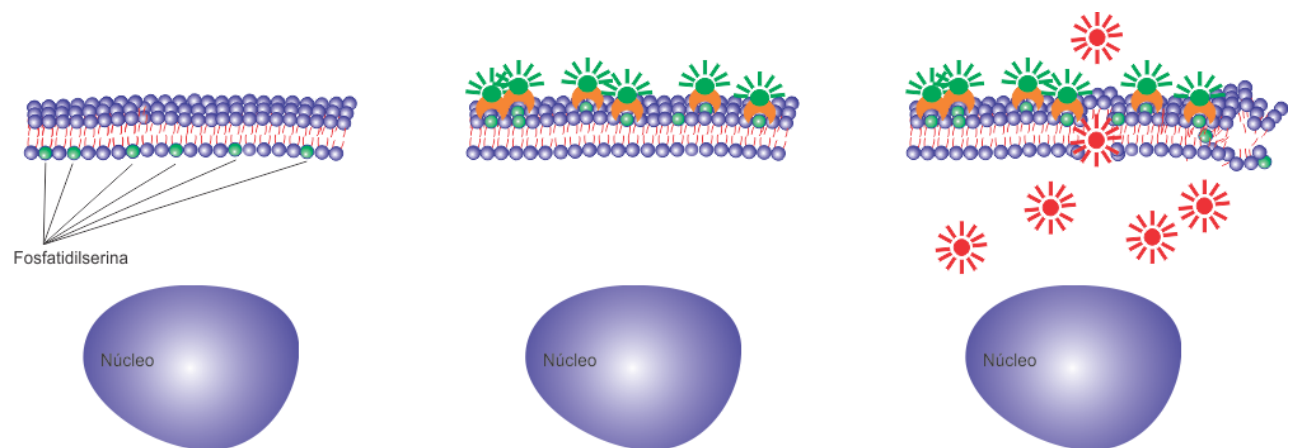
1.3.3 Células viáveis, em apoptose e em necrose

Muitas dessas mudanças morfológicas e bioquímicas são observáveis em análise de citômetro de fluxo e estão mais bem descritas em materiais e métodos. Além disso, pode-se observar diferenças com a necrose, outro mecanismo de morte celular com a observação dos resultados de integridade de membrana e externalização de fosfatidilserina.

Na célula viável, a membrana plasmática apresenta-se íntegra e não há externalização de fosfatidilserina consideráveis (APPELT et al., 2005). Em células apoptóticas, a membrana plasmática apresenta-se íntegra, mas há externalização de

fosfatidilserina e nas células em necrose e na necrose secundária à apoptose, a membrana plasmática não se apresenta íntegra e há externalização de fosfatidilserina (Figura 4).

Figura 4 – Externalização de fosfatidilserina na célula viável, em apoptose e em necrose ou necrose secundária à apoptose



Na célula viável, quase não há externalização de fosfatidilserina e a membrana plasmática se apresenta íntegra (figura à esquerda). Em uma célula em apoptose, há a externalização de fosfatidilserina, que pode ser reconhecida por Anexina V, e emitir fluorescência (figura ao centro). Células em necrose ou em necrose secundária a apoptose além da externalização da fosfatidilserina há também a disruptura da membrana plasmática permitindo a entrada, por exemplo, de iodeto de propídeo que emite fluorescência (figura à direita). A um ensaio que utiliza a anexina V e o iodeto de propídeo permite identificar o estatus da célula, se ela está viável, em apoptose ou em necrose.

Vale mencionar que células em apoptose e em necrose são caracterizadas por fragmentação de DNA. Entretanto a fragmentação ocorre por padrões diferentes. Na apoptose a clivagem de DNA ocorre por endonucleases específicas como o CAD, por isso a fita de DNA apresenta-se com quebras em múltiplos de 180-200 kb. Na necrose, as endonucleases são variadas e por isso, o DNA se cliva em diferente gradiente de tamanhos.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o exercício físico agudo e crônico não induziu apoptose em neutrófilos da medula óssea de camundongos. Houve aumento da apoptose e diminuição de proliferação de linfócitos em camundongos exercitados cronicamente. A via do TNFR1 está envolvida neste processo.

REFERÊNCIAS¹

ADES, P. A.; SAVAGE, P. D.; CRESS, M. E.; BROCHU, M.; LEE, N. M.; POEHLMAN, E. T. Resistance training on physical performance in disabled older female cardiac patients. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 35, p. 1265–1270, 2003.

ARDAWI M. S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.**, v. 208, n. 3, p. 743-748, 1982.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745–56, 2003.

AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS letters**, v. 487, n. 3, p. 318–322, 2001.

AKGUL, C.; EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 2402-2408, 2003.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. Cap. 7. p. 139-147.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **Physical activity and public health: update recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association**. California, 2007.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position stand: progression models in resistance training for healthy adults. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 41, n. 3, p. 687-708, 2009.

APPELT, U. et al. Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for PS-dependent clearance. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 2, p. 194–196, 2005.

BERRYMAN, J. W.; PARK, R. J. **Sport and exercise science: essays in the history of sports medicine**. Estados Unidos: University of Illinois Press, 1992.

BOISE, L. H. ; GONZALEZ-GARCIA, M. ; POSTEMA, C. E. ; DING, L. ; LINDSTEN, T. ; TURKA, L. A. ; MAO, X. ; NUNEZ, G. ; THOMPSON, C. B. Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominated regulator of apoptotic cell death. **Cell**, v. 74, p. 597-608, 1993.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CABRINI, M.; NAHMOD, K.; GEFNER, J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 17, p. 31-35, 2010.

COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. **Journal of Immunological Methods**. v. 232, n. 1-2, p. 191-200, 1999.

CROFT, D. R.; COLEMAN, M. L.; LI, S.; ROBERTSON, D.; SULLIVAN, T.; STEWART, C. L. Actin–myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. **J. Cell. Biol.**, v. 168, n. 2, p. 245–255, 2005.

CROSS, A.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The dual effects of TNF α on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. **Blood**, v. 111, n. 2. p. 878-884, 2008.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJÃO, R.; DE LIMA, T. M.; PIVA, T. M.; PERES, C. M.; SORIANO, F. G.; CURI, R. Toxicity of a soybean oil emulsion on human lymphocytes and neutrophils. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 30, n. 2, p. 115-123, 2006.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJÃO, R.; DE LIMA, T. M.; FIAMONCINI, J.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J.; SORIANO, F. G.; CURI, R. Effect of olive oil-based emulsion on human lymphocyte and neutrophil death. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 32, n. 1, p. 81-87, 2008.

DARZYNKIEWICZ, Z.; STAIANO-COICO, L.; MELAMED, M. R. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, n. 4, p. 2383-2387, 1981.

DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Cell suicide in health and disease. **Scientific American**, v. 275, p. 280–287, 1996.

EASTMAN, A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH, and Ca²⁺ associated with apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 41-55, 1995.

FLECK, S. L.; DEAN, L. S. Resistance-training experience and the pressor response during resistance exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 1, p. 116–120, 1987.

FLECK, J. S.; KRAEMER, W. J. **Strength training for young athletes**. 3rd ed. Stanford, CA: Human Kinetics, 2004. 377 p.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v. 125, n. 3, p. 281–288, 2008.

GENNARI, A.; VIVIANI, B.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M.; PIETERS, R.; CORSINI, E. Organotins induce apoptosis by disturbance of [Ca²⁺]_i and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes". **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 169, n. 2, p. 185-190, 2000.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 1974–1984, 2005.

GREEVENBROEK, M. M. J. et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor- α (TNF-R p55 and TNF-R p75) in familial combined hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v. 153, n. 1, p. 1-8, 2000.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, J. A. L. Exercise and bone mass in adults. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 39, n. 6, p. 439-468, 2009.

HANSON, P. M.; HUME, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **Trends Immunol.**, v. 27, p. 244–250, 2006

HARDIN, B. J. et al. TNF- α acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 694–699, 2008.

HASKELL, W. L.; LEE, I. M.; PATE, R. R.; POWELL, K. E.; BLAIR, S. N.; FRANKLIN, B. A.; MACERA, C. A.; HEATH, G. W.; THOMPSON, P. D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, v. 116, n. 9, p. 1081-1093, 2007.

HEALY, D. A.; WATSON, R. W. G.; NEWSHOLME, P. Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line. **Clinical Science**, v. 104, n. 2, p. 171-179, 2003.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 1-20, 2005.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos de hematologia**. 4. ed. Moss: Artmed, 2004.

HOFFMAN-GOETZ, L.; QUADRILATERO, J. Treadmill exercise in mice increases intestinal lymphocyte loss via apoptosis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 179, n. 3, p. 289–297, 2003.

HORNBERGER JR, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 29, n. 116-31, 2004.

HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. **Exp. Clin. Endocrinol Diabetes**, v. 107, n. 2, p. 119-125, 1999.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol. Res.**, v. 43, p. 25-61, 2009.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KLUCK, R. M.; MARTIN, S. J.; HOFFMAN, B. M.; ZHOU, J. S.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. **EMBO J.**, v. 16, p. 4639-4649, 1997.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a system biology-level approach. **Wiley Interdisco. Rev Syst. Biol. Med.**, v. 1, n. 3, p. 309–333, 2009.

KORKIA, P. K.; TUNSTALL-PEDOE, D. S.; MAFFULLI, N. An epidemiological investigation of training and injury patterns in British triathletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 28, n. 3, p. 191-196, 1994.

KROEMER, G.; DELLAPORTA, R.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 619-642, 1998.

KRÜGER, K. et al. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 110, n. 5, p. 1226-1232, 2011.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 197, n. 1-2, p. 139-150, 1996.

LAGRANHA, C. J.; SENNA, S. M.; DE LIMA, T. M.; SILVA, E. P.; DOI, S. Q.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 2, p. 210-217, 2004.

LAMKANFI, M.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; BERGHE, T. VANDEN; VANDENABEELE, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 1, p. 44–55, 2007.

LARRABEE, R. C. Leucocytosis after violent exercise. **J. Med. Res.**, v. 7, n. 1, p. 76–82, 1902.

LEVADA-PIRES, A. C.; CURY-BOAVENTURA, M. F., GORJÃO, R., HIRABARA, S. M.; PUGGINA, E. F.; PERES, C. M.; LAMBERTUCCI, R. H.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 40, n. 8, p. 1447-1454, 2008.

LEVADA-PIRES, A. C.; FONSECA, C. E.; HATANAKA, E.; ALBA-LOUREIRO, T.; D'ANGELO, A.; VELHOTE, F. B.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. The effect of an

adventure race on lymphocyte and neutrophil death. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 109, n. 3, p. 447-53, 2010.

LEVADA-PIRES, A. C.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; GORJÃO, R.; HIRABARA, S. M.; PUGGINA, E. F.; PELLEGRINOTTI, I. L.,; DOMINGUES FILHO, L. A.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Induction of Lymphocyte Death by Short- and Long-Duration Triathlon Competitions. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 10, p.1896-1901, 2009.

JANEWAY, C. A. Jr.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Imunologia: O sistema immune na saúde e na doença*, 5ª edição, artmed editora, Porto Alegre, 2002.

MACLENNAN, I. S. The use of sodium lamps to brightly illuminate mouse houses during their dark phases. **Laboratory Animals**, p. 384-392, 2004.

MAIANSKI, N. A; MAIANSKI, A N.; KUIJPERS, T. W.; ROOS, D. Apoptosis of neutrophils. **Acta haematologica**, v. 111, n. 1-2, p. 56–66, 2004.

MARTIN, S. J.; et al. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 12, p. 6425–6428, 1995.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 181–90, 2003.

MIGNOTTE, B.; VAYDDIERE, J. L. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 1, p. 1-15, 1998.

MUNTEANU, L. S.; DINU, A. Fractionation of granulocytes from whole human blood by centrifugation. Practical hints. **Romanian J. Biophys.**, v. 14, p. 53-58, 2004.

NAGASHIMA, K.; et al. Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4266–4273, 2006.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp. Cell. Res.**, v. 256, n. 1, p. 12-18, 2000.

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 619-630, 2010.

NAGATA, S. Apoptosis and autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1209, p. 10-16, 2010.

NDOZANGUE-TOURIGUINE, O.; HAMELIN, J.; BRÉARD, J. Cytoskeleton and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 11–8, 2008.

NETTO, F. A. C. S.; FERRAZ, E. M. Apoptose, neutrófilos e o cirurgião. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 28, n. 1, p. 56-61, 2000.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C.

A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

NIEMAN, D. C. et al. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, v. 30, p.316-328, 1990

NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. **Nutrition and exercise immunology**. Florida: CRC, 2000. 190 p.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. I. Bcl-a heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, p. 609-619, 1993.

OWEN-SCHAUB, L. B.; YONEHARA, S.; CRUMP, W. L.; ELIZABETH, A. G. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. **Cellular Immunology**, v.140, n. 1, p. 197-205, 1992.

PHANEUF, S.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 3, p. 393-396, 2001.

PILLAY, J. et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 625–627, 2010.

PITHON-CURI, T. C.; SCHUMAKER, I. R.; FREITAS, J. J.; LAGRANHA, C.; NEWSHOLME, P.; PALANCH, A. C.; DOI, S. Q.; CURI, R. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **Am. J. Physiol-Cell Physiol.**, v. 284, n. 6, p. 1355-1361, 2003.

POLLOCK, M. L.; FRANKLIN, B. A.; BALADY, G. J.; CHAITMAN, B. L.; FLEG, L.; FLETCHER, B.; LIMACHER, M.; PIÑA, I. L.; STEIN, R. A.; WILLIAMS, M.; BAZZARRE, T. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease. **Circulation**, v. 101, p. 828-833, 2000.

PONTE, E.; RIZZO, J.; CRUZ, Á. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. **J. Bras. Pneumol.**, v. 33, n. 3, p. 335–342, 2007.

PUTCHA, G. V.; JOHNSON JR, E. M. Men are but worms: neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates. **Cell Death Different.**, v. 11, n. 1, p. 38-48, 2004.

QUADRILATERO, J.; HOFFMAN-GOETZ, L. N-acetyl-l-cysteine protects intestinal lymphocytes from apoptotic death after acute exercise in adrenalectomized mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, n. 6, p. 1664-1672, 2005.

RANGAMANI, P.; SIROVICH, L. Survival and apoptotic pathways initiated by $\text{tnf-}\alpha$: modeling and predictions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1216–1229, 2007.

REED, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature**, v. 387, p. 773-776, 1997.

RUDIN, C. M.; THOMPSON, C. B. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 267–281, 1997.

RYAN, A. S.; PRATLEY, R. E.; ELAHI, D.; GOLDBERG, A. P. Resistive training increases fat-free mass and maintains RMR despite weight loss in postmenopausal women. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, p. 818-823, 1995.

SANTOS, V. H. A.; NASCIMENTO, W. F.; LIBERALI, R. O treinamento de resistência muscular localizada como intervenção no emagrecimento. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 2, n. 7, p. 34–43, 2008.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 534, p. 1-11, 2006.

SCHALLER, J.; GERBER, S.; KAMPFER, U.; LEJON, S.; TRACHSEL, C. **Human blood proteins: structure and function**. New York: Wiley, 2008.

SHARMA, V.; TEWARI, R.; HOSSAIN, U.; JOSEPH, C.; SEN, E. Ebselen sensitizes glioblastoma cells to Tumor Necrosis Factor (TNF α)-induced apoptosis through two distinct pathways involving NF- κ B downregulation and Fas-mediated formation of death inducing signaling complex. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 2204-2212, 2008.

SHEPARD, R. J. **Alterações fisiológicas através dos anos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1994.

SHEPARD, R. J.; BALADY, G. J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, v. 99, p. 963–972, 1999.

SIEMSEN, D. W.; SCHEPETKIN, I. A.; KIRPOTINA, L.N.; LEI, B.; QUINN, M. T. Neutrophil isolation from nonhuman species. **Methods. Mol. Biol.**; v. 412, p. 21-34, 2007.

SPRAGHE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 539-552, 2009.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; BONE, R. C. Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. S10, p. S447-463, 1993.

SUTHEESOPHON, K.; NISHIMURA, N.; KOBAYASHI, Y.; FURUKAWA, Y.; KAWANO, M.; ITOH, K.; KANO, Y.; ISHII, H.; FURUKAWA, Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). **J. Cell. Physiol.**, v. 203, n. 2, p. 387-397, 2005.

TANG, C.; XUE, H. L.; BAI, C. L.; FU, R. Regulation of adhesion molecules expression in TNF-alpha-stimulated brain microvascular endothelial cells by tanshinone IIA: involvement of NF-kappaB and ROS generation. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 3, p. 376-380, 2010.

THE JACKSON LABORATORY. **Hematological survey of 11 inbred strains of mice**. MPD: Jaxpheno4. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. Disponível em: <<http://phenome.jax.org>>. Acesso em: 10 Dec 2012.

THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2002. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/>. Acesso em: 18 Nov 2012.

THOMPSON, P. D. Exercise prescription and proscription for patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 112, n. 15, p. 2354–2363, 2005.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". **J. Immunol. Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T. I.; JONES, D. P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondrial blocked. **Science**, v. 275, p. 1129-1132, 1997.

WALSH, N. P. et al. Position statement Part one: Immune function and exercise. **Immune Function and Exercise**, v. 17, p. 6–63, 2011.