

Adriana Cristina Levada Pires

Papel dos ácidos graxos na função e morte de neutrófilos de humanos: Utilização do exercício intenso como modelo

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Fisiologia).

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Tania Cristina Pithon -Curi

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Curi

São Paulo

2008

Resumo

Levada-Pires, AC. Papel dos ácidos graxos na função e morte de neutrófilos humanos: Utilização do exercício intenso como modelo [Tese Doutorado em Fisiologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da competição de *triathlon* na função e morte de neutrófilos de atletas de elite e investigar o possível envolvimento dos ácidos graxos neste processo. Os neutrófilos foram obtidos do sangue coletado de onze voluntários sedentários e de doze triatletas em repouso e após realização de uma competição de *triathlon* de longa duração (*Half Ironman*, 2 Km de natação, 80 Km de ciclismo e 20 Km de corrida). A competição de *triathlon* aumentou a capacidade dos neutrófilos em realizar quimiotaxia e de produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), no entanto reduziu a capacidade fagocitária destas células. Além disso, elevou a fragmentação de DNA e a externalização de fosfatidilserina em neutrófilos quando comparado aos resultados obtidos em repouso e de indivíduos sedentários. A despolarização de membrana mitocondrial foi maior nos neutrófilos de triatletas em repouso e após a competição quando comparado aos indivíduos sedentários. Os neutrófilos dos atletas avaliados após a competição apresentaram diminuição do conteúdo de lipídios neutros e da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL e aumento da expressão da pró-apoptótica Bax. A competição de *triathlon* aumentou a concentração de ácidos graxos livres no plasma dos triatletas (3,7 vezes) e esta foi correlacionada positivamente com a proporção de neutrófilos com DNA fragmentado e fosfatidilserina externalizada. Os AGs que proporcionalmente mais aumentaram no plasma dos triatletas após a competição quando comparado com indivíduos sedentários foram esteárico, oléico e linoléico. Para analisar a toxicidade destes AGs, neutrófilos de indivíduos sedentários foram cultivados por 3 h com concentrações crescentes desses AGs. A concentração máxima tolerada (não tóxica) pelos neutrófilos durante 3 h de incubação foi de 100 μM para o ácido esteárico, de 200 μM para o ácido oléico e de 250 μM para o ácido linoléico. Neutrófilos humanos cultivados na presença de concentrações tóxicas dos ácidos oléico e linoléico apresentaram aumento da fragmentação de DNA, externalização de fosfatidilserina e condensação de cromatina. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos neste processo estão o aumento na produção de EROS, despolarização da membrana mitocondrial e ativação da caspase 3. O ácido esteárico, em concentração tóxica, induziu aumento da fragmentação de DNA e

condensação de cromatina e diminuição da integridade de membrana celular sem alterar os demais parâmetros analisados, indicando que os mecanismos envolvidos na indução de morte por este ácido são diferentes. Concluímos que a competição de *triathlon* aumentou a capacidade dos neutrófilos de migrar e de realizar *burst* oxidativo, porém inibiu a capacidade fagocitária dessas células. Além disso, induziu aumento da fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina, sugerindo que este tipo de competição leva a apoptose dos neutrófilos. A elevação da concentração plasmática dos AGs (oleico, linoleico e esteárico) parece estar envolvida nas alterações funcionais e na apoptose verificada após a competição de *triathlon*. Dentre os mecanismos envolvidos no processo de apoptose estão o aumento da produção de EROS, despolarização da membrana mitocondrial, da expressão da proteína pró-apoptótica (Bax) e ativação de caspase 3, e redução na expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-xL) e conteúdo de lipídios neutros.

Palavras Chaves: Apoptose. Neutrófilos. Ácidos graxos. Toxicidade. *Triathlon*.

Abstract

Levada-Pires, AC. Role of fatty acids in human neutrophil function and death: Intense exercise as a model. [PhD thesis Physiology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The objective of this study was to evaluate the effect of triathlon competition on function and death of neutrophils from elite athletes and to investigate the involvement of fatty acids in this process. Neutrophils were obtained from blood collected from eleven sedentary volunteers and twelve triathletes under rest and after a Half Ironman triathlon competition (2 Km swimming, 80 Km cycling and 20 Km running). The triathlon competition increased the migration and reactive oxygen species production in neutrophils, however it reduced the phagocytosis activity. Moreover, it raised DNA fragmentation and phosphatidylserine serine externalization when compared with the results in rest and from sedentary volunteers. The proportion of neutrophils with mitochondrial transmembrane depolarization was increased in the triathletes at rest and after the competition as compared with sedentary volunteers. Plasma levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were increased in triathletes after the competition. Expression of Bcl-xL (anti apoptotic) was decreased and of Bax (pro apoptotic) was increased, whereas intracellular neutral lipid content was lowered in neutrophils after the *triathlon*. A positive correlation was found between the proportion of neutrophils with DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization and the plasma free fatty acid levels, which was elevated by 3.7-fold after competition. Plasma levels of oleic, linoleic and stearic acids were increased in triathletes after the competition when compared with sedentary volunteers. To analyze the toxicity of stearic, oleic and linoleic acids neutrophils from sedentary volunteers were cultivated by 3 hours with increasing concentrations of these fatty acids. The maximal tolerable (non-toxic) concentration of the fatty acids by 3-hour cultured neutrophils was 200 μ M for oleic, 250 μ M for linoleic acids and 100 μ M for stearic acid. Oleic and linoleic acids promoted increased DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization and cromatine condensation at toxic concentration. The possible mechanisms involved are increased ROS production, mitochondrial membrane despolarization and caspase 3 activation. Stearic acid, in toxic concentration, induced an increase in DNA fragmentation and cromatine condensation and decrease membrane integrity, suggesting that stearic acid induces secondary necrosis. In summary, *triathlon* competition increased neutrophil migration capacity and reactive oxygen species production, however it decreased phagocytosis capacity. Moreover, it induced

neutrophils death possibly by apoptosis as indicated by DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization. The increase in plasma levels of oleic, linoleic and stearic acids induced by the competition may be involved in neutrophil death observed possibly by increasing ROS production, membrane mitochondrial depolarization, altering anti (Bcl-xL) and pro apoptotic (Bax) protein expression, caspase 3 activation and decrease intracellular neutral lipid content.

Key Words: Apoptosis. Neutrophils. Fatty acids. Toxicity. *Triathlon*.

1.1 Introdução

1.1 Origem e características dos neutrófilos

A maioria dos leucócitos humanos são granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), sendo que os neutrófilos constituem aproximadamente 60 a 70 % do total dos leucócitos circulantes. Cerca de 100 bilhões de neutrófilos circulam em um indivíduo de 70 kg diariamente sob condições fisiológicas, número que pode aumentar 10 vezes durante uma infecção aguda (Lee et al., 1993).

Os neutrófilos originam-se de células primordiais pluripotenciais da medula óssea, as quais também são precursoras de outros leucócitos, eritrócitos e plaquetas. O processo de desenvolvimento do neutrófilos é controlado pelo microambiente no qual a hematopoiese ocorre e por fatores de crescimento hematopoiéticos, e envolve processos de diferenciação, amplificação do número de células e maturação celular. Na seqüência de maturação celular para formação dos neutrófilos, os mieloblastos são as células mais imaturas e ao apresentarem granulações citoplasmáticas específicas são denominadas promielócitos neutrofilicos (Bainton et al., 1971; Junqueira e Carneiro, 1995). Os estágios seguintes da maturação compreendem os mielócitos neutrófilos, metamielócitos neutrófilos, neutrófilos com núcleos em bastão e neutrófilos maduros, os quais se diferem em compartimentos anatômicos e funcionais (Bainton et al., 1971; Cronkite, 1979). Após sua formação cerca de 90% da população de neutrófilos mantém-se na medula óssea, onde podem ser encontrados em vários estágios de maturação. O restante encontra-se distribuído na circulação e endotélio vascular, este compartimento compreende células retidas pela rede capilar excluídas temporariamente da circulação por vasoconstrição ou, especialmente nos pulmões onde permanecem como população marginal.

Este tipo de leucócito tem núcleo formado por dois a cinco lóbulos (multilobulado), ligados entre si por finas pontes de cromatina. A célula muito jovem tem núcleo não segmentado em lóbulos, sendo chamada de neutrófilo com núcleo em bastonete (Junqueira e Carneiro, 1995).

Os neutrófilos medem de 9 a 14 μm de diâmetro, não apresentam nucléolo, apresentam raros ribossomas e o aparelho de Golgi é pequeno. O retículo endoplasmático rugoso e as mitocôndrias não são abundantes quando estas células estão em fase final de diferenciação. O citoplasma destas células contém grânulos primários ou azurófilos, secundário ou específicos

e terciários. A distinção entre estes é realizada de acordo com a cronologia do aparecimento durante a maturação dos neutrófilos na medula óssea e com a composição química de cada tipo, o que determina as diferenças em suas funções.

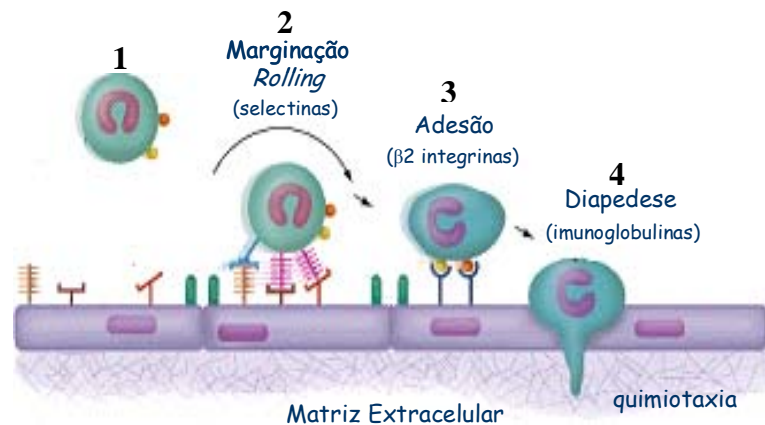
Os grânulos primários são produzidos primeiro e em seu interior encontram-se enzimas lisossomais, tais como; mieloperoxidase, elastase, e proteinase 3 alfa-1 antitripsina (Damiano et al., 1988; Csernok et al., 1990; Mason et al., 1991). Estes grânulos também contêm fatores bactericidas, como as defensinas, e proteínas que facilitam a permeabilidade bactericida (Weiss e Olsson, 1987). A síntese dos grânulos primários pára quando se inicia a síntese dos grânulos secundários, portanto, o número desses grânulos por célula decresce durante as divisões mitóticas, pois se repartem entre as células filhas. Enquanto isso, a síntese de grânulos secundários continua e seu número aumenta, sendo o tipo predominante no neutrófilo maduro (Borregaard et al., 1993; Junqueira e Carneiro, 1995; Roos et al., 2003). Os grânulos secundários apresentam lactoferrina, lisozima, gelatinase, fosfatase alcalina e proteínas ligantes a B12, e não contêm peroxidase (Borregaard et al., 1993; Borregaard e Cowland, 1997). Os grânulos terciários contêm gelatinase, uma enzima com grande similaridade a colagenase neutrofilica e a heparanase (Mollinedo et al., 1997). Estes grânulos estão localizados no citocromo b e, como os grânulos secundários, constituem um importante acúmulo intracelular de moléculas de adesão (Sengelov et al., 1993). Os grânulos secretórios ou “fagossomos” não contêm gelatinases e sim proteínas plasmáticas, como albumina, receptor complemento (CR-1), tirosina quinases e fosfolipases (Borregaard et al., 1992; Sengelov et al., 1994; Morgan et al., 1997).

1.2 Funções dos neutrófilos

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo, pois fagocitam agentes invasores e os matam auxiliando no combate a infecção. Além disso, possuem função importante no início e sustentação do processo inflamatório. Estas células sintetizam proteínas que participam de suas próprias funções efectoras e polipeptídeos anti- e pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e interferons.

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

Nos mamíferos, os leucócitos presentes nos vasos sanguíneos ocupam uma coluna central envolta por uma zona periférica de plasma e eritrócitos (Fahraeus, 1929). Durante o desenvolvimento do processo inflamatório, os vasos dilatam-se e o fluxo sanguíneo torna-se mais lento, possibilitando a formação de aglomerados de eritrócitos, cuja massa excede a dos leucócitos que são, então, deslocados para a periferia da coluna (Wilhelm, 1977). Os neutrófilos presentes na circulação são atraídos quimiotaxicamente para o local da inflamação por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e outros corpos estranhos. A marginação é iniciada devido à diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e aumento da força de adesão provocada por interações leucócito-endotélio. As moléculas de adesão envolvidas nesta interação pertencem às famílias das selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas. O *rolling* é decorrente de substâncias quimioatraentes, assim como citocinas e ocorre devido à interação da L-selectina presente na membrana de neutrófilos com moléculas presentes nas células endoteliais. Desta forma os neutrófilos aderem reversivelmente à parede dos vasos e passam a rolar sobre o endotélio. A aderência dos neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares ocorre devido à interação das integrinas presentes na membrana dos neutrófilos com as moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas presentes na membrana do endotélio (Granger e Kubes, 1994; Celi et al., 1997). Após a adesão ocorre a diapedese dos neutrófilos que nada mais é do que a migração das células aderentes para o exterior do vaso, através de junções interendoteliais. A seguir, há o deslocamento do sítio extravascular e acúmulo de neutrófilos no local da lesão, chamado de quimiotaxia (**Esquema 1**).



Esquema 1. Seqüência esquemática da migração de neutrófilos.

Os neutrófilos presentes na circulação (1) iniciam a marginação devido à diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e aumento da força de adesão devido interações leucócito endotélio. O *rolling* é decorrente de substâncias quimioatraentes, como citocinas e ocorre devido à interação de L selectina presente na membrana dos neutrófilos com moléculas presentes nas células endoteliais (2). Os neutrófilos aderem-se às células endoteliais através da interação das integrinas presentes na membrana dos neutrófilos com as imunoglobulinas presentes no endotélio (3) e, extravasam para o espaço extravascular através das junções interendoteliais (4) sendo guiados pelo gradiente quimiotáxico até o foco inflamatório.

FONTE: www.rndsystems.com (modificado).

Ao chegar ao local da lesão os neutrófilos entram em contato com a partícula ou microorganismo invasor, que é rodeada por pseudópodos que se fundem em torno dela, formando o fagossomo. No mecanismo de fagocitose a internalização da partícula inicia-se pela interação entre receptores específicos situados na superfície do neutrófilo com ligantes presentes na superfície da partícula. Isso leva a polimerização da actina no sítio de ingestão, e a internalização da partícula por um mecanismo dependente de actina. Assim, a partícula finalmente ocupa um vacúolo (fagossoma) delimitado por uma membrana derivada da superfície celular (Mudd et al., 1934; Junqueira e Carneiro, 1995).

Após a internalização os microrganismos fagocitados, recobertos ou não com complemento ou anticorpo específico, são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por uma combinação de espécies reativas de oxigênio (Babior, 1999). Após este processo os neutrófilos induzem sua própria morte para preservação do tecido ainda intacto.

Nos neutrófilos a fagocitose envolve duas classes de receptores, os receptores Fcy – FcyRIIA (CD32) e FcyRIIIB (CD16), e receptores do complemento CR-1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18 integrina) (Witko-Sarsat et al., 2000). A expressão de CD 11b e CD16 na superfície dos neutrófilos facilitam a fagocitose e conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio (Hasegawa et al., 1997).

O processo de fagocitose dos neutrófilos pode sofrer modulação por citocinas, prostaglandinas, hormônios e metabólitos (Ren e Savill, 1995; Franc et al., 1999). Portanto, situações patológicas e algumas situações de estresse onde a concentração destas substâncias estão alteradas podem induzir aumento da predisposição à infecções.

A ação microbicida desenvolvida pelos neutrófilos depende de seus grânulos, reponsáveis pela liberação de proteínas e enzimas, e também da ativação da oxidase dependente de NADPH, fato que conseqüentemente induz a geração de espécies reativas de oxigênio (Babior, 2004).

Além de sua função no combate aos agentes invasores, os neutrófilos também desempenham função importante na síntese e liberação de citocinas (interleucina-1 e 6, fator de necrose tumoral) que modulam a função dos linfócitos T e B. Dessa forma, pode-se dizer que os neutrófilos apresentam uma função eferente (fagocitose e desgranulação) e outra aferente (liberação de citocinas imunoregulatórias) relacionadas com as respostas inflamatória e imune (Pyne, 1994).

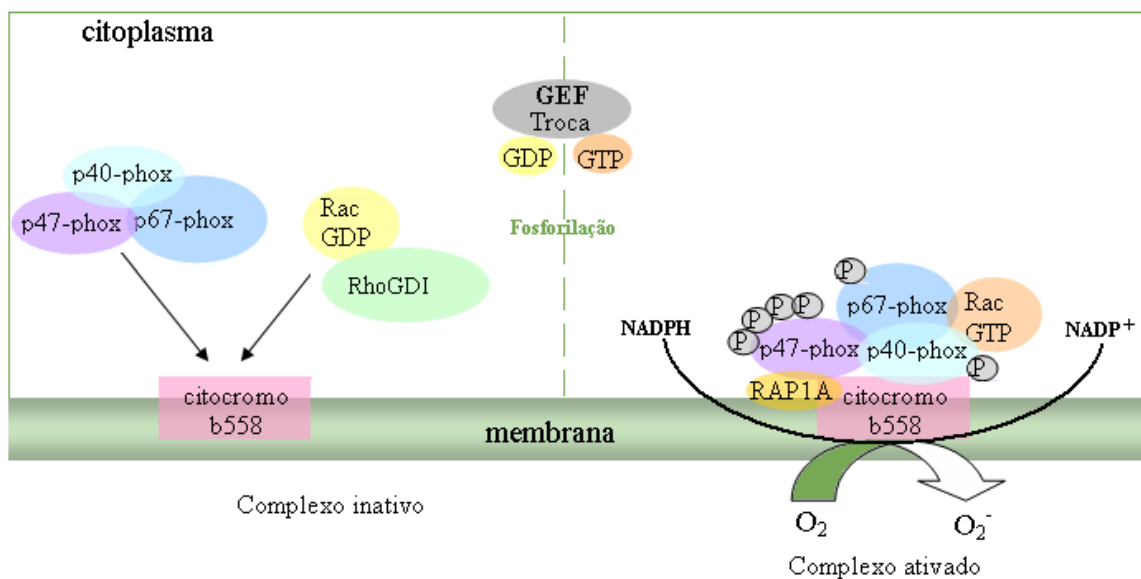
1.2.1 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

As EROS geradas pelos neutrófilos desempenham papel importante como oxidantes microbicidas, bem como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. Durante a fagocitose há aumento no consumo de oxigênio. Uma vez estimulados, a maior parte do oxigênio consumido pelo neutrófilos é convertida em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido pela enzima NADPH-oxidase (Dusi et al., 1995). O passo inicial na produção das espécies reativas de oxigênio é a redução do oxigênio à superóxido, utilizando NADPH como doador de elétrons (Dusi et al., 1995; Babior, 1999; Babior, 2004), sendo este um fator limitante para a atividade desta enzima (Babior, 1999).

A NADPH-oxidase é o sítio mais importante para a produção de EROS em fagócitos. Quando a célula não está ativada, três dos seus componentes estão distribuídos no citossol (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) e outros dois (p22^{phox}, gp91^{phox}) estão localizados em vesículas secretórias da membrana. Existem ainda as proteínas G de baixo peso molecular (Rac 2 e

Rap-1A), que auxiliam na ativação da enzima (Babior, 1999). A Rap-1A está localizada na membrana, enquanto que a Rac 2, funcionando como molécula ativadora na cascata de sinalização encontra-se no citossol na sua forma inativa quando ligada ao GDP (*Guanosine Diphosphate*) e associada ao RhoGDI (*Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor*). A separação dos componentes em compartimentos subcelulares distintos garante que a oxidase esteja inativa quando a célula está em repouso (Welch et al., 2002).

Após estímulo do neutrófilo por fMLP (orto-formimitionil-leucilfenilalanina) ou PMA (éster 13-acetato de forbol 12-miristato), a Rac 2 se liga ao GTP (*Guanosine Triphosphate*), através da P-Rex-1 que atua como GEF (*Guanine-nucleotide Exchanche Factors*) para Rac 2 (Welch et al., 2002), e se desloca para a membrana associando-se as outras proteínas oxidases. A subunidade citossólica da NADPH-oxidase p47^{phox}, é fosforilada pela proteína quinase C (PKC), para então associar-se aos outros componentes (p40^{phox} e p67^{phox}) sendo translocados para a membrana celular, onde associam-se ao complexo flavocitocromo b₅₅₈ (constituído pelos componentes p22^{phox} e gp91^{phox}), unidade catalítica da enzima, formando o complexo funcionalmente ativo (Hwang et al., 2003; Babior, 2004) (**Esquema 2**).

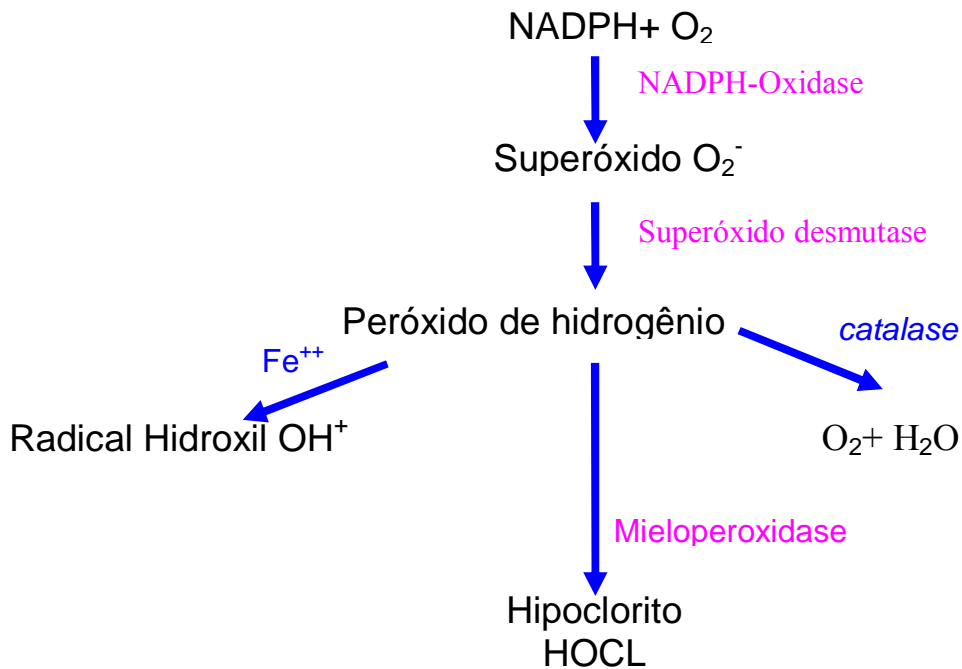


Esquema 2. Ativação da NADPH-oxidase nos leucócitos.

Quando a célula não está ativada os componentes da NADPH-oxidase estão distribuídos entre o citoplasma (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac2) e a membrana (Rap-1A e citocromo b₅₅₈ constituído pelo p22^{phox} e gp91^{phox}). A Rac 2 e Rap 1 A são moléculas nucleotídeo guanina de baixo peso molecular que ligam-se com proteínas que auxiliam em outros processos para a ativação da oxidase. Quando a célula está ativada, a GEF (*Guanine-nucleotide Exchanche Factors*) troca GDP por GTP na Rac 2. Além disso, a p47^{phox} é fosforilada e as subunidades do citossol migram para a membrana, onde ligam-se ao citocromo b₅₅₈ para ativar a NADPH-oxidase. A fosforilação dos componentes citossólicos está representada por P.

FONTE: <http://www.biochem.emory.edu> (modificado).

O superóxido gerado pela NADPH-oxidase pode ser espontaneamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e este pode gerar ácido hipocloroso ($HOCl$) através da oxidação de Cl^- . Esta reação é catalisada pela mieloperoxidase (Babior, 2004) (**Esquema 3**).



Esquema 3. Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos, através da enzima NADPH-oxidase.

FONTE: <http://courses.washington.edu/conj/bloodcells/oxygenradicals.htm> (modificado).

A ativação da NADPH-oxidase pode ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de receptor. Dentre os mecanismos dependentes estão o componente do sistema complemento C5a, o peptídeo quimiotático fMLP e complexos antígenos-anticorpos através da ligação com o receptor FcIII. A maioria das funções dos neutrófilos mediadas por receptores são desencadeadas por proteínas G (proteínas ligantes de GTP) que estabelecem uma conexão entre os receptores de membrana, segundos mensageiros e enzimas intracelulares, ativando uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação dos componentes citossólicos da NADPH-oxidase, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$. Já os agentes independentes do receptor incluem o PMA e os ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos oléico e

araquidônico (Huizinga et al., 1989). Portanto, o sistema da NADPH-oxidase pode ser regulado por membros da superfamília Ras da proteína ligadora de GTP: Rac 1 e/ou Rac 2 (Bokoch, 1995) e pela PKC que auxilia na fosforilação do componente p47^{phox} (Lopes et al., 1999).

No entanto, as EROS também podem ser geradas por mecanismo independente da NADPH-oxidase, através da mitocôndria. A produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio pode ser estimulada na mitocôndria por ativação de canais de potássio de pequena condutância ativados por cálcio (SK) (FAY et al., 2006). Além disso, neutrófilos possuem uma pequena quantidade de citocromo c que leva à redução da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial resultando em acúmulo de elétrons e subsequente formação de EROS (Maianski et al., 2004). A produção excessiva de EROS pelos neutrófilos pode causar lesão tecidual.

Os neutrófilos protegem-se dos efeitos nocivos das EROS através da produção de enzimas anti-oxidantes, tais como; superóxido dismutase, catalase e o ciclo catalisado por glutathione peroxidase-redutase, além de compostos antioxidantes como as vitaminas E e C (Cheson et al., 1976; Pereira et al., 1995). O desequilíbrio entre a produção de EROS e o sistema antioxidante contribui para a morte programada dessas células (Jacobson, 1996; Narayanan et al., 1997).

1.3 Processo de morte dos neutrófilos

Quando liberados da medula óssea, os neutrófilos permanecem por curto período de tempo na circulação (8-20 horas) e nos tecidos (1 a 4 dias). Diariamente são formados na circulação cerca de $0,8-1,6 \times 10^9$ células por Kg de peso corpóreo (Akgul et al., 2001; Maianski et al., 2004; Maianski et al., 2004) sendo, portanto, necessário que o mesmo número de neutrófilos entre em apoptose (morte constitutiva) para manter a homeostasia. O aumento da ocorrência de morte celular leva à diminuição da contagem de neutrófilos (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 qual está associado com infecção bacteriana, leucemia mielóide e infarto agudo do miocárdio (Akgul et al., 2001; Maianski et al., 2004). Além disso, a morte dos neutrófilos é um evento celular essencial para manter o número destas células durante os processos de infecção e inflamação. As enzimas e as EROS secretadas pelos neutrófilos durante a infecção e inflamação podem ser tóxicas para células e

tecidos próximos a este local, intensificando a inflamação. Deste modo, a apoptose dos neutrófilos senescentes e sua remoção por macrófagos permite a resolução rápida e eficaz do processo inflamatório (Luo e Loison, 2008).

Células podem morrer por diferentes tipos de morte: apoptose, necrose, necrose secundária, aponecrose, autofagia, oncose e senescência (Ryter et al., 2007). No entanto, apoptose e necrose são os tipos de morte mais caracterizados. Alterações morfológicas e bioquímicas permitem a distinção entre estes dois tipos de morte (Wyllie et al., 1980).

1.3.1 Necrose

Necrose, na etimologia grega, quer dizer “estado de morte”, e envolve um processo de morte que é resultado de injúria celular irreversível. Este tipo de morte celular geralmente acomete um grupo de células vizinhas e envolve inflamação. As primeiras alterações celulares observadas são: tumefação celular e degeneração gordurosa em alguns casos, com formação de vacúolos lipídicos no citoplasma. A mitocôndria e o retículo endoplasmático tornam-se tumefeitos. A ruptura das organelas antes tumefeitas dá aspecto granuloso ao citoplasma. Com a ruptura dos lisossomos e conseqüente lise das organelas pelas enzimas lisossomais, verifica-se a homogeneização do citoplasma em uma massa acidófila e opaca. Quando toda basofilia é perdida e os limites entre as organelas se tornam indistinguíveis, as células necróticas são chamadas de *ghost cells*. A ruptura da membrana celular permitem o extravasamento do conteúdo citoplasmático e a entrada do material extracelular. O rompimento celular induz uma resposta inflamatória local e fagocitose do tecido (Proskuryakov et al., 2003).

1.3.2 Apoptose

Apoptose é um termo de etimologia grega que significa “folhas caindo das árvores” e foi inicialmente descrita por Kerr et al. (1972). A apoptose é um modelo bem caracterizado de morte celular que pode ocorrer por uma diversidade de estímulos fisiológicos e não fisiológicos. Trata-se de um “suicídio celular” mediante a ativação de um processo bioquímico controlado, que requer energia e não envolve inflamação (Gorman et al., 1997). O processo apoptótico pode ocorrer em situações fisiológicas adaptativas como na embriogênese, ciclo menstrual, reabsorção de tecido mamário após desmame, menopausa, maturação do sistema nervoso central, morte das células imunes (linfócitos T e B no processo

de seleção ou após depleção de citocinas), ou em situações patológicas como citotoxicidade de linfócitos T por aumento de ácidos graxos ou ceramidas, depleção de células em proliferação (criptas intestinais e tumores), infecções virais, estímulos nocivos e tratamentos drásticos (hipertermia, grandes variações de pH, radiação, agentes químicos) (Jacobson et al., 1997).

As células que morrem por apoptose apresentam condensação de cromatina em grandes corpos granulares que se ligam a carioteca, formando um núcleo picnótico. Em um estágio posterior, ocorre clivagem do DNA internucleossomal, causado pelas endonucleases endógenas, em fragmentos de 180-200 pares de base ou maiores. A fragmentação nuclear é uma fase irreversível da apoptose (Kerr et al., 1972; Thompson et al., 1998). Ocorre condensação do citoplasma, com grande aumento da densidade das organelas, as quais mantêm sua integridade. Surgem vacúolos citoplasmáticos e ocorrem projeções da membrana celular denominadas *blebs*. A seguir estas se destacam, dando origem aos corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980).

Dentre os eventos bioquímicos mais freqüentes observados na apoptose estão a ativação de caspases (*Cysteine Aspartate Proteases*) e nucleases, permeabilização das membranas mitocondriais, vazamento de diversas moléculas desta organela (citocromo c, *Smac/Diablo*), desestabilização do citoesqueleto, externalização de fosfatidilserina e promoção do cruzamento de proteínas (*crosslinking*), não necessariamente nesta ordem (Vermes et al., 1995; Chang e Yang, 2000).

A externalização de fosfatidilserina é um evento importante, pois facilita o reconhecimento das células apoptóticas por células fagocíticas que apresentam receptores para fosfatidilserina. Normalmente, fosfatidilcolina e esfingomiéline estão na face externa da bicamada lipídica e a fosfatidilserina está exclusivamente na face interna da membrana plasmática. Na apoptose, ocorre perda da simetria dos fosfolípides com exposição da fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática. Assim, ocorre a translocação de cargas negativas da molécula de fosfolípidios da face interna da membrana citoplasmática para a superfície celular (Martin et al., 1996). Tal fato faz com que a fagocitose ocorra antes da perda da integridade de membrana, prevenindo inflamação e lesões teciduais provocadas pelo extravasamento do conteúdo intracelular (Vermes et al., 1995).

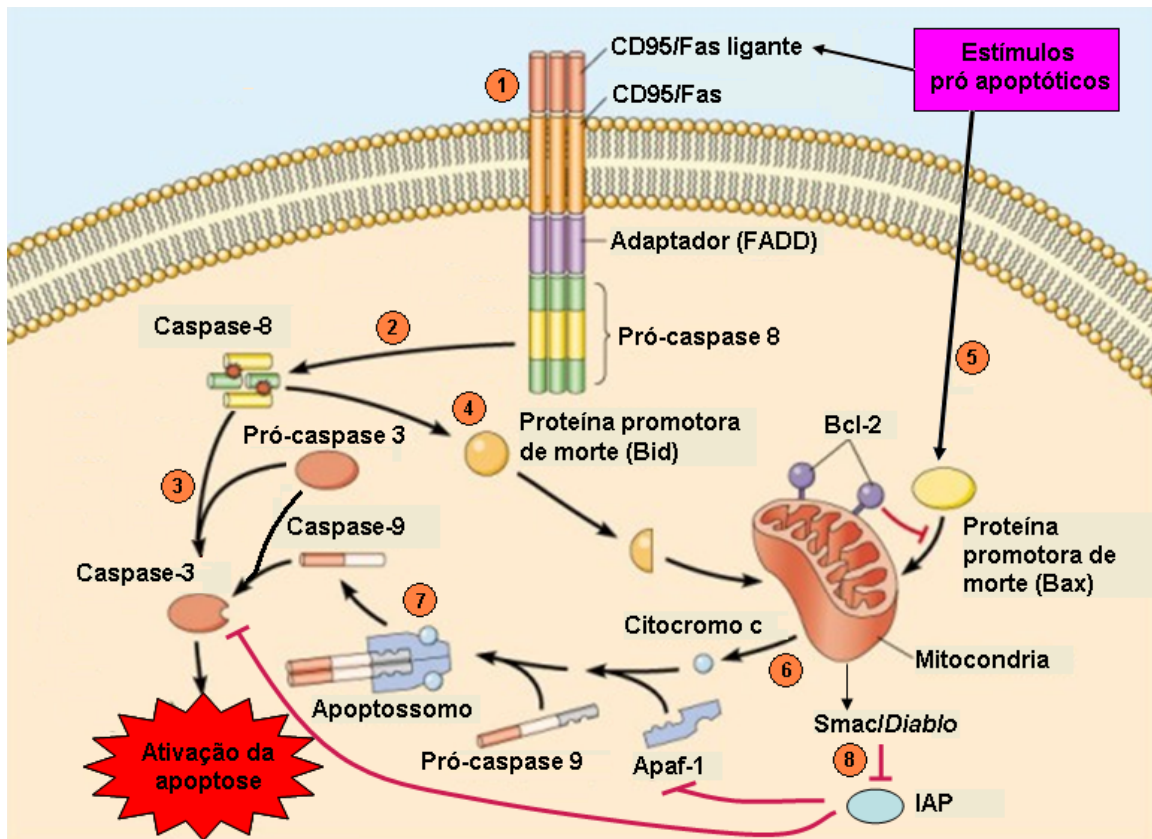
Em estágios iniciais da apoptose, a membrana plasmática está íntegra e suas funções de transporte estão preservadas, porém esta pode sofrer alterações durante a apoptose (Gomez-Angelats et al., 2000).

As caspases são responsáveis pela continuidade do sinal pró-apoptótico, fazem parte de uma família de cisteína proteases que clivam proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (Kroemer, 1998). São separadas em duas classes: as iniciadoras, que iniciam a cascata apoptótica (caspases 8 e 9) e as efetoras (caspases 3, 6 e 7) que são ativadas pelas caspases executoras (Mak e Yeh, 2002).

As proteínas da família Bcl-2 são moléculas reguladoras localizadas no citoplasma e na membrana mitocondrial externa e integram sinais de morte ou de sobrevivência celulares e podem ativar ou não a apoptose. A família Bcl-2 divide-se em três subfamílias, sendo que duas delas possuem multidomínios BH (*Bcl-2 Homology regions*) e possuem ação anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1/Bfl-1) ou pró-apoptótica (Bax, bak, Mtd/Bok e Bcl-rambo). A outra subfamília são as pró-apoptóticas que possuem somente o domínio BH3 (Bad, Bid, Bim/Bod, Bmf, Blk, Bnip3/Nix, BiK/Nbk, Bnip3L, Hrk/DP5, Noxa, Puma, p193 e Bcl-G). Esta subfamília ativa membros das pró-apoptóticas multidomínios e/ou inativam as anti-apoptóticas (Shimizu et al., 1998).

Apoptose de neutrófilos pode ser iniciada tanto pela via extrínseca como pela via intrínseca (Kroemer, 1998; Luo e Loison, 2008). A via extrínseca é desencadeada pela ativação dos receptores de superfície; como TNF-R (*Tumor Necrosis Factor Receptors*) e Fas (CD95/Apo1). Após a ligação com seus ligantes, TNF- α e FasL, respectivamente, esses formam o complexo DISC (*Death-inducing signaling complex*), que consiste do receptor de morte, uma proteína adaptadora (FADD, TRADD) e uma caspase iniciadora (pró-caspase 8). O recrutamento da pró-caspase 8 ao DISC resulta na sua ativação e leva a uma série de eventos, incluindo ativação da caspase 3 e clivagem de múltiplos substratos, levando à morte (Yang et al., 1997; Krammer, 2000). A via intrínseca é mediada pela mitocôndria, sendo caracterizada por perda do potencial da membrana mitocondrial. A despolarização da membrana mitocondrial induz vazamento de proteínas da organela em função da formação de poros. Dentre as proteínas que vazam da mitocôndria estão o citocromo c (componente da cadeia respiratória), o AIF (fator indutor de apoptose), pró-caspase 9, *Smac/diablo* (*Smac* segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria e *diablo* - proteína ligadora direta de proteínas inibidoras de apoptose com baixo ponto isoelétrico) e a Omi/HtrA2 (*High Temperature Requirement*) (Kroemer et al., 1998; Kroemer, 2002; Mayer e Oberbauer, 2003). O citocromo c, a pró-caspase 9 e o Apaf-1 formam o apoptossomo que, por sua vez ativa a caspase 9, que em seguida ativa a caspase 3. A via extrínseca pode amplificar a via intrínseca através da clivagem do Bid à tBid que promove alteração conformacional na Bax permitindo que esta atue na membrana mitocondrial externa e promova a abertura dos poros e

conseqüente extravasamento das proteínas acima citadas. É importante observar que ambas as vias convergem para a ativação da caspase 3 (**Esquema 4**).



Esquema 4. Esquema das vias de apoptose.

A apoptose desencadeada pela via extrínseca (1), também chamada de via receptor, envolve membros da superfamília de receptores de morte (CD95/Fas/Apo1 e TNF R1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte que recruta pró-caspase (8 ou 10) através de proteínas de domínio de morte associadas ao receptor. O complexo formado pelo receptor, uma molécula adaptadora (FADD ou TRAAD) e pela pró-caspase é chamado de complexo DISC. O recrutamento da pró-caspase ao complexo DISC permite sua ativação. Uma vez ativada caspase 8 ou 10 (2), cliva a pró-caspase 3 tornando-a ativa (3) e pronta para clivar substratos específicos que induzem a apoptose celular. A via extrínseca pode interagir com a via intrínseca, potencializando o sinal apoptótico através da clivagem e ativação da proteína Bid (4), que facilita a ação da Bax e a formação do poro de transição mitocondrial. Já a apoptose desencadeada pela via intrínseca (5), também chamada de via mitocondrial envolve alterações sofridas na mitocôndria, geralmente ocorre em resposta a lesões de DNA e envolve a ativação de um membro pró apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros anti (Bcl-2, Bcl-xL) e pró-apoptóticos (Bax, Bid) da família Bcl-2 regulam a liberação do citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna (6). Este associa-se com Apaf-1, dATP e pró-caspase 9, formando o apoptossomo (7), que torna a caspase 9 ativa. A caspase 9, por sua vez, cliva a caspase 3 e a torna ativa. Após dano mitocondrial, a *Smac/Diablo* é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c (8). A *Smac/Diablo* bloqueia a função da IAP (proteína inibidora da apoptose), impedindo assim que esta iniba a atividade das caspases 9 e 3.

FONTE: <http://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter/images/apoptosis.jpg> (modificado).

A superexpressão da Bcl-2 é capaz de impedir as alterações no potencial transmembrânico mitocondrial e o vazamento do citocromo c e de AIF (Cai et al., 1998), pois impede a atuação da Bax. Alguns pesquisadores relatam que neutrófilos não expressam o fator anti-apoptótico Bcl-2, em contrapartida expressa Mcl-1, AI e Bcl-xL (outras proteínas da

família Bcl-2) (Akgul et al., 2001; Luo e Loison, 2008). A quantidade de Mcl-1 e Bcl-xL é gradualmente reduzida durante a morte de neutrófilos, levando a liberação da Bax dos complexos heterodiméricos Mcl-1:Bax e Bcl-xL:Bax e subsequente translocação para membrana mitocondrial (Moulding et al., 1998). Por outro lado, as proteínas pró-apoptóticas (Bax) formam poros na membrana da mitocôndria facilitando o vazamento do citocromo c e a ativação das caspases.

Recentemente foi demonstrada a existência de uma outra via de morte independente da ativação de caspases (Maianski et al., 2003; Maianski et al., 2004; Chen et al., 2006; Ishihara e Shimamoto, 2006). Maianski et al. (2004) demonstraram que a Omi/HtrA2 (proteína mitocondrial pró-apoptótica) inativa o sistema antioxidante mitocondrial e promove morte dos neutrófilos pelo excesso de produção de EROS, que é derivada dos complexos I, II e III da cadeia transportadora de elétrons presente na mitocôndria. Chen et al. (2006) demonstraram que o TNF- α induz morte em neutrófilos humanos por uma via independente de caspase e está relacionada com as calpaínas e EROS. Além disso, Ishihara e Shimamoto (2006) demonstraram que o estresse oxidativo pode estimular a fragmentação de DNA através da ativação da endonuclease G na ausência de atividade das caspases.

Em apoptose os neutrófilos reduzem a capacidade de realizar quimiotaxia e fagocitose. Além disso, também ocorre redução no número de receptores de superfície e de moléculas de adesão (Luo e Loison, 2008).

Nosso grupo demonstrou que o exercício intenso de curta duração é capaz de modular tanto a função como o processo de morte dos neutrófilos de ratos (Lagranha et al. (2004). No entanto, o efeito do exercício intenso de longa duração sobre o processo de morte de neutrófilos humanos permanece a ser esclarecido. O exercício intenso e de longa duração pode alterar a morte dos neutrófilos, já que a magnitude das alterações do sistema imune decorrentes do exercício dependem da intensidade e da duração em que o mesmo é realizado.

1.4 Triathlon

O *triathlon* é um evento esportivo constituído por três modalidades: natação, ciclismo e corrida. A história do *triathlon* iniciou-se em 1978, quando o primeiro *Ironman* foi realizado no *Hawaii*. Nesta ocasião, poucos atletas participaram do chamado *Hardest race of the world* já constituído pelas três modalidades do *triathlon*. Duas décadas depois a primeira competição de *triathlon* Olímpico foi realizada em Sidney 2000 (Egermann et al., 2003). A União Internacional de *Triathlon* distingue o *triathlon* em quatro categorias: *Short/Sprint*, Olímpico,

Half Ironman e *Ironman*. As distâncias percorridas em cada uma destas categorias estão no quadro abaixo:

Quadro 1. Características das diferentes categorias de *triathlon*, modalidades esportivas realizadas, distâncias percorridas (Km) e duração média da competição.

Prova	Natação	Ciclismo	Corrida	Duração da prova
<i>Ironman</i>	3,8	180	42,2	± 8h e 30 min
<i>Half Ironman</i>	2	80	20	± 4 h
<i>Olímpico</i>	1,5	40	10	± 2 h
<i>Short/Sprint</i>	0,75	20	5	± 58 min

Triatletas de elite geralmente são altos, possuem em média baixo peso e porcentagem de gordura corpórea (Sleivert e Rowlands, 1996).

Assim como em esportes de resistência, a determinação primária para o sucesso nas provas de *triathlon* está na habilidade para produzir e utilizar eficientemente grandes quantidades de energia por períodos prolongados de tempo. Cada modalidade do *triathlon* deve ser realizada num ritmo ótimo, sem causar fadiga, o que poderia comprometer o desempenho na próxima modalidade. À distância, o terreno e as condições do ambiente variam entre as competições, fazendo com que a demanda fisiológica de uma prova de *triathlon* seja diferente da outra (O'Toole e Douglas, 1995).

A longa duração das provas, principalmente no *Half Ironman* e *Ironman*, unida à natureza cíclica das modalidades que as compõem, confere ao *triathlon* características de atividade predominantemente aeróbia, podendo ser considerado como um longo exercício exaustivo.

Estudos tem demonstrado alta incidência de lesões por contração excessiva da musculatura em triatletas (Korkia et al., 1994; Egermann et al., 2003). Após períodos de treinamento intenso e competições como *triathlon*, a atividade plasmática de enzimas como a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase podem aumentar de 2 a 10 vezes em relação aos níveis de repouso (24-170 U/L). A CK é importante para a síntese de ATP à célula. Existem três isoformas desta enzima; a CK-MM, CKMB e CK-BB, estas são encontradas

principalmente nos músculos esqueléticos e cardíacos, cérebro e trato gastrointestinal. O músculo esquelético contém quase que exclusivamente CK-MM, portanto, o extravasamento desta enzima para a corrente sanguínea indica que houve lesão desse tecido (Wilmore e Costill, 2001; Suzuki et al., 2003; Peake et al., 2005).

Além de provocar alterações no sistema músculo esquelético o exercício intenso têm sido apontado como causador de imunossupressão em atletas de alto nível (Gleeson, 2007).

1.5 Função dos neutrófilos e exercício físico

A influência do exercício sobre a função imune foi demonstrada por LARRABEE, em um estudo pioneiro, no início do século XX (1902). Esse autor verificou leucocitose, principalmente de neutrófilos em corredores após a realização de maratona. Outros autores também demonstraram aumento no número de neutrófilos circulantes em resposta ao exercício e competição de longa duração (> que 60 min) (Chinda et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Umeda et al., 2008). A neutrocitose observada parece estar mais relacionada à duração do que à intensidade do exercício, especialmente em sessões de exercício que elevam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico, β -endorfina e cortisol (Gabriel et al., 1997). Os neutrófilos são recrutados principalmente da população marginal e do pulmão (Benschop et al., 1996).

No entanto, após o exercício o número de leucócitos circulantes, exceto neutrófilos, diminui rapidamente e se o exercício for intenso (acima de 65% do $VO_{2m\acute{a}x}$) e de longa duração, o número de células *natural killer* e de linfócitos pode diminuir abaixo dos valores de repouso iniciais (Mooren et al., 2002; Shephard, 2003).

Shinkai et al. (1993) observaram diminuição no número leucócitos no sangue periférico dos triatletas imediatamente após a competição.

Alguns autores acreditam que após a prática de exercício intenso os atletas ficam mais susceptíveis as infecções, principalmente das vias aéreas superiores. Este período é chamado de *open window* (Nieman, 1994; Pedersen e Ullum, 1994; Mars et al., 1998; Nieman, 2000), e parece ser resultado da supressão do sistema imune (Nieman, 1994; Nieman, 2000).

Pedersen e Bruunsgaard (1995) relataram que a imunossupressão é observada em maior grau quando o exercício é intenso e de longa duração. De fato, atletas que realizam provas de resistência, como maratonistas e triatletas (Nieman et al., 1990; Bassit et al., 2000), são mais susceptíveis a doenças infecciosas durante períodos de treinamento intenso e competições (Pyne e Gleeson, 1998; Gleeson, 2007). A frequência do aparecimento de infecções no trato

respiratório superior em atletas de resistência é três vezes maior do que na população em geral (Gleeson, 2007). Nesse sentido, vem crescendo o número de estudos utilizando triatletas, pelo fato da prova do *triathlon* ser considerada uma forma de exercício bastante intensa (Bassit et al., 2000; Bassit et al., 2002; Nieman et al., 2004; Libicz et al., 2006).

O exercício intenso pode estar associado com períodos de recuperação insuficientes podendo, nesse caso, levar à síndrome do supertreinamento. Essa situação é prejudicial ao atleta não apenas pela impossibilidade da continuação do treinamento e queda do desempenho nas competições, mas também pelas conseqüências à saúde. No supertreinamento, a imunossupressão é mais severa que no exercício intenso (Castell, 2003) e pode aparecer devido a distúrbios na função de leucócitos (Nieman, 2000; Castell, 2003). Dentre estas estão a supressão na função dos neutrófilos, na proliferação de linfócitos, na atividade de células *natural killer* e diminuição das imunoglobulinas plasmática e salivar (MacKinnon, 2000; Nieman, 2000; Nieman, 2000). Alterações na secreção hormonal e na produção de citocinas são decorrentes do exercício intenso e podem prejudicar a função dos leucócitos (Armstrong e VanHeest, 2002; Lakier Smith, 2003). Outra possibilidade para explicar a redução da função provocada pelo exercício intenso é a diminuição na concentração plasmática de glutamina (Field et al., 2000; Castell, 2003). A taxa de utilização de glutamina por neutrófilos, linfócitos e macrófagos é similar ou até mesmo maior do que a de glicose. A utilização desse aminoácido por neutrófilos de ratos incubados por uma hora é de 12,8 nmol/min por mg de proteína. Pithon-Curi et al. (1997) demonstraram que menos de 1 % deste aminoácido é completamente oxidado, sendo em maior parte convertido à glutamato, alanina, lactato, aspartato e amônia, indicando que o metabolismo desse substrato por essas células não é preferencialmente para produção de energia, mas sim para outras funções. Recentemente, foi demonstrado que a glutamina nas concentrações de 1 e 2 mM (*in vitro*) além de assegurar a produção normal de EROS (Pithon-Curi et al., 2002; Castell et al., 2004), protege neutrófilos de humanos e de ratos da apoptose (Pithon-Curi et al., 2003), sendo capaz de prevenir os eventos apoptóticos desencadeados nestas células após exercício agudo (Lagranha et al., 2004). Além disso, a glutamina também preserva a função dos neutrófilos durante infecções e injúrias através da diminuição da produção de TNF- α (Pithon-Curi et al., 2002).

Os dados da literatura em relação à função dos neutrófilos e exercício moderado e intenso são controversos, devido às diferenças interindividuais na responsividade dos neutrófilos, o estado de treinamento dos indivíduos estudados, o protocolo de exercício utilizado e técnica utilizada para o ensaio. Há estudos demonstrando manutenção, redução e/ou aumento na atividade fagocitária de neutrófilos após o exercício intenso (Smith et al.,

1990; Ortega, 1994; Pyne, 1994; Gabriel et al., 1995; Chinda et al., 2003; Chinda et al., 2003).

O exercício com intensidade moderada (50 e 65% $VO_{2máx}$) regula positivamente a função imune (Nieman, 1994; Nieman, 2000) enquanto que o exercício intenso (acima de 70% $VO_{2máx}$) regula negativamente (Nieman, 1994; Pyne e Gleeson, 1998; Peake, 2002).

Macha et al. (1990) examinaram o efeito do exercício moderado (1 hora de bicicleta à 50% do $VO_{2máx}$) em 7 indivíduos saudáveis (5 homens, 2 mulheres), sobre a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos circulantes estimulados com PMA, antes e após 10, 15 e 29 minutos de exercício. A técnica de polarografia foi utilizada para monitorar a geração de peróxido de hidrogênio extracelular dos neutrófilos. O exercício aumentou o número de neutrófilos circulantes e diminuiu a capacidade dessas células de gerar peróxido de hidrogênio após estimulação com PMA.

Pyne et al. (1996) e Robson et al. (1999) também reportaram que o *burst* oxidativo dos neutrófilos diminui após exercício de intensidade moderada (50-60% $VO_{2máx}$) tanto de curta quanto de longa duração (40 ou 150 minutos). Em contraste, outros tem encontrado aumento no *burst* oxidativo após este mesmo tipo de exercício. Smith et al. (1996) demonstraram aumento no *burst* oxidativo de neutrófilos após 60-90 minutos de exercício com intensidade moderada (50-70% do $VO_{2máx}$). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o treinamento crônico (realizado durante 11 semanas) com intensidade moderada (50% $VO_{2máx}$) aumenta o *burst* oxidativo em neutrófilos de ratos e que o provável mecanismo envolvido é o aumento na expressão dos componente p47^{phox} da enzima NADPH-oxidase (Levada-Pires et al., 2007).

Por sua vez, as atividades plasmáticas de mieloperoxidase e lisozima estão elevadas após o exercício intenso (Morozov et al., 2003; Suzuki et al., 2003), sugerindo que efetivamente ocorre ativação dos neutrófilos.

Tendo em vista os aspectos já mencionados é importante elucidar as possíveis alterações funcionais induzidas pelo exercício intenso, a fim de que se possa prevenir instalação de quadros inflamatórios ou infecciosos que diminuam o rendimento dos atletas.

1.6 Processo de morte celular e exercício físico

Evidências recentes têm demonstrado que muitos marcadores associados com apoptose celular presentes no desenvolvimento normal também são evidentes em leucócitos após exercício intenso.

Alterações nas características bioquímicas e moleculares da apoptose tais como: externalização de fosfatidilserina (Mooren et al., 2002), despolarização de membrana mitocondrial (Hsu et al., 2002; Quadrilatero e Hoffman-Goetz, 2004), fragmentação de DNA (Mars et al., 1998), aumento nos níveis de caspase 3 e citocromo c citossólico (Quadrilatero e Hoffman-Goetz, 2005), aumento no receptor CD95 (Mooren et al., 2002), liberação de Ca^{++} (Azenabor e Hoffman-Goetz, 2000), tem sido observadas em linfócitos após exercício intenso. Porém, há poucos artigos sobre os efeitos do exercício na apoptose de neutrófilos.

Hsu et al. (2002) foi o primeiro a verificar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial em neutrófilos de atletas submetidos a diferentes intensidades de exercício aeróbio. Em estudo realizado no nosso laboratório determinou-se o efeito de uma única sessão de exercício em esteira ergométrica por 1 hora na apoptose de neutrófilos de ratos com 90 (maturados) e 60 (imaturados) dias (Lagranha et al., 2004). Houve aumento na fragmentação de DNA, condensação de cromatina, externalização de fosfatidilserina nos neutrófilos dos ratos, sugerindo que o processo de morte induzido pelo exercício é a apoptose. Neste mesmo estudo foi verificado que dentre os prováveis mecanismos envolvidos estão o aumento da produção de EROS, a despolarização da mitocôndria e a alteração na expressão de genes anti- (Bclx-L) e pró-apoptóticos (Bclx-S e Bax).

Além disso, o exercício aumenta fatores que podem induzir a morte celular, tais como glicocorticóides, catecolaminas, cortisol e ácidos graxos (Mastaloudis et al., 2001; Wigernaes et al., 2001).

Os ácidos graxos podem regular a função de leucócitos (Calder, 2001; Gorjao et al., 2007). Estudos têm demonstrado aumento da apoptose de leucócitos em situação onde estes estão elevados, assim como jejum e diabetes *mellitus* (Otton et al., 2004; Pires et al., 2007; Sudo et al., 2007).

1.7 Exercício e ácidos graxos (AGs)

A concentração plasmática dos AGs está elevada durante o jejum e em diferentes formas de estresse, assim como no exercício onde há liberação de hormônios lipolíticos, tais como cortisol e adrenalina (Peake, 2002).

Os AGs livres do plasma são os principais substratos utilizados durante a prática de exercício de resistência com intensidade acima de 65% do VO_2 máx (Galbo e Stallknecht,

1996; Jeukendrup et al., 1998). O aumento na liberação de AGs do tecido adiposo durante o exercício é contrabalanceado pela elevada utilização destes na contração muscular. No entanto, quando o exercício é interrompido a concentração plasmática de AGs aumenta rapidamente (Pruett, 1970; el Sayed et al., 1996; Horowitz, 2003) podendo, em indivíduos em jejum que realizaram exercício intenso, atingir valores acima de 3 mM (Bahr et al., 1991).

Holly et al. (1986), em um estudo utilizando nove atletas que competiram no *Hawaii Ironman Triathlon World Championship*, observaram elevação na concentração plasmática de glicose (1,5 vezes), glicerol (3,5 vezes) e de AGs livres (2,9 vezes), imediatamente após a competição quando comparado aos valores basais. Cinco dias após a competição, foi encontrado aumento nas concentrações de triglicerídeos (2 vezes), redução dos AGs livres (58%) e normalização dos valores de glicose.

Wigernaes et al. (2001) demonstraram que as concentrações de AGs livres no plasma de atletas de resistência submetidos ao jejum aumenta, após prática de exercício intenso (83% do VO_2 máx durante 60 minutos), de 0,47 para 0,7 mM, sendo que este aumento persiste mesmo após 2 horas do término do exercício. Além disso, os autores demonstraram que um período de recuperação ativo de 15 min a 50% do VO_2 máx, além de prevenir a redução no número de células circulantes, também impede a súbita elevação de AGs livres no plasma. No entanto, este grupo não demonstrou correlação entre a redução e elevação na concentração dos AGs.

1.8 Leucócitos e AGs

Os AGs podem atuar como moléculas biologicamente ativas na regulação de várias funções do sistema imune, assim como proliferação de linfócitos, produção de citocinas e de moléculas de adesão em macrófagos, fagocitose e quimiotaxia de neutrófilos (Zheng et al., 1999; Kelley, 2001; Thies et al., 2001). Desta forma, qualquer alteração na concentração plasmática de AGs pode levar à modulação da função de leucócitos circulantes (Yaqoob, 1998; Calder et al., 2002)

Alteração na capacidade fagocitária e migratória de leucócitos têm sido observada quando estes são cultivados com diferentes AGs (Calder et al., 1990; Zheng et al., 1999). AGs insaturados aumentam a atividade fagocitária de macrófagos, enquanto que AGs saturados suprimem esta atividade (Spratt e Kratzing, 1975). Os AGs modificam a composição lipídica das membranas (Pompeia et al., 2000; Kelley, 2001). Schroit e Gallily

(1979) correlacionaram a atividade fagocitária do macrófago com a composição de AGs em fosfolípidos de membrana, demonstrando que estes interferem no processo de endocitose realizado por estas células.

A capacidade dos AGs em gerar mediadores (como prostaglandinas e leucotrienos) e de participar de vias de sinalização celular (através da geração de diacilglicerol e ceramidas) é importante na regulação das respostas imune e inflamatória (Pompeia et al., 2000). As mudanças na fluidez de membrana podem afetar as interações celulares e a atividade de receptores, transportadores e a geração de moléculas de sinalização celular. Os AGs poliinsaturados geralmente aumentam a fluidez, enquanto que os saturados diminuem-na (Kelley, 2001).

1.8.1 Neutrófilos e AGs

Nos neutrófilos, a capacidade de um AG em ativar a NADPH-oxidase está relacionada a sua estrutura química. A NADPH-oxidase é um complexo enzimático associada à membrana, portanto, sua regulação também pode estar diretamente associada a mudanças na composição de AGs desta. Dessa forma, o aumento no comprimento da cadeia carbônica, remoção das duplas ligações e a esterificação do grupamento carboxil diminuem o efeito dos AGs na ativação da NADPH-oxidase (Poulos et al., 1991). Hardy et al. (1994) demonstraram que a capacidade de ativação da NADPH-oxidase pelos AGs poliinsaturados é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia carbônica.

Embora os efeitos dos AGs na produção de EROS por leucócitos tenham sido amplamente estudados, vários pontos devem ser esclarecidos, pois há muitos dados controversos quanto à produção destas moléculas. Alguns trabalhos demonstram estimulação (Bellinati-Pires et al., 1993; Moriuchi et al., 1998) enquanto outros demonstram inibição (Ishida-Okawara et al., 1996; Cockeran et al., 2004) da produção de EROS por neutrófilos.

Recentemente nosso grupo verificou em neutrófilos estimulados e não estimulados com PMA, o efeito dos ácidos oléico, linoléico e gama-linolênico na produção intra e extra celular de EROS através de cinco técnicas: quimiluminescência na presença de lucigenina ou luminol, redução de citocromo c, utilização de diidrotidina e redução do fenol vermelho (Hatanaka et al., 2006). Todos os AGs testados estimularam a produção de EROS nos neutrófilos, no entanto, as técnicas de redução de citocromo c e luminol apresentaram aspectos críticos a serem considerados. Na técnica do luminol, a atividade da peroxidase é

necessária para a reação do luminol com EROS gera luz, e os ácidos oléico, linoléico e gama-linolênico inibiram a atividade da mieloperoxidase em neutrófilos estimulados. Dessa forma, a utilização desta técnica pode mascarar os efeitos dos AGs sobre a produção de EROS. Os ácidos oléico, linoléico e gama-linolênico podem reduzir espontaneamente o citocromo c, mesmo na ausência de célula, indicando que este método também não deve ser utilizado para determinar a produção de EROS estimulada por AGs (Hardy et al., 1994; Hatanaka et al., 2006). A discrepância entre os dados demonstrados na literatura pode ser parcialmente atribuída ao método utilizado. Neste mesmo estudo foi demonstrado que os ácidos oléico, linoléico e gama-linolênico pré ativam o *burst* oxidativo de neutrófilos humanos e de ratos, uma vez que a adição de PMA ao ensaio causou efeito aditivo na produção de EROS por estas células (Hatanaka et al., 2006). O estímulo provocado pelos AGs sobre os neutrófilos é rápido e atinge o pico de produção em torno de 10 minutos. Os AGs provavelmente estimulam a enzima NADPH oxidase, uma vez que a adição de DPI (*difenyleneiodonium*) um inibidor dessa enzima, diminui a níveis próximos dos basais a produção de EROS induzida pelos AGs (Hatanaka et al., 2006). O efeito pré ativador dos AGs também foi demonstrado por Huang et al. (1997). Este grupo demonstrou que os ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) causam ativação de monócitos e macrófagos provocando aumento da atividade do *burst* oxidativo em resposta a outros estímulos utilizados (fMLP).

Pompeia et al. (2003) verificaram que o ácido araquidônico pode ativar o *burst* oxidativo em linhagem de células leucêmicas HL-60 (não diferenciadas e diferenciadas em neutrófilos). Existem várias hipóteses para explicar o efeito estimulatório do AA no sistema da NADPH-oxidase estimulado por PMA. Dentre elas podemos citar o efeito estimulatório sobre a bomba de próton (Cherny et al., 2001), estimulação da translocação da PKC (Hwang e Rhee, 1999) e da via celular de geração de eicosanóides, dissociação de inibidores dos componentes do complexo NADPH-oxidase, translocação ou fosforilação do componente p47^{phox} (Zhao et al., 2002).

1.9 AGs e morte de leucócitos

Altas concentrações de AGs, principalmente dos poliinsaturados (PUFAs), causam morte de células Jurkat (linfócito T), Raji (linfócito B) e HL-60 (linhagem de células

leucêmicas) por apoptose e necrose (Finstad et al., 1998; Lima et al., 2002). As concentrações de AGs que induzem necrose dificilmente são atingidas *in vivo*. Por outro lado, concentrações de AG que levam a apoptose são observadas em condições fisiológicas e patológicas. Por este motivo, maior atenção tem sido dada à apoptose induzida por AG, também denominada “lipoapoptose” (Martins de Lima et al., 2007).

Os AGs mais abundantes no plasma são os ácidos oléico, linoléico, palmítico e esteárico (Puttmann et al., 1993). Esses AGs apresentam toxicidade significativa em linhagem de linfócitos T (Jurkat), B (Raji) mesmo nas concentrações encontradas no plasma (Lima et al., 2002). O efeito tóxico de vários AGs foi demonstrado por Lima et al. (2002), através de avaliação da integridade de membrana e fragmentação de DNA por citometria de fluxo. Estes autores não encontraram diferença na toxicidade dos AGs entre as células T e B. No entanto, foi observada maior toxicidade pelos AGs de cadeia mais longa com maior número de duplas ligações.

A apoptose de células humanas Jurkat e HL-60 diferenciadas em neutrófilos parece ser mais estimulada por PUFAs (AA, DHA, EPA e linoléico), do que por ácidos monoinsaturados (ácido oléico) ou saturados (ácido palmítico) (Healy et al., 2003; Cury-Boaventura et al., 2004). Há evidência de que a apoptose induzida por PUFAs está relacionada com o aumento de atividade das caspases 3 e 9 (Healy et al., 2003).

Cury-Boaventura et al. (2006) demonstraram que o ácido linoléico é mais tóxico do que o oléico em linfócitos humanos e que o mecanismo de indução de morte do ácido linoléico envolve despolarização de mitocôndria e produção de EROS. Já a apoptose induzida pelo ácido oléico envolve ativação de caspase 3. Portanto, os mecanismos que envolvem a morte celular são diferentes entre as classes de AGs.

Os PUFAs podem levar a morte celular devido ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica, neste processo os PUFAs da membrana reagem com EROS, principalmente com radicais hidroxil, gerando novos radicais e propagando a reação em cadeia que deforma a estrutura da membrana celular e desequilibra a osmolaridade da célula. Além disso, durante a apoptose, há redução da concentração de glutathione reduzida na mitocôndria, diminuindo a capacidade antioxidante das células. Aparentemente, há também a participação da síntese alterada de eicosanóides nesse processo (Finstad et al., 1998).

Competições esportivas de alta intensidade, como o *triathlon*, induzem aumento na concentração de AGs (Holly et al., 1986; el Sayed et al., 1996). É sabido que os AGs podem

modular a função de leucócitos *in vitro* (Calder, 2001; Gorjao et al., 2007), portanto uma possível regulação da função e morte de neutrófilos por AGs durante a competição de *triathlon* poderia indicar um novo papel para este metabólito.

Desta forma, é importante investigar o efeito da competição de *triathlon Half Ironman* sobre a função e morte de neutrófilo para que assim se possa entender melhor as possíveis alterações imunológicas observadas após este tipo de competição.

Conclusão

Os achados deste trabalho evidenciam que a competição de *triathlon* aumentou a capacidade dos neutrófilos de migrar e de realizar *burst* oxidativo, porém inibiu a capacidade fagocitária dessas células. Além disso, induziu aumento da fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina, sugerindo que este tipo de competição leva a apoptose dos neutrófilos. A elevação da concentração plasmática dos AGs (oléico, linoléico e esteárico) parece estar envolvida nas alterações funcionais e na apoptose verificada após a competição de *triathlon*. Dentre os mecanismos envolvidos no processo de apoptose estão o aumento da produção de EROS, despolarização da membrana mitocondrial, da expressão da proteína pró-apoptótica (Bax) e ativação de caspase 3, e redução na expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-xL) e conteúdo de lipídios neutros.

*Referências Bibliográficas**

- Abushufa R, Reed P, Weinkove C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clinical Chemistry*. 1994 Sep;40(9):1707-12.
- Akamatsu H, Komura J, Miyachi Y, Asada Y, Niwa Y. Suppressive effects of linoleic acid on neutrophil oxygen metabolism e phagocytosis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1990 Sep;95(3):271-4.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters*. 2001 Jan 5;487(3):318-22.
- Allen RC. Chemiluminescence e the study of phagocyte redox metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1982;141:411-21.
- Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, Takehara Y, Akiyama J, Horton AA, et al. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 e n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Pharmacology*. 2001 Oct 1;62(7):821-8.
- Armstrong LE, VanHeest JL. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: clues from depression e psychoneuroimmunology. *Sports Medicine*. 2002;32(3):185-209.
- Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *The Journal of Nutrition*. 2002 Jul;132(7):1812-8.
- Avula CP, Muthukumar AR, Zaman K, McCarter R, Fernees G. Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *Journal of Applied Physiology*. 2001 Dec;91(6):2546-52.
- Azenabor AA, Hoffman-Goetz L. Effect of exhaustive exercise on membrane estradiol concentration, intracellular calcium, e oxidative damage in mouse thymic lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000 Jan 1;28(1):84-90.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion Immunology*. 2004 Feb;16(1):42-7.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
- Babij P, Matthews SM, Rennie MJ. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1983;50(3):405-11.
- Bahr R, Hostmark AT, Newsholme EA, Gronnerod O, Sejersted OM. Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose e catecholamines. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1991 Sep;143(1):105-15.
- Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*. 1971 Oct 1;134(4):907-34.
- Bassit RA, Sawada LA, Bacurau RF, Navarro F, Costa Rosa LF. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000 Jul;32(7):1214-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Bassit RA, Sawada LA, Bacurau RF, Navarro F, Martins E, Jr., Santos RV, et al. Branched-chain amino acid supplementation e the immune response of long-distance athletes. *Nutrition*. 2002 May;18(5):376-9.

Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM, Carneiro-Sampaio MM. Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, e oxidative activity. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993 Apr;53(4):404-10.

Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, e future directions. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1996 Jun;10(2):77-91.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, e oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Aug 15;272(33):20313-6.

Bernt E, Bergmeyer HU. L-Glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase e NAD⁺. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press; 1974. p.1704-8.

Bokoch GM. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends in Cell Biology*. 1995 Mar;5(3):109-13.

Borregaard N, Cowle JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3503-21.

Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengelov H, et al. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992 Jul;90(1):86-96.

Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, et al. Human neutrophil granules e secretory vesicles. *European Journal of Haematology*. 1993 Oct;51(4):187-98.

Bosca L, Zeini M, Traves PG, Hortelano S. Nitric oxide e cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function e fate. *Toxicology*. 2005 Mar 15;208(2):249-58.

Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum*. 1968;97:9-29.

Bradford MM. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976 May 7;72:248-54.

Brunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *The Journal of Physiology*. 1997 Mar 15;499 (Pt 3):833-41.

Burns CP, Welshman IR, Spector AA. Differences in free fatty acid e glucose metabolism of human blood neutrophils e lymphocytes. *Blood*. 1976 Mar;47(3):431-7.

Cacicedo JM, Benjachareowong S, Chou E, Ruderman NB, Ido Y. Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, e ceramide. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1838-45.

Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):139-49.

- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, e immunity. *Lipids*. 2001 Sep;36(9):1007-24.
- Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake e incorporation of saturated e unsaturated fatty acids into macrophage lipids e their effect upon macrophage adhesion e phagocytosis. *The Biochemical Journal*. 1990 Aug 1;269(3):807-14.
- Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids e lymphocyte functions. *The British Journal of Nutrition*. 2002 Jan;87 Suppl 1:S31-48.
- Cannon JG, St Pierre BA. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998 Feb;179(1-2):159-67.
- Castell L. Glutamine supplementation in vitro e in vivo, in exercise e in immunodepression. *Sports Medicine*. 2003;33(5):323-45.
- Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminase in human neutrophils e the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 2;279(14):13305-10.
- Castell LM, Newsholme EA. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. *Nutrition*. 1997 Jul-Aug;13(7-8):738-42.
- Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J, Newsholme EA. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, e the effects of glutamine supplementation. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1997;75(1):47-53.
- Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Seminars in Hematology*. 1997 Oct;34(4):327-35.
- Cervinka M, Puza V. Apoptosis e necrosis: Dynamics of structural changes in cells cultivated *in vitro* after treatment with xenobiotics. *Toxicology in vitro*. 1995;9(4):987-396.
- Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions e regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000 Dec;64(4):821-46.
- Chen HC, Wang CJ, Chou CL, Lin SM, Huang CD, Lin TY, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-independent cell death in human neutrophils via reactive oxidants e associated with calpain activity. *Journal of Biomedical Science*. 2006 Mar;13(2):261-73.
- Cherny VV, Henderson LM, Xu W, Thomas LL, DeCoursey TE. Activation of NADPH oxidase-related proton e electron currents in human eosinophils by arachidonic acid. *The Journal of Physiology*. 2001 Sep 15;535(Pt 3):783-94.
- Cheson BD, Christensen RL, Sperling R, Kohler BE, Babior BM. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1976 Oct;58(4):789-96.
- Chinda D, Nakaji S, Umeda T, Shimoyama T, Kurakake S, Okamura N, et al. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence*. 2003 Nov-Dec;18(6):324-9.
- Chinda D, Umeda T, Shimoyama T, Kojima A, Tanabe M, Nakaji S, et al. The acute response of neutrophil function to a bout of judo training. *Luminescence*. 2003 Sep-Oct;18(5):278-82.
- Cockeran R, Theron AJ, Feldman C, Mitchell TJ, Eerson R. Docosahexaenoic acid e eicosapentaenoic acid antagonize the proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *Infection and Immunity*. 2004 Jul;72(7):4327-9.

- Cronkite EP. Kinetics of granulocytopoiesis. *Clinics in Haematology*. 1979 Jun;8(2):351-70.
- Csernok E, Ludemann J, Gross WL, Bainton DF. Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *The American Journal of Pathology*. 1990 Nov;137(5):1113-20.
- Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *The American Journal of Physiology*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1124-9.
- Cury-Boaventura MF, Gorjao R, de Lima TM, Newsholme P, Curi R. Comparative toxicity of oleic e linoleic acid on human lymphocytes. *Life Sciences*. 2006 Feb 23;78(13):1448-56.
- Cury-Boaventura MF, Gorjao R, de Lima TM, Piva TM, Peres CM, Soriano FG, et al. Toxicity of a soybean oil emulsion on human lymphocytes e neutrophils. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2006 Mar-Apr;30(2):115-23.
- Cury-Boaventura MF, Pompeia C, Curi R. Comparative toxicity of oleic acid e linoleic acid on Jurkat cells. *Clinical Nutrition*. 2004 Aug;23(4):721-32.
- Cury-Boaventura MF, Pompeia C, Curi R. Comparative toxicity of oleic acid e linoleic acid on Raji cells. *Nutrition*. 2005 Mar;21(3):395-405.
- Damiano VV, Kucich U, Murer E, Laudenslager N, Weinbaum G. Ultrastructural quantitation of peroxidase- e elastase-containing granules in human neutrophils. *The American Journal of Pathology*. 1988 May;131(2):235-45.
- Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Apr;78(4):2383-7.
- Duncombe WG. The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. *Clinica Chimica Acta. International Journal of Clinical Chemistry*. 1964 Feb;10:122-5.
- Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *The Biochemical Journal*. 1995 Jun 15;308 (Pt 3):991-4.
- Eastman A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, e intracellular pH e Ca²⁺ associated with apoptosis. *Methods in Cell Biology*. 1995;46:41-55.
- Egermann M, Brocai D, Lill CA, Schmitt H. Analysis of injuries in long-distance triathletes. *International Journal of Sports Medicine*. 2003 May;24(4):271-6.
- el Sayed MS, Rattu AJ, Lin X, Reilly T. Effects of active warm-down e carbohydrate feeding on free fatty acid concentrations after prolonged submaximal exercise. *International Journal of Sport Nutrition*. 1996 Dec;6(4):337-47.
- Fahraeus R. The suspension stability of the blood. *Physiology Review*. 1929;9:241-74.
- Field CJ, Johnson I, Pratt VC. Glutamine e arginine: immunonutrients for improved health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000 Jul;32(7 Suppl):S377-88.
- Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil e IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*. 1993 Jul;265(1 Pt 2):R166-72.

- Finstad HS, Dyrendal H, Myhrstad MC, Heimli H, Drevon CA. Uptake e activation of eicosapentaenoic acid are related to accumulation of triacylglycerol in Ramos cells dying from apoptosis. *Journal of Lipid Research*. 2000 Apr;41(4):554-63.
- Finstad HS, Myhrstad MC, Heimli H, Lomo J, Blomhoff HK, Kolset SO, et al. Multiplication e death-type of leukemia cell lines exposed to very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Leukemia*. 1998 Jun;12(6):921-9.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation e purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957 May;226(1):497-509.
- Franc NC, White K, Ezekowitz RA. Phagocytosis e development: back to the future. *Current Opinion Immunology*. 1999 Feb;11(1):47-52.
- Gabriel H, Muller HJ, Kettler K, Brechtel L, Urhausen A, Kindermann W. Increased phagocytic capacity of the blood, but decreased phagocytic activity per individual circulating neutrophil after an ultradistance run. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1995;71(2-3):281-4.
- Gabriel H, Kindermann W. The acute immune response to exercise: what does it mean? *International Journal of Sports Medicine*. 1997 Mar;18 Suppl 1:S28-45.
- Galbo H, Stallknecht B. Regulation of fat metabolism in exercise. In: Maughan RJ, Shirreffs SM. editors. *Biochemistry of exercise IX*. Champaign: Human kinetics Publishers; 1996. p. 97-104.
- Garcia C, de Oliveira MC, Verlengia R, Curi R, Pithon-Curi TC. Effect of dexamethasone on neutrophil metabolism. *Cell Biochemistry and Function*. 2003 Jun;21(2):105-11.
- Garcia C, Pithon-Curi TC, de Lourdes Firmano M, Pires de Melo M, Newsholme P, Curi R. Effects of adrenaline on glucose e glutamine metabolism e superoxide production by rat neutrophils. *Clinical Science (Lond)*. 1999 Jun;96(6):549-55.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero MC, Garcia-Garmendia JL, Perez-Paredes C, Moyano-Del Estad MR, et al. Effects of three intravenous lipid emulsions on the survival e mononuclear phagocyte function of septic rats. *Nutrition*. 2002 Sep;18(9):751-4.
- Gennari A, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R, Corsini E. Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ e mitochondrial activity, causing oxidative stress e activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicology Applied Pharmacology*. 2000 Dec 1;169(2):185-90.
- Ghosh S, An D, Pulinilkunnil T, Qi D, Lau HC, Abrahami A, et al. Role of dietary fatty acids e acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. *Nutrition*. 2004 Oct;20(10):916-23.
- Gleeson M. Immune function in sport e exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2007 Aug;103(2):693-9.
- Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2000 Jul;301(1):33-42.
- Gorjao R, Cury-Boaventura MF, de Lima TM, Curi R. Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. *Cell Biochemistry and Function*. 2007 May-Jun;25(3):305-15.
- Gorman AM, Samali A, McGowan AJ, Cotter TG. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry*. 1997 Oct 1;29(2):97-105.
- Granger DN, Kubes P. The microcirculation e inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994 May;55(5):662-75.

Green DR. Introduction: apoptosis in the development e function of the immune system. *Seminars in Immunology*. 2003 Jun;15(3):121-3.

Hamilton S, Hamilton RJ, Sewell PA. Extraction Of Lipids Derivate Formation In: Hamilton RJH, Hamilton S, editors. *Lipid analysis: a practical approach*. London: Oxford University Press; 1992. p.54.

Hardy SJ, Ferrante A, Poulos A, Robinson BS, Johnson DW, Murray AW. Effect of exogenous fatty acids with greater than 22 carbon atoms (very long chain fatty acids) on superoxide production by human neutrophils. *Journal of Immunology*. 1994 Aug 15;153(4):1754-61.

Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grunert-Fuchs M, Speit G. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*. 1994 May;9(3):269-72.

Hasegawa H, Suzuki K, Nakaji S, Sugawara K. Analysis e assessment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- e luminol-dependent chemiluminescence. *Journal of Immunological Methods*. 1997 Dec 15;210(1):1-10.

Hatanaka E, Levada-Pires AC, Pithon-Curi TC, Curi R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, e gamma-linolenic acids in human e rat neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006 Oct 1;41(7):1124-32.

Hawley HP, Gordon GB. The effects of long chain free fatty acids on human neutrophil function e structure. *Journal of Technical Methods and Pathology*. 1976 Feb;34(2):216-22.

Healy DA, Watson RW, Newsholme P. Glucose, but not glutamine, protects against spontaneous e anti-Fas antibody-induced apoptosis in human neutrophils. *Clinical Science (Lond)*. 2002 Aug;103(2):179-89.

Healy DA, Watson RW, Newsholme P. Polyunsaturated e monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation e apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line. *Clinical Science (Lond)*. 2003 Feb;104(2):171-9.

Holly RG, Barnard RJ, Rosenthal M, Applegate E, Pritikin N. Triathlete characterization e response to prolonged strenuous competition. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1986 Feb;18(1):123-7.

Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2003 Oct;14(8):386-92.

Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, Tsai K. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2002 Mar;34(3):438-42.

Huang ZH, Hii CS, Rathjen DA, Poulos A, Murray AW, Ferrante A. N-6 e n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate translocation of protein kinase Calpha, -betaI, -betaII e -epsilon e enhance agonist-induced NADPH oxidase in macrophages. *The Biochemical Journal*. 1997 Jul 15;325 (Pt 2):553-7.

Hufnagel B, Dworak M, Soufi M, Mester Z, Zhu Y, Schaefer JR, et al. Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2Cbeta e induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2005 Jun;180(2):245-54.

Huizinga TW, van Kemenade F, Koenderman L, Dolman KM, von dem Borne AE, Tetteroo PA, et al. The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the

IgG-induced respiratory burst e IgG-induced phagocytosis. *Journal of Immunology*. 1989 Apr 1;142(7):2365-9.

Hurst NP, French JK, Gorjatschko L, Betts WH. Studies on the mechanism of inhibition of chemotactic tripeptide stimulated human neutrophil polymorphonuclear leucocyte superoxide production by chloroquine e hydroxychloroquine. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1987 Oct;46(10):750-6.

Hwang D, Rhee SH. Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999 Oct;70(4):545-56.

Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M, et al. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circulation Research*. 2003 Dec 12;93(12):1225-32.

Ishida-Okawara A, Tsuchiya T, Nuno H, Mizuno S, Suzuki K. Modulation of degranulation e superoxide generation in human neutrophils by unsaturated fatty acids of odd carbon numbers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996 Dec 12;1314(3):239-46.

Ishihara Y, Shimamoto N. Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Mar 10;281(10):6726-33.

Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *The British Journal of Nutrition*. 1978 Nov;40(3):497-504.

Jacobson MD. Reactive oxygen species e programmed cell death. *Trends in Biochemical Sciences*. 1996 Mar;21(3):83-6.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):347-54.

Jeukendrup AE, Saris WH, Wagenmakers AJ. Fat metabolism during exercise: a review--part II: regulation of metabolism e the effects of training. *International Journal of Sports Medicine*. 1998 Jul;19(5):293-302.

Jeukendrup AE, Saris WH, Wagenmakers AJ. Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization e muscle metabolism. *International Journal of Sports Medicine*. 1998 May;19(4):231-44.

Junqueira L, Carneiro J. Células do sangue. In: Carneiro J, editor. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p. 191-204.

Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis e degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004 Apr 12;1655(1-3):400-8.

Keast D, Arstein D, Harper W, Fry RW, Morton AR. Depression of plasma glutamine concentration after exercise stress e its possible influence on the immune system. *The Medical Journal of Australia*. 1995 Jan 2;162(1):15-8.

Kelley DS. Modulation of human immune e inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*. 2001 Jul-Aug;17(7-8):669-73.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

- Korge P, Honda HM, Weiss JN. Effects of fatty acids in isolated mitochondria: implications for ischemic injury e cardioprotection. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2003 Jul;285(1):H259-69.
- Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, Warchol JB. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reproductive Biomedicine Online*. 2008 May;16(5):657-63.
- Korkia PK, Tunstall-Pedoe DS, Maffulli N. An epidemiological investigation of training e injury patterns in British triathletes. *British Journal of Sports Medicine*. 1994 Sep;28(3):191-6.
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.
- Kroemer G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie*. 2002 Feb-Mar;84(2-3):103-4.
- Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death and Differentiation*. 1998 Jun;5(6):547.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis e necrosis. *Annual Review of Physiology*. 1998;60:619-42.
- Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva EP, Doi SQ, Curi R, et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2004 Feb;36(2):210-7.
- Lakier Smith L. Overtraining, excessive exercise, e altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports Medicine*. 2003;33(5):347-64.
- Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis e prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993 Oct;54(4):283-8.
- Levada-Pires AC, Lambertucci RH, Mohamad M, Hirabara SM, Curi R, Pithon-Curi TC. Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. *European Journal of Applied Physiology*. 2007 May;100(2):153-60.
- Libicz S, Mercier B, Bigou N, Le Gallais D, Castex F. Salivary IgA response of triathletes participating in the French Iron Tour. *International Journal of Sports Medicine*. 2006 May;27(5):389-94.
- Lima TM, Kanunfre CC, Pompeia C, Verlengia R, Curi R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat e Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicology in vitro*. 2002 Dec;16(6):741-7.
- Llor X, Pons E, Roca A, Alvarez M, Mane J, Ferneez-Banares F, et al. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid e linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical Nutrition*. 2003 Feb;22(1):71-9.
- Lopes LR, Hoyal CR, Knaus UG, Babior BM. Activation of the leukocyte NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999 May 28;274(22):15533-7.
- Lund P. Determination of glutamine with glutaminase e glutamate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press; 1974. vol. 4, p. 1719-1722.
- Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms e regulation. *American Journal of Hematology*. 2008 Apr; 83(4):288-95.

Macha M, Shlafer M, Kluger MJ. Human neutrophil hydrogen peroxide generation following physical exercise. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1990 Dec;30(4):412-9.

MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity e performance in athletes. *Immunology and Cell Biology*. 2000 Oct;78(5):502-9.

Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2004 Feb;11(2):143-53.

Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematologica*. 2004;111(1-2):56-66.

Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1987-95.

Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Dickinson AM. Gamma-linolenic acid induces apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Leukemia and Lymphoma*. 2001 Jan;40(3-4):393-403.

Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival e apoptosis in the immune system. *Arthritis Research*. 2002;4 Suppl 3:S243-52.

Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998 Aug 19;249(2):366-70.

Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells e cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996 Nov 15;271(46):28753-6.

Martins de Lima T, Gorjao R, Hatanaka E, Cury-Boaventura MF, Portioli Silva EP, Procopio J, et al. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. *Clinical Science (Lond)*. 2007 Jul;113(2):65-77.

Martins EF, Torres RP, Maluf LMP, Mancini J, Nishiyama A, Peres CM, et al. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos graxos por cromatografia. In: Curi R, Pompeia C, Miyasaka CK, Procopio J, editors. *Entendendo a gordura Os ácidos graxos*. Barueri: Manole; 2002. p. 34-41.

Mason DY, Cramer EM, Masse JM, Crystal R, Bassot JM, Breton-Gorius J. Alpha 1-antitrypsin is present within the primary granules of human polymorphonuclear leukocytes. *The American Journal of Pathology*. 1991 Sep;139(3):623-8.

Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001 Oct 1;31(7):911-22.

Mayer B, Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News in Physiology Sciences*. 2003 Jun;18:89-94.

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell*. 2003 Mar;11(3):577-90.

Mironova GD, Gateau-Roesch O, Levrat C, Gritsenko E, Pavlov E, Lazareva AV, et al. Palmitic e stearic acids bind Ca²⁺ with high affinity e form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to Ca²⁺-activated mitochondrial pores. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2001 Aug;33(4):319-31.

- Mochida N, Umeda T, Yamamoto Y, Tanabe M, Kojima A, Sugawara K, et al. The main neutrophil e neutrophil-related functions may compensate for each other following exercise-a finding from training in university judoists. *Luminescence*. 2007 Jan-Feb;22(1):20-8.
- Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C, et al. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase e gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *The Biochemical Journal*. 1997 Nov 1;327 (Pt 3):917-23.
- Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive e moderate exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2002 Jul;93(1):147-53.
- Mooren FC, Lechtermann A, Volker K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2004 Sep;36(9):1476-83.
- Morgan CP, Sengelov H, Whatmore J, Borregaard N, Cockcroft S. ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles e mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils. *The Biochemical Journal*. 1997 Aug 1;325 (Pt 3):581-5.
- Moriuchi H, Zaha M, Fukumoto T, Yuizono T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Medicine*. 1998 Jul;24(7):709-15.
- Morozov VI, Pryatkin SA, Kalinski MI, Rogozkin VA. Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase e lysozyme release from blood neutrophils. *European Journal of Applied Physiology*. 2003 May;89(3-4):257-62.
- Morozov VI, Usenko TN, Rogozkin VA. Neutrophil antiserum response to decrease in proteolytic activity in loaded rat muscle. *European Journal of Applied Physiology*. 2001 Mar;84(3):195-200.
- Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines e correlation with cell survival. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2495-502.
- Mudd J, McCutcheon M, Lucke B. *Phagocytosis and Phisiology Review*. 1934;14:210.
- Muns G. Effect of long-distance running on polymorphonuclear neutrophil phagocytic function of the upper airways. *International Journal of Sports Medicine*. 1994 Feb;15(2):96-9.
- Narayanan PK, Ragheb K, Lawler G, Robinson JP. Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997 Apr;61(4):481-8.
- Ndozangue-Touriguine O, Hamelin J, Breard J. Cytoskeleton e apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 2008 Apr 1.
- Newsholme EA. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained e overtrained athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 1994 Oct;15 Suppl 3:S142-7.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid e simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining e flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991 Jun 3;139(2):271-9.
- Nieman DC. Exercise immunology: future directions for research related to athletes, nutrition, e the elderly. *International Journal of Sports Medicine*. 2000 May;21 Suppl 1:S61-8.
- Nieman DC. Exercise, infection, e immunity. *International Journal of Sports Medicine*. 1994 Oct;15 Suppl 3:S131-41.

Nieman DC. Exercise, upper respiratory tract infection, e the immune system. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1994 Feb;26(2):128-39.

Nieman DC. Is infection risk linked to exercise workload? *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000 Jul;32(7 Suppl):S406-11.

Nieman DC. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunology and Cell Biology*. 2000 Oct;78(5):496-501.

Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A, et al. Vitamin E e immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2004 Aug;36(8):1328-35.

Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW, Arabatzis K. Infectious episodes in runners before e after the Los Angeles Marathon. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1990 Sep;30(3):316-28.

Nishiyama-Naruke A, Junior. S, Carnelos M, Curi R. HPLC determination of underivatized fatty acid saponified at low temperature analyses of fatty acids in oils e tissues. *Analytical Letters*. 1998;31:2565-76.

O'Toole ML, Douglas PS. Applied physiology of triathlon. *Sports Medicine*. 1995 Apr;19(4):251-67.

Ortega E. Physiology e biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. *International Journal of Sports Medicine*. 1994;15:172-8.

Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *The Journal of Endocrinology*. 2004 Jul;182(1):145-56.

Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis e palmitate-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Feb 7;272(6):3324-9.

Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation e respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exercise Immunology Review*. 2002;8:49-100.

Peake JM, Suzuki K, Hordern M, Wilson G, Nosaka K, Coombes JS. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity e muscle damage. *European Journal of Applied Physiology*. 2005 Dec;95(5-6):514-21.

Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Hordern M, Nosaka K, Mackinnon L, et al. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, e markers of neutrophil activation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2005 May;37(5):737-45.

Pedersen BK, Bruunsgaard H. How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Medicine*. 1995 Jun;19(6):393-400.

Pedersen BK, Ullum H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1994 Feb;26(2):140-6.

Pereira B, Rosa LF, Safi DA, Bechara EJ, Curi R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, e glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 1995 Dec 22;50(12):2093-8.

Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis e exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2001 Mar;33(3):393-6.

Pilane CM, LaBelle EF. cPLA2 activator peptide, PLAP, increases arachidonic acid release e apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2004 Jan;198(1):48-52.

Pires J, Curi R, Otton R. Induction of apoptosis in rat lymphocytes by starvation. *Clinical Science (Lond)*. 2007 Jan;112(1):59-67.

Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production e the expression of p47phox, p22phox e gp91phox in rat neutrophils. *Clinical Science (Lond)*. 2002 Oct;103(4):403-8.

Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *American Journal of Physiology*. 2003 Jun;284(6):C1355-61.

Pithon-Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell Biochemistry and Function*. 2002 Jun;20(2):81-6.

Pizza FX, Mitchell JB, Davis BH, Starling RD, Holtz RW, Bigelow N. Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte e lymphocyte subsets. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1995 Mar;27(3):363-70.

Pompeia C, Cury-Boaventura MF, Curi R. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. *Brazilian Journal of Medical e Biological Research*. 2003 Nov;36(11):1549-60.

Pompeia C, Freitas JJ, Kim JS, Zyngier SB, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress e eicosanoid synthesis. *Biology of the Cell*. 2002 Sep;94(4-5):251-65.

Pompeia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procopio J, Sannomiya P, Curi R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian Journal of Medical e Biological Research*. 2000 Nov;33(11):1255-68.

Poulos A, Robinson BS, Ferrante A, Harvey DP, Hardy SJ, Murray AW. Effect of 22-32 carbon n-3 polyunsaturated fatty acids on superoxide production in human neutrophils: synergism of docosahexaenoic acid with f-met-leu-phe e phorbol ester. *Immunology*. 1991 May;73(1):102-8.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*. 2003 Feb 1;283(1):1-16.

Pruett ED. FFA mobilization during e after prolonged severe muscular work in men. *Journal of Applied Physiology*. 1970 Dec;29(6):809-15.

Puttmann M, Krug H, von Ochsenstein E, Kattermann R. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clinical Chemistry*. 1993 May;39(5):825-32.

Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Medicine*. 1994 Apr;17(4):245-58.

Pyne DB, Baker MS, Smith JA, Telford RD, Weidemann MJ. Exercise e the neutrophil oxidative burst: biological e experimental variability. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1996;74(6):564-71.

Pyne DB, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ. Neutrophil oxidative activity is differentially effected by moderate e intense interval exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1993;25:S102.

- Pyne DB, Gleeson M. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 1998 Jul;19 Suppl 3:S183-91; discussion S91-4.
- Quadrilatero J, Hoffman-Goetz L. N-acetyl-L-cysteine inhibits exercise-induced lymphocyte apoptotic protein alterations. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2005 Jan;37(1):53-6.
- Quadrilatero J, Hoffman-Goetz L. N-Acetyl-L-cysteine prevents exercise-induced intestinal lymphocyte apoptosis by maintaining intracellular glutathione levels e reducing mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004 Jul 2;319(3):894-901.
- Ren Y, Savill J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *Journal of Immunology*. 1995 Mar 1;154(5):2366-74.
- Robson PJ, Blannin AK, Walsh NP, Castell LM, Gleeson M. Effects of exercise intensity, duration e recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 1999 Feb;20(2):128-35.
- Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2003 Nov;5(14):1307-15.
- Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1967 Apr;69(4):696-705.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2007 Jan;9(1):49-89.
- Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. *In vitro* effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst e viability. *Journal of Dairy Science*. 2006 Jan;89(1):147-54.
- Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, et al. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2557-64.
- Scheinichen D, Jankowski M, Ruschulte H, Juttner B, Kleine HD, Meyer zu Vilsendorf A, et al. Lack of influence of omega-3 fatty acid-enriched lipids on apoptosis e secondary necrosis of cultured human lymphocytes. *Nutrition*. 2003 May;19(5):441-5.
- Schroit AJ, Gallily R. Macrophage fatty acid composition e phagocytosis: effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. *Immunology*. 1979 Feb;36(2):199-205.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *Journal of Immunology*. 1993 Feb 15;150(4):1535-43.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M, Borregaard N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *Journal of Immunology*. 1994 Jul 15;153(2):804-10.
- Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*. 2006 Mar 18;534(1-3):1-11.
- Shephard RJ. Adhesion molecules, catecholamines e leucocyte redistribution during e following exercise. *Sports Medicine*. 2003;33(4):261-84.

- Shephard RJ, Verde TJ, Thomas SG, Shek P. Physical activity e the immune system. *Canadian Journal of Sport Sciences*. 1991 Sep;16(3):169-85.
- Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity e diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Mar 3;95(5):2498-502.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, et al. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Feb 17;95(4):1455-9.
- Shinkai S, Kurokawa Y, Hino S, Hirose M, Torii J, Watanabe S, et al. Triathlon competition induced a transient immunosuppressive change in the peripheral blood of athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1993 Mar;33(1):70-8.
- Siddiqui RA, Jensi LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001 Jan 15;1499(3):265-75.
- Singh A, Failla ML, Deuster PA. Exercise-induced changes in immune function: effects of zinc supplementation. *Journal of Applied Physiology*. 1994 Jun;76(6):2298-303.
- Sleivert GG, Rowles DS. Physical e physiological factors associated with success in the triathlon. *Sports Medicine*. 1996 Jul;22(1):8-18.
- Smith JA, Gray AB, Pyne DB, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ. Moderate exercise triggers both priming e activation of neutrophil subpopulations. *The American Journal of Physiology*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):R838-45.
- Smith JA, Telford RD, Mason IB, Weidemann MJ. Exercise, training e neutrophil microbicidal activity. *International Journal of Sports Medicine*. 1990 Jun;11(3):179-87.
- Spratt MG, Kratzing CC. Oleic acid as a depressant of reticuloendothelial activity in rats e mice. *Journal of the Reticuloendothelial Society*. 1975 Mar;17(3):135-40.
- Steensberg A, Morrow J, Toft AD, Bruunsgaard H, Pedersen BK. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis e F2-isoprostanes. *European Journal of Applied Physiology*. 2002 May;87(1):38-42.
- Stillwell W, Shaikh SR, Zerouga M, Siddiqui R, Wassall SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reproduction, Nutrition, Development*. 2005 Sep-Oct;45(5):559-79.
- Sudo C, Ogawara H, Saleh AW, Nishimoto N, Utsugi T, Ooyama Y, et al. Clinical significance of neutrophil apoptosis in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus. *Laboratory Hematology*. 2007;13(3):108-12.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Liu Q, Kurakake S, Okamura N, et al. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine e neutrophil responses. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2003 Feb;35(2):348-55.
- Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, e muscle damage. *Journal of Applied Physiology*. 1999 Oct;87(4):1360-7.
- Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *The Journal of Nutrition*. 2001 Jul;131(7):1918-27.

Thompson MA, Rosenthal MA, Ellis SL, Friend AJ, Zorbas MI, Whitehead RH, et al. c-Myb down-regulation is associated with human colon cell differentiation, apoptosis, e decreased Bcl-2 expression. *Cancer Research*. 1998 Nov 15;58(22):5168-75.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure e some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*. 1969 Mar;22(2):158-61.

Tripathi P, Hildeman D. Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis*. 2004 Sep;9(5):515-23.

Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, et al. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001 Dec 1;31(11):1465-72.

Ulloth JE, Casiano CA, De Leon M. Palmitic e stearic fatty acids induce caspase-dependent e -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 2003 Feb;84(4):655-68.

Umeda T, Yamai K, Takahashi I, Kojima A, Yamamoto Y, Tanabe M, et al. The effects of a two-hour judo training session on the neutrophil immune functions in university judoists. *Luminescence*. 2008 Jan-Feb;23(1):49-53.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.

Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, Gleeson M. Glutamine, exercise e immune function. Links e possible mechanisms. *Sports Medicine*. 1998 Sep;26(3):177-91.

Wang JS, Huang YH. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *European Journal of Applied Physiology*. 2005 Oct;95(4):290-7.

Weiss J, Olsson I. Cellular e subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood*. 1987 Feb;69(2):652-9.

Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Erews SR, Erdjument-Bromage H, et al. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- e Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*. 2002 Mar 22;108(6):809-21.

Wigernaes I, Hostmark AT, Stromme SB, Kierulf P, Birkele K. Active recovery e post-exercise white blood cell count, free fatty acids, e hormones in endurance athletes. *European Journal of Applied Physiology*. 2001 Apr;84(4):358-66.

Wilhelm DL. Inflammation and Healing. In: Anderson WAD, Kissane JM, editors. *Pathology*. 7th ed. St. Louis: C.V. Mosby; 1977. p. 25-89.

Wilmore JH, Costill DL. Quantificação do treinamento esportivo. In: Wilmore JH, Costill DL, editors. *Fisiologia do esporte e exercício*. Barueri: Manole; 2001. p. 395-6.

Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*. 1985;1(1):43-9.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions e pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2000 May;80(5):617-53.

Wolach B, Falk B, Gavrieli R, Kodesh E, Eliakim A. Neutrophil function response to aerobic e anaerobic exercise in female judoka e untrained subjects. *British Journal of Sports Medicine*. 2000 Feb;34(1):23-8.

Wolach B, Gavrieli R, Ben-Dror SG, Zigel L, Eliakim A, Falk B. Transient decrease of neutrophil chemotaxis following aerobic exercise. *Medicine and Science in sports and Exercise*. 2005 Jun;37(6):949-54.

Wolach B, Sonnenschein D, Gavrieli R, Chomsky O, Pomeranz A, Yuli I. Neonatal neutrophil inflammatory responses: parallel studies of light scattering, cell polarization, chemotaxis, superoxide release, e bactericidal activity. *American Journal of Hematology*. 1998 May;58(1):8-15.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. 1980;68:251-306.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1129-32.

Yaqoob P. Monounsaturated fats e immune function. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1998 Nov;57(4):511-20.

Zhao X, Bey EA, Wientjes FB, Cathcart MK. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity. cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67(phox) e p47(phox). *The Journal of Biological Chemistry*. 2002 Jul 12;277(28):25385-92.

Zheng L, Zomerdijk TP, Van Den Barselaar MT, Geertsma MF, Van Furth R, Nibbering PH. Arachidonic acid, but not its metabolites, is essential for FcgammaR-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *Immunology*. 1999 Jan;96(1):90-7.