

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA

FELIPE AVILA

**IMPORTÂNCIA DOS RECEPTORES
COLINÉRGICOS E DE GLICOCORTICÓIDES
SOBRE A INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO
EXERCÍCIO AGUDO DURANTE 72 HORAS DE
RECUPERAÇÃO.**

SANTOS

2016

FELIPE AVILA

**IMPORTÂNCIA DOS RECEPTORES
COLINÉRGICOS E DE GLICOCORTICÓIDES
SOBRE A INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO
EXERCÍCIO AGUDO DURANTE 72 HORAS DE
RECUPERAÇÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos curriculares para a obtenção do título de bacharel em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatili dos Santos

Co-orientador: Prof. Ms. André Minari

SANTOS

2016

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe e meus irmãos. Dedico também à minha namorada Talita. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Agradecimentos

Primeiro, gostaria de agradecer a todos os educadores que fizeram parte da minha formação como pessoa e como aluno, entre eles estão: meus professores e técnicos. Mas em especial, gostaria de agradecer a professora Ivone Tokugawa, professora que me ensinou grandes valores, e que ensinar e a educação vão muito além da sala de aula.

Agradeço a instituição UNIFESP, por prover os subsídios para que eu cursasse este curso. E a todo o corpo docente, que sem dúvida, é um dos melhores do país na área de Educação Física, agradeço a todos vocês, sem exceção.

Agradeço também aqueles que me deram força em toda a caminhada, não só desta graduação, mas de toda a vida, esses, são os que eu chamo de amigos e que eu sei que estarão comigo até o final desta jornada, estejam eles em São Paulo, Santos ou São José dos Campos, onde estiverem e onde eu esteja, sem importar a distância, sei que estamos juntos.

Importante agradecer também a um seleto grupo de amigos, aqueles de um grupo de Whatsapp, um tal de “parças”. Os anos de faculdade aqui foram muito melhores tendo vocês ao meu lado, dividindo todas as experiências que a faculdade poderia me proporcionar. Vocês moram no meu coração.

Sou grato ao grupo PET- Educação Física, por ter sido algo norteador ao longo da minha graduação, e junto ao grupo eu agradeço aos tutores Ricardo Guerra e Sionaldo, vocês fizeram parte da minha formação quanto aluno e pessoa.

Aos meus orientadores, claro, Ronaldo e André, que me aturaram e tiveram paciência com a minha “veloz prontidão” em realizar minhas tarefas, este trabalho é de vocês também. Vocês representam a minha iniciação dentro da produção acadêmica e iniciação científica, sou realmente grato a vocês por isso.

Não podia deixar de lembrar, de todos os meus queridos amigos do laboratório de Fisiologia da Nutrição, eu sou imensamente grato pela forma como vocês me receberam e pela paciência em me ensinar, vocês foram a melhor parte deste trabalho. Em especial, a professora Lila, obrigado pelos feriados e finais de semana comigo no laboratório, obrigado por ter me ensinado sempre com cuidado e a mais boa vontade, mesmo sem ter estas obrigações. Vocês são especiais para mim.

Obrigado, Atlético, por me permitir defender as cores e o sangue Verde e Roxo em tantas competições até aqui, isto foi parte marcante da minha graduação. E com isso, gostaria de agradecer a todos os colegas de time que eu tive o prazer de dividir a quadra.

A minha família, é extremamente difícil achar palavras que representam a importância de vocês para mim. Em especial, eu gostaria de agradecer ao meu avô Miguel, grande parte do homem que eu sou hoje eu devo ao senhor, sinto a sua falta.

Aos meus irmãos, vocês são parte fundamental de mim, e por mais que eu queira matá-los em grande parte do tempo, a companhia de vocês preenche os meus dias desde que eu nasci, e assim vai se estender até o dia que eu me for. Lucas, obrigado por ter sido meu companheiro de quarto aqui em Santos, você tornou esta experiência especial. Amo vocês.

Aos meus pais, afinal, eles me botaram no Mundo, certo? Em especial a minha mãe, que é uma incrível e forte mulher, que me criou e foi provedora de todo o meu sustento, sem você NADA do que fiz até hoje teria sido realizado, você é um exemplo para mim de dedicação e talento, nós sabemos, brigamos as vezes pois eu sou parecido com você, e agradeço a Deus por isso, eu te amo.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a você, Talita, você tem sido ao longo desses anos minha maior e melhor companhia, dividimos juntos tantas experiências, você me deu força e me inspirou dia após dia ao longo da minha caminhada. Eu te amo e te agradeço por tudo que você fez por mim até aqui.

Epígrafe

“... viver, viver e ser livre. Saber dar valor para as coisas mais simples, só o amor constrói pontes indestrutíveis...”

CBJR.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a quantificação dos receptores colinérgicos e de glicocorticoides no músculo tríceps de camundongos e seu possível papel na modulação da resposta inflamatória no músculo, com ênfase na resposta mediada pelos macrófagos e sua mudança fenotípica, após sessão aguda de exercício físico *Downhill* em esteira. As proteínas GR, ACH α 7, F4/80 e CD11b foram quantificadas pelo método *Western Blotting*. A citocina IL-6 foi analisada por Multiplex. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Para as análises comparativas foi adotado ANOVA de uma via com Tukey's post hoc test. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e normalizada pelo Z-score quando necessário. Não foram observadas diferenças estatísticas para as proteínas F4/80, CD11b e GR. Para a proteína ACH α 7r foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo G72 para os grupos G0 e G24 (P= 0,009 e P=0,05 respectivamente). Para a produção de citocina IL-6 foram encontradas diferenças significativas no G72 em relação a todos os outros grupos (Ctrl: P= 0,001; G0: P= 0,000; G24: P= 0,001; e G48: P= 0,011). A partir dos resultados e da nossa discussão nós podemos concluir que não foi possível observar diferenças significativas nas quantificações das proteínas F4/80, CD11b e GR. Todavia sugerimos que a via colinérgica anti-inflamatória aparenta ter papel na modulação da resposta imune após lesão muscular gerada pelo exercício físico *Downhill*, tendo aumento significativo no G72 em relação aos grupos G0 e G24.

Palavras-Chaves: Macrófagos, Exercício *Downhill*, Resposta Imune, Inflamação, Colinérgica.

ABSTRACT

This study aimed at the analysis of cholinergic receptors in the triceps muscle of mice and its possible role in the modulation of the inflammatory response in the muscle, with emphasis on the macrophages mediated response and its phenotypic change, after acute treadmill exercise. The GR, ACH α 7r, F4/80 and CD11b proteins were quantified by the Western Blotting method. IL-6 cytokine was analyzed by Multiplex. The results were expressed as \pm standard deviation. All data were expressed as mean and standard deviation. For comparative analyzes, one-way ANOVA was adopted with Tukey's post hoc test. The data distribution was verified by the Kolmogorov-Smirnov test, and normalized by Z-score when necessary. No statistical differences were observed for the F4/80, CD11b and GR proteins. For the ACH α 7r protein, statistical differences were observed between the G72 group for the G0 and G24 groups ($P = 0.009$ and $P = 0.05$, respectively). For the IL-6 cytokine production, significant differences were found in G72 in relation to all the other groups (Ctrl: $P = 0.001$, G0: $P = 0.000$, G24: $P = 0.001$, and G48: $P = 0.011$).

Keywords: Macrophages, Downhill Exercise, Immune Response, Inflammation, Cholinergic.

Lista de ilustrações

Gráfico 1 - Quantificação Proteica F4/80	18
Gráfico 2 - Quantificação Proteica GR	18
Gráfico 3 - Quantificação Proteica CD11b	19
Gráfico 4 - Quantificação Proteica ACH α 7r	19
Gráfico 5 - IL-6	20

SUMÁRIO

<u>1 - INTRODUÇÃO</u>	8
<u>2 – OBJETIVO</u>	14
<u>3 - MÉTODOS</u>	15
<u>3.1 - Seleção dos Animais:</u>	15
<u>3.2 - Grupos experimentais:</u>	15
<u>3.3 - Procedimentos experimentais:</u>	16
<u>3.3.1 - Protocolo de exercício físico agudo extenuante em esteira:</u>	16
<u>3.3 - Eutanásia dos animais</u>	16
<u>3.3.3 - Coleta de sangue:</u>	16
<u>3.3.4 - Retirada dos músculos:</u>	16
<u>3.4 - Análises experimentais</u>	16
<u>3.4.1 - Western Blot:</u>	16
<u>3.4.2 – ELISA</u>	18
<u>3.4.3 - Análise Estatística:</u>	18
<u>3 – RESULTADOS</u>	19
<u>4 – DISCUSSÃO</u>	22
<u>5 – CONCLUSÃO</u>	25
<u>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	26
<u>ANEXOS</u>	27

1 - INTRODUÇÃO

Durante a minha trajetória no curso de Educação Física na Universidade Federal de São Paulo - Campus Baixada Santista fui apresentado a possibilidade de produzir conhecimento e no futuro seguir minha formação dentro da área acadêmica. Essa possibilidade me despertou interesse em realizar uma iniciação científica, e por ter mais proximidade com as áreas oriundas das ciências biológicas pude me aproximar desta temática junto ao professor orientador do presente estudo, que tem como objetivo principal analisar a resposta imune e a mudança fenotípica da população de macrófagos após sessão aguda de exercício físico extenuante no músculo esquelético de camundongos C57BL/6.

O entendimento da participação das células do sistema imunológico nos processos de lesão e regeneração muscular é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que minimizem os efeitos colaterais e potencialize seus efeitos regenerativos. Este conhecimento pode ser utilizado pelo profissional de educação física como ferramenta para a periodização e controle das cargas. Além disso, este entendimento gera informações valiosas no que diz respeito aos mecanismos de atrofia e hipertrofia muscular implicados em algumas doenças, como a consequente diminuição de músculo em distrofias musculares, doenças inflamatórias crônicas, dentre outras. Apesar desta temática já ter sido alvo de muitos estudos, a literatura científica ainda carece de mais estudos que busquem avaliar quais são as moléculas envolvidas no processo de recrutamento, proliferação e mudança fenotípica dos macrófagos residentes no músculo esquelético logo após uma sessão aguda de exercício físico.

O interesse na prática do exercício físico visando a busca por padrões estéticos e também por melhora da qualidade de vida tem aumentado nos últimos anos, esta muitas vezes é realizada sem o devido acompanhamento de um profissional capacitado para a elaboração e acompanhamento das mesmas (BENNELL e CROSSLEY, 1996; SANTOS e KNIJNIK, 2009). A referida prática sem acompanhamento profissional desencadeia em estratégias que não seriam indicadas e colocam em cheque a saúde e o bem-estar do praticante. Neste cenário é comum o uso de fármacos anti-inflamatórios pós exercício sem a devida orientação, o que pode atrapalhar a resposta do sistema imune, que tem se mostrado essencial para a regeneração muscular (DE SOUZA, *et al* 2015).

O sistema imune é o principal sistema de defesa do organismo, sendo constituído por diversas células oriundas da medula óssea que passam por diferenciações até atingir sua maturação final (ENNACIRI e GIRARD, 2009). Células mielóides e células linfóides são os dois principais tipos celulares deste sistema (ENNACIRI e GIRARD, 2009). De origem mielóide, macrófagos são

responsáveis pela identificação, apresentação e eliminação de diversos tipos de vírus e bactérias. Por meio destas funções, os macrófagos são encarregados de interligar a resposta imune inata à resposta imune adaptativa (ABDELSADIK e TRAD, 2011; GEISSMANN *et al.*, 2010).

No músculo esquelético, macrófagos participam ativamente dos processos de lesão e regeneração. No músculo esquelético de camundongos em repouso existem cerca de 200 macrófagos por miligrama de tecido muscular (ARNOLD *et al.*, 2007). Após lesão induzida por veneno de cobra (notexina), seu número pode aumentar de 10 a 15 vezes nas primeiras 24 horas (ARNOLD *et al.*, 2007).

Nestas primeiras 24 horas, monócitos são recrutados da corrente sanguínea e se diferenciam nos tecidos em macrófagos residentes. Após seu recrutamento, macrófagos aumentam a liberação de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de oxigênio e os ânions superóxido (WOODS, LU e LOWDER, 2000). A liberação destas substâncias, além de aumentar o perfil pró-inflamatório local, também promove dano muscular secundário, etapa fundamental para desencadear o início da limpeza tecidual através do processo fagocítico (CHAZAUD *et al.*, 2009). A fagocitose é responsável pela remoção das células musculares lesadas, a fim de estimular posteriormente a criação de um ambiente “limpo”, propício para a proliferação de novas fibras musculares (ARNOLD *et al.*, 2007; CHAZAUD *et al.*, 2009).

Além de exibir funções celulares isoladas, como a lesão secundária e aumento da fagocitose, os macrófagos recrutados também são responsáveis por interagir com mioblastos, refinando de forma coordenada os processos de proliferação e diferenciação celular (CHAZAUD *et al.*, 2009). A princípio, macrófagos do tipo M1I liberam citocinas que aumentam sua comunicação com mioblastos (via célula-a-célula), motivando as reações de proliferação celular, garantindo o número necessário de células indiferenciadas que irão se tornar células musculares maduras posteriormente (CHAZAUD *et al.*, 2009).

Contudo, com o decorrer deste processo, os macrófagos são responsáveis não só pela limpeza local de células musculares necrosadas, mas também exibem papel chave na modulação de células miogênicas, culminando na criação de um microambiente potencialmente regenerativo. Neste sentido, podemos observar um período de transição, ou um período em que ocorre a polarização de macrófagos (ARNOLD *et al.*, 2007; CHAZAUD *et al.*, 2003; CHAZAUD *et al.*, 2009).

Através das mesmas interações célula-a-célula ocasionadas nas fases iniciais entre macrófagos e células miogênicas, neste período de transição é observada a diminuição da atividade de fagocitose e de proliferação miogênica, dando lugar a dois fenômenos distintos: mudança fenotípica de macrófagos para o perfil tipo M2 e diminuição da proliferação de mioblastos,

aumentando os processos de diferenciação (ARNOLD *et al.*, 2007; CHAZAUD *et al.*, 2003; CHAZAUD *et al.*, 2009).

Estas características referentes a regeneração muscular também podem ser observadas após sessão de exercício físico, pois, o exercício é capaz de gerar danos teciduais no músculo esquelético (CHAUZAD, 2015), principalmente após exercícios extenuantes ou de contração excêntrica, esse dano local é capaz de desencadear resposta inflamatória, que resulta na liberação de substâncias como as citocinas e as quimiocinas. (MALM *et al.*, 2000)

Podemos enxergar a inflamação decorrente do exercício físico como um processo natural e necessário para a regeneração muscular (CHAUZAD, 2015). Esse processo envolve inúmeras células do sistema imune, dentre elas pode-se destacar o papel dos macrófagos, que são encontrados em grandes quantidades em diferentes fases do processo inflamatório durante regeneração muscular (CHAUZAD, 2015). Além disso, a presença do infiltrado de macrófagos no músculo esquelético após exercício físico já foi demonstrada em diferentes modelos e protocolos desenvolvidos em animais (CHAUZAD, 2015).

Apesar de alguns estudos abordarem o tema, ainda pouco se sabe como a polarização de macrófagos é mediada no músculo esquelético após lesões musculares, sendo necessário esclarecer de forma mais adequada como a liberação de moléculas, como, por exemplo, as quimiocinas, fatores de crescimento e fatores neuroendócrinos, afetam esta mudança fenotípica (SACLIER, *et al.*, 2013).

Durante os processos lesão e regeneração muscular, além de ocorrer apolarização de macrófagos, outros mecanismos são responsáveis por modular as respostas inflamatórias locais, como a ação conjunta do sistema neuroendócrino. (TRACEY, 2007). Após um evento lesivo, é desencadeada a liberação de diversas substâncias inflamatórias locais, como IL-1 β e TNF- α , que além de recrutar células inflamatórias têm um papel importante em estimular receptores neuronais periféricos. A estimulação destes receptores neuronais transmite sinais aferentes que levam informações até o núcleo do trato solitário no sistema nervoso central, que por sua vez ativa resposta eferente vagal autorreflexiva, inibindo a resposta inflamatória (TRACEY, 2007).

Sabe-se que a ativação desta resposta é mediada pela liberação local de acetilcolina, que inibe a liberação de TNF- α e IL-1 β , via inibição da via transcricional NF κ B (WANG, *et al.*, 2004; TRACEY, 2007). Entretanto, apesar deste mecanismo funcionar de forma rápida e reflexa, nem sempre a ação anti-inflamatória da acetilcolina é suficiente para a resolução da resposta pró-inflamatória. Quando ocorre a ativação inflamatória de maior magnitude, ou em ativação crônica, a contínua liberação de TNF- α e IL-1 β , motiva a estimulação do trato solitário a se comunicar com regiões específicas do hipotálamo, como o núcleo parvoventricular. A estimulação deste núcleo

estimula o hipotálamo a secretar CRH no sistema porta hipofisário, que por sua vez estimula a secreção sanguínea de ACTH. A liberação de ACTH estimula a secreção de glicocorticoides pelo córtex da adrenal, responsável também por inibir a resposta inflamatória local, também pela inibição da via do NFkB (KAGOSHIMA, *et al.* 2003; TRACEY, 2007).

Nesse sentido, o problema que se busca responder neste estudo é: qual o comportamento dos receptores colinérgicos e de glicocorticóides após sessão de exercício agudo Downhill, e qual seu possível papel no controle da resposta inflamatória local em camundongos C57BL/6?

2 – OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo quantificar os receptores colinérgicos e de glicocorticóides sobre a inflamação induzida por sessão aguda de exercício físico *Downhill* em camundongos C57BL/6.

2.1 – Objetivos específicos

1 - Quantificar as proteínas GR, F4/80, CD11b e ACh α 7r no músculo esquelético de camundongos C57BL/6, pelo método *Western Blotting*.

2 – Quantificar a citocina IL-6 no músculo esquelético de camundongos C57BL/6, pelo método ELISA.

3 - MÉTODO

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA) sob o número de protocolo 0969/11.

3.1 - Seleção dos Animais:

Foram utilizados para o estudo 24 camundongos machos da linhagem C57BL/6, provenientes do biotério central da UNIFESP, com 2 meses de idade mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) no biotério do Departamento de Psicobiologia (UNIFESP), Campus São Paulo, sendo a sala mantida em ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do período claro às 07h00 da manhã. A temperatura e umidade relativa do ar foram controladas em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ de umidade local, respectivamente, e os animais tiveram acesso à água e ração ad libitum. Os animais foram agrupados de maneira randomizada em 6 grupos: sendo 1 grupos controle e 5 grupos experimentais, conforme apresentado a seguir.

3.2 - Grupos experimentais:

Grupo Controle (Ctrl n=4): grupo cujos animais não realizaram E.F excêntrico *downhill* e foram submetidos à eutanásia 48 horas após o final do protocolo, simultaneamente ao G0;

Grupo Exercício 0 horas (G0 n= 6): grupo cujos animais realizaram uma sessão aguda de E.F excêntrico *downhill* e foram submetidos à eutanásia 24 horas após o final do protocolo;

Grupo Exercício 24 horas (G24 n= 5): grupo cujos animais realizaram uma sessão aguda de E.F excêntrico *downhill* e foram submetidos à eutanásia 24 horas após o final do protocolo;

Grupo Exercício 48 horas (G48 n= 5): grupo cujos animais realizaram uma sessão aguda de E.F excêntrico *downhill* e foram submetidos à eutanásia 36 horas após o final do protocolo.

Grupo Exercício 72 horas (G48 n= 4): grupo cujos animais realizaram uma sessão aguda de E.F excêntrico *downhill* e foram submetidos à eutanásia 48 horas após o final do protocolo.

3.3 - Procedimentos experimentais:

O estudo foi dividido em quatro etapas: privação de alimentos nas 6 horas que antecedem a eutanásia, aplicação do protocolo de exercício físico agudo, eutanásia com a conseguinte coleta do sangue e dos tecidos e a análise experimental.

3.3.1 - Protocolo de exercício físico *downhill* em esteira:

O protocolo de E.F agudo *downhill* foi adaptado de Armstrong, Ogilvie, Schwane (1983). O ensaio experimental consistiu em duas etapas: etapa de adaptação motora e a etapa de E.F excêntrico *downhill*. A primeira etapa consistiu em adaptar os animais 5 vezes por semana, por 1 semana, sendo cada sessão diária composta por 10 min., velocidade de 10m/min. sem inclinação. Já a sessão de E.F excêntrico *downhill* ocorreu após a semana de adaptação, seguida por no mínimo 2 dias de repouso. Os animais do grupo experimental foram submetidos a 18 tiros de 5 min., com intervalo de 2 min. entre cada tiro. A velocidade dos tiros foi de 17 m/min. em declinação de 17° alcançando um período total de 90 min. de corrida. Todos os animais do grupo controle foram manuseados e submetidos aos mesmos estímulos do grupo experimental, com exceção do protocolo de E.F *downhill*.

3.3.4 - Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada por decapitação sem anestesia, seguindo a ordem de divisão dos grupos, com os animais em jejum de 6 horas para que o estado metabólico de todos os animais fossem similar.

3.3.5 - Retirada dos músculos:

Após a eutanásia foram retirados o músculo tríceps direito e esquerdo.

3.4 - Análises experimentais

3.4.1 - *Western Blot*:

Foram avaliadas as seguintes proteínas no tecido extraído; CD11b (marcador característico da população M1), F4/80, receptor de acetilcolina (ACH) e receptor de glicocorticóides

(GR), o homogenato de tecido foi colocado em 1,0 ml de tampão específico para extratos totais de proteína, composto por 100 mM de Trizma base (pH=7.5), 10 mM EDTA, 10% SDS, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio. O tampão foi preparado no dia do experimento. Os tecidos foram rapidamente homogenizados e centrifugados por 40 min. a 12000 rcf a 4°C. O sobrenadante mantido em gelo e o teor de proteínas totais foi determinado por (BRADFORD, 1976) utilizando kit comercial da BioRad®. Às amostras foram adicionadas na proporção de 4:1, o tampão de Laemmli (0,01% de azul de bromofenol, 50 mM fosfato de sódio, 25% de glicerol e 1% SDS) contendo 200mM DTT. Foram consideradas 150 µg de proteínas para a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Após a separação eletroforética, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 2 horas à temperatura ambiente e, bloqueadas por 2 horas (ou overnight a 4°C) em 5 ml de solução bloqueadora, (10 mM de Trizma base, 150 mM de NaCl, 20 50 ul/ml de Tween) contendo 1% BSA. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário específico por tempo e temperatura específicos de cada anticorpo, com o anticorpo diluído em solução basal e BSA 1%. Após incubação do anticorpo primário a membrana foi lavada e incubada posteriormente uma hora com anticorpo secundário associado à peroxidase. O anticorpo secundário consistiu em uma anti-imunoglobulina dirigida contra o animal produtor de anticorpo primário. Após três lavagens com solução bloqueadora, a membrana foi revelada por quimioluminescência mediante reagente de revelação (ECL Amersham®) e então, a membrana foi exposta a filme de raios-X. As bandas de interesse foram identificadas pelo seu padrão de migração eletroforética, por comparação de padrões conhecidos e quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa Scion Image®.

3.4.2- IL-6

As amostras foram homogenizadas em tampão RIFA (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25mM sodio fosfato, e 1mM ethylene-diamine tetraacetic acid at pH 7.4) contendo 10 µg/ml de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). O homogenato foi centrifugado em 12.000 × g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi reservado, e a concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California) utilizando BSA como referência. A avaliação da quantidade de IL-6 foi realizada por Multiplex com kits da Merck Millipore.

3.4.4 - Análise Estatística:

Todos os dados foram expressos em média e desvio padrão. Para as análises comparativas foi adotado ANOVA de uma via com Tukey post hoc test. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov, e normalizada pelo Z-score quando necessário. O software utilizado foi Statsdirect versão 2.7.2, e o nível de significância foi fixado em $\leq 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 Quantificação de proteínas

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na quantificação de proteínas para os anticorpos F4/80, GR e CD11b, como mostram os gráficos 1, 2 e 3 respectivamente, os dados foram expressos em média e desvio padrão.

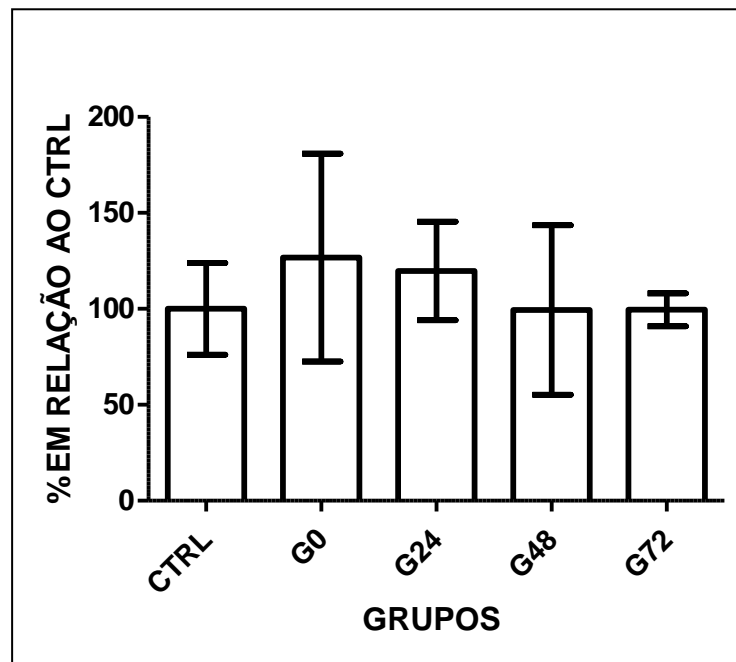


Gráfico 1 Quantificação de proteínas F4/80 expressas por % de unidades arbitrárias em relação a médias dos controles, dados em média e desvio padrão. Onde; Ctrl: grupo controle (n=4); G0: Grupo 0 horas (n=6); G24: Grupo 24 horas (n=5); G48: Grupo 48 horas (n=5); e G72: Grupo 72 horas (n=4). ANOVA de uma via com Tukey post hoc test, ($p < 0,05$).

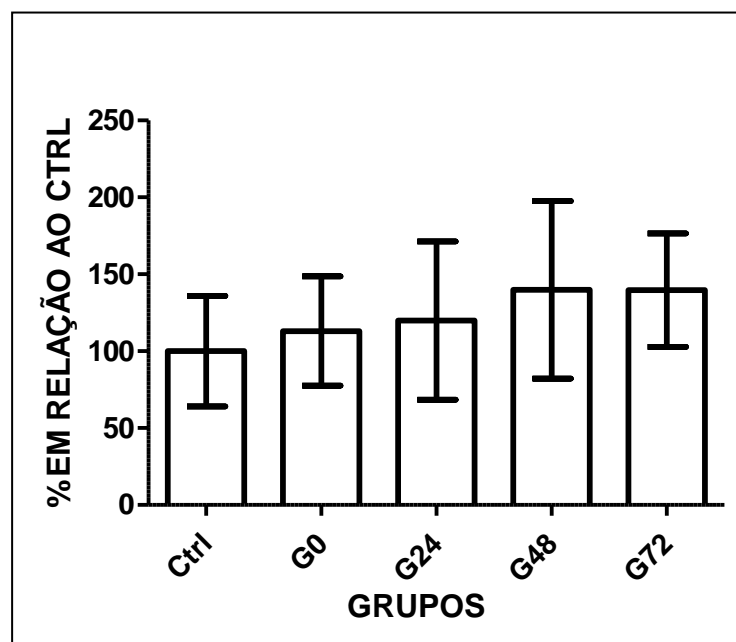


Gráfico 2 Quantificação de proteínas GR expressos por % de unidades arbitrárias em relação a médias dos controles, dados em média e desvio padrão. Ctrl: grupo controle (n=4); G0: Grupo 0 horas (n=6); G24: Grupo 24 horas (n=5); G48: Grupo 48 horas (n=5); e G72: Grupo 72 horas (n=4). ANOVA de uma via com Tukey post hoc test,($p < 0,05$).

!0

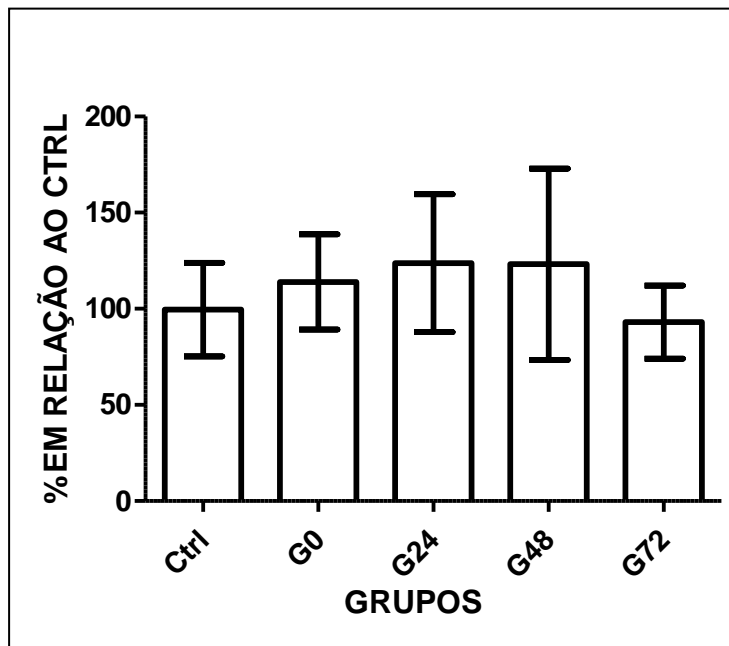


Gráfico 3 - Quantificação de proteínas CD11b expressos por % de unidades arbitrárias em relação a médias dos controles, dados em média e desvio padrão. Ctrl: grupo controle (n=4); G0: Grupo 0 horas (n=6); G24: Grupo 24 horas (n=5); G48: Grupo 48 horas (n=5); e G72: Grupo 72 horas (n=4). ANOVA de uma via com Tukey post hoc test,($p < 0,05$).

Porém, para o anticorpo ACH α 7 foi observada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) no grupo 72 horas pós exercício em relação aos grupos 0 e 24 horas, como demonstra o gráfico 4, os dados foram expressos em média e desvio padrão.

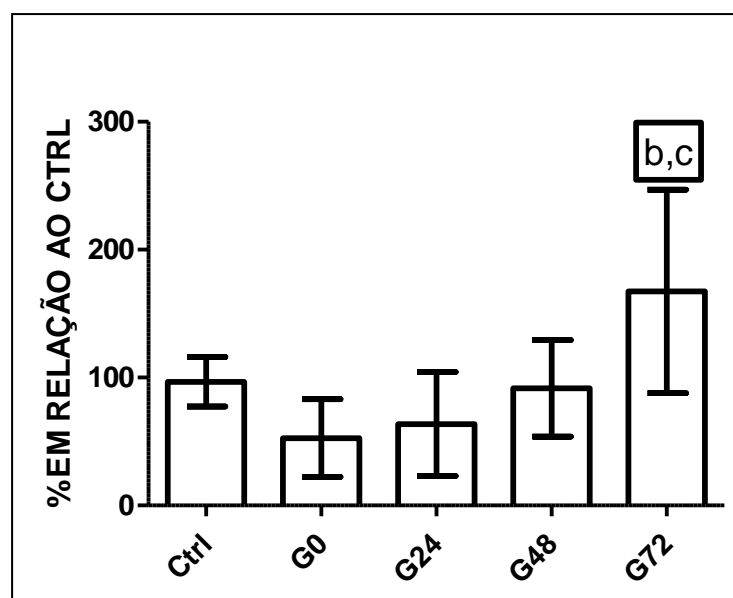


Gráfico 4 - Quantificação de proteínas ACH α 7 expressos por % de unidades arbitrárias em relação a médias dos controles, dados em média e desvio padrão. Ctrl: grupo controle (n=4); G0: Grupo 0 horas (n=6); G24: Grupo 24 horas (n=5); G48: Grupo 48 horas (n=5); e G72: Grupo 72 horas (n=4). ANOVA de uma via com Tukey post hoc test,($p < 0,05$). ^b diferente em relação a G0 e ^c diferente do G24.

3.2 - Produção de citocina IL-6

Foi observado diferença estatística significativa na quantificação da produção de IL-6 entre o grupo 72 horas após exercício em relação aos demais grupos, como demonstrado no gráfico 5, onde os dados foram expressos em média e desvio padrão.

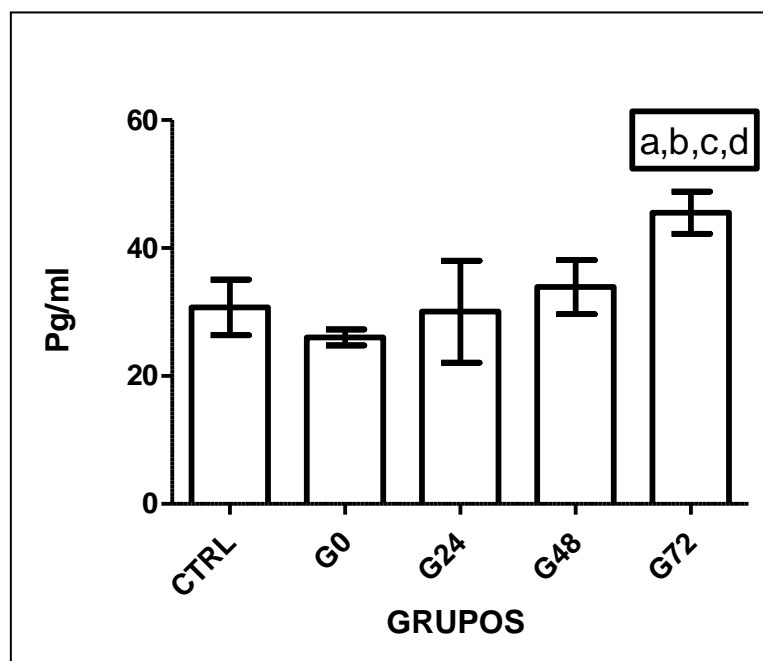


Gráfico 5 - Quantificação da produção de citocina IL-6 pelo método *Multiplex*, expressos em Pg/ml e dados em média e desvio padrão. Ctrl: grupo controle (n=4); G0: Grupo 0 horas (n=6); G24: Grupo 24 horas (n=5); G48: Grupo 48 horas (n=5); e G72: Grupo 72 horas (n=4). ANOVA de uma via com *Tukey post hoc test*, ($p < 0,05$). A= diferença significativa em relação ao CTRL ($P= 0,001$); B= diferença significativa para o G0 ($P= 0,000$); C= diferença significativa em relação ao G24 ($P= 0,001$); e D= diferença significativa em relação ao G48 ($P= 0,011$)

4 – DISCUSSÃO

A resposta inflamatória após lesão tecidual do músculo esquelético tem sido descrita em diversos estudos de modelo animal, com diversos protocolos de lesão (estiramento, corte, pancada, veneno, etc). Sabe-se que durante reparo tecidual a resposta inflamatória possui importante papel na limpeza do microambiente e na formação de novas fibras musculares, todavia, certos mecanismos que desencadeiam este processo permanecem desconhecidos, sobretudo quando esta lesão tem como origem o exercício físico, que aparenta ter respostas inflamatória de menor magnitude diante da menor gravidade do dano tecidual (CHAUZAD, 2015; MINARI, OYAMA e DOS SANTOS, 2015).

Em nosso trabalho, não foi possível observar diferenças nos marcadores F4/80, CD11b e GR após quantificação destas proteínas, todavia com o identificamos diferença estatística significativa no marcador para receptor de acetilcolina de subunidade $\alpha 7$ (ACH $\alpha 7r$) no grupo 72 horas em relação aos grupos 0 horas e 24 horas. A análise da citocina IL-6 pelo método *Multiplex* também apresentou diferença significativa no grupo 72 horas após exercício em relação a todos os outros grupos.

A proteína F4/80 é uma proteína de membrana característica dos macrófagos, que indicaria presença de infiltrado de macrófagos no tecido estudado, já a proteína CD11b é outra proteína de membrana clássica para identificar macrófagos, porém, esta caracteriza uma subpopulação do tipo M1, que é a considerada pró-inflamatória responsável pelo primeiro estágio da regeneração muscular, que é a limpeza tecidual e se relaciona a liberação de moléculas e o microambiente pró-inflamatório.

Estudo anterior com análise da expressão proteica de marcadores para macrófagos sugeriu que o melhor momento após sessão aguda de exercício físico de contração excêntrica para a análise da polarização de macrófagos seria entre 24-48 horas, (MINARI, OYAMA e DOS SANTOS, 2015)

Isso não pode ser confirmado em nosso trabalho, apesar de acreditarmos que o processo tenha ocorrido, devido ao aumento dos receptores colinérgicos, e também a presença de resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da IL-6. Outros trabalhos observaram aumento nos marcadores de macrófagos e um comportamento típico de polarização após lesão muscular, fato que também não pode ser observado em nosso estudo (ARNOLD, *et al.*, 2007; LAPOINTE, FRENETTE e CÔTÉ, 2002; TSIVITSE, *et al.*, 2003). A manutenção da quantidade desses marcadores, porém, não significam necessariamente que o processo não esteja acontecendo, talvez ele possa acontecer de forma mais tardia do que imaginávamos ou talvez a magnitude da lesão não tenha sido suficiente para

um aumento significativo desses marcadores em relação aos animais controles. Um fator que nos leva a acreditar que o processo tenha se desencadeado mesmo sem o aumento dos marcadores de macrófagos é ter sido evidenciado a liberação de IL-6, características da resposta pró-inflamatória, no G72.

Evidências apontam a existência de uma resposta do nervo vago a partir do reconhecimento do processo inflamatório no músculo, que estimula liberação de moléculas neuroendócrinas que são capazes de modular a liberação de citocinas no tecido alvo, o que caracterizam uma via-colinérgica-antiinflamatória (TRACEY, 2007). Nesse sentido se mostra como protagonista a acetilcolina que é o neurotransmissor mais abundante do nervo vago, e tem seu receptor presente em células importantes para a liberação de citocinas, como os macrófagos por exemplo (TRACEY, 2007). A ativação de seus receptores colinérgicos é capaz de inibir rapidamente e significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune, como a inibição da liberação de TNF- α pelos macrófagos. Assim, acreditamos que a alteração significativa no grupo 72 horas para esse receptor possa significar uma tentativa desta via de controlar a resposta pró-inflamatória no músculo característica da primeira fase de limpeza tecidual após lesão muscular (WANG, *et al.*, 2003), evidenciada em nosso trabalho pela liberação da citocina IL-6.

Fan e colaboradores (2014) em seu trabalho também identificaram aumento dos receptores de acetilcolina ACH α 7r após lesão muscular induzida no músculo de camundongos após 3 dias de recuperação.

Além disso, em seu trabalho eles evidenciaram um aumento maior que se prolongou por mais dias, esta diferença de magnitude na resposta dos receptores em relação ao demonstrado em nosso trabalho provavelmente se dá pela magnitude da lesão ser maior que a magnitude da lesão tecidual gerada pelo exercício. Neste trabalho, os autores evidenciaram aumento dos receptores de acetilcolina nos macrófagos, o que comprova a presença de receptores em células não neurais e indicam que esta via pode ter papel importante na modulação do microambiente após lesão muscular.

Trabalho conduzido por Tian e colaboradores (2015), também com protocolo de lesão induzida evidenciaram aumento significativo nos marcadores de ACH α 7r por *Western Blotting* de a partir do primeiro dia de lesão que se estendeu até o dia 21, este resultado corrobora em partes com com nosso achado, e tem como diferenças a magnitude da resposta que também parece ser maior do que a encontrada em nosso trabalho e um aumento mais precoce em relação ao que encontramos, tendo sido evidenciado a elevação das quantidades destes receptores a partir do primeiro dia de recuperação. Estes autores também evidenciaram em seu trabalho aumento dos receptores em células

musculares progenitoras, o que relaciona estes via com mais um grupo celular envolvido no processo de regeneração muscular.

Estas evidencias nos fazem acreditar que o aumento encontrado nos receptores ACh α 7r em nosso estudo pode ter sido relacionado tanto com como uma resposta anti-inflamatória impedindo parcialmente a liberação de moléculas pró-inflamatórias, mas também como a possível proliferação de células satélites no músculo após lesão muscular, todavia, serão necessários novos estudos que quantifiquem estes receptores especificamente nestes grupos celulares, já que pelo método escolhido nós só pudemos evidenciar um aumento no extrato do tecido muscular, e não em grupos celulares específicos.

A Interleucina-6 é uma citocina que possui várias funções e é produzida por diversos tecidos. Entre outras funções ela é responsável pela maturação de linfócitos B, e suas principais fontes são monócitos/ macrófagos ativados, fibroblastos e células endoteliais vasculares (TOMIYA, *et al.* 2004). Por isso, alguns estudos demonstraram forte relação da IL-6 com a atividade pró-inflamatória que ocorre no músculo esquelético após lesão tecidual (TOMIYA, *et al.* 2004). Em revisão, Paulsen e colaboradores (2012) demonstram a existência de evidências de aumento desta citocina após exercícios de contração excêntrica de maneira local e também no plasma sanguíneo. Outros estudos com contração excêntrica evidenciaram aumento desta citocina tanto em humanos quanto em modelos animais (BUFORD, *et al.* 2009; TOMIYA, *et al.* 2014; ISANEJAD, *et al.* 2015; JONSDOTTIR, *et al.* 2000).

O aumento significativo de IL-6 no grupo 72 horas em relação aos demais grupos nos leva a acreditar neste momento a resposta pró-inflamatória estava aumentada, o que corrobora para que acreditemos que aumento da via-colinérgica-anti-inflamatória percebida pela diferença significativa de receptores ACh α 7r, esteja acontecendo como para modular a resposta imune para que a regeneração muscular passe a ocorrer em sua fase de diferenciação e crescimento celular característica dos macrófagos tipo M2.

5 – CONCLUSÃO

A partir dos resultados e da nossa discussão nós podemos concluir que não foi possível observar diferenças significativas nas quantificações das proteínas F4/80, CD11b e GR. Todavia sugerimos que a via colinérgica anti-inflamatória aparenta ter importante papel na modulação da resposta imune após lesão muscular gerada pelo exercício físico *Downhill*, tendo aumento significativo no G72 em relação aos grupos G0 e G24.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELSADIK, A.; TRAD, A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. **Human immunology**, v.72, n.12, p.1188-1193, 2011.

ARNOLD, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of experimental medicine**, v.204, n.5, p.1057-1069, 2007.

BENNELL, K. L.; CROSSLEY, K. Musculoskeletal injuries in track and field: incidence, distribution and risk factors. **Australian journal of science and medicine in sport**, v.28, n.3, p.69-75, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CHAZAUD, B. *et al.* Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of cell biology**, v.163, n.5, p.1133-1143, 2003.

CHAZAUD, B. *et al.* Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. **Exercise and sport sciences reviews**, v.37, n.1, p.18-22, 2009.

CHAZAUD, B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. **Immunology and cell biology**, v.94, n.2, p.140-145, 2015.

DE SOUZA, D. K. *et al.* Diferenciação e ativação de células satélites durante a regeneração musculoesquelética: fatores parácrinos e endócrinos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.23, n.3, p.170-180, 2015.

ENNACIRI, J.; GIRARD, D. Immune system: maturation of myeloid cells. **Human Embryogenesis: Methods and Protocols**, v.505, n.12, p.195-203, 2009.

FAN, Y. *et al.* The time-dependent expression of $\alpha 7$ nAChR during skeletal muscle wound healing in rats. **International journal of legal medicine**, v.128, n.5, p.779-786, 2014.

GEISSMANN, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v.327, n.5966, p.656-661, 2010.

ISANEJAD, A. *et al.* The effect of endurance training and downhill running on the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α and HSP72 in rat skeletal muscle. **Cytokine**, v.73, n.2, p.302-308, 2015.

JONSDOTTIR, I. H. *et al.* Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. **The Journal of physiology**, v.528, n.1, p.157-163, 2000.

LAPOINTE, B. M.; FRENETTE, J.; CÔTÉ, C. H. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. **Journal of Applied Physiology**, v.92, n.5, p.1995-2004, 2002.

MALM, C. *et al.* Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. **The Journal of physiology**, v. 529, n. 1, p. 243-262, 2000.

MINARI, A. L. A.; OYAMA, L. M.; DOS SANTOS, R. V. T. Downhill exercise-induced changes in gene expression related with macrophage polarization and myogenic cells in the triceps long head of rats. **Inflammation**, v.38, n.1, p.209-217, 2015.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 4, p. 246-251, 2000.

PAULSEN, Goran *et al.* Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise. **Exercise Immunology Rev**, v.18, n.1, p.42-97, 2012.

ROSA NETO, J. C. *et al.* Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. **Lipids Health Disease**, v.10, n.1, p.10-97, 2011.

SACLIER, M. *et al.* Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **FEBS Journal**, v.280, n.17, p.4118-4130, 2013.

SANTOS, S. C.; KNIJNIK, J. D. Motivos de adesão à prática de atividade física na vida adulta intermediária. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.5, n.1, 2009.

TIAN, Z., *et al.* $\alpha 7$ nAChR is expressed in satellite cells at different myogenic status during skeletal muscle wound healing in rats. **Journal of molecular histology**, v.46, n.6, p.499-509, 2015.

THOMAS, J. R.; NELSON, J. K.; SILVERMAN, S. J. **Métodos de pesquisa em atividade física**. Artmed Editora, 2009.

TOMIYA, A. *et al.* Myofibers express IL-6 after eccentric exercise. **The American journal of sports medicine**, v.32, n.2, p.503-508, 2004.

TSIVITSE, S. K. *et al.* Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. **European journal of applied physiology**, v.90, n.5-6, p.633-638, 2003.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of clinical investigation**, v.117, n.2, p.289-296, 2007.

WANG, Hong *et al.* Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature medicine**, v.10, n.11, p.1216-1221, 2004.

WOODS, J. A.; LU, Q.; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology and cell biology**, v.78, n.5, p.545-553, 2000.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 16 de novembro de 2016
CEUA N 2763090816

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Ronaldo Vagner Thomatieli Dos Santos

Depto/Disc: Biociências

Pesquisadores associados: Felipe Avila (universidade Federal De São Paulo); André Luis Araújo Minari (universidade Federal De São Paulo); Lila Missae Oyama (universidade Federal De São Paulo); Ronaldo Vagner Thomatieli Dos Santos (orientador)

Título do projeto: "EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EXTENUANTE SOBRE A MUDANÇA FENOTÍPICA DE MACRÓFAGOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS C57BL/6".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A prática de exercício físico extenuante e de contração excêntrica pode ser associada a micro lesões teciduais no músculo esquelético, estas desencadeiam resposta inflamatória recrutando células do sistema imune, principalmente monócitos e macrófagos. Macrófagos possuem papel de destaque nesse processo de lesão e regeneração muscular, sendo encontrado em dois subtipos celulares: macrófago tipo 1 (M1) que está relacionado ao processo de fagocitose e limpeza do tecido lesado, e macrófago tipo 2 (M2) que está associado ao processo de regeneração do músculo esquelético e ao recrutamento de células satélite, sabe-se que esta mudança está diretamente relacionada a liberação de moléculas e ao microambiente celular. Este grupo celular vem sendo alvo de inúmeros estudos dentro desta temática, porém ainda se faz necessário elucidar quais moléculas desencadeiam o recrutamento e a mudança fenotípica de macrófagos. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar a possível influência das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- γ sobre a mudança fenotípica de macrófagos 0 horas, 2 horas, 4 horas e 6 horas após protocolo de exercício físico extenuante em esteira (20m/min por 50 minutos, após os 50 minutos acréscimo de 1m/min a cada minuto de exercício, até que o animal entre em fadiga), serão quantificados nos músculos sóleo, tríceps cabeça longa e gastrocnêmio: M1 e M2, por Western Blotting e será realizado o ensaio ELISA para quantificação de IL-6, IL-10 e TNF γ . Os resultados serão expressos em média \pm desvio padrão. Para a análise estatística, os dados serão submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov Smirnov, para identificação da distribuição dos dados (paramétrico ou não paramétrico). A partir deste resultado inicial será adotado o teste estatístico mais adequado levando em conta o desenho experimental.

ANIMAIS

Serão utilizados:

28 camundongos heterogênicos C57BL/6, machos, 150g, dois meses

Procedência: Biotério/CEDEME

Manutenção: Biotério/Psicobiologia

Cronograma do estudo, início previsto para: janeiro/2017 com término previsto para: julho/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 03/11/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.