

RELAÇÕES DO ESTADO INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO COM A ADAPTAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE INDUÇÃO AO OVERTRAINING

Fernando Oliveira Catanho da Silva¹, Lázaro Alessandro Soares Nunes¹
René Brenzikofer², Denise Vaz de Macedo²

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar a relação dos estados inflamatório e oxidativo com a adaptação em ratos submetidos a um protocolo de indução ao *overtraining*. O protocolo foi realizado por 11 semanas, com sessões de treino em esteira 5x/semana, 60 minutos/sessão, considerando treinos de 1x/dia até 4x/dia. Foram analisadas as concentrações hepática e muscular das citocinas Fator de Necrose Tumoral-alfa, Interleucina 1-beta, Interleucina 6 e Interleucina 10, além da concentração muscular dos aminoácidos Glutamina e Glutamato. Ainda, analisamos a concentração sérica da Proteína C-reativa, Albumina, Ácido Úrico, Capacidade Antioxidante, Creatina Quinase, Uréia, Proteínas Totais e Creatinina, além do hemograma completo. A *performance* e os biomarcadores foram analisados após a 9ª (grupos Treinado [Tr] e Controle [CO]) e a 11ª semana (grupo *Functional Overreaching* [FOR]). Os resultados mostraram que a *performance* da maioria dos ratos melhorou significativamente no grupo FOR em relação aos grupos Tr e CO ($p < 0,05$). O grupo FOR mostrou ainda maior padrão anti-inflamatório/antioxidante muscular e sérico em relação aos grupos Tr e CO ($p < 0,05$). Ao mesmo tempo apresentou maior padrão pró-inflamatório no fígado em relação ao grupo CO ($p < 0,05$). Ainda, houve queda na razão Glutamina/Glutamato em relação ao grupo Tr ($p < 0,05$) e queda do hematócrito em relação aos grupos Tr e CO ($p < 0,05$). Os resultados apresentados sugerem que os ratos do grupo FOR estavam bem adaptados ao protocolo de treinamento, considerando os níveis mais controlados de dano tecidual e inflamação sistêmica, além de exibirem nível de *performance* superior, junto de melhor padrão da razão anti-inflamatória/inflamatória e antioxidante/oxidante.

Palavras-chave: Inflamação. Oxidação. Treinamento Físico. Adaptação. *Overtraining*.

1-Centro Universitário UniMetrocamp/Wyden, Campinas-SP, Brasil.

ABSTRACT

Relationships of the inflammatory and oxidative state with adaptation in rats submitted to an overtraining induction protocol

The objective of this manuscript was to investigate the relationship among inflammation and oxidation with adaptation in rats submitted to an overtraining-inducing protocol. Our protocol lasted 11 weeks, considering 5x/week treadmill sessions, 60minutes/session, considering training sessions since 1x/day until 4x/day. We analysed hepatic and muscular cytokines concentration including Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin 1-beta, Interleukin 6 and Interleukin 10, added to Glutamine and Glutamate muscular concentration. Indeed, we analysed serum concentrations of C-Reactive Protein, Albumin, Uric Acid, Ferric Reducing Ability of Plasma, Creatine Kinase, Urea, Total Proteins, Creatinine and Hemogram. Performance and biomarkers were analysed after 9 weeks (groups Trained [Tr] and Control [CO]) and 11 weeks of training (group Functional Overreaching [FOR]). Our results showed significant increase in performance of FOR in relation to Tr and CO groups ($p < 0,05$). Group FOR still showed a greater anti-inflammatory/antioxidant serum and muscular status in relation to Tr and CO groups ($p < 0,05$). At the same time, FOR showed a greater hepatic pro-inflammatory status in relation to CO ($p < 0,05$), added to a decrease in Glutamine/Glutamate ratio in relation to Tr ($p < 0,05$) and a decrease in hematocrit in relation to Tr and CO groups ($p < 0,05$). Our results suggest that rats from group FOR were well-adapted to the training protocol, considering controlled levels of muscle damage and systemic inflammation, added to a greater performance status after 11 weeks of training program. Adding to this, FOR showed a better balance considering anti-inflammatory/inflammatory and antioxidant/oxidant ratios.

Key words: Inflammation. Oxidation. Exercise training. Adaptive response. *Overtraining*.

INTRODUÇÃO

O exercício físico pode ser considerado um modelo indutor de traumas, responsáveis cronicamente pelas adaptações morfofuncionais do organismo (Smith e colaboradores, 2008).

Essa relação entre o estímulo e a adaptação depende, dentre outros fatores, da ativação da resposta inflamatória aguda, tanto local quanto sistêmica, considerando o *cross-talk* de diversas células, componentes de diversos tecidos (Tidball, 2005).

Destacam-se, nesse sentido, as células sanguíneas do sistema imune inato e adaptativo, assim como o músculo-esquelético, o fígado e a glândula supra-renal (Silva, Macedo, 2011).

Durante a instalação do processo inflamatório, os neutrófilos e monócitos são atraídos por quimiotaxia ao tecido lesado e, após o processo de diapedese, iniciam o processo de fagocitose e destruição dos restos celulares, através do aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Silva, Macedo, 2011).

Essa ação se procede pelas enzimas catalíticas *NADPH oxidase* e *Mieloperoxidase*. Secundariamente à esta ação inicial, os macrófagos, juntos dos linfócitos, se responsabilizam pela reestruturação das células e tecidos, organizando processos como a ativação das células-satélite, produção de diversos fatores de crescimento e estimulação da síntese protéica (Tidball, 2005).

Nesse sentido, as ações das células do sistema imune inato e adaptativo estão atreladas às glicoproteínas chamadas citocinas, produzidas tanto por estas células quanto pelas células dos tecidos lesados, em especial o músculo-esquelético (Pedersen, 2000).

As citocinas auxiliam no processo estímulo-dano-regeneração como um todo, uma vez que participam desde a quimiotaxia dos leucócitos, da expressão de moléculas de adesão teciduais, da diapedese, da produção local de EROs, até a ativação, proliferação e diferenciação de células-satélite, junto da estimulação da síntese protéica *in loco* (Moldoveanu, Shephard, Shek, 2001).

Ainda, as citocinas viabilizam o *cross-talk* junto tanto das células hepáticas, viabilizando a produção das Proteínas de Fase Aguda (PFAs), quanto das células da glândula supra-renal, regulando a produção de

glicocorticóides e catecolaminas (Walsh, 2018).

Portanto, a resposta inflamatória constituinte do processo adaptativo deve ser aguda (transitória) e muito bem regulada, a fim de preservar as células íntegras dos tecidos envolvidos, assim como acelerar a restauração da integridade fisiológica dos mesmos (Butterfield, Best, Merrick, 2006).

Nesse contexto, organismos expostos a um processo contínuo de treinamento físico podem responder, basicamente, de duas maneiras: tanto podem experimentar uma queda prevista e rápida na *performance*, como podem sustentar uma *performance* cronicamente diminuída por longo período (Meeusen e colaboradores, 2006).

A primeira condição foi denominada de *Overreaching* Funcional (*FOR*) e a segunda de *Overreaching* Não-Funcional (*NFOR*) ou *Overtraining* (Meeusen e colaboradores, 2006).

Nesse íterim, um modelo animal de indução ao *continuum* treinamento-*overtraining*, considerando onze semanas de corrida em esteira, foi desenvolvido por Hohl e colaboradores (2009) (Hohl e colaboradores, 2009), permitindo a separação dos ratos em grupos *FOR* e *NFOR* e, por conseguinte, possibilitando o estudo das relações entre treinamento físico, adaptação e *overtraining*.

O objetivo do presente estudo foi, através da aplicação do protocolo de treinamento de corrida em esteira por onze semanas (Hohl e colaboradores, 2009), investigar a relação entre inflamação, oxidação e adaptação em ratos, de forma a relacionar a resposta inflamatória e o estado oxidativo ora com a adaptação positiva ao treinamento físico ora com a instalação do quadro de *overtraining*.

Utilizamos para tal marcadores bioquímicos e imunológicos em amostras de músculo, fígado e sangue, além dos testes de *performance* propostos por Hohl e colaboradores (2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar (n=37), adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp, alimentados com ração e água *ad libitum*.

Os ratos foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C

e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo 1447-1).

Os ratos foram adaptados à esteira rolante 15 dias antes do início do protocolo (o início do protocolo se deu com os ratos atingindo 60 dias de idade).

Ao final do período de adaptação os ratos foram submetidos ao primeiro teste de *performance* e, posteriormente, divididos em

dois grupos: controle sedentário (n=11) e grupo submetido ao protocolo de treinamento (n=26).

Protocolo de treinamento

Os ratos foram submetidos a um protocolo de indução a um *continuum* entre Treinamento-Overtraining durante 11 semanas, treinando 5x/semana, conforme mostrado na Tabela 01.

Tabela 1 - Protocolo de treinamento e indução ao overtraining de 11 semanas.

Semanas experimentais	Fases do treino	Número dos testes	Velocidade do treino (m/min)	Duração do treino (min)	Número de sessões diárias	Recuperação entre as sessões (h)
	Adaptação	0	--	--	--	--
1 ^a	TA1	semana sem testes	15	20	1	--
2 ^a	TA1	semana sem testes	20	30	1	--
3 ^a	TA1	semana sem testes	22,5	45	1	--
4 ^a	TA1	1	25	60	1	--
5 ^a a 7 ^a	TA2	semana sem testes	25	60	1	--
8 ^a	TA2	2	25	60	1	--
9 ^a	T2x	3	25	60	2	4
10 ^a	T3x	4	25	60	3	3
11 ^a	T4x	5	25	60	4	2

Legenda: TA = Treinamento Adaptativo.

As quatro primeiras semanas foram dimensionadas respeitando-se um treinamento adaptativo, onde velocidade e tempo de corrida foram aumentados progressivamente a cada semana. Da 5^a à 8^a semana manteve-se a velocidade e o tempo de corrida, a fim de que os ratos estivessem bem adaptados à carga de treinamento estabelecida.

Na 9^a, 10^a e 11^a semanas procurou-se estabelecer um desequilíbrio entre estímulo e recuperação nos ratos treinados, aumentando-se o número de sessões diárias de treino para duas, três e quatro vezes, com diminuição no tempo de recuperação entre as sessões (4, 3 e 2 h, respectivamente).

Ratos que não foram submetidos ao treinamento caracterizaram o grupo controle (CO; n=11). O grupo CO realizou, duas vezes na semana, 10 minutos de corrida na velocidade de 12 m/min durante todo o período relativo ao protocolo de treinamento.

A avaliação da *performance* foi feita através de seis testes (testes 1-6), indicados na Tabela 01.

Os testes de desempenho realizados no grupo CO foram feitos nas semanas correspondentes aos testes realizados durante o período de treinamento, ou seja, no mesmo tempo de vida dos ratos treinados.

Os ratos que participaram do protocolo de treinamento foram divididos em grupo treinado (Tr; n=11) e grupo *overreaching* funcional (FOR; n=12), sendo representativos da 9^a e 11^a semanas de treinamento, respectivamente.

Testes de desempenho

Todos os testes foram realizados 60 horas após a última sessão de treinamento; a velocidade inicial da esteira foi de 12 m/min, sem inclinação. A cada 2 min incrementou-se a velocidade em 1 m/min até que fosse atingido 20 m/min.

A partir dessa velocidade o incremento da esteira passou a ser de 2 m/min a cada 3 minutos, até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi definida no momento que os ratos tocaram a grade eletrificada da esteira cinco vezes em um minuto (Liu e colaboradores, 2000).

Quantificação do desempenho

Para avaliar longitudinalmente o efeito do treinamento nos ratos foi necessário estabelecer um teste que pudesse quantificar o desempenho dos ratos de maneira

independente da variação de sua massa corpórea.

Para tanto, buscamos quantificar a potência impressa pelos ratos nos respectivos testes. A potência mecânica é o produto entre massa e velocidade e o trabalho mecânico realizado é o produto entre potência e tempo. Com a distância total “d” percorrida nos estágios $i = 1, 2, 3, 4...$ na velocidade “ v_i ” durante tempos “ t_i ” é $d = \sum d_i = \sum v_i t_i$ pudemos calcular uma grandeza relacionada à *performance* que considera a massa do animal durante o teste multiestágio:

$$P = m \times d$$

Onde: (P) representa a *performance* do rato; (m) = massa; (d) = distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. Ao envolver a massa do animal esta variável P permite comparar os desempenhos dos ratos longitudinalmente. Neste caso, P é expresso em kg.m.

Cronograma dos testes de *performance* e momentos de eutanásia dos ratos

Os testes até a exaustão foram realizados antes do início do treinamento e nas semanas 4, 8, 9, 10 e 11 (Tabela 01), salientando-se que os ratos não treinavam no

dia do teste de *performance*. Ao término da 9ª semana de treinamento separamos randomicamente um grupo de ratos ($n=11$) que compôs o grupo treinado (Tr) do protocolo. O sacrifício desses ratos foi feito 60 h após o teste de *performance*, afim de analisarmos as adaptações crônicas do treinamento, junto do sacrifício de ratos do grupo controle (CO; $n=11$). Ao término da 11ª semana, novamente após 60h do teste de *performance*, foi feito a eutanásia dos ratos e a separação dos grupos FOR e NFOR.

Separação dos grupos FOR e FOR

A separação dos grupos FOR e FOR foi feita através da utilização do coeficiente angular da reta (α) utilizando os dados de *performance* desempenhadas por ratos “Controle” (não submetidos ao protocolo de treinamento de 11 semanas) nos testes 4, 5 e 6, representativos da 9ª, 10ª e 11ª semanas do protocolo, respectivamente (Hohl e colaboradores, 2009).

A Figura 1 apresenta a frequência dos valores de coeficiente angular da reta do trabalho realizado (α) pelos ratos FOR e NFOR, assim como os valores brutos da *performance* destes ratos ($n=15$) ao longo de todo o protocolo de treinamento (em Kg.m).

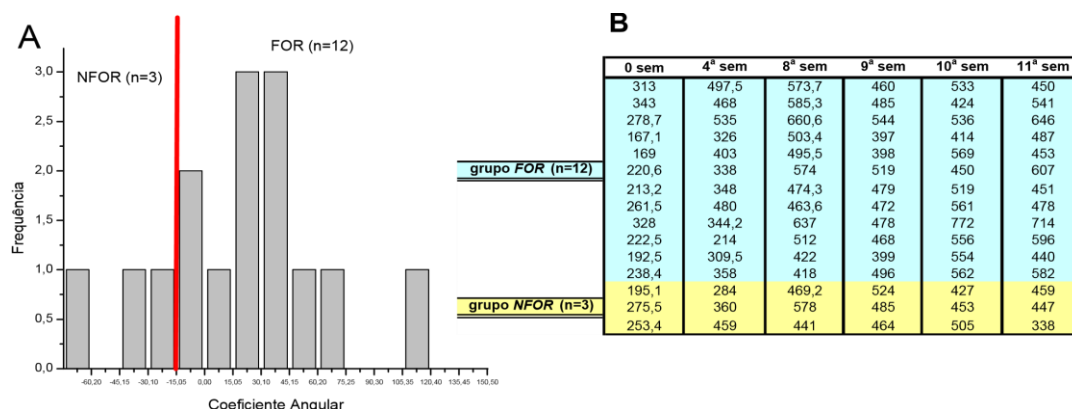


Figura 1 - Histograma da frequência de valores do coeficiente angular da reta (α) da *performance* nos testes referentes à 9ª, 10ª e 11ª semana dos ratos submetidos ao protocolo de indução ao contínuum Treinamento-Overtraining (A). Valores de *performance* (Kg.m) nos 6 testes executados ao longo do protocolo de indução ao contínuum Treinamento-Overtraining nos grupos FOR e NFOR (B).

Os dados indicaram que a maioria dos ratos melhorou seu desempenho, apresentando $\alpha \geq -15,05$ Kg.m, sendo selecionados para o grupo FOR ($n=12$).

Somente 3 ratos foram separados como grupo NFOR. O critério para inclusão dos ratos nesse grupo foi apresentar uma queda no coeficiente angular superior a -15,05 (Hohl e colaboradores, 2009).

Coleta de sangue total

Os ratos foram anestesiados via intraperitonal com ketamina e cloridrato de xilazina, nas doses de 10 e 5 unidades pra cada 100 g, respectivamente. Em seguida, realizou-se uma secção na cavidade torácica para a visualização do coração. Todo o sangue possível (12 ± 1 mL) foi coletado do ventrículo esquerdo, sendo 2 mL transferidos para tubos Vacuette (Greiner-BioOne) contendo EDTA/K₃ e os outros 10 mL para tubos de coleta de soro com gel separador. O sangue total em EDTA/K₃ (ST) foi imediatamente utilizado para as análises hematológicas. Os tubos com gel separador foram centrifugados a 2800rpm por 15 minutos para a obtenção das amostras de soro que posteriormente foram aliquotadas para as análises bioquímicas e imunológicas.

Coleta das amostras de músculo e fígado e preparação dos homogenatos

Após a coleta do sangue total executamos a dissecação das amostras de músculo e fígado. As amostras do músculo gastrocnêmio total esquerdo (GTE) foram retiradas para as análises bioquímicas (aminoácidos).

As amostras do músculo gastrocnêmio total direito (GTD) foram retiradas e dissecadas nos seus diferentes constituintes: gastrocnêmio vermelho (GV) e gastrocnêmio branco (GB) para as análises imunológicas. As amostras de fígado foram retiradas e dissecadas em quatro partes diferentes para as análises imunológicas.

Análises bioquímicas

Foram quantificadas a concentração sérica das Proteínas de Fase Aguda (PFA): Proteína C-reativa (PCR) e Albumina. Foi também analisada a atividade sérica da enzima Creatina Quinase (CK), a concentração sérica dos antioxidantes através do método de FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) e Ácido Úrico (AU), junto da concentração muscular dos aminoácidos Glutamato (GLU) e Glutamina (GLN). As análises foram realizadas no aparelho automatizado (Autolab18, Boehringer Mannheim Diagnostics).

Análises hematológicas

Foram quantificados o número total de hemácias (RBC), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT) e contagem total de leucócitos (WBC) no sangue total em equipamento automatizado (Celm CC 550). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia após coloração de esfregaços pelo método de *May-Grunwald-Giemsa*.

Análises imunológicas

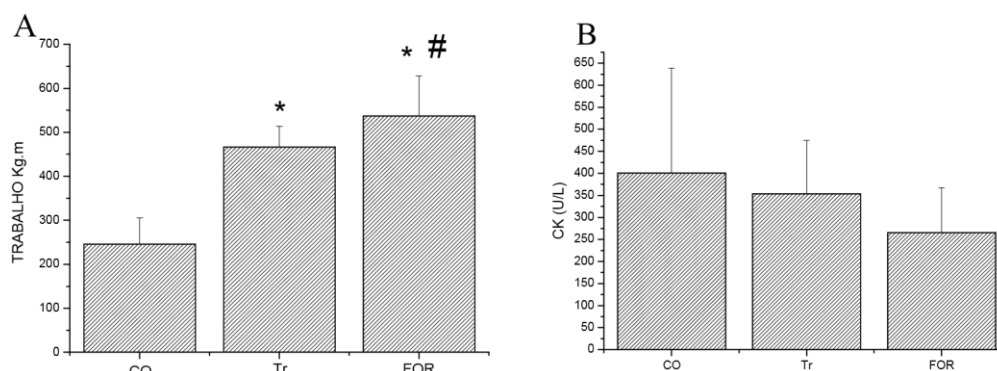
Foram quantificadas as citocinas Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina 1-beta (IL-1 β) e Interleucina 10 (IL-10) nos músculos gastrocnêmio vermelho (GV), gastrocnêmio branco (GB), além do fígado. As análises foram feitas através da metodologia de ELISA, utilizando kits Duo-Set (R&D Systems) em leitora de microplacas BioTek.

Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados na forma de média e desvio-padrão ($X \pm DP$). Para o cálculo das análises imunológicas foi utilizado o programa *MATLAB 7.0* e para a construção dos gráficos foi utilizado o programa *Origin 6.0*. Foi utilizado o programa *GraphPad Instat*[®] (San Diego, CA) para conduzir as análises estatísticas para amostras não-pareadas e paramétricas (ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey) e para amostras não-pareadas e não-paramétricas (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). Para todas as análises foi adotada a significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Figura 02 apresenta os dados da *performance* (A) e a atividade sérica da enzima CK (B). A *performance* dos ratos foi progressivamente aumentada com o aumento na frequência de sessões diárias de treinos (Figura 2A), sendo que um maior número de sessões diárias realizadas pelo grupo *FOR* não interferiu e sim, corroborou ainda mais no tocante às adaptações de *performance* já alcançadas no grupo *Tr*. A concentração sérica da CK apresentou uma tendência de queda nos grupos *Tr* e *FOR* ($p > 0,05$) quando comparados ao grupo *CO* (Figura 2B).



Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao grupo CO, # $p < 0,05$ em relação ao grupo Tr.

Figura 2 - Evolução da performance dos ratos [Kg*m] (A) e atividade sérica da CK [U/L] (B) dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

Tabela 2 - Hemograma com a contagem diferencial de leucócitos, glutamina, glutamato e razão glutamina/glutamato no músculo-esquelético dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

Grupos/Análises	Grupo CO	Grupo Tr	Grupo FOR
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	$8,6 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,9$	$8,0 \pm 0,5^*$
Hematócrito (HCT) (%)	$49,3 \pm 7,8$	$51,1 \pm 13,8$	$41,1 \pm 1,5^* \#$
Hemoglobina (Hb) (g/dL)	$15,3 \pm 1,0$	$15,6 \pm 1,0$	$15,6 \pm 0,5$
Leucócitos Totais (mm^3)	$3135 \pm 1229,7$	$3457,1 \pm 1206,7$	$2659 \pm 751,6$
Bastonetes (mm^3)	$57,5 \pm 64,8$	$99,7 \pm 55,0$	$66,8 \pm 37,7$
Segmentados (mm^3)	$648,1 \pm 406,5$	$810,3 \pm 359,6$	$593,1 \pm 255,5$
Eosinófilos (mm^3)	0,0	0,0	$8,2 \pm 12,9$
Linfócitos (mm^3)	$2324,2 \pm 829,8$	$2352,6 \pm 901,5$	$1905,1 \pm 608,5$
Monócitos (mm^3)	$101 \pm 41,3$	$195 \pm 107,6^*$	$84,3 \pm 50,2^{\#}$
Glutamina (mmol/Kg)	$2,06 \pm 0,44$	$2,28 \pm 0,64$	$2,05 \pm 0,8$
Glutamato (mmol/Kg)	$0,88 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,22$	$1,03 \pm 0,2$
Razão Glutamina/Glutamato	$2,38 \pm 0,73$	$2,61 \pm 0,29$	$1,95 \pm 0,6^{\#}$

Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao grupo CO; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Tr.

A Tabela 2 mostra os valores do hemograma dos diferentes grupos, além da concentração muscular dos aminoácidos glutamina e glutamato.

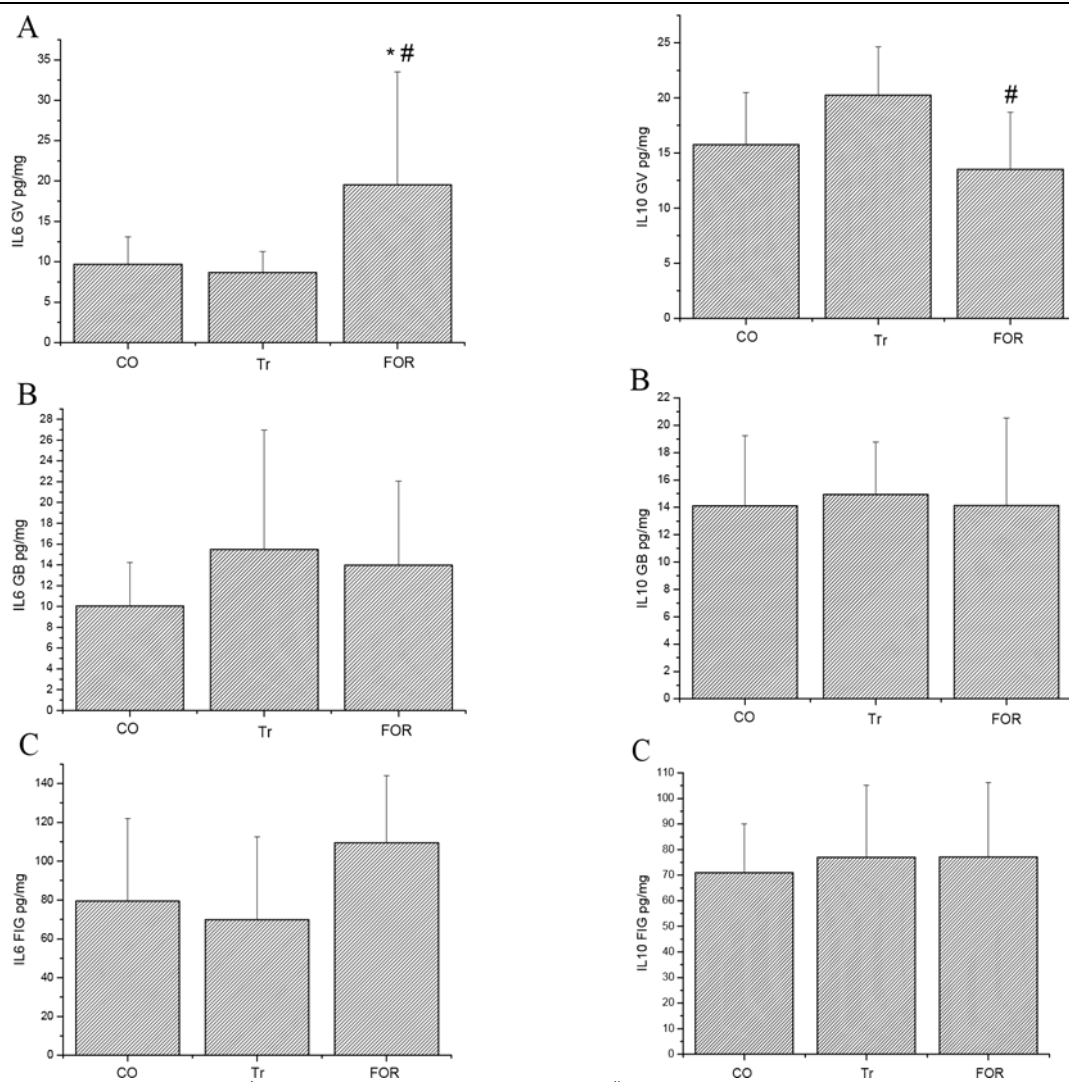
Os ratos do grupo Tr não apresentaram alterações significativas em praticamente nenhum dos parâmetros analisados quando comparados ao grupo CO, exceto quanto ao aumento no número de monócitos circulantes. A comparação entre os ratos do grupo FOR com os do grupo CO mostrou que o grupo FOR apresentava um número de hemácias e hematócrito (RBC e HCT) significativamente menores, associado à manutenção nas concentrações de Hb. O número de leucócitos totais (WBC) junto da contagem diferencial, à exceção dos eosinófilos, apresentou tendência de queda no grupo FOR ($p > 0,05$) em relação ao grupo Tr. A razão Gln/Glu mostrou queda significativa no grupo FOR em relação ao grupo Tr.

A Figura 03 mostra a concentração das citocinas IL-6 e IL-10 nos músculos GV (A), GB (B) e fígado (C) dos ratos do grupo CO, Tr e FOR.

O grupo Tr não apresentou alteração significativa nas concentrações de IL-6 em nenhum dos tecidos, somente uma tendência de aumento no músculo GB. Já a IL-10 apresentou tendência de aumento no músculo GV. A IL-6 do grupo FOR apresentou-se significativamente superior quando comparada aos grupos CO e Tr no músculo GV. No fígado houve tendência de aumento na IL-6 em relação ao grupo Tr ($p > 0,05$).

A produção da IL-10 do músculo GV no grupo FOR diminuiu significativamente quando comparado ao grupo Tr.

A Figura 04 mostra a concentração das citocinas IL-1 β e TNF- α nos músculos GV (A), GB (B) e fígado (C) dos ratos do grupo CO, Tr e FOR.



Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao grupo CO; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Tr.

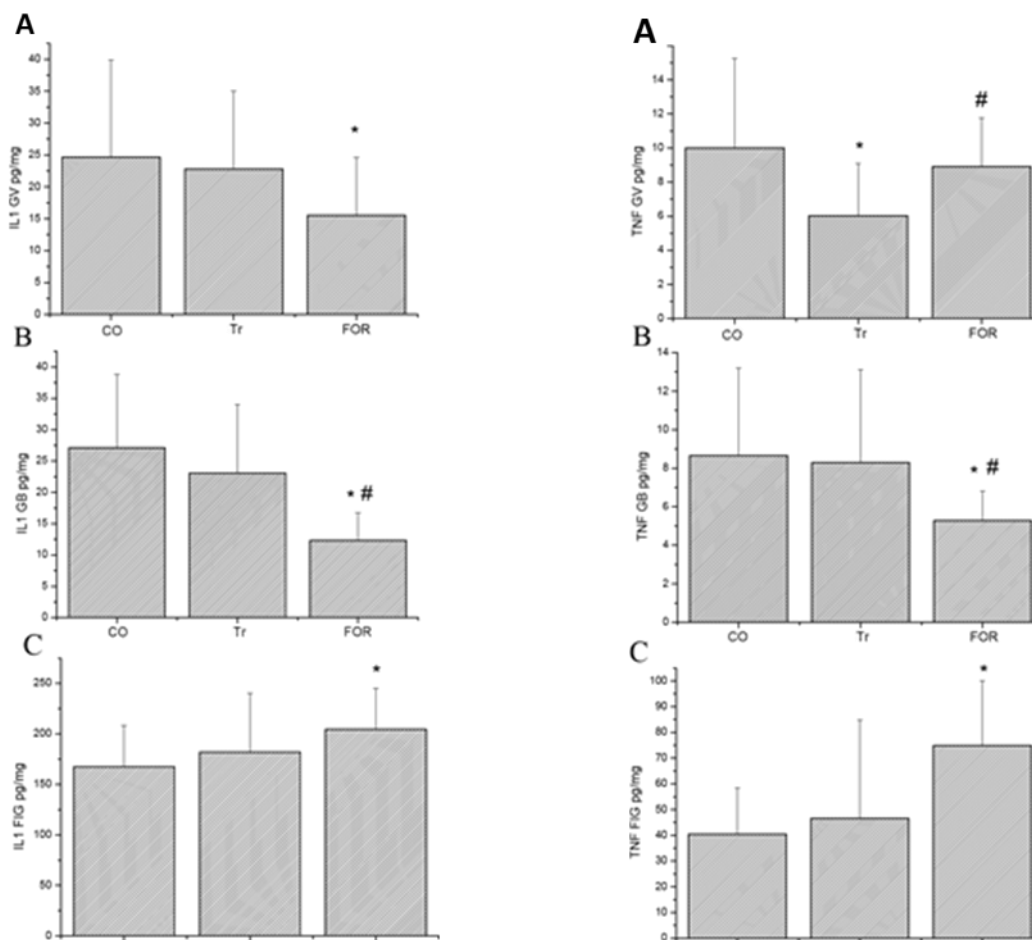
Figura 3 - Concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 (pg/mg) nos músculos GV (A) e GB (B) e no fígado (C) dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

O grupo Tr apresentou diminuição significativa nas concentrações de TNF-alfa somente no músculo GV, sem outras alterações nos demais tecidos. Já a IL-1beta dos ratos do grupo Tr não se alterou em nenhum dos tecidos.

O grupo FOR apresentou diminuição significativa nos valores de TNF-alfa no músculo GB e aumento no fígado em relação aos grupos CO e Tr. As concentrações de IL-1beta nos músculos GV e GB diminuíram

significativamente no grupo FOR quando comparadas aos grupos CO (GV e GB) e Tr (GB). Já a produção hepática de IL-1beta seguiu o perfil encontrado para TNF-alfa, com aumento significativo no grupo FOR em relação ao CO, mas não ao grupo Tr.

A Tabela 03 apresenta os valores das concentrações séricas tanto das proteínas de fase aguda quanto dos antioxidantes e marcadores de degradação protéica.



Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao grupo CO; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Tr.

Figura 4 - Concentrações das citocinas IL-1beta e TNF-alfa (pg/mg) nos músculos GV (A) e GB (B) e no fígado (C) dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

Tabela 3 - Concentração sérica das proteínas de fase aguda (PCR e albumina), antioxidantes de baixo peso molecular (FRAP e AU) e marcadores de catabolismo protéico (uréia, proteínas totais e creatinina) dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento.

Grupos/Análises	Grupo CO	Grupo Tr	Grupo FOR
PCR (mg/L)	4,8 ± 1,8	5,6 ± 1,1	3,9 ± 0,6* #
Albumina (g/dL)	4,3 ± 0,1	4,1 ± 0,3*	4,2 ± 0,1
FRAP (mEq TROLOX)	312,5 ± 43,2	303,1 ± 58,9	347,5 ± 63,2* #
Ácido Úrico (mg/dL)	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,8	1,8 ± 0,7* #
Uréia (mg/dL)	49,1 ± 9,4	53,4 ± 10,1	43,1 ± 5,9#
Proteínas Totais (g/dL)	6,3 ± 0,6	6,0 ± 0,7	6,3 ± 0,6
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao grupo CO; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Tr.

Os ratos do grupo Tr mostraram tendência de aumento na PCR e diminuição significativa nas concentrações de albumina quando comparados ao grupo CO, sem alterações nos demais parâmetros analisados.

Os ratos do grupo FOR apresentaram valores séricos aumentados de FRAP e AU e

diminuição significativa nas concentrações de PCR quando comparado aos grupos CO e Tr, além de diminuição significativa na concentração de uréia em relação ao grupo Tr.

DISCUSSÃO

Considerando o exercício físico como um modelo orgânico-adaptativo indutor de traumas teciduais, oxidação e inflamação agudas (Castell e colaboradores, 2018), os dados apresentados nesse estudo mostraram que o protocolo de indução de um *continuum* Treinamento-Overtraining induziu, inicialmente, melhora no desempenho da maioria dos ratos.

Junto ao desempenho, o conjunto de dados imunológicos referentes aos tecidos muscular e hepático dos grupos Tr e FOR, reforçam a adaptação positiva ao treinamento, corroborando com a literatura que não evidenciou alterações significativas nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias no soro e nos músculos-esqueléticos, além das PFA, após protocolos variados de treinamento físico (Peake, Gerrard, Griffin, 2003; Stewart e colaboradores, 2007; Vogiatzis e colaboradores, 2007; Huffman e colaboradores, 2008).

Isso pode ser justificado pelo fato destas proteínas, especialmente as citocinas, atuarem em concentrações picomolares, sendo a dinâmica de sua alteração muscular e sérica bastante sutil.

Da mesma forma como o observado em humanos (Febbraio, Pedersen, 2002), nossos dados mostraram aumento na produção de IL-6 pela musculatura esquelética, principalmente no gastrocnêmio vermelho e, ao mesmo tempo, controle na produção e secreção muscular de TNF-alfa e IL-1beta (Starkie e colaboradores, 2003).

Dentre as várias ações metabólicas exercidas pela IL-6 produzida no músculo-esquelético, destacam-se aquelas anti-inflamatórias locais e sistêmicas (Petersen, Pedersen, 2005; Fisher, 2006), considerando desde a inibição na síntese de citocinas pró-inflamatórias (Silva, Macedo, 2011), inibição nas vias de sinalização dos processos pró-oxidantes (Petersen, Pedersen, 2005), ativação dos processos de regeneração tecidual (Fisher, 2006), estímulo da síntese local de citocinas anti-inflamatórias (eg. IL-10, IL-4, IL-1ra, IL-13) (Fisher, 2006) e potencialização na produção de PFA positivas pelo fígado (Silva, Macedo, 2011; Petersen, Pedersen, 2005; Fisher, 2006).

Nesse sentido, algumas evidências tem mostrado que o treinamento físico, regular e sistematizado, tende a instalar um padrão anti-inflamatório local e sistêmico, com diminuição na produção e secreção de TNF-alfa e IL-1beta pelo músculo-esquelético

(Bruunsgaard e colaboradores, 2004; Lambert e colaboradores, 2008; Al-Jarrah, Erekat, 2018), uma vez que estas citocinas estão ligadas à sinalização de vias que levam à proteólise muscular, inibição das vias de anabolismo, diminuição da capacidade de reparo, acelerando a sinalização apoptótica intracelular via caspases, além de acentuarem a coagulação na microvasculatura e favorecerem o colapso hemodinâmico tecidual (Anwar e colaboradores, 2002; Chevrel, Granet, Miossec, 2005).

Juntas, TNF-alfa e IL-1beta, quando produzidos e secretados em concentrações supra-fisiológicas, podem desencadear sintomas sistêmicos como febre, fadiga e distúrbios do sono, condição conhecida como *Sickness Behavior Syndrome*, correlata à Síndrome do *Overtraining* (Meeusen e colaboradores, 2006).

Enfim, no tocante à produção muscular das citocinas, nossos dados corroboram com a literatura no tocante às diferentes vias de sinalização intracelular envolvidas na produção daquelas com padrão pró ou anti-inflamatório, porém com mecanismos de regulação inter-dependentes pós-produção e secreção (Keller e colaboradores, 2006).

Ao analisarmos a produção hepática das citocinas, especialmente considerando aquelas pró-inflamatórias, podemos destacar esta como parte integrante da resposta metabólico-inflamatória do próprio tecido ao estresse, ocasionado eventualmente pela intensificação do treinamento ao longo das semanas (Li, Diehl, 2003).

Este evento pode ser desencadeado por uma condição de estresse oxidativo aumentado no fígado, resultando na ativação do fator de transcrição NF-κB e, conseqüentemente, na ativação da expressão de TNF-alfa, que induz maior expressão das citocinas IL-1beta e IL-6 (Smith, 2000).

Esta resposta pode estar ainda ligada à própria regeneração do tecido hepático, uma vez que as citocinas, especialmente o TNF-alfa, estimulam a proliferação dos hepatócitos (Smith, 2000), favorecendo de certa forma a adaptação positiva deste tecido ao protocolo de treinamento.

Em relação aos marcadores bioquímicos séricos analisados neste estudo, a tendência crônica de queda na atividade sérica da enzima CK pode ter ocorrido como reflexo do treinamento físico regular e sistematizado, devido a fatores como um

maior número de sarcômeros inseridos nas fibras musculares, alteração no padrão de recrutamento das unidades motoras ou devido a algum mecanismo neural protetor (Chen, 2003).

Esse marcador sérico, que apresenta grande aplicabilidade prática (Lazarim e colaboradores, 2009), refletiu os efeitos adaptativos positivos causados pelo protocolo de treinamento, especialmente no tocante à evolução da *performance*. Outra cinética crônica dos biomarcadores que reforçam essa premissa adaptativa, especialmente no grupo *FOR*, é a diminuição na concentração sérica de uréia, refletindo um controlado catabolismo protéico (Moldoveanu, Shephard, Shek, 2001; Williamson, Kimball, Jefferson, 2005).

Interessante observar que o aumento na produção hepática das citocinas pró-inflamatórias foi acompanhada por uma diminuição significativa das concentrações séricas de PCR, especialmente no grupo *FOR*.

Essa resposta adaptativa é considerada normal pela literatura em situações de treinamento físico regular e sistematizado (Plaisance, Grandjean, 2006) devido a fatores como diferentes vias de sinalização intracelulares hepáticas comandando a expressão de PFA, além das citocinas pró-inflamatórias (Tomaszewski e colaboradores, 2003), bem como fatores relacionados à alteração da composição corporal dos organismos treinados ou até mesmo mecanismos de *downregulation* hepático sofridos pela ação endócrina da IL-6 (Stewart e colaboradores, 2007).

De forma a corroborar essa hipótese, a concentração sérica de albumina, que representa uma PFA negativa, se mostrou inalterada entre os grupos ao longo do protocolo de treinamento (Silva, Macedo, 2011).

Ainda, níveis fisiológicos estáveis de albumina sérica auxiliam na manutenção do estado antioxidante nesse ambiente, assim como mantém a função de carreamento de diversas substâncias pelo sangue, incluindo as citocinas (Silva, Macedo, 2011).

Ainda, no tocante ao poder antioxidante sérico, especialmente no grupo *FOR*, os marcadores FRAP e AU mostraram aumentos significativos importantes e condizentes ao processo adaptativo positivo alcançado nesse grupo de treinamento. Nossos dados corroboram achados da literatura sobre o efeito adaptativo no sistema de defesa antioxidante em decorrência do

exercício físico regular e sistematizado (Ji, 2008), incluindo os efeitos adaptativos no soro (Kostaropoulos e colaboradores, 2006).

Finalizando a discussão sobre os marcadores investigados, a tendência de diminuição na razão glutamina/glutamato no músculo-esquelético, especialmente no grupo *FOR*, pode ser explicada ora por uma menor produção muscular desse aminoácido (Bowtell, Bruce, 2002), ora devido a um maior usufruto deste pelo próprio metabolismo intramuscular em reações anapleróticas e anabólicas (Gleeson, 2007), ora devido a uma maior exportação desse aminoácido para a corrente sanguínea, visto a importância do mesmo como fonte de energia para as células do sistema imune (Tidball, 2005).

Em conclusão, a análise das concentrações musculares e hepáticas das citocinas mostrou-se bastante útil para a identificação de um quadro anti-inflamatório controlado, especialmente nos ratos do grupo *FOR*, que, somado a um maior potencial antioxidante sérico, diminuição nos valores séricos de inflamação crônica e à manutenção do padrão normal da contagem total e diferencial das células brancas, viabilizaram a evolução da *performance* ao longo do protocolo de treinamento.

Nosso trabalho reforça achados anteriores que defendem a execução do treinamento físico regular e sistematizado, apesar de poder ocasionar alguns possíveis efeitos agudos indesejados, como um potente antídoto anti-inflamatório e antioxidante, adaptando positivamente a resposta imune ao esforço e a controlando a inflamação sistêmica crônica de baixo grau (Pedersen, 2000; Petersen, Pedersen, 2005; Gleeson, 2006).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos também ao Centro de Bioterismo da Unicamp pela disponibilização do modelo animal e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1-Al-Jarrah, M.D.; Erekat, N.S. Treadmill exercise training could attenuate the upregulation of Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in skeletal muscle of mouse model of chronic/progressive Parkinson disease. *Neuro Rehabilitation*. Vol.43. Num. 4. p.501-507. 2018.

- 2-Anwar, A.; Zahid, A.A.; Scheidegger, K.J.; Brink, M.; Delafontaine, P. Tumor necrosis factor- α regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation*. Vol.105. p.1220-1225. 2002.
- Bowtell, J.L.; Bruce, M. Glutamine: an anaplerotic precursor. *Nutrition*. Vol.18. Num.3. p.222-224. 2002.
- 3-Bruunsgaard, H.; Bjerregaard, E.; Schroll, M.; Pedersen, B.K. Muscle strength after resistance training is inversely correlated with baseline levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the oldest old. *Journal American Geriatric Society*. Vol.52. p.237-41. 2004.
- 4-Butterfield, T.A.; Best, T.M.; Merrick, M.A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal Athletic Training*. Vol.41. p.457-465. 2006.
- 5-Castell, L.M.; Nieman, D.C.; Bermon, S.; Peeling, P. Exercise-induced illness and inflammation: can immunonutrition and iron help? *International Journal Sport Nutrition Exercise Metabolism*. Vol.14. p.1-26. 2018.
- 6-Chen, T.C. Effects of a second bout of maximal eccentric exercise on muscle damage and electromyographic activity. *European Journal Applied Physiology*. Vol.89. p.115-121. 2003.
- 7-Chevrel, G.; Granet, C.; Miossec, P. Contribution of tumour necrosis factor α and interleukin (IL) 1 β to IL6 production, NF- κ B nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: in vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Annals Rheumatic Disease*. Vol.64. p.1257-1262. 2005.
- 8-Febbraio, M.A.; Pedersen, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB Journal*. Vol.16. p.1335-1347. 2002.
- 9-Fisher, C.P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. *Exercise Immunological Review*. Vol.12. p.6-33. 2006.
- 10-Gleeson, M. Immune function in sport and exercise. *Journal Applied Physiology*. Vol.103. p.693-699. 2007.
- 11-Gleeson, M. Immune system adaptation in elite athletes. *Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care*. Vol.9. p.659-665. 2006.
- 12-Hohl, R.; Ferrareso, R. L. P.; Buscariolli, R.; Lucco, R.; Brenzikofer, R.; Macedo, D.V. Development and characterization of an overtraining animal model. *Medicine Science Sports Exercise*. Vol.41. Num.5. p.1155-1163. 2009.
- 13-Huffman, K.M.; Slentz, C.A.; Bales, C.W.; Houmard, J.A.; Kraus, W.E. Relationships between adipose tissue and cytokine responses to a randomized controlled exercise training intervention. *Metabolism*. 2008. Vol.57. p.577-583. 2008.
- 14-Ji, L.L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radical Biology Medicine*. Vol.44. p.142-152. 2008.
- 15-Keller, C.; Hellsten, Y.; Steensberg, A.; Pedersen, B.K. Differential regulation of IL-6 and TNF- α via calcineurin in human skeletal muscle cells. *Cytokine*. Vol.36. p.141-147. 2006.
- 16-Kostaropoulos, I.A.; Nikolaidis, M.G.; Jamurtas, A.Z.; Ikonou, G.V.; Makrygiannis, V.; Papadopoulos, G.; Kouretas, D. Comparison of the blood redox status between long-distance and short-distance runners. *Physiological Research*. Vol.55. p.611-616. 2006.
- 17-Lambert, C.P.; Wright, N.R.; Finck, B.N.; Villareal, D.T. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. *Journal Applied Physiology*. Vol.105. p.473-478. 2008.
- 18-Lazarim, F.L.; Antunes-Neto, J.M.; Da Silva, F.O.; Nunes, L.A.; Bassini-Cameron, A.; Cameron, L.C.; Alves, A.A.; Brenzikofer, R.; Macedo, D.V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *Journal Science Medicine Sport*. Vol. 12. p.85-90. 2009.

- 19-Li, Z.; Diehl, A.M. Innate immunity in the liver. *Current Opinion Gastroenterology*. Vol.19. p.565-571. 2003.
- 20-Liu, J.; Yeo, H.C.; Overvik-Douki, E.; Hagen, T.; Doniger, S.J.; Chu, D. W.; Brooks, G. A.; Ames, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal Applied Physiology*. Vol.89. p.21-28. 2000.
- 21-Meeusen, R.; Duclos, M.; Gleeson, M.; Rietjens, G.; Steinacker, J.; Urhausen, A. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome. *European Journal Sport Science*. Vol. 6. p.1-14. 2006.
- 22-Moldoveanu, A.I.; Shephard, R.J.; Shek, P.N. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Medicine*. Vol.31. p.115-144. 2001.
- 23-Peake, J.M.; Gerrard, D.F.; Griffin, J.F. Plasma zinc and immune markers in runners in response to a moderate increase in training volume. *International Journal Sports Medicine*. Vol.24. p.212-216. 2003.
- 24-Pedersen, B.K. Exercise and cytokines. *Immunology Cell Biology*. Vol.78. p.532-535. 2008.
- 25-Petersen, A.M.W.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal Applied Physiology*. Vol.98. p.1154-1162. 2005.
- 26-Plaisance, E.P.; Grandjean, P.W. Physical activity and high-sensitivity C-reactive protein. *Sports Medicine*. Vol.36. p.443-458. 2006.
- 27-Silva, F.O.C.; Macedo, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. *Revista Brasileira Cineantropometria Desempenho Humano*. Vol.13. Num.4. p.320-328. 2011.
- 28-Smith, C.; Kruger, M.J.; Smith, R.M.; Myburgh, K.H. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Medicine*. Vol.38. p.947-969. 2008.
- 29-Smith, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine Science Sports Exercise*. Vol.32. p.317-331. 2000.
- 30-Starkie, R.; Ostrowski, S.R.; Jauffred, S.; Febbraio, M.; Pedersen, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB Journal*. Vol.17. p.884-886. 2003.
- 31-Stewart, L.K.; Flynn, M.G.; Campbell, W.W.; Craig, B.A.; Robinson, J.P.; Timmerman, K.L.; Mcfarlin, B.K.; Coen, P.M.; Talbert, E. The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Medicine Science Sports Exercise*. Vol.39. p.1714-1719. 2007.
- 32-Tidball, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal Physiology*. Vol. 288. R345-R353. 2005.
- 33-Tomaszewski, M.; Charchar, F.J.; Przybycin, M.; Crawford, L.; Wallace, A.M.; Gosek, K.; Lowe, G.D.; Zukowska-Szczechowska, E.; Grzeszczak, W.; Sattar, N.; Dominiczak, A.F. Strikingly low circulating CRP concentrations in ultramarathon runners independent of markers of adiposity: how low can you go? *Arteriosclerotic Thrombotic Vascular Biology*. Vol.23. p.1640-1644. 2003.
- 34-Vogiatzis, I.; Stratakis, G.; Simoes, D.C.; Terzis, G.; Georgiadou, O.; Roussos, C.; Zakyntinos, S. Effects of rehabilitative exercise on peripheral muscle TNFalpha, IL-6, IGF-I and MyoD expression in patients with COPD. *Thorax*. Vol.62. p.950-956. 2007.
- 35-Walsh, N.P. Recommendations to maintain immune health in athletes. *European Journal Sport Science*. Vol.18. Num.6. p.820-831. 2018.
- 36-Williamson, D.L.; Kimball, S.R.; Jefferson, L.S. Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*. Vol.289. E95-E104. 2005.
- Projeto de Doutorado financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº. 04/07203-5.
- Comitê de Ética na Experimentação Animal (IB/UNICAMP): Protocolo número 638-1 ("Desenvolvimento de Tecnologia Desportiva

Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício

ISSN 1981-9900 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbpfex.com.br

Através de uma Ação Multidisciplinar”) sob responsabilidade da Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo.

2-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

E-mail dos autores:

ocatanho@gmail.com

lazaroalessandro@gmail.com

brenzikofer@fef.unicamp.br

denisevm@unicamp.br

Autor para correspondência:

Fernando Oliveira Catanho da Silva

Centro Universitário UniMetrocamp/Wyden

Rua Doutor Sales de Oliveira, 1661.

Vila Industrial, Campinas-SP, Brasil.

Recebido para publicação 14/05/2019

Aceito em 20/08/2019